



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mickael Rey

Le : 15 novembre 2012

Titre :

Implantation du microbiote et mise en place des fonctions du rumen chez le veau de race laitière et effet de la supplémentation en levures vivantes

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
UMR 1289 INRA-INP/ENSAT-ENVT 'TANDEM'

Directeur(s) de Thèse :

Valérie Monteils
Francis Enjalbert

Rapporteurs :

Evelyne Forano
Véronique Julliand

Membre(s) du jury:

Evelyne Forano
Véronique Julliand
Gérard Fonty
Valérie Monteils
Francis Enjalbert

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit de thèse vient clôturer une belle expérience scientifique et humaine qui a été réalisée au sein de l'UMR 1289 TANDEM (Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème, Métabolisme). Pour cela, je souhaiterais remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet.

Je tiens à remercier les personnes qui ont accepté de participer à mon jury de thèse : Evelyne Forano (Unité de Microbiologie, INRA, Clermont-Ferrand-Theix), Véronique Julliand (AgroSup Dijon, D2A2E, URANIE-USC INRA Nutrition du cheval athlète, Dijon), pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Mais aussi Gérard Fonty (Microorganismes : Génome et Environnement, CNRS, Aubière Cedex. France) pour avoir accepté de participer à ce jury et m'avoir fait l'honneur d'en être le président.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Francis Enjalbert et Valérie Monteils pour leurs encadrements et leurs qualités scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de structurer mon travail au cours de ces trois années. Merci aussi pour m'avoir donné la chance de participer à ce nouveau projet de recherche et de m'avoir fait confiance pour le mener à bien.

Je suis reconnaissant à la région Midi-Pyrénées et à l'INRA qui m'ont attribué une bourse pour réaliser ce projet. Je souhaite remercier la société Lesaffre Feed additives pour le financement de la 2^{ème} expérimentation sur les veaux.

Je tiens à remercier Monsieur Xavier Fernandez, Directeur de l'UMR TANDEM et Thierry Gidenne, animateur de l'équipe NED pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et permis de travailler dans leur laboratoire.

Je souhaite aussi remercier les membres du comité de pilotage pour le temps qu'ils m'ont consacré et les discussions intéressantes qui ont permis d'améliorer ce travail de thèse : Cécile Martin (URH-DIMA INRA de Clermont-Ferrand Theix), Jérôme Hamelin (UR LBE INRA de Narbonne), Sylvie Combes (UMR TANDEM), Gérard Fonty (Microorganismes : Génome et Environnement, CNRS, Aubière Cedex. France) et Jean-Philippe Marden (Lesaffre Feed Additives).

Ayant travaillé sur les 3 sites géographiques qui compose l'UMR TANDEM :

- Je souhaite remercier tout le personnel qui travaille sur le site de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse dont Annabelle Troegeler-Meynadier pour son aide scientifique et sa joie, Muhammad Kaleem et Yapo Magloire Yapi thésards dans la même galère et Asma

Zened pour sa joie de vivre, son oreille attentive et ses connaissances scientifiques sur de nombreux sujets.

-Je souhaite remercier tout le personnel qui travaille sur le site INRA de Toulouse (site d'Auzeville-Tolozane) dont particulièrement Carole Bannelier, Véronique Tartié et Muriel Ségura pour m'avoir aidé dans l'analyse de nombreux échantillons de ce travail. Je tiens à remercier sincèrement Béatrice Gabinaud (traitement des échantillons en qPCR et en 454), Laurent Cauquil (pour son gros travail de traitement des données du 454 et l'appui technique sur R) et Sylvie Combes avec qui j'ai travaillé sur les techniques de biologie moléculaire et qui m'ont apporté toutes les connaissances et les notions essentielles qu'ils avaient sur ces techniques, leurs joies, leurs soutiens et permis de travailler dans de bonnes conditions tout au long de ce travail. Ce fut un plaisir et un enrichissement de travailler avec vous tous. Je tiens aussi à remercier Valérie Lozano et Viviane Batailler pour leur aide administrative. Viviane a su m'apporter pendant toute la durée de la thèse sa bonne humeur, son oreille attentive et de bons conseils.

-Je souhaite remercier tout le personnel qui travaille sur le site de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse ou j'ai passé la majorité de mes 3 ans de thèse pour leurs aides et leurs bonnes humeurs. Que de bons moments en votre compagnie. Un grand merci à : Hélène Manse pour m'avoir transmis tous les conseils et aides essentielles pour l'analyse en laboratoire ; Nathalie Marty-Gasset pour sa joie de vivre, ses blagues toujours des plus recherchées et les grands moments de rires même derrière la blouse quand il fait très chaud ; Michel Bouilliet-Oudot pour ses visites dans le bureau et sa joie de vivre ; Stéphane Seidlinger pour son rire communicatif ; Alain Auvergne pour ses réflexions scientifiques et mais aussi ses nombreuses visites dans le bureau ; Zulma Vitezica pour sa bonne humeur et son accent tout aussi joyeux ; Caroline Molette qui est toujours là pour aider les autres, avec le sourire, les bons repas, les taquineries et Corine Bayourthe pour son aide scientifique et le temps passé à mes côtés pour m'aider dans mon travail, les repas toujours d'un régal digne d'un restaurant 3 étoiles et délicieux, ses rires et taquineries.

Un grand merci à tout le personnel du Domaine de Borret : (station expérimentale) Caroline Dufresne, Anaïs Segailat et plus particulièrement un très grand merci à Brigitte Santacruz qui m'ont aidé lors des expérimentations sur les veaux, pour la mise en place et la prise des échantillons souvent très contraignants.

Je remercie la plateforme génomique de l'INRA (Génopole Toulouse/Midi-Pyrénées, Castanet-Tolosan) pour leur connaissance dans l'analyse du pyroséquençage sur leur site.

Un grand merci à tous les stagiaires du bureau central comme Valérie Degand et Nina Munster (mes stagiaires) que j'ai torturé mais grâce à qui ce travail de thèse a pu avancer,

mais aussi tous les autres qui sont passés à un moment donné dans ce bureau comme Carole, Viviana, Marco, Madonna, Anaïs... et les thésard qui sont dans la même galère Sahar Awde et Yohanna François. Je remercie aussi Katia Julian avec qui j'ai partagé de très bons moments. Je remercie également tous les anciens doctorants qui sont passés par l'UMR 1289 TANDEM durant ces 3 années de thèse.

Enfin je souhaite remercier ceux grâce à qui cette thèse n'aurait pas pu se passer aussi bien, qui m'ont soutenu, épaulé pendant ces 3 années et ceux avec qui j'ai partagé les mauvais et surtout les meilleurs moments (Karaoké, repas, rigolade en tous genres) : Julien Arroyo, Christine Julien et particulièrement Corinne Pautot. Un très grand MERCI, je n'y serais jamais arrivé sans vous et vous serez toujours avec moi ou que je sois et je vous dois beaucoup.

Je remercie aussi ma famille, ma moitié et Marie-Laure ainsi que les autres amis qui me sont proches pour m'avoir supporté, épaulé... et avoir participé à ce travail pendant ces 3 années de thèse. Merci cela n'a pas été facile pour vous de me supporter.

En tous cas merci à tous pour ces 3 années qui m'ont permis d'apprendre beaucoup intellectuellement (scientifiquement ou pas) et émotionnellement. Je ne vous oublierai pas.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE

Publications dans des revues à comité de lecture de rang A

- Articles au cours de la thèse

Article 1: Rey M., Enjalbert F., and Monteils V. (2012). Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. **J. Dairy Sci.** **95** :1500–1512.

Article 2: Rey M., Enjalbert F., Combes S., Cauquil L., Bouchez O., and Monteils V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning using high throughput 454 GS FLX pyrosequencing (**en preparation, Applied and Environmental Microbiology**).

Article 3: Rey M., Enjalbert F., Combes S., Cauquil L., Bouchez O., and Monteils V. Establishment of protozoal and archaeal communities in the rumen of dairy calves from birth to weaning (**en preparation, Applied and Environmental Microbiology**).

Article 4: Rey M., Monteils V., Bayourthe C., Marden J-P.M. and Enjalbert F. Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves weaned at 60 days (**en preparation, Journal of Dairy Science**).

Article 5: Rey M., Enjalbert F., Combes S., Cauquil L., Bouchez O., Marden J-P.M. and Monteils V. Effect of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal microbiota (bacteria, archaea and protozoa) in dairy calves weaned at 60 days (**en preparation, Journal of Dairy Science**).

Communications en congrès scientifiques

Congrès Internationaux

1-Rey M., Enjalbert F., Cauquil L., Combes S. and Monteils V. (2011). **Evolution of bacterial diversity in the rumen in dairy calves from birth to weaning using a high throughput 454 GS FLX pyrosequencing.** In Advances in Animal Biosciences Volume 2 Part 2. Proceedings of the 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH8). September 2011, p. 252. Aberystwyth UK. (oral communication).

2- Rey M., Enjalbert F., Cauquil L., Bouchez O, Combes S. and Monteils V. (2012). **Establishment of archaea in the rumen of dairy calves from birth to weaning using 454 GS FLX pyrosequencing.** IIXth INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology. Clermont-Ferrand, France (Poster).

Journées scientifiques

3- Rey M., Enjalbert F. and Monteils V. (2010). **Evolution des paramètres physico-chimiques et fermentaires dans le rumen du veau de la naissance au sevrage.** *Journée scientifique de l'école doctorale SEVAB*, 7 octobre 2010, ENV de Toulouse, France. (Poster)

4- Rey M., Enjalbert F., Cauquil L., Combes S. et Monteils V. (2011). **Etude par pyroséquençage haut débit (454) de l'implantation des bactéries au niveau du rumen du veau laitier, de sa naissance au sevrage.** *Journée scientifique de l'école doctorale SEVAB*, 27 octobre 2011, ENSA de Toulouse, France. (Poster)

5- Rey M., Enjalbert F. and Monteils V. (2012). **Evolution des paramètres physico-chimiques et fermentaires dans le rumen du veau de la naissance au sevrage.** *Journée scientifique de l'Ecole Nationale Supérieure Agricole de Toulouse* , 23 Mars 2012, ENSA de Toulouse, France. (Communication orale)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ANTÉRIEURS AU TRAVAUX DE THÈSE

Monteils V., Rey M., Cauquil L., Troegler-Meynadier A., Silberberg M., Combes S. (2011). Random changes in heifer rumen in bacterial community structure, physico-chemical and fermentation parameters, and in vitro fiber degradation. **Livestock Science 141: 104-112.**

Monteils V., Rey M., Silberberg M., Cauquil L., and Combes S. Modification of activities of the ruminal ecosystem and its bacterial and protozoan composition during repeated dietary changes in cows. (accepté en aout 2012, **Journal of Animal Science**).

Monteils V., Rey M. and Gidenne T. (2009). **Mid to long term stability of ruminal physicochemistry in dairy cows fed a fibre- or a starch-based diet.** XIth International Symposium on Ruminant Physiology. September 2009. Clermont-Ferrand, France (Poster).

SOMMAIRE

Remerciements	3
Publications scientifiques et communications issues de la thèse.....	7
Sommaire.....	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des abréviations.....	17

INTRODUCTION GENERALE.....19

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....25

Chapitre 1-Anatomie et fonctions digestives des pré-estomacs des polygastriques.....27

I. Chez le ruminant adulte.....27

1. Anatomie.....27

2. Fonctions digestives.....28

a. Le métabolisme azoté.....28

b. Le métabolisme glucidique.....30

c. La méthanogénèse.....32

II. Chez le jeune ruminant.....33

1. Evolution anatomique.....33

2. Mise en place des fonctions.....35

Chapitre 2-L'écosystème ruminal.....39

I. Les paramètres physico-chimiques de l'environnement ruminal (pH et Eh).....39

1. Chez le ruminant adulte.....39

2. Chez le jeune ruminant.....40

II. Le microbiote ruminal.....40

1. Approche taxonomique.....41

a. Techniques de détermination du microbiote digestif.....41

i. Dénombrement et culture.....41

ii. Techniques moléculaires.....41

b.	Le microbiote digestif chez le ruminant adulte.....	47
i.	Les bactéries.....	47
ii.	Les archées.....	51
iii.	Les protozoaires.....	52
iv.	Les champignons.....	53
c.	Le microbiote digestif chez le jeune ruminant.....	53
2.	Relation entre la taxonomie et les fonctions métaboliques.....	57
Chapitre 3-Facteurs de variation du microbiote et de son activité.....		62
I. Chez le ruminant adulte.....		62
1.	Composition de la ration (ratio fourrages / concentrés).....	62
2.	Les additifs microbiens.....	65
a.	Les bactéries.....	65
b.	Les champignons.....	66
c.	Les levures.....	67
i.	Effet de la levure sur la production et la qualité laitière et sur la production de bovins de boucherie.....	67
ii.	Effet de la levure sur le fonctionnement ruminal.....	68
3.	Autres facteurs de variations qui influencent la composition du microbiote ruminal.....	71
II. Chez le jeune ruminant.....		73
1.	Effet de la ration.....	73
2.	Influence des probiotiques.....	74
3.	Autres facteurs de variations chez le jeune ruminant qui influencent la mise en place de l'écosystème ruminal.....	76
ETUDE EXPERIMENTALE.....		79
Chapitre 1-PRÉSENTATION GÉNÉRALE-OBJECTIFS.....		81
Chapitre 2-MATERIELS ET METHODES.....		83
I.	Animaux et plan expérimental.....	83
II.	Alimentation.....	85
III.	Mesures et échantillonnages.....	87

IV.	Analyses chimiques.....	91
V.	Détermination des activités enzymatique.....	91
VI.	Mesure et analyse <i>in vitro</i> de la production de méthane.....	93
VII.	Dénombrement des protozoaires.....	93
VIII.	Quantification des bactéries et des archées.....	94
	1. Extraction de l'ADN.....	94
	2. qPCR en temps réel.....	94
IX.	Caractérisation du microbiote par pyroséquençage 454.....	96
	1. Extraction de l'ADN.....	96
	2. Marquage de l'ADN cible par PCR	96
	3. Analyse des séquences.....	97

Chapitre 3- Etude expérimentale 1 : Etude de la mise en place des paramètres physico-chimiques et des paramètres fermentaire du rumen ainsi que l'implantation du microbiote ruminal chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage (à 83 jours).....101

Article 1 - Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning.....101

Article 2 - Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning using high throughput 454 GS FLX pyrosequencing.....129

Article 3 - Establishment of protozoal and archaeal communities in the rumen of dairy calves from birth to weaning.....157

Chapitre 4- Etude expérimentale 2 : Etude de l'effet de la supplémentation en levures vivantes (*Sacharomyces cerevisiae*) sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen ainsi que sur le microbiote ruminal chez les veaux de race laitière en période pré- et post-sevrage (sevrage à 60 jours).....181

Article 4 - Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves weaned at 60 days.....181

Article 5 - Effect of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal microbiota (bacteria, archaea and protozoa) in dairy calves weaned at 60 days.....209

DISCUSSION GÉNÉRALE.....	247
I. Implantation des microorganismes du rumen et acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau de la naissance au sevrage.....	249
1. Entre 1 et 10 jours	250
2. Entre 10 jours et le sevrage.....	252
3. Comparaison des données issues de l'essai 1 et de l'essai 2 avec les animaux témoins en période pré-sevrage.....	255
II. Maturation des microorganismes du rumen et des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période post-sevrage jusqu'à 4 mois d'âge (sevrage à 2 mois).....	259
1. De 60 à 90 jours.....	259
2. De 90 à 120 jours.....	260
III. Etude de l'influence de la supplémentation en levures vivantes les microorganismes du rumen et l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau de la naissance au sevrage et en période post-sevrage (4 mois d'âge).....	266
1. Effet de la supplémentation en levures vivantes en période pré-sevrage.....	266
2. Effet de la supplémentation en levures vivantes en période post-sevrage.....	272
IV. Apports et limites des méthodes analytiques utilisées lors de nos travaux.....	278
1. Les apports liés aux techniques de biologies moléculaires utilisées.....	278
2. Les limites observées lors de cette étude.....	278
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	281
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	289
ANNEXE.....	313
ABSTRACT.....	321
RÉSUMÉ.....	322

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Présentation de quelques avantages et inconvénients des principales techniques moléculaires d'étude des écosystèmes microbiens complexes.....	47
Tableau 2 : Principales espèces bactériennes hydrolytiques isolées du rumen classées par fonction majeure.....	58
Tableau 3 : Principales espèces bactériennes fermentatives isolées du rumen classées par fonction majeure.....	59
Tableau 4 : Principales espèces bactériennes hydrogénotrophes isolées du rumen.....	60
Tableau 5 : Distribution des genres dominants bactériens du rumen chez des vaches en fonction de la ration.....	63
Tableau 6 : Composition de la population bactérienne ruminale chez le jeune en fonction de l'alimentation.....	73
Tableau 7 : Quantité d'aliment d'allaitement distribuée aux animaux dans les essais 1 et 2.....	87
Tableau 8 : Résumé des éléments principaux des expérimentations et du découpage en articles.....	99
Tableau 9 : Comparaison des taxa majoritairement représentés dans le rumen chez le veau après sevrage (notre étude) et chez des bovins adultes (Li et al., 2011 ; Callaway et al., 2010 ; Zened,2011).....	262
Tableau 10 : Synthèse des taxa bactériens majoritaires et des taxa bactériens affectés par la supplémentation en levures en fonction de l'âge des veaux en période pré-sevrage	268
Tableau 11 : Synthèse des taxa bactériens majoritaires et des taxa bactériens affectés par la supplémentation en levures en fonction de l'âge des veaux en période post-sevrage	273

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie des réservoirs prégastriques et gastrique des ruminants.....	27
Figure 2 : Epithélium du réticulo-rumen.....	28
Figure 3 : Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière.....	30
Figure 4 : Les différentes voies du métabolisme des glucides dans le rumen.....	31
Figure 5 : Développement des différents compartiments du réticulo-rumen et de la caillette du ruminant de la naissance à sa maturité.....	34
Figure 6 : Développement du rumen avec l'âge chez le veau (apparence extérieure et épithélium intérieur). A : à 4 semaines d'âge chez un veau recevant du lait uniquement. B : à 8 semaines d'âge chez un veau recevant du lait et un aliment granulé. C : à 12 semaines d'âge chez un veau recevant du lait, du foin et un aliment granulé.....	35
Figure 7a : Dénombrement des bactéries ruminales cellulolytiques et des archées méthanogènes (unités formant des colonies / g de poids humide de contenu ruminal) chez des veaux sevrés précocement (4 semaines) ou tardivement (6 semaines).....	37
Figure 7b : Dénombrement des bactéries ruminales amylolytiques, utilisatrices de lactate et protéolytiques (unités formant des colonies / g de poids humide de contenu ruminal) chez des veaux sevrés précocement (4 semaines) ou tardivement (6 semaines).....	38
Figure 8 A et B : Principe de la qPCR par SYBR Green (A) et par Taqman (B). Les phases de la PCR quantitative sont : 1) Phase de dénaturation de l'ADN cible et mise en présence des séquences à amplifier avec le SYBR GREEN ou la sonde TaqMAN en fonction de la technique, les dNTP et la polymérase, 2) Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces, 3) Phase d'élongation. Ce cycle est répété plusieurs fois.....	43
Figure 9 : Préparation de l'échantillon d'ADN et pyroséquençage.....	44
Figure 10 : Pyroséquençage 454, étapes 2 à 3 et 5.....	45
Figure 11 : Représentation des principaux taxons microbiens observés dans les systèmes digestifs.....	50

Figure 12 : Implantation des communautés microbiennes dans le rumen chez l'agneau.....	54
Figure 13 : Distribution relative (%) des 6 phyla majoritaires dans le microbiote ruminal des veaux pré-ruminants nourris au lait de remplacement (n = 3) à 14 et 42 jours après la naissance, et à 12 mois d'âge (taurillons nourris avec un régime à base de foin, n = 4).....	56
Figure 14 : Image de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : (a) en microscopie électronique et (b) sur milieu gélosé.....	67
Figure 15 : Mode d'action présumé de <i>S. cerevisiae</i> sur les performances de l'animal.....	71
Figure 16 : planning de l'entrée des veaux en essai.....	84
Figure 17 : Planning de l'essai 2, avec 6 veaux témoins et 6 veaux dans le lot levures.....	85
Figure 18 : Récapitulatif de la répartition et du traitement des prélèvements de contenu ruminal dans les essais 1 et 2.....	90
Figure 19 : Synthèse des résultats sur l'implantation des microorganismes du rumen et de l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau de la naissance au sevrage	258
Figure 20 : Synthèse des résultats sur l'implantation des microorganismes du rumen et de l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période post-sevrage (sevrage à 60 jours)	265
Figure 21 : Synthèse de l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur la maturation des microorganismes du rumen et des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période pré-sevrage (sevrage à 60 jours).....	271
Figure 22 : Synthèse de l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur l'implantation des microorganismes du rumen et l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période post-sevrage (sevrage à 60 jours).....	277

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Adenosine
ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFLP	Amplified Fragment-Lengh Polymorphism
AGV	Acides Gras Volatils
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARN/RNA	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
C	Cytosine
CE-SSCP	Capillary Electrophoresis- Single Strand Conformation Polymorphism
CFU	Colony-Formit Unit
C group	Veaux du lot contrôle
CH ₄	Méthane
CO ₂	DiOxyde de Carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
C2	Acide acétique/acétate
C3	Acide propionique/propionate
C4	Acide butyrique/butyrate
C5	Acide valérique/valérate
DGGE	Électrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant
ddNTP	Dideoxy Nucleoside TriPhosphates
E _h	Potentiel redox
FISH	Fluorescent in Situ hybridation
G	Guanine
H ₂	DiHydrogène

MG	Matière grasse
MS/DM	Matière Sèche/Dry Matter
NH3	Ammoniac
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SC group	Veaux du lot levure
T	Thymine
TB	Taux butyreux
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
TP	Taux protéique
t-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TTGE	Temporal Temperature Gel Electrophoresis

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

En exploitation de bovins laitiers en France, une vache réalise environ trois lactations au cours de sa carrière. De ce fait, l'élevage des génisses pour un renouvellement interne du troupeau de vaches laitières est nécessaire et est estimé à environ 35% par an. Cet élevage représente donc un enjeu et un coût importants pour l'éleveur. En effet, l'alimentation du jeune veau est très coûteuse surtout sur la période de pré-sevrage en raison du prix de l'aliment d'allaitement. Durant cette période, les veaux pré-ruminants sont séparés des mères à la naissance et le plan d'alimentation habituel est constitué de colostrum (frais ou congelé) pendant les 2 à 3 premiers jours de vie, remplacée ensuite par du lait maternel ou un aliment d'allaitement avec un apport progressif d'aliments solides (concentré et fourrage). La période de pré-sevrage dure environ 9 à 10 semaines. Cette période représente ainsi un enjeu en termes de pérennité de la production de l'élevage, mais aussi de coût du renouvellement du troupeau. Il est donc nécessaire de bien la maîtriser pour permettre la pérennité de la production. Un levier possible et important de l'élevage des jeunes ruminants se situe dans la conduite alimentaire, et ce dès le plus jeune âge. En effet chez les ruminants, le rumen (premier compartiment du tractus digestif) constitue un compartiment primordial pour la digestion des aliments de par sa fonction de dégradation des aliments, notamment par une activité de fermentation importante réalisée par les micro-organismes qu'il héberge. Lors de la phase d'élevage, la période de la naissance au sevrage pourrait être décisive pour le fonctionnement futur du rumen et le développement du veau. En effet durant cette période, le jeune bovin est en phase de transition du pré-ruminant qu'il est à la naissance, vers le ruminant qu'il devient après sevrage. Cette transition nécessite la mise en place d'un écosystème ruminal fonctionnel.

Chez l'adulte, le rumen contient un écosystème complexe et dense principalement constitué par des bactéries, des archées, des protozoaires et des champignons ou encore des virus. Cet écosystème ruminal possède un large spectre enzymatique lui permettant de digérer et valoriser les rations alimentaires ingérées par l'animal par des voies d'hydrolyses et de fermentations. Cette activité du microbiote ruminal produit de l'ammoniac réutilisé pour des synthèses microbiennes de protéines, et des acides gras volatils (AGV) qui seront utilisés par l'animal hôte. Chez le veau nouveau-né, une partie du tractus digestif, surtout la partie proximale, est anatomiquement et physiologiquement non mature (Tamate et al., 1962). Le rumen est donc non fonctionnel à la naissance, il se développe fortement (augmentation de son volume, mise en place de l'épithélium ruminal, fermentations microbiennes) au cours du premier mois de vie de l'animal.

Chez le bovin adulte, de nombreuses études ont abordé l'effet de différents types de rations alimentaires et de probiotiques sur les fermentations ruminales et le microbiote ruminal, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité digestive, les performances zootechniques et la rentabilité économique des élevages. Les études du fonctionnement ruminal, et notamment de la mise en place de l'écosystème chez les jeunes, sont beaucoup moins nombreuses dans la littérature scientifique. Des études ont montré que le développement du rumen est fortement lié à l'alimentation du jeune animal (par exemple les fibres engendrent l'augmentation du volume ruminal ; Zitnan et al., 1998) et aux produits de fermentations (les AGV stimulent le développement des papilles de l'épithélium ruminal ; Tamate et al., 1962 ; Suarez et al., 2006). La dégradation des premiers aliments (liquides ou solides) arrivant dans le rumen est réalisée par les fermentations microbiennes qui se mettent en place. Parmi les travaux recensés dans la littérature, la plupart concernent l'agneau. Ainsi, il a été observé chez le jeune pré-ruminant et en particulier chez l'agneau, une colonisation du rumen par des microorganismes quelques heures après la naissance et donc bien avant le sevrage (Bryant et al., 1960 ; Fonty et al., 1987). Ces études, assez anciennes et réalisées via des techniques culturales, permettent d'apporter des éléments pour la compréhension de la mise en place de l'écosystème digestif chez le jeune concernant les implantations successives des différentes communautés et les interactions entre microorganismes par exemple. Néanmoins ces travaux sont directement liés aux connaissances existantes sur les conditions de cultures des différentes communautés microbiennes et ne permettent pas d'avoir une vision globale et sans *a priori* sur l'implantation du microbiote ruminal chez le jeune ruminant, alors qu'une telle approche est possible avec l'aide des nouvelles techniques de biologie moléculaire. Les quelques études réalisées chez le veau portent essentiellement sur les réponses des performances zootechnique des veaux à des facteurs de variation (du caillé contenant des bactéries lactiques et *Saccharomyces cerevisiae* : Agarwal et al., 2002 ; *Saccharomyces cerevisiae* : Lesmeister et al., 2004 ; *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii* : Pinos-Rodriguez et al., 2008 ; sevrage abrupte et sevrage graduel : Roth et al., 2009 ; Sweeney et al., 2010) et très peu concernent la colonisation du rumen lors des premiers jours de la vie de l'animal. Un manque flagrant d'information concernant la colonisation du rumen du veau apparaît donc, et plus spécifiquement sur les séquences temporelles de la colonisation et les facteurs de variation associés. La place des probiotiques (bactéries, levures...) en élevage bovin est fortement développée et très étudiée, surtout chez les ruminants sevrés. Ces études montrent que les probiotiques améliorent l'efficacité digestive des rations avec une action directe au niveau du microbiote ruminal. Au vu des données observées chez des

animaux adultes, on peut penser que leur utilisation, chez le jeune ruminant, pourrait jouer un rôle dans l'implantation du microbiote ruminal et améliorer l'efficacité digestive et ainsi accélérer la mise en place d'un écosystème plus efficace face aux aliments solides et ainsi conduire à une diminution de la durée de phase d'allaitement

Le fonctionnement de l'écosystème ruminal a un rôle majeur dans l'utilisation digestive de la ration mais aussi sur la santé digestive des ruminants. Pour cela, une meilleure connaissance de la colonisation du tractus digestif pourrait conduire à une meilleure efficacité alimentaire, éviter les troubles d'origines nutritionnels et ainsi réduire les coûts de production en diminuant les frais vétérinaires d'une part, et en augmentant les performances des animaux d'autre part. L'ensemble de ces améliorations conduirait à une meilleure compétitivité des élevages de ruminants.

Par conséquent, l'objectif premier du travail présenté était de déterminer les séquences temporelles de la mise en place du microbiote ruminal (bactéries, archées et protozoaires) et des principales fonctions du rumen par la caractérisation des paramètres physicochimiques (pH/Eh), des paramètres fermentaires (AGV et ammoniac) et des activités enzymatiques (fibrolytique, amylolytique, uréolytique et protéolytique) à partir de la naissance. Un deuxième objectif a été d'envisager, les effets de l'addition de probiotiques sur les paramètres décrits précédemment.

Pour répondre aux objectifs de ce travail, deux expérimentations ont été réalisées. La première expérimentation a eu pour but de caractériser l'implantation séquentielle des microorganismes (bactéries, archées et protozoaires) dans le rumen chez des veaux de race laitière de la naissance au sevrage (avec un focus sur les 10 premiers jours de vie) et l'évolution des paramètres fermentaires. La deuxième expérimentation a visé à étudier l'effet d'un apport de levures vivantes comme potentiel facteur de variation dans la mise en place de l'écosystème ruminal, et à préciser les variations du microbiote et des activités fermentaires lors du sevrage chez des jeunes veaux de race laitière.

En amont de la partie expérimentale de cette thèse, une synthèse bibliographique présente les connaissances relatives aux particularités du système digestif et de l'écosystème ruminal chez le ruminant adulte et le jeune pré-ruminant. Cette synthèse vise également à aborder l'évolution des techniques utilisées pour caractériser le microbiote ruminal ainsi que l'intérêt de l'utilisation de probiotiques chez les ruminants. Cette partie non exhaustive permettra de comparer la maturation de l'écosystème ruminal chez le jeune veau avec l'état

de l'art de l'écosystème ruminal chez le ruminant adulte. Ensuite la partie expérimentale présente de façon détaillée les objectifs de la thèse, et les matériels et méthodes utilisés dans ce travail ainsi que les résultats obtenus lors des 2 essais expérimentaux présentés sous forme d'articles scientifiques. La troisième partie est consacrée à la discussion générale autour de l'ensemble des résultats et la réflexion sur des perspectives nouvelles.

ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 - Anatomie et fonctions digestives des pré-estomacs des polygastriques

I. Chez le ruminant adulte

1. Anatomie

Les ruminants polygastriques (bovins, ovins et caprins pour les espèces d'élevage) ont la particularité de posséder un système digestif antérieur à l'estomac vrai (appelé caillette ou abomasum) très développé. Ce système digestif est très complexe et composé de plusieurs compartiments, appelés pré-estomacs qui sont le réticulum (réseau), le rumen (panse) et le feuillet (omasum) (figure 1).

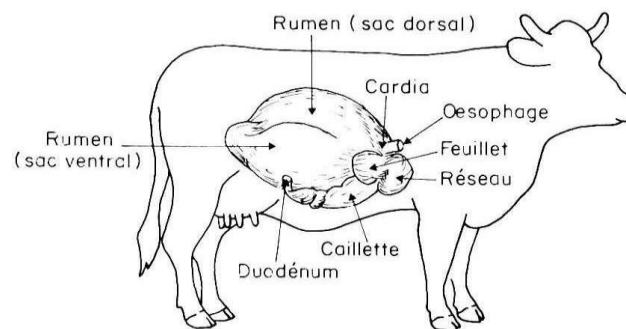


Figure 1 : Anatomie des réservoirs pré-gastriques et gastrique des ruminants (Thivend et al., 1985).

Parmi ces compartiments, le rumen est le plus volumineux : son volume varie entre 120 et 200 litres chez un bovin adulte, celui du réseau entre 7 et 12 litres, celui de l'omasum entre 9 et 16 litres et celui de l'abomasum entre 12 et 20 litres (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Le rumen est divisé en 2 parties : le sac ventral contenant une partie solide avec de grosses particules alimentaires (des fibres par exemple) surmontée par une phase liquide contenant de petites particules alimentaires et le sac dorsal rempli par les gaz issus des fermentations microbiennes.

L'ensemble réseau-rumen (pour simplifier, le terme rumen sera employé par la suite) est le siège d'un véritable écosystème où une grande part des aliments ingérés par l'animal est valorisée. Les aliments qui sont ingérés, après une mastication rapide dans la bouche, rejoignent directement le rumen. Le bol alimentaire subit alors des dégradations mécaniques (mastication au cours de la rumination) et enzymatiques (*via* les microorganismes du rumen), avant d'arriver dans l'omasum. Cette dégradation permet de fournir l'énergie et les métabolites nécessaires aux ruminants (pour leur entretien, la croissance, la production laitière...) mais aussi aux microorganismes du système digestif.

L'énergie et les métabolites comme les AGV produits par la dégradation microbienne de la ration ingérée par le ruminant sont soit réutilisés par les bactéries pour leur croissance ou alors, par diffusion, traversent la paroi ruminale. Les papilles qui composent la muqueuse du rumen sont hautes et nombreuses, surtout au niveau de la phase liquide (figure 2A). Au niveau du réticulum, l'épithélium est garni d'arrêtes en forme d'hexagones (figure 2B). Les papilles du rumen et les arrêtes du réticulum permettent d'augmenter la surface d'échange entre l'intérieur du rumen et l'hôte.

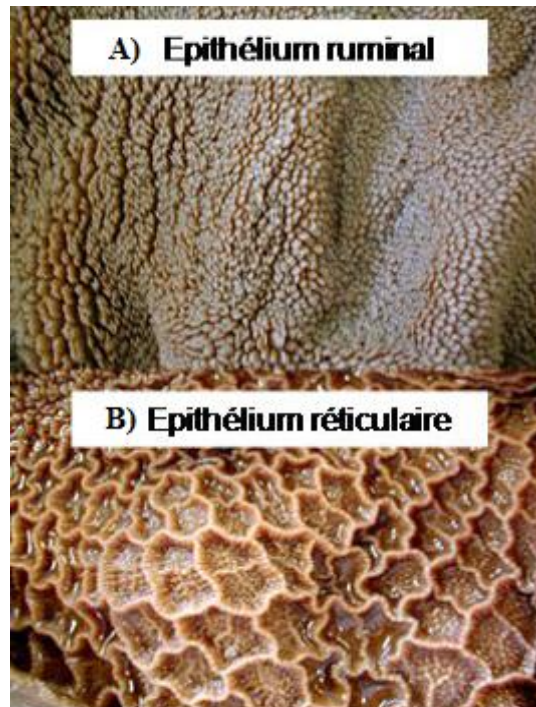


Figure 2 : Epithélium du réticulo-rumen (d'après Rory Michelland, thèse 2009)

2. Fonctions digestives

Le microbiote ruminal est complexe et varié. Cet écosystème possède l'équipement enzymatique nécessaire pour dégrader les substrats de la ration qui arrivent dans le rumen. Cette dégradation dans le rumen par les microorganismes est conditionnée par l'adhésion des microorganismes aux particules, l'accessibilité aux substrats et par les activités enzymatiques réalisées (Cheng et al., 1991).

a. Le métabolisme azoté

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires. Les bactéries ruminales ont une forte

activité protéolytique par rapport aux protozoaires car cette activité est présente au niveau de leur paroi cellulaire à l'inverse des protozoaires dont l'activité protéolytique est intracellulaire (Nugent et Mangan, 1981 ; Coleman, 1983). Les champignons anaérobies ont une très faible activité protéolytique (Wallace et Joblin, 1985 ; Bonnemoy et al., 1993).

La première étape du métabolisme azoté dans le rumen est la protéolyse (Figure 3). Les enzymes bactériennes agissent directement sur les protéines solubles pour produire des peptides et des acides aminés, alors que les protozoaires ingèrent les résidus protéiques (acides aminés) et les bactéries elles-mêmes (Coleman, 1975 ; Nugent et Mangan, 1981 ; Ushida et al., 1986). Ces acides aminés présents dans le rumen sont désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac (NH_3) et des squelettes carbonés dont des AGV ramifiés en particulier isobutyrate et isovalérate (Mackie et White, 1990 ; Hino et Russel, 1985 ; Jouany, 1994). L'activité uréolytique de certaines bactéries participe aussi à la production d'ammoniac, à partir d'urée alimentaire ou endogène.

La deuxième étape est une synthèse protéique par les microorganismes, réutilisant en partie les produits de dégradation (peptides, acides aminés et ammoniac). Ces protéines microbiennes sont ensuite digérées dans l'intestin grêle.

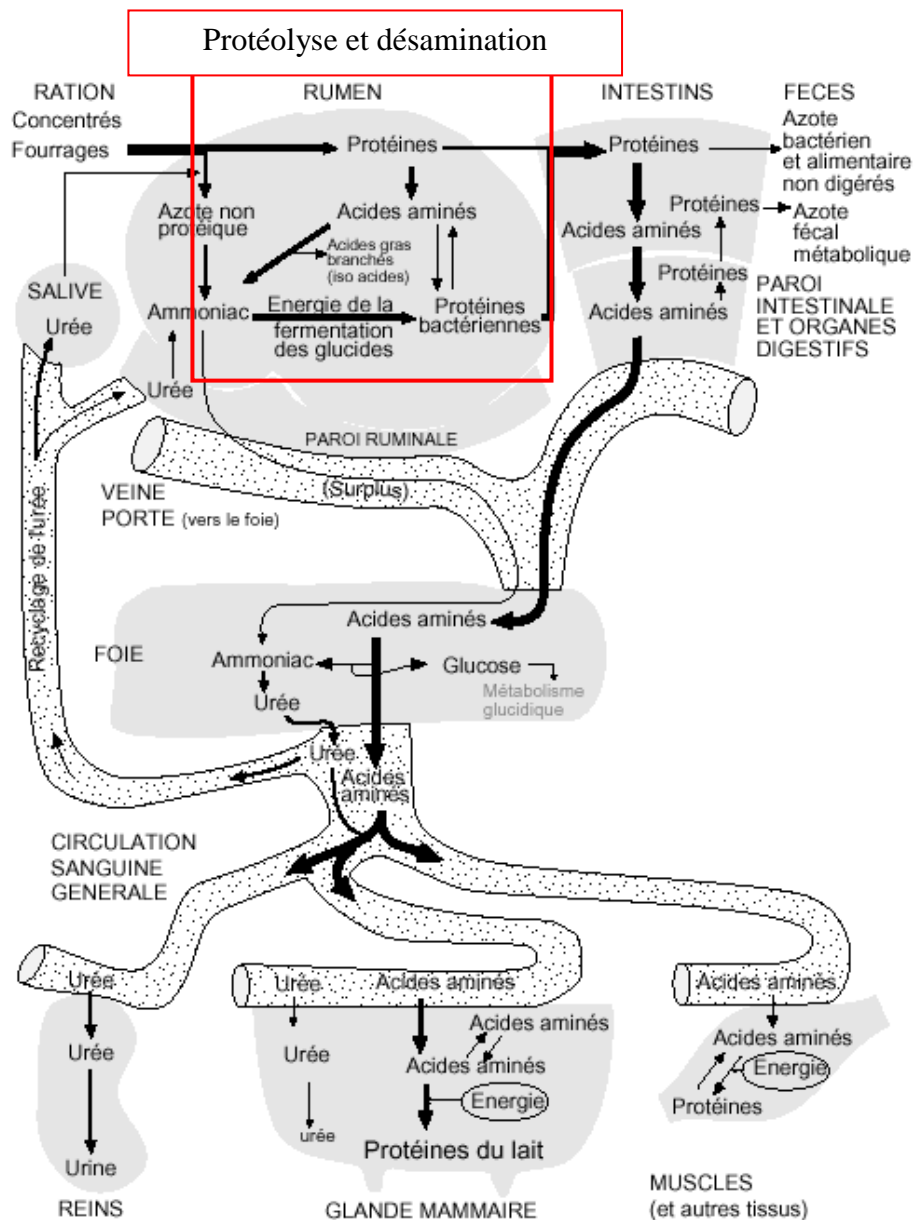


Figure 3 : Vue générale du métabolisme protéique chez la vache laitière (Site internet N° 1).

b. Le métabolisme glucidique

Le microbiote ruminal possède un large panel d'activités enzymatiques pour hydrolyser les constituants glucidiques fibreux (cellulose, hémicelluloses, pectines) et l'amidon de la ration. L'hydrolyse produit dans un premier temps des oses simples, qui sont ensuite fermentés pour donner les composants utilisables par le métabolisme de l'animal, principalement les AGV (figure 4).

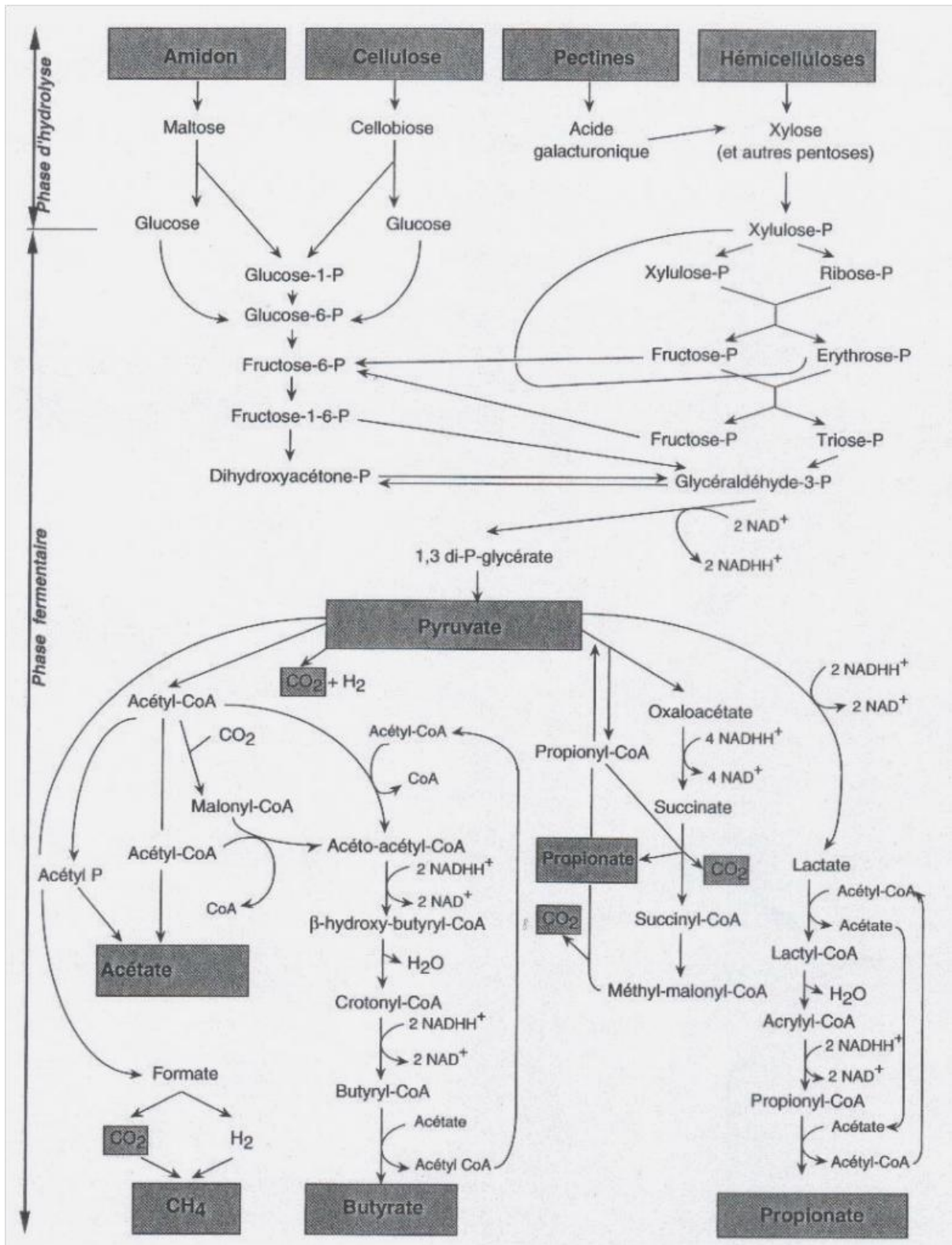


Figure 4 : Les différentes voies du métabolisme des glucides dans le rumen (Jouany, 1995).

Les enzymes qui hydrolysent les hémicelluloses sont des endoxylanases, des exoxylanases et des bêta-xylosidases qui vont permettre la formation de xylose et autres pentoses (Figure 4). Les enzymes responsables de l'hydrolyse de la cellulose pour former du glucose sont des cellulases (endoglucanases, exoglucanases et bêta-glucosidases ; Forano et al., 1996). Les pectines sont hydrolysées par des enzymes extracellulaires comme l'exopectate lyase (Duskova et Marounek, 2001). Les amidons rapides sont partiellement dégradés dans le rumen par les amylases salivaires et extrabactériennes (Jouany et al., 1995). Les amidons lents sont dégradés au niveau de l'intestin.

Les oses simples produits sont ensuite fermentés en AGV (figure 4). Pour cela, deux étapes sont utilisées :

- la première permet de fermenter les oses simples pour former l'acide pyruvique par les voies de la glycolyse (transformation du glucose pour produire du pyruvate et de l'ATP) et les voies des pentoses phosphates (transformation des xyloses phosphates en pyruvate) ;

- la deuxième permet de fermenter le pyruvate pour former des AGV par les voies acétate, butyrate et/ou propionate (Andersen et al., 1999). L'équilibre entre ces différentes voies dépend des substrats disponibles et donc des rations alimentaires ingérées par l'animal hôte.

Les AGV produits sont majoritairement absorbés par la muqueuse ruminale, puis utilisés par l'animal hôte pour ses besoins d'entretien, mais sont aussi utilisés pour la croissance du microbiote du rumen. De plus ces AGV participent à la prolifération des cellules de l'épithélium ruminal (Sakata et Tamate, 1979).

Ces voies fermentaires produisent également du CO₂ et du H₂ qui ne s'accumulent pas dans le rumen car ces produits sont très rapidement utilisés par les microorganismes hydrogénotrophes. Ces microorganismes sont les bactéries sulfato-réductrices, les bactéries acétogènes et surtout les archées méthanogènes.

c. La méthanogénèse

Les nombreuses fermentations ruminales conduisent à la formation de gaz (comme CO₂, N₂, H₂, H₂S ; figure 4) qui sont principalement éliminés par éructation. Une partie de ces gaz se dissout dans le liquide ruminal. Les archées du rumen vont alors pouvoir utiliser

comme substrats les formes dissoutes de l'acétate, du méthanol, de l'hydrogène/CO₂, du formate et des méthylamines pour produire du méthane (CH₄; Demeyer et Fievez, 2000). Les voies métaboliques de la méthanogenèse utilisées par les archées du rumen sont au nombre de trois : la voie hydrogénotrophe (*via* le CO₂/H₂), la voie méthylotrophe (*via* le méthanol et ses dérivés) et la voie acétoclaste (*via* l'acétate et ses dérivés) (Pelmont, 2005 ; Liu et Whitman, 2008 ; Popova et al., 2011). Dans le rumen, il est considéré que la voie hydrogénotrophe est la voie principale.

II. Chez le jeune ruminant

1. Evolution anatomique

Le lait maternel ou distribué au veau à partir de la naissance court-circuite les pré-estomacs grâce à la gouttière œsophagienne (Wise et Anderson 1939). La fermeture de la gouttière œsophagienne est contrôlée par l'arrivée des liquides (dont le lait) et empêche l'entrée dans le rumen par contraction des 2 lèvres qui la composent (Oskov et al., 1970 ; Guilhermet et al., 1975).

La position de la tête du veau au moment de la buvée au seau contribue au passage de lait dans le rumen. En effet, à partir de 20 jours d'âge, Wise et Anderson (1939) ont montré que la gouttière œsophagienne laisse entrer dans le rumen 40% du lait et 95% de l'eau ingérés quand le veau est alimenté uniquement avec ces 2 liquides et au seau. A l'inverse la tétée ou la consommation de lait via une tétine engendrent le maintien de la tête dans une position élevée et l'absence de passage de lait dans le rumen (Wise et Anderson, 1939).

Chez le jeune pré-ruminant, le rumen étant non fonctionnel et anatomiquement et physiologiquement non mature (Tamate et al., 1962), son volume est petit : 20% du volume total de l'appareil digestif face à 60% pour la caillette (Tamate et al., 1962, figure 5). Dès 2 mois après la naissance, le rumen représente 50% du volume digestif contre 10% pour la caillette (Stobo et al., 1966). Au-delà de 4 mois d'âge, le rumen représente 80% du volume digestif, comme chez l'adulte, contre 8% pour la caillette (figure 5). Le volume du rumen dépend fortement de la quantité de fourrages que l'animal ingère, par exemple le foin ou la paille (Beharka et al., 1998 ; Suarez et al., 2006 ; Tamate et al., 1962 ; Harrison et al., 1960).

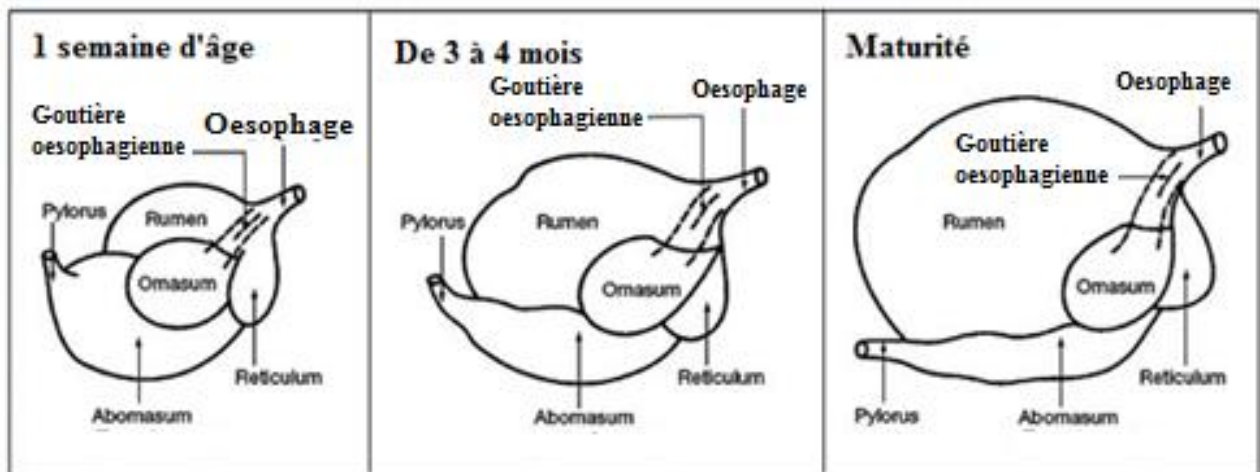


Figure 5 : Développement des différents compartiments du réticulo-rumen et de la caillette du ruminant de la naissance à sa maturité. (Site Internet N°2)

A la naissance du jeune ruminant, l'épithélium de la paroi ruminale est presque lisse. Une surface d'échange peu importante apparaît alors suffisante pour l'absorption des nutriments. Lorsque l'ingestion d'aliments solides commence, le microbiote du rumen les fermente et produit des AGV. Ces derniers stimulent le développement des papilles de la paroi (Suarez et al., 2006 ; Tamate et al., 1962 ; Harrison et al., 1960 ; figure 6). La mise en place des papilles conduit à une augmentation de la surface d'échange entre l'intérieur et l'extérieur du rumen, ce qui permet une absorption plus importante.

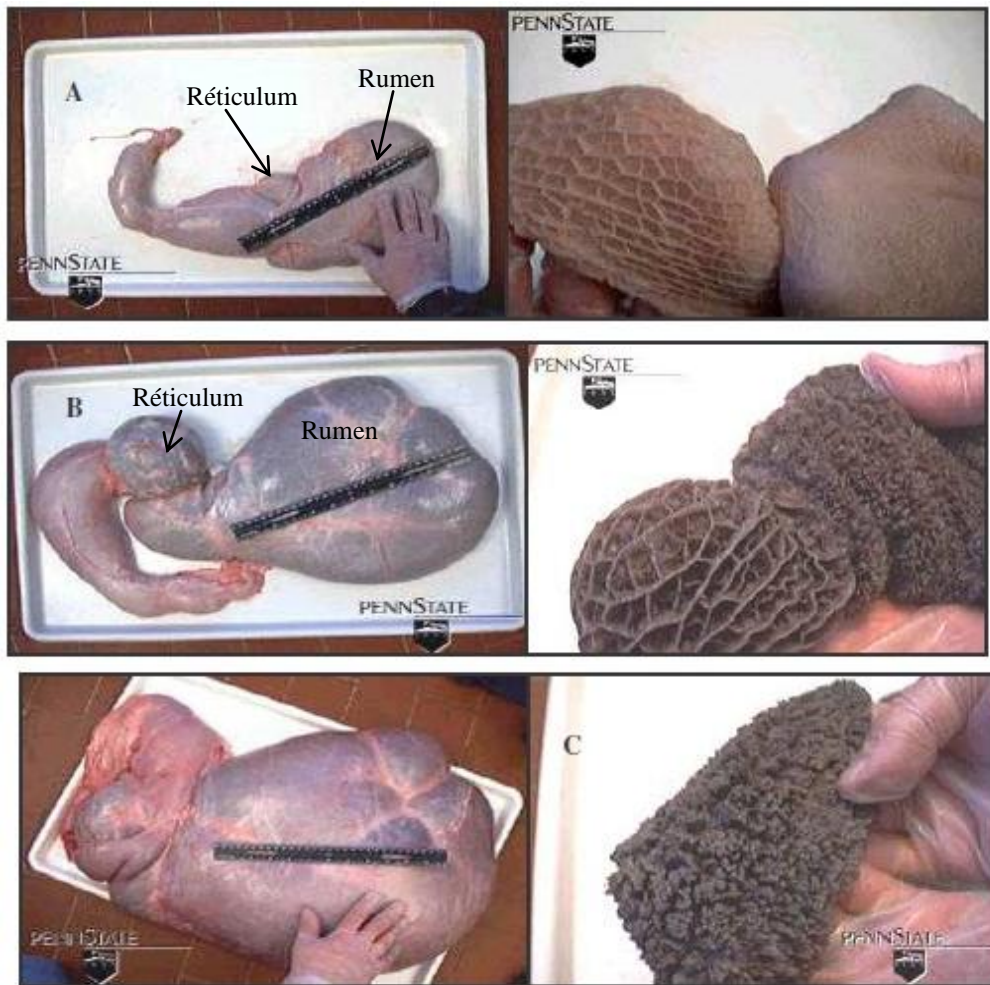


Figure 6 : Développement du rumen avec l'âge chez le veau (apparence extérieure et épithélium intérieur). A : à 4 semaines d'âge chez un veau recevant du lait uniquement. B : à 8 semaines d'âge chez un veau recevant du lait et un aliment granulé. C : à 12 semaines d'âge chez un veau recevant du lait, du foin et un aliment granulé. (Suarèz, 2006).

2. Mise en place des fonctions

Le rumen n'étant pas fonctionnel les premiers jours après la naissance, le lait ingéré est dans un premier temps digéré par la caillette. La chymosine ou présure entraîne la coagulation du lait, qui permet de conserver la caséine et les graisses dans la caillette, et donc entraîne une arrivée progressive des nutriments dans l'intestin grêle (Cruywagen et al., 1990; Guilloteau et al., 1983; Guilloteau et al., 1984). La chymosine est présente en concentrations élevées chez les nouveau-nés et diminue avec l'âge et au moment du sevrage (Cybulski et Andren, 1990; Guilloteau et al., 1985). Pendant le séjour du coagulum dans la caillette, la pepsine, endopeptidase gastrique, digère partiellement les protéines du lait (Logenbach et

Heinrichs, 1998). La capacité des nouveau-nés à digérer et à utiliser des laits à concentrations élevées en matière grasse est due à une combinaison d'enzymes appelée estérase prégastrique (Huber et al., 1961), sécrétée par les tissus buccaux des mammifères (Nelson et al., 1960), et qui diffère chez le jeune animal entre les espèces (Guilloteau et al., 2009). Quand le lait caille dans la caillette, l'estérase prégastrique commence la dégradation des lipides (environ 20% des liaisons des glycérols - acide gras du lait) dans le caillot de caséine (Bondi, 1987 ; Hill et al., 1970 ; Pitas et Jensen, 1970). La suite de la digestion se déroule dans l'intestin du jeune (Kehoe et Heinrichs, 2006). En l'absence de digestion prégastrique, les premiers jours de sa vie, le pré-ruminant est considéré comme un monogastrique fonctionnel.

Les principales activités enzymatiques (fibrolytique, amylolytique, protéolytique, et uréolytique) du microbiote ruminal ont été observées dans le rumen dès les premiers jours, entre 4 et 10 jours après la naissance (Sahoo et al., 2005 ; Kmet et al., 1986b). Les produits fermentaires ruminiaux, chez le jeune sont observés dès les premiers jours de vie (veau, agneau). La concentration en AGV augmente rapidement jusqu'à 1 mois après la naissance alors que la concentration en ammoniac est faible les premiers jours après la naissance puis augmente rapidement jusqu'à 15 jours de vie pour ensuite diminuer et se stabiliser à 1 mois d'âge (Anderson et al., 1987 ; Beharka et al., 1991 ; Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002 ; Lesmeister et Heinrichs, 2004).

L'évolution des bactéries responsables des activités enzymatiques principales sont présentées dans la figure 7a et 7b. Les bactéries cellulolytiques sont présentes à partir de 2 ou 4 jours (agneaux et veaux, respectivement) après la naissance, leurs densités restent faibles les trois premières semaines de vie et augmentent fortement jusqu'à 10 semaines de vie pour se stabiliser (Anderson et al., 1987 ; Beharka et al., 1991 ; Bryant et al., 1958 ; Fonty et al., 1987). Les bactéries amylolytiques sont observées dès 4 jours et leur densité reste stable avec l'âge. Les bactéries utilisatrices de lactate apparaissent dans le rumen dès la première semaine de vie, augmentent jusqu'à 2 semaines et se stabilisent. Les bactéries protéolytiques apparaissent dès la première semaine avec une forte densité qui reste stable les trois premières semaines de vie du jeune, puis elles augmentent jusqu'à 1 mois et se stabilisent. La population des archées méthanogènes est faible les 3 premières semaines de la vie du jeune, augmente ensuite fortement jusqu'à 12 semaines d'âge et se stabilise (Anderson et al., 1987 ; Beharka et al., 1991 ; Bryant et al., 1958 ; Fonty et al., 1987).

Ainsi, chez les pré-ruminants, les études réalisées à ce jour montrent la mise en place de micro-organismes aux fonctions connues mais il existe un manque flagrant de connaissance sur la mise en place des fonctions du rumen c'est-à-dire l'activité enzymatique ruminale dès la naissance chez le jeune ruminant.

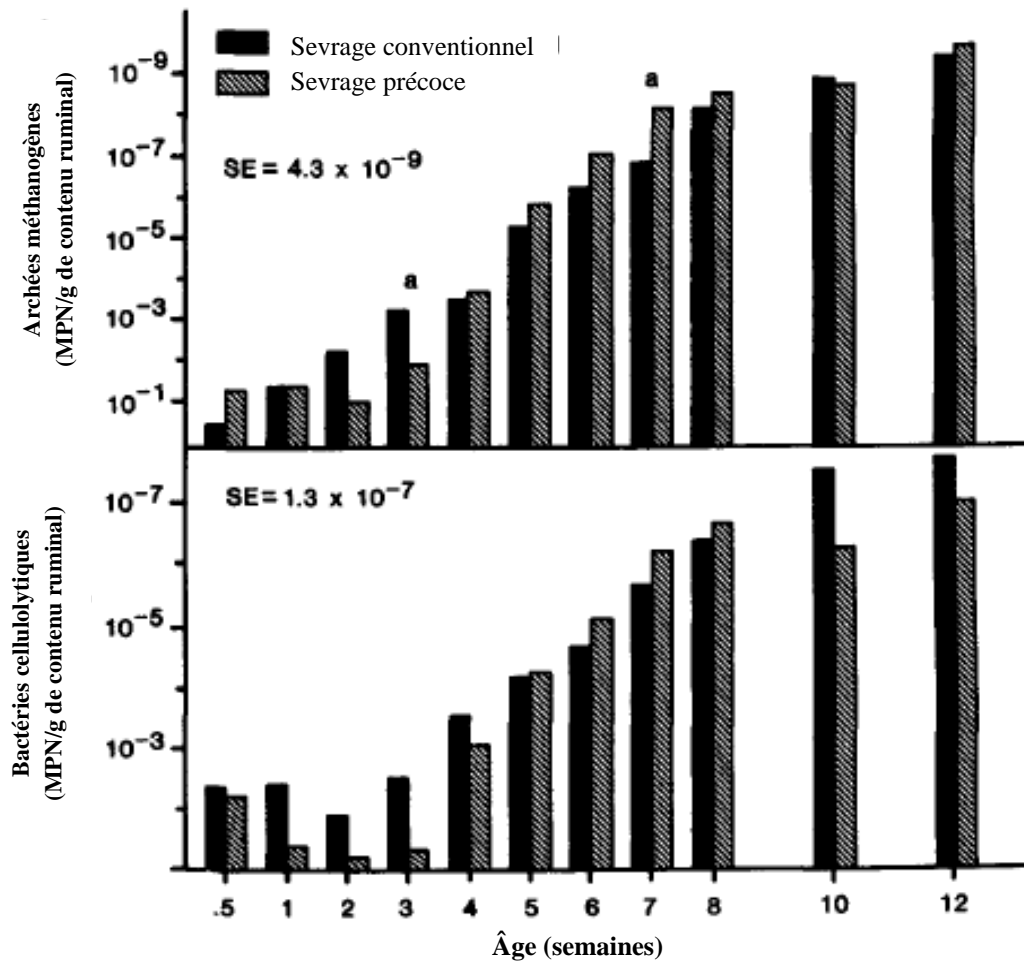


Figure 7a : Dénombrement des bactéries ruminales cellulolytiques et des archées méthanogènes (unités formant des colonies / g de poids humide de contenu ruminal) chez des veaux sevrés précocement (4 semaines) ou tardivement (6 semaines (Anderson et al., 1987)).

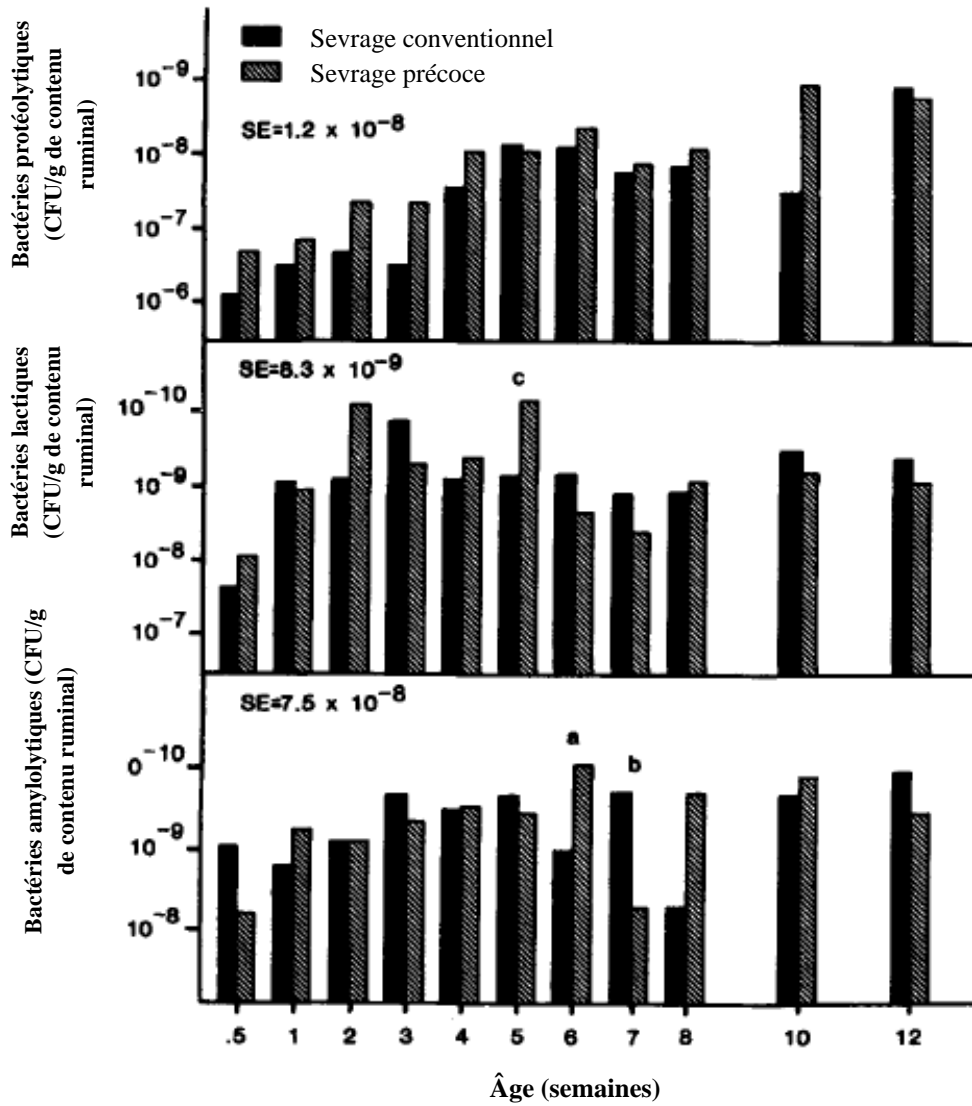


Figure 7b : Dénombrement des bactéries ruminales amylolytiques, utilisatrices de lactate et protéolytiques (unités formant des colonies / g de poids humide de contenu ruminal) chez des veaux sevrés précocement (4 semaines) ou tardivement (6 semaines (Anderson et al., 1987)).

Chapitre 2 - L'écosystème ruminal

L'écosystème ruminal est composé par un microbiote complexe (faune et flore) et dense et un environnement (paramètres physico-chimiques et paramètres fermentaires) qui sont liés entre eux.

I. Les paramètres physico-chimiques de l'environnement ruminal (pH et Eh)

1. Chez le ruminant adulte

L'environnement ruminal est déterminé par un ensemble de paramètres physico-chimiques comme le pH et le potentiel redox (E_h). Le pH ruminal chez le ruminant adulte varie entre 5,5 et la neutralité en fonction des régimes de l'animal. En effet chez le ruminant recevant un régime alimentaire riche en concentrés, le pH ruminal diminue fortement durant les heures (entre 3 et 5h) qui suivent les repas principaux puis augmente jusqu'au repas suivant de par la présence de bicarbonate salivaire (Marden et al., 2005 ; Brugère, 1983). La dégradation des aliments ingérés engendre une formation plus ou moins importante de produits de fermentation (dont les AGV et l'acide lactique...) selon la composition de la ration. Les produits de fermentation vont influencer directement le pH ruminal. En effet, une ration riche en amidon va engendrer un pH ruminal plus faible qu'une ration riche en fibres (Julien et al., 2010a).

Le microbiote ruminal est sensible aux variations de pH, en particulier les bactéries cellulolytiques comme *Ruminococcus flavefaciens* qui produit des cellulases à un pH optimum compris entre 6,4 et 6,6 (Pettipher et Latham, 1979) et *Fibrobacter succinogenes* qui produit des endoglucanases à un pH optimal de 7. Les bactéries amylolytiques comme *Streptococcus bovis* ont une croissance optimale pour un pH compris entre 5,5 et 5 mais pour des pH inférieurs, elles disparaissent (Dawson et Allison, 1988) ; ou comme *Ruminococcus amylophilus*, produisent des amylases dont l'optimum d'activité est autour d'un pH de 6,3. Les lactobacilles se développent fortement à des pH faibles même inférieurs à 5 (Roque, 1991). Les bactéries utilisatrices de lactate ont une activité optimale pour de pH compris entre 6 et 6,5 sauf *Megasphaera elsdenii* qui résiste à des pH inférieurs à 5,5 mais est inhibée pour des pH inférieurs à 4,8 (Roque, 1991). Les bactéries qui dégradent l'urée ont une activité optimale pour des pH compris entre 7 et 8,5 (Wallace et Cotta, 1988). Les bactéries qui possèdent une activité lypolytique ont une activité optimale pour des pH supérieurs à 6,3

(Stewart et Bryant, 1988). Les protozoaires ciliés sont sensibles aux pH acides, ainsi que les archées méthanogènes (Dawson et Alisson, 1988 ; Thiret, 2001). La composition et les modifications du milieu ruminal (substrats, pH...) influencent donc fortement le microbiote.

L'environnement ruminal est fortement anaérobie ce qui se traduit par un milieu réducteur et un potentiel redox (E_h) très négatif. Il varie en moyenne entre -220 et -110 mV chez des vaches taries (Julien et al., 2010b ; Monteils et al., 2011), entre -88 et -134 mV chez des vaches laitières (Marden et al., 2008) et entre -145 et -190 mV chez des moutons (Marounek et al., 1982). Les modifications de E_h observées sont sans doute liées à l'arrivée d'oxygène dans le rumen (Andrade et al., 2002) soit au moment de l'ingestion soit par diffusion depuis le sang vers le contenu ruminal.

2. Chez le jeune ruminant

Chez les pré-ruminants, avant le sevrage, le pH ruminal à la naissance et jusqu'à 1 semaine d'âge est proche de la neutralité (entre 6 et 7), ensuite il diminue fortement jusqu'à 5 semaines d'âge pour se rapprocher d'une valeur moyenne de 5. Cette valeur faible est à rapprocher du début des fermentations ruminales qui acidifient le milieu. Entre 5 et 12 semaines le pH ruminal augmente pour se stabiliser à une valeur moyenne de 6 en raison de l'apparition de la rumination et de l'effet tampon de la salive (Anderson et al., 1987 ; Leismester et al., 2004 ; Sahoo et al., 2005).

Dès la première semaine de la vie des agneaux, Chaucheyras-Durand et Fonty (2002) ont mis en évidence un potentiel redox fortement négatif dans le rumen (varie entre -250 et -300 mV). Ceci indique que l'environnement ruminal est déjà un milieu fortement réducteur chez le pré-ruminant comme chez des animaux adultes (Marden et al, 2008 ; Julien et al, 2010 ; Monteils et al., 2011). Cependant, le potentiel redox dans le rumen chez les veaux nouveau-nés reste très peu étudié.

II. Le microbiote ruminal

Le rumen est un véritable fermenteur anaérobie grâce à une flore et une faune qui permettent de dégrader la majorité des constituants des aliments. Le microbiote ruminal est composé par des bactéries, des archées, des champignons et des protozoaires. D'autres hôtes peuvent être aussi observés dans le rumen comme des virus. Ce microbiote est en symbiose

avec son hôte (l'animal). Cette population microbienne est adaptée à un milieu anaérobie, des pH compris entre 5,5 et 7,0 et une température de 39-40°C.

1. Approche taxonomique

a. Techniques de détermination du microbiote digestif

Le microbiote digestif est composé d'un large spectre de microorganismes différents. Dans cette partie, les techniques de caractérisation du microbiote (en particulier pour les bactéries et les archées) seront présentées, au vu de la rapide évolution des différentes techniques de caractérisation microbienne des techniques culturales vers des techniques moléculaires plus récentes.

i. Dénombrement et culture

Pour caractériser le microbiote, un large panel de techniques a été utilisé : dénombrement en microscopie (dénombrement avec ou sans coloration), cytométrie de flux (caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules isolées en solution pour les bactéries par exemple) et méthodes culturales (par exemple, cultures sur milieu avec ensemencement sur boîte ou tube permettant l'isolement, la culture et l'identification des microorganismes) permettant de mettre en évidence une petite partie de la communauté microbienne d'un écosystème donné. L'utilisation de ces techniques implique le besoin de connaître les conditions de croissance des micro-organismes à étudier, ce qui est contraignant sur certains écosystèmes complexes et denses quand on veut caractériser la communauté qui les compose.

ii. Techniques moléculaires

La suite de ce chapitre sera consacrée à l'approche moléculaire. Ces techniques permettent de s'affranchir de contraintes liées à la culture des souches de microorganismes et donnent une nouvelle vision des communautés microbiennes, plus exhaustive que les techniques par culture.

Les approches moléculaires permettent d'évaluer la diversité spécifique des écosystèmes en se basant sur les propriétés des acides nucléiques et donc le polymorphisme de l'ADN ribosomal 16S (ou 18S pour les eucaryotes). Ces approches permettent de différencier les microorganismes à différents niveaux taxonomiques et/ou de déterminer les degrés de similitude par les techniques d'hybridation par sonde d'oligonucléotides (exemple : FISH),

d’empreinte moléculaire (exemple RFLP), de clonage ou de séquençage, de puces à ADN et la métagénomique.

L’approche moléculaire comprend plusieurs types de techniques :

- Les puces à ADN (analyse de milliers de gènes) comme les biopuces ou les microarrays qui permettent d’étudier soit la diversité phylogénétique (par des sondes d’ARNr 16S spécifiques d’un taxon donné), soit la diversité métabolique (par des sondes représentant un panel de séquences ADN de gènes de fonction).

- Les empreintes moléculaires qui donnent rapidement le profil de l’ensemble de la communauté contenue dans un échantillon (exemple T-RFLP, ARISA, DGGE, CE-SSCP...). Les empreintes moléculaires donnent une image globale de la communauté étudiée (structure, abondances relatives...) alors que les séquençages permettent de connaître plus en profondeur la composition de la communauté ciblée.

- La PCR quantitative (qPCR), technique automatisée permettant de quantifier précisément et rapidement un gène d’intérêt (spécifique d’un genre, d’une espèce...), une population totale (bactéries totales, archées totales...) dans de nombreux échantillons par quantification d’un signal fluorescent. L’intensité de la fluorescence pour chaque cycle de PCR est proportionnelle à la quantité de séquences produites et donc proportionnelle à la quantité initiale d’ADN présente dans le milieu réactionnel (Elyse, 2002). Deux types de techniques existent : SYBR GREEN et TaqMan. Le SYBR Green est une molécule qui se fixe à l’ADN pendant les phases d’hybridation et d’élongation de la PCR et émet de la fluorescence (Figure 8A). La technique de la TaqMan fait intervenir lors de la PCR une sonde Taqman (composée par des oligonucléotides uniques doublement marqués avec des fluorochromes en 5' par le *reporter* et en 3' par le *quencher*) en plus des deux amorces (Figure 8B). La PCR quantitative présente l’avantage d’être très sensible et spécifique pour quantifier une population donnée mais par contre un des inconvénients majeurs de cette technique est le côté laborieux de sa mise au point. En effet la recherche des amorces spécifiques de la population que l’on souhaite quantifier est longue et pas toujours facile.

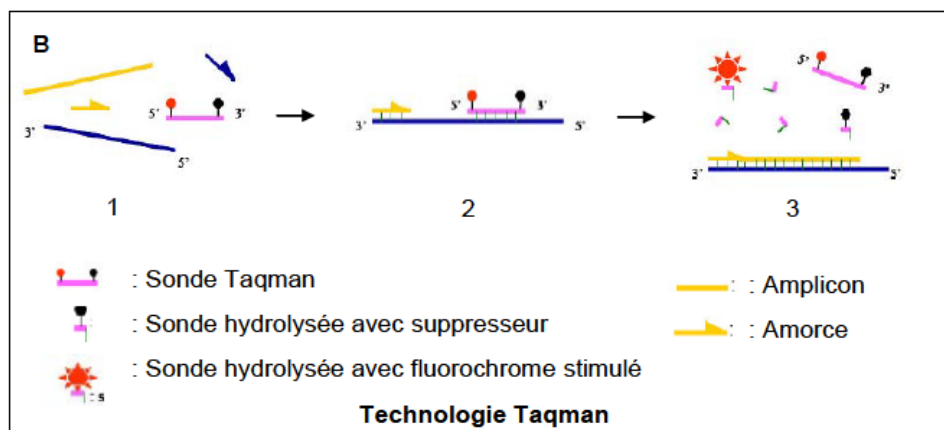
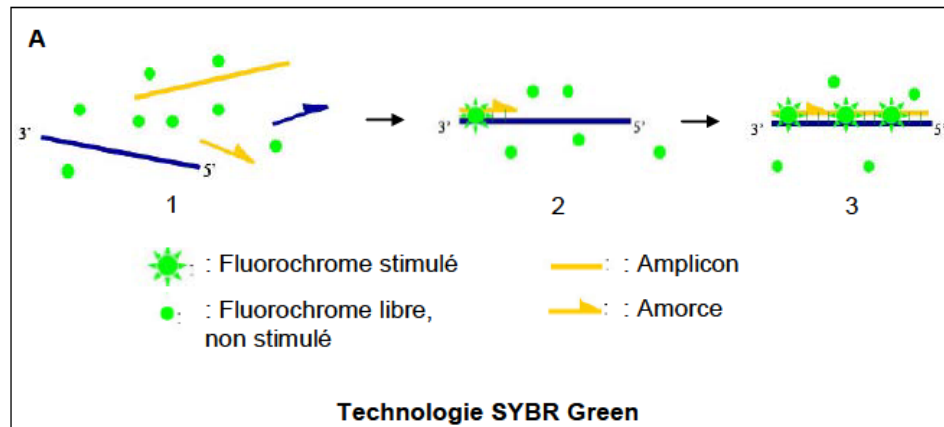


Figure 8 A et B : Principe de la qPCR par SYBR Green (A) et par Taqman (B). Les phases de la PCR quantitative sont : 1) Phase de dénaturation de l'ADN cible et mise en présence des séquences à amplifier avec le SYBR GREEN ou la sonde TaqMAN en fonction de la technique, les dNTP et la polymérase, 2) Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces, 3) Phase d'élongation. Ce cycle est répété plusieurs fois (d'après Rory Michelland, thèse 2009).

- Les séquençages (par exemple le séquençage de Sanger ou le pyroséquençage) permettent de faire l'inventaire des populations présentes dans un échantillon sur la base du polymorphisme de l'ADNr 16S, et permettent donc de déterminer la diversité microbienne sans culture. Dans le cas d'un séquençage par la méthode de Sanger, les ADN extraits doivent être amplifiés par PCR, l'amplification est ensuite séquencée par la méthode de Sanger (PCR avec des ddNTP marqués. Cette technique est longue et variable entre échantillons car le recours au clonage fait qu'elle est peu reproductible (Edwards et al., 2004). Le principe du pyroséquençage 454 est de capter chaque nucléotide (A, T, C et G) qui s'incorpore à la nouvelle séquence synthétisée pendant la phase d'élongation de la PCR. Le pyroséquençage est découpé en 5 étapes :

1) Le mélange réactionnel est constitué avec les enzymes clefs et les différents substrats, puis amplification de l'ADN à séquencer : PCR en émulsion (attachement de

l'ADN aux billes avec 1 brin d'ADN par billes puis émulsion de billes par PCR en microréacteur avec 1 bille par réacteurs) (figure 9).

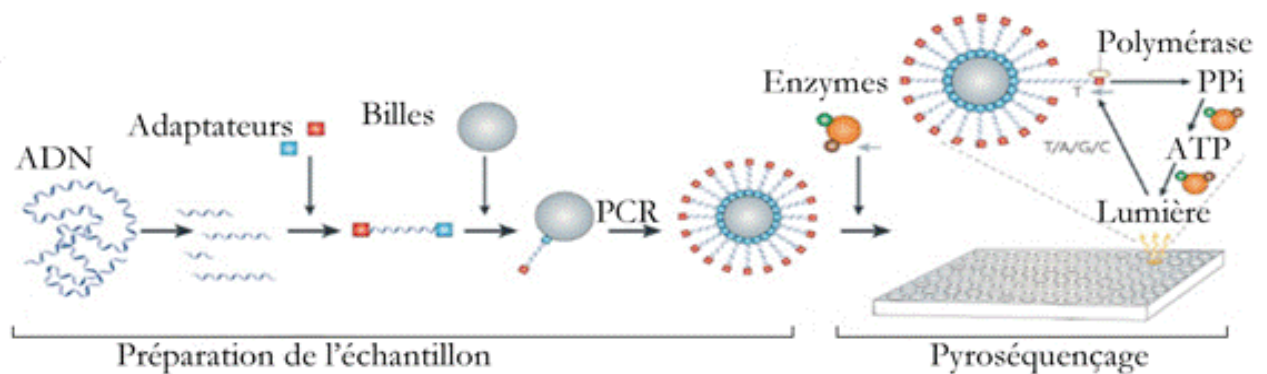


Figure 9 : Préparation de l'échantillon d'ADN et pyroséquençage (Medini et al., 2008).

2) Chaque nucléotide ajouté dans les puits (ajout successif des nucléotides) libère un pyrophosphate dans le milieu réactionnel quand le nucléotide correspond à celui nécessaire pour l'action de la polymérase. Une ATPsulfurylase vient alors transformer ce pyrophosphate (PPi) en ATP (figure 10).

3) L'ATP couplé à une luciférine dans le milieu réactionnel est alors utilisé par une luciférase pour produire de l'oxyluciférine. L'oxyluciférine émet alors un signal lumineux (figure 10).

4) Les surplus en nucléotides sont dégradés par une apyrase dans le milieu réactionnel.

5) Le signal lumineux est capté par le scanner du séquenceur : chaque pic correspond à l'insertion d'un nucléotide défini (figure 10) et l'intensité du pic est proportionnelle au nombre de bases identiques insérées (Ronaghi et al., 1996). Ces étapes sont recommencées jusqu'à que la polymérase n'ait plus d'ADN à hybrider (entre 200 et 700 pb). La séquence peut ainsi être déduite à partir de l'intensité de chaque pic.

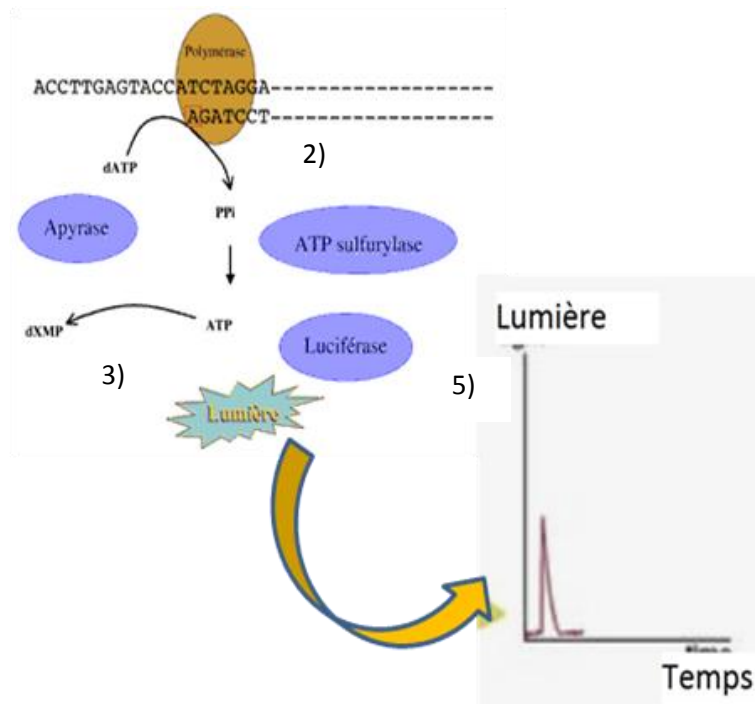


Figure 10 : Pyroséquenceage 454, étapes 2 à 3 et 5 (Site internet N°3)

Les nombreuses séquences détectées par le pyroséquenceage 454 sont ensuite alignées par des logiciels de bioinformatique (logiciel Mothur par exemple; Schloss et al., 2009) et comparées pour l'affiliation taxonomique en utilisant un RDP-classificateur, par exemple dans des bases de données spécifiques de la communauté ciblée.

Le pyroséquenceage présente de grands avantages :

- il permet d'analyser plusieurs échantillons en même temps
- il n'est pas utile de mettre les échantillons en culture car le séquenceage est réalisé directement à partir de l'ADN cible extrait des échantillons
- il offre une grande capacité de différenciation des espèces par l'ADNr 16S
- il est sans *a priori* à l'inverse des techniques culturelles, et permet de caractériser une communauté microbienne globale en identifiant les différentes séquences par comparaison à une base de données informatiques
- il est rapide (5 millions de séquences de bases / heure contre 5 000 pour le séquenceage Sanger)
- il permet aussi un accès à des populations sous-dominantes.

Mais il présente aussi quelques inconvénients :

- coût élevé
- le matériel génétique utilisé comme support correspond à l'ADN total extrait (mélange de cellules mortes et de cellules vivantes) ce qui peut créer un biais
- l'identification finale des séquences nécessite l'utilisation de banques de données qui sont plus ou moins complètes (beaucoup d'*unclassified* ou *uncultured*)
- comme c'est une technique automatisée il y a des erreurs liées au matériel utilisé avec environ 16% de séquences chimères
- la recherche d'amorces spécifiques de la population cible est laborieuse
- il nécessite l'extraction de l'ADN, ce qui peut aussi induire des biais.

Les autres techniques ont aussi des avantages et des inconvénients présentés dans le tableau 1.

Afin d'étudier de façon précise la communauté, il est nécessaire de trouver un bon compromis pour discriminer au mieux les espèces microbiennes étudiées. Parmi toutes les techniques disponibles, la qPCR permet de quantifier de façon précise les groupes microbiens et le pyroséquençage semble être un bon choix pour l'étude d'une communauté constituant un écosystème complexe. Ces 2 techniques semblent être un bon compromis entre rapidité (analyses de nombreux échantillons en même temps), spécificité des amorces d'une communauté cible et une analyse sans aucun a priori. Afin d'étudier les différentes composantes du microbiote ruminal, une approche quantitative par qPCR et une approche semi-quantitative et qualitative par pyroséquençage 454 apparaissent complémentaires pour une caractérisation plus précise.

Méthodes	Applications et avantages	Limites
Cultures	Isolement de souches : "l'idéal"	Non représentatif ; lent et laborieux
DGGE/TGGE/TTGE	Suivi de la dynamique de communautés/ populations ; analyse comparative rapide	Biais possibles dus à l'étape de PCR ; semi-quantitatif ; l'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones
T-RFLP	Suivi de la dynamique de communautés/ populations ; analyse comparative rapide ; méthode sensible	Biais possibles dus à l'étape de PCR ; semi-quantitatif ; l'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones
SSCP	Suivi de la dynamique de communautés/ populations ; analyse comparative rapide	Biais possibles dus à l'étape de PCR ; semi-quantitatif ; l'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones
FISH	Détection ; dénombrement ; analyse comparative possible avec système automatisé (cytométrie en flux)	Nécessité d'avoir des informations liées aux séquences ciblées ; laborieux si on se place au niveau de l'espèce
Hybridation en dot-blot	Détection ; estimation de l'abondance relative	Nécessité d'avoir des informations liées aux séquences ciblées ; laborieux si on se place au niveau de l'espèce
Puces à ADN (diversité)	Détection ; estimation de l'abondance relative	En cours de développement ; coût élevé
Profil de séquences non 16-rRNA	Suivi de la dynamique de communautés/ populations ; analyse comparative rapide	L'identification nécessite des approches complémentaires basées sur l'ARNr 16S
PCR quantitative	Détection ; estimation de l'abondance relative ; très sensible et spécifique pour quantifier une population donnée	Laborieux pour la recherche d'amorces spécifiques
Séquençage de l'ADNr 16S	Identification phylogénique	Laborieux ; biais possibles dus à l'étape de PCR
Pyroséquençage 454	Identification phylogénique ; analyse de plusieurs échantillons en même temps ; pas de mise en culture car analyse de l'ADN cible directement ; grande capacité de différenciation des espèces par l'ADNr 16S ; rapide d'utilisation	Coût élevé ; besoin de banque de données pour la caractérisation phylogénique ; technique automatisé avec des erreurs de la machine ; laborieux pour la recherche d'amorces spécifiques

Tableau 1 : Présentation de quelques avantages et inconvénients des principales techniques moléculaires d'étude des écosystèmes microbiens complexes (d'après Zoedental et al., 2004).

b. Le microbiote digestif chez le ruminant adulte

i Les bactéries

Les bactéries représentent le plus grand nombre des micro-organismes colonisant le rumen. Leur nombre varie entre 10^{10} et 10^{11} bactéries / g de contenu ruminal (Stewart et al.,

1997). La majorité des bactéries du rumen sont strictement anaérobies et plus de 200 espèces ont été isolées à ce jour. La classification des bactéries a évolué en fonction de l'avancée des techniques. Les bactéries peuvent être classées phénotypiquement selon des critères morphologiques (forme et groupement des bactéries, présence ou absence de flagelle, nature de la paroi, type de mobilité, etc.) ou selon des critères physiologiques (voies métaboliques, types de substrats utilisés, etc.). Cette dernière classification conduit aux groupes fonctionnels suivants : bactéries cellulolytiques, bactéries hémicellulolytiques, bactéries pectinolytiques, bactéries amylolytiques, bactéries protéolytiques, bactéries utilisatrices de lactate (Fonty et al., 1995).

La microflore ruminale est majoritairement composée (plus de 90% des bactéries totales) par des bactéries à Gram positif. Parmi les bactéries à Gram positif on retrouve : celles appartenant aux « bacilles », dont *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lachnospira*, *Clostridium* et celles appartenant aux « coques » majoritairement représentés par le genre *Ruminococcus* qui dégrade la cellulose. Il a été aussi répertorié la présence de *Peptostreptococcus* et *Streptococcus*.

Dans le rumen, il est aussi trouvé des bactéries Gram négatives : celles appartenant aux « bacilles » qui sont également essentielles, comprenant *Fibrobacter*, *Ruminobacter*, *Prevotella*, *Succinivibrio*, *Selenomonas*, *Fusobacterium* et celles appartenant aux « coques » avec les genres *Megasphaera* et *Veillonella*.

Certaines espèces dans le rumen sont anaérobies facultatives comme *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Enterobacter*.

Depuis l'apparition des techniques de biologie moléculaire, la classification des bactéries s'est organisée autour de leur affiliation taxonomique par homologie et différences entre les génomes bactériens (figure 11). Le rumen chez la vache comprend 2 phyla majoritaires : la proportion de *Firmicutes* est de 49 et 69% et celle des *Bacteroidetes* de 39 et 29% pour la phase liquide et solide, respectivement (Tajima et al., 1999). Les autres bactéries du rumen sont représentées par 2.5% d'*Actinobacteria*, de 3 à 5% de *Proteobacteria* ou encore par les *Fibrobacter* et les *Spirochètes* en moindre abondance (Nelson et al., 2003 ; An et al., 2005 ; Larue et al., 2005). L'étude de l'ARNr 16S par pyroséquençage a confirmé que la communauté bactérienne du contenu ruminal chez des vaches taries est dominée par les phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* dont les familles les plus abondantes sont les *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae*, and *Rikenellaceae* (Zened et al., 2012). Cette étude montre aussi que les genres les plus présents sont *Prevotella*, *Ruminococcaceae*

Incertae_Sedis, *Rikenellaceae* RC9, *Bifidobacterium*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Acetitomaculum*, *Lachnospiraceae* *Incertae_Sedis*, *Xylanibacter* avec des abondances relatives allant de 11 à 1% et de nombreux taxa *unclassified* appartenant aux familles listées au-dessus (Zened al., 2012).

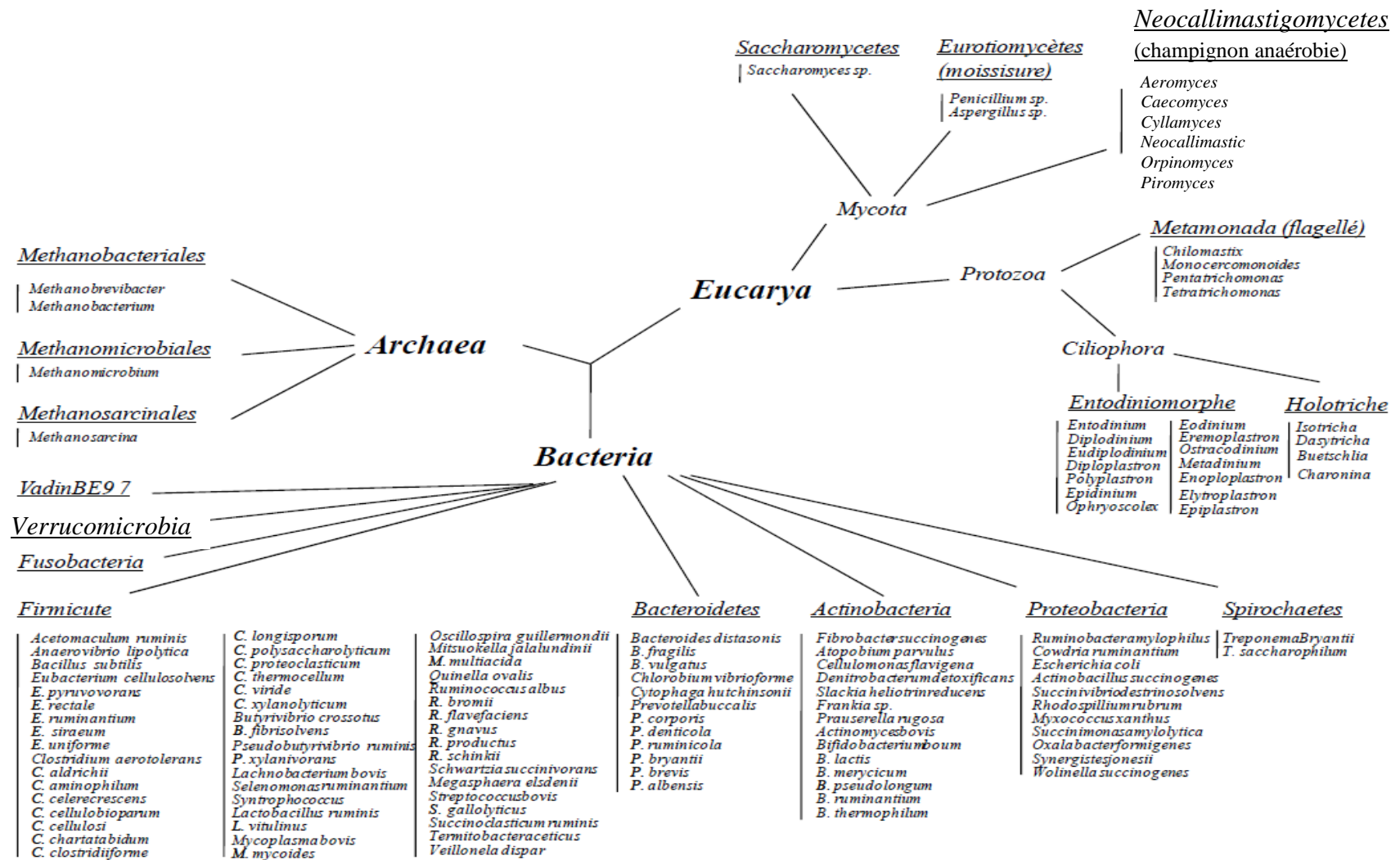


Figure 11 : Représentation des principaux taxons microbiens observés dans les systèmes digestifs (d'après Rory Michelland, thèse 2009).

La phase solide du contenu ruminal contient environ 75% de la biomasse bactérienne totale, 25% se trouve dans la phase liquide (Forsberg et Lam, 1977) et environ 1% se trouve au niveau de la paroi ruminale (appelé communauté épimurale, Sadet, 2008). L'adhérence des bactéries de la phase solide est un préalable important à la fibrolyse. Les bactéries qui adhèrent aux fibres produisent un complexe d'enzymes (polysaccharidases et glucosidases) qui leur permet de digérer les parois cellulaires végétales (Fonty et Forano, 1998).

ii Les archées

Les archées sont connues principalement pour leurs activités méthanogènes dans les fermenteurs anaérobies (Raskin et al., 1994). En effet ces organismes complètent les fermentations des bactéries anaérobies en utilisant l'hydrogène (produit lors de la fermentation des glucides par les bactéries) présent dans le rumen pour synthétiser et produire du méthane (Wolin et al., 1997).

La quantité d'archées au niveau du rumen a été évaluée entre 10^8 et 10^9 archées / g de contenu ruminal par des méthodes culturales. Chez les ruminants, 2 phyla sont retrouvés dans le rumen avec majoritairement le phylum *Euryarchaeota* et rarement le phylum *Crenarchaeota* (Shin et al., 2004b). Les archées dans le rumen sont peu diversifiées (figure 11) et le genre majoritaire est *Methanobrevibacter* (Janssen et Kirs, 2008). Les genres *Methanomicrobium*, *Methanobacterium* et *Methanosarcina* sont aussi présents (Wolin et al., 1997 ; Jarvis et al., 2000 ; Wright et al., 2008). Des études basées sur l'ADNr 16S, se sont intéressées à la phylogénie des archées et révèlent l'existence de nouveaux groupes d'archées appartenant au phylum *Euryarchaeota* (Tajima et al., 2001 ; Whitford et al., 2001).

Les archées méthanogènes dans le rumen sont attachées aux particules du rumen, attachées à l'épithélium du rumen et associées au sein du rumen aux protozoaires (Ohene-Adjei et al., 2007). La densité en archées méthanogènes varie en fonction de la phase du rumen étudiée : respectivement 3.10^8 , 2.10^9 et 9.10^9 copies de gène de l'ARNr 16S pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei et al., 2010). Cette étude montrait aussi la prédominance du genre *Methanibrevibacter* au sein des 3 phases du rumen étudiées avec respectivement 84, 78 et 77% d'abondance pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei et al., 2010). Cette étude révèle aussi un nombre plus ou moins important de taxa non identifiés au sein de chaque phase avec des abondances de respectivement 12, 24 et 25% pour les phases liquides, solides et de l'épithélium du rumen (Pei et al., 2010). Les communautés méthanogènes vivant en liberté ou associés aux

protozoaires sont composées des trois genres : le groupe C (aussi appelé CCR apparenté de loin aux *Thermoplasma*), les *Methanobrevibacter* et les *Methanomicrobium* (Janssen et Kirs, 2008 ; Tymensen et al., 2012). Tymensen et al. (2012) ont d'autre part montré que les archées méthanogènes libres au niveau du rumen appartiennent aux groupes RCC et *Methanomicrobium* et les archées méthanogènes associées aux protozoaires appartiennent au groupe *Methanobrevibacter*. Les abondances relatives des archées méthanogènes, observées au niveau du rumen, varient en fonction de la nature des rations, des protozoaires présents, mais aussi en fonction des amorces utilisées pour leurs identifications (Tymensen et al., 2012).

iii Les protozoaires

Les protozoaires sont majoritairement ciliés, anaérobies stricts et sont évalués entre 10^3 à 10^6 protozoaires / g de contenu ruminal par dénombrement sur cellule de comptage (Jouany, 1988 ; McAllister et Chang, 1996 ; Williams et Coleman, 1997). Dans le rumen, les protozoaires flagellés sont peu nombreux. Quatre espèces ont été mises en évidence : *Chilomastix sp.*, *Monocercomonas sp.*, *Pentatrichomonas sp.* et *Tetratrichomonas sp.* (De Puytorac *et al.*, 1987) mais leur rôle est peu connu. La densité des protozoaires est faible au regard de celle des bactéries mais ils représentent entre 20 et 50% de la biomasse microbienne (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

Les protozoaires ciliés sont composés de deux groupes : les entodiniomorphes et les holotriches (figure 11). Dans le rumen chez l'adulte, on observe 9 genres de protozoaires appartenant au groupe des entodiniomorphes (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex*). Le groupe des holotriches est majoritairement représenté dans le rumen par la famille Isotrichidaea avec deux genres prépondérants : *Isotricha* et *Dasytricha* (Williams et Coleman, 1997 ; Karnati et al., 2003). Au sein de la phase liquide du rumen, deux genres sont identifiés *Entodinium* (69,6% des clones) et *Epidinium* (31,4% des clones), un certain nombre de clones n'étaient pas identifiables (30,4%) (Shin et al., 2004a). Au niveau de la phase solide du rumen, le genre *Entodinium* est majoritaire et aucun *Epidinium* n'a été observé. Au niveau de l'épithélium ruminal, aucun protozoaire n'a été détecté (Shin et al., 2004a).

Les protozoaires ciliés participent aussi au métabolisme glucidique dans le rumen car ils ingèrent les particules alimentaires et les digèrent à l'intérieur de leurs vacuoles (Ushida et Jouany, 1994). Les hemicelluloses sont fortement dégradées par les entodiniomorphes alors

que les holotriches fermentent plutôt les sucres solubles excepté le mannose et la glucosamine (Jouany et Ushida, 1998). *Isotricha* possède une forte activité amylolytique (Gouet et al., 1986) et la dégradation de l'amidon conduit à la formation d'acide butyrique, H₂, et CO₂ majoritairement et un peu d'acides propioniques et lactiques.

iv Les champignons

Chez le ruminant adulte, la densité de champignons mesurée par des méthodes de cultures, est comprise entre 10³ et 10⁴ champignons / mL de contenu ruminal (McAllister et Cheng, 1996). Des densités similaires ont été observées via des techniques de biologie moléculaire (Lwin et al., 2011). Les champignons du rumen sont totalement anaérobies (McAllister et Cheng, 1996).

La quantité de champignons dans le rumen chez l'adulte peut varier fortement en fonction du régime alimentaire et du délai entre les repas (Orpin, 1977 ; Grenet et al., 1989). Six genres différents de champignons du rumen ont pu être isolés et identifiés ; ils appartiennent à la famille des *Neocallimastigomycetes* (*Anaeromyces*, *Caecomycetes*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* et *Piromyces* ; Orpin et Joblin, 1997 ; Kittelmann et al., 2012 ; figure 11). Une étude récente a montré que chez les ruminants, *Piromyces* et *Neocallimastix* spp. sont les champignons les plus abondants et un nouveau groupe appelé SK, dont le groupe SK3, est retrouvé chez tous les ruminants (Kittelmann et al., 2012).

Les champignons du rumen sont souvent attachés aux fibres composant la phase solide et représentent environ 5 à 10% de la biomasse microbienne totale du rumen (Orpin, 1981).

Les champignons du rumen ont un fort potentiel fibrolytique grâce à une forte production de polyosidases, qui permettent de dépolymériser la cellulose et les hémicelluloses, et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés mais ne dégradent pas la pectine. Les produits terminaux générés par la fermentation des glucides sont du formate, de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du CO₂ et de l'H₂ (Bauchop & Mountfort, 1981).

c. Le microbiote digestif chez le jeune ruminant

A la naissance, l'ensemble du tractus digestif (et donc le rumen) est stérile. Le contenu ruminal est composé de mucus, de salive et de cellules desquamées. Dès les premiers jours après la naissance, le rumen est rapidement colonisé par un microbiote abondant et diversifié, alors que le jeune ruminant n'est alimenté que par du lait qui atteint directement la caillette du

fait de la fermeture de la gouttière œsophagienne. La colonisation du rumen chez le jeune animal est liée à des contaminations environnementales, par les liens avec la mère, sa salive, le lieu de couchage, les animaux aux alentours et la nourriture (Long et Swenson, 1977 ; Fonty et al., 1987 ; Mackie et al., 1999). Ces différents types de contamination vont conditionner le microbiote ruminal qui pourra s'installer. La colonisation du rumen est observée dès 2 jours après la naissance du jeune (Jayne-Williams, 1979 ; Fonty et al., 1987). Chez l'agneau, la concentration en bactéries déterminée par des techniques culturales est de 10^9 cellules / mL de contenu ruminal 2 jours après la naissance et atteint 10^{11} cellules / mL de contenu ruminal à 1 semaine d'âge (Fonty et al., 1987). Fonty et al. (1987) ont montré que la colonisation chez l'agneau est séquentielle et temporelle (figure 12).

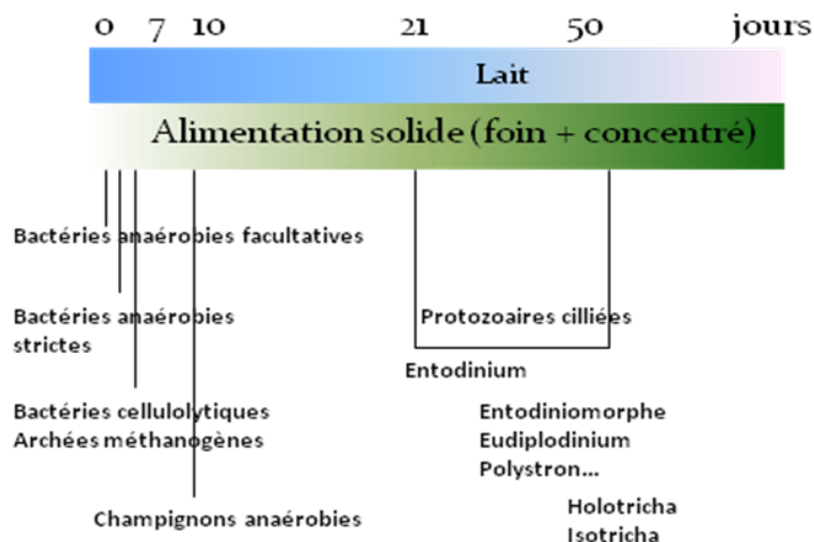


Figure 12 : Implantation des communautés microbiennes dans le rumen chez l'agneau (d'après Fonty et al., 1987).

En effet chez l'agneau :

- les bactéries sont les premières à s'implanter. Des bactéries anaérobies facultatives se mettent en place dès 2 jours, suivies par des bactéries anaérobies strictes qui deviennent rapidement majoritaires. La densité des bactéries anaérobies strictes augmente jusqu'au sevrage alors que celles des bactéries anaérobies facultatives et aérobies diminuent (Fonty et al., 1987).

- les bactéries cellulolytiques apparaissent entre 2 et 4 jours, avant même l'ingestion d'aliments solides, et représentent 10^7 - 10^8 cellules / mL de contenu ruminal. (Fonty et al., 1987).

-les archées méthanogènes colonisent le rumen parallèlement aux bactéries cellulolytiques, amylolytiques, protéolytiques et utilisatrices de lactate, entre 3 et 4 jours après la naissance (Fonty et al., 1987). Skillman et al. (2004) observent l'implantation des archées dès 3 à 7 jours après la naissance. Leur densité augmente avec l'âge des agneaux et se stabilise autour de 25 jours. La colonisation initiale, dès 3 jours d'âge, est majoritairement réalisée par *Methanobrevibacter* et parfois couplé avec *Methanobacterium*. Par la suite, les *Methanobacterium* disparaissent (entre 12 et 19 jours d'âge) et *Methanobrevibacter* devient majoritaire (Skillman et al., 2004).

-les champignons anaérobies apparaissent rapidement, entre 8 et 10 jours (Fonty et al., 1987).

-les protozoaires ciliés colonisent le rumen en dernier, après 2 semaines de vie selon une séquence bien définie : les *Entodinium* entre 15 et 20 jours, les *Polyplastrons* et les *Entodiplodinium* entre 20 et 25 jours et les *Isotricha* à partir de 50 jours. (Fonty et al., 1987).

Le microbiote ruminal chez le jeune se stabilise en général vers 3 mois d'âge (Fonty et al 1987 ; Bryant et al 1958).

Chez le veau, dès les premiers jours après la naissance, comme chez l'agneau, les bactéries anaérobies facultatives apparaissent, suivies par les bactéries anaérobies strictes rapidement majoritaires (Minato et al., 1992). La quantité de bactéries cellulolytiques augmente plus lentement que chez l'agneau (Anderson et al., 1987), car elle reste faible les 3 premières semaines de vie. La colonisation chez le veau a été peu étudiée mais l'implantation ruminale de quelques bactéries est connue. Chez le veau, le rumen possède une population bactérienne différente de celle observée chez l'adulte et qui n'est pas stable jusqu'à 13 semaines d'âge (Bryant et al., 1958), avec les genres dominants *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* et *Bifidobacterium*. Cependant, une partie de la population bactérienne observée est commune au jeune et à l'adulte comme les streptocoques anaérobies facultatifs, les ruminocoques, les genres *Butyrivibrio* et *Selenomonas* et des espèces comme *Prevotella ruminicola* et *Fibrobacter succinogenes* (Bryant et al., 1958).

Une étude récente par pyroséquençage chez le veau recevant exclusivement un aliment d'allaitement a confirmé l'évolution rapide de la colonisation bactérienne au niveau du rumen et une variation des abondances relatives des phyla bactériens observés entre 14 et 42 jours après la naissance (Li et al., 2011 ; figure 13). Le microbiote ruminal à 14 jours d'âge est

composé par *Prevotella* (genre dominant à 33,1% d'abondance relative), suivi par *Bacteroides* (18,1%), *Oscillibacter* (12,9%), *Paraprevotella* (7,1%), *Butyricimonas* (3,1%) et *Pelistega* (3,0%). *Bacteroides* devient le genre le plus répandu dans la communauté microbienne des veaux à 42 jours d'âge (71,4%), suivi par *Porphyromonas* (6,2%), *Prevotella* (5,1%), *Butyricimonas* (2,0%) et *Coprococcus* (1,9%). Les abondances relatives des 6 phyla observés à 14 et 42 jours diffèrent des abondances relatives à 12 mois d'âge (Li et al., 2011 ; figure 13). Ce qui suppose que la communauté bactérienne n'a pas atteint le climax à 42 jours chez le veau.

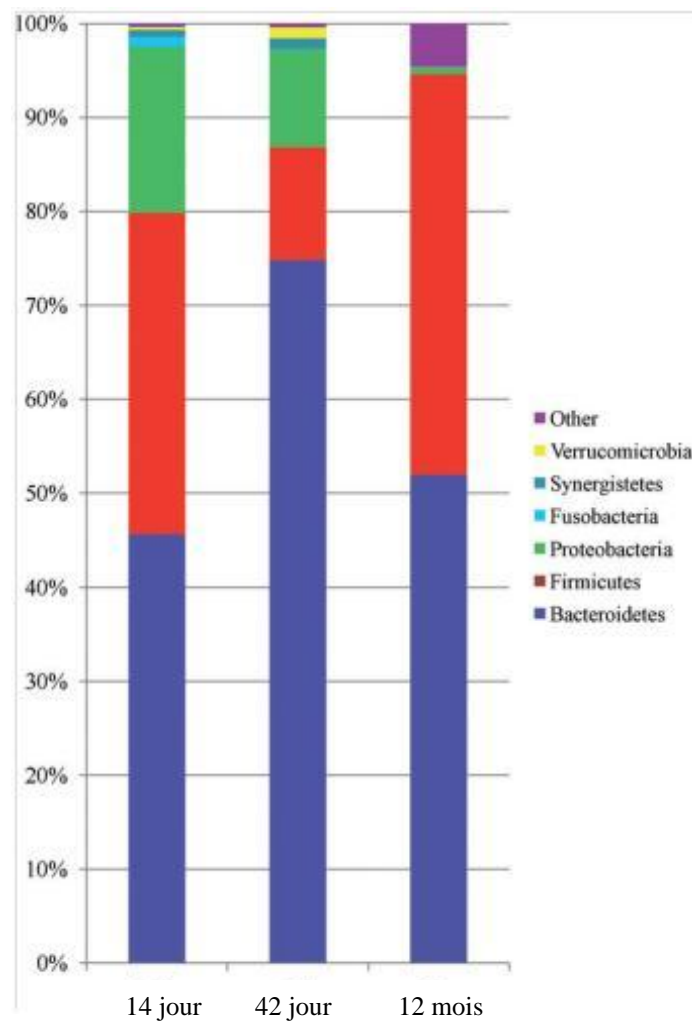


Figure 13 : Distribution relative (%) des 6 phyla majoritaires dans le microbiote ruminal des veaux pré-ruminants nourris au lait de remplacement (n = 3) à 14 et 42 jours après la naissance, et à 12 mois d'âge (taurillons nourris avec un régime à base de foin, n = 4) (d'après Li et al., 2011).

2. Relation entre la taxonomie et les fonctions métaboliques

Les bactéries du rumen possèdent un large panel d'activités enzymatiques et certaines couplent même plusieurs fonctions enzymatiques avec des prédominances dont l'expression évolue au cours du temps en fonction des substrats présents dans l'environnement ruminal suite à l'ingestion de la ration par l'animal.

Les principales espèces bactériennes responsables de nombreuses fonctions métaboliques importantes dans le rumen sont présentées dans les tableaux 2, 3 et 4. La liste des espèces bactériennes hydrolytiques et fermentatives présentées n'est pas exhaustive et représente les bactéries cultivables isolées au sein de la communauté ruminale.

Espèces hydrolytiques bactériennes					
Cellulolytiques	Hémicellulolytiques	Pectinolytiques	Amylolytiques	Protéolytiques	Lipolytiques
<p>Espèces majeures : <i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i></p> <p>Espèces mineures : <i>Clostridium polysaccharolyticum</i>, <i>Clostridium longisporum</i>, <i>Clostridium aerotolerans</i>, <i>Eubacterium cellulosolvens</i></p> <p>Cellodextrinolytiques <i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Clostridium polysaccharolyticum</i>, <i>C. longisporum</i>, <i>C. aerotolerans</i>, <i>Eubacterium cellulosolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Selenomonas ruminantium</i>, <i>Streptococcus bovis</i></p>	<p><i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Prevotella bryantii</i></p> <p>Xylodextrinolytiques <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Prevotella bryantii</i>, <i>Eubacterium ruminantium</i>, <i>Eubacterium limosum</i></p>	<p><i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Ruminococcus albus</i>, <i>Ruminococcus flavefaciens</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Prevotella bryantii</i>, <i>Lachnospira multipara</i>, <i>Streptococcus bovis</i>, <i>Treponema bryantii</i>, <i>Treponema saccharophylum</i></p>	<p><i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Selenomonas ruminantium</i>, <i>Streptococcus bovis</i>, <i>Ruminobacter amylophilus</i>, <i>Succinomonas amylolytica</i>, <i>Ruminococcus bromii</i>, <i>Mitsuokella jalaludinii</i>, <i>Mitsuokella multiacidus</i></p> <p>Amylodextrinolytiques <i>Fibrobacter succinogenes</i>, <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Selenomonas ruminantium</i>, <i>Streptococcus bovis</i>, <i>Ruminobacter amylophilus</i>, <i>Succinomonas amylolytica</i>, <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>, <i>Eubacterium ruminantium</i></p>	<p><i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Prevotella bryantii</i>, <i>Prevotella brevis</i>, <i>Prevotella albensis</i>, <i>Selenomonas ruminantium</i>, <i>Streptococcus bovis</i>, <i>Ruminobacter amylophilus</i></p> <p>Peptidolytiques <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>, <i>Prevotella ruminicola</i>, <i>Prevotella bryantii</i>, <i>Prevotella brevis</i>, <i>Prevotella albensis</i>, <i>Selenomonas ruminantium</i>, <i>Streptococcus bovis</i>, <i>Clostridium aminophilum</i>, <i>Clostridium sticklandii</i></p>	<p><i>Anaerovibrio lipolytica</i>, <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i></p>

Tableau 2 : Principales espèces bactériennes hydrolytiques isolées du rumen (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007) classées par fonction majeure.

Espèces fermentatives bactériennes										
Cellulose	Maltose	Saccharose	Glucose	Galactose	Fructose	Pentoses	Acides uroniques	Acides aminés	Acides organiques	Glycérol
<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Clostridium polysaccharolyticum</i> , <i>Clostridium longisporum</i> , <i>Clostridium aerotolerans</i> , <i>Eubacterium cellulosolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Lachnospira multipara</i> , <i>Lachnobacterium bovis</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Ruminobacter amylophilus</i> , <i>Succinomonas amylolytica</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Lachnobacterium bovis</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Lachnospira multipara</i> , <i>Lachnobacterium bovis</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Prevotella bryantii</i> , <i>Prevotella brevis</i> , <i>Prevotella albensis</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Succinomonas amylolytica</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Lachnospira multipara</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Lachnobacterium bovis</i> , <i>Mannheimia succiniproducens</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Prevotella bryantii</i> , <i>Prevotella brevis</i> , <i>Prevotella albensis</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Succinomonas amylolytica</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Lachnospira multipara</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Lachnobacterium bovis</i> , <i>Mannheimia succiniproducens</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Prevotella bryantii</i> , <i>Prevotella brevis</i> , <i>Prevotella albensis</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Lachnospira multipara</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Anaerovibrio lipolytica</i> , <i>Lachnobacterium bovis</i> , <i>Mannheimia succiniproducens</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Prevotella bryantii</i> , <i>Prevotella brevis</i> , <i>Prevotella albensis</i> , <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Eubacterium ruminantium</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Mannheimia succiniproducens</i>	<i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> , <i>Prevotella ruminicola</i> , <i>Prevotella bryantii</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Lachnospira multipara</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Clostridium aminophilum</i> , <i>Clostridium sticklandii</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Synergistes jonesii</i> , <i>Acidaminococcus fermentans</i> , <i>Allisonella histaminiformans</i>	Lactate: <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Megasphaera elsdenii</i> , <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Veillonella alcalescens</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , Malate: <i>Wolinella succinogenes</i> , Fumarate: <i>Wolinella succinogenes</i> , <i>Veillonella alcalescens</i> , Succinate : <i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Succiniclasticum ruminis</i> , <i>Schwartzia succinivorans</i> , Oxalate : <i>Oxalobacter formigenes</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i> , <i>Propionibacterium sp.</i> , <i>Anaerovibrio lipolytica</i> , <i>Mitsuokella jalaludinii</i> , Méthanol <i>Eubacterium limosum</i>

Tableau 3 : Principales espèces bactériennes fermentatives isolées du rumen (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007) classées par fonction majeure.

Groupe fonctionnel	Principales espèces bactériennes
Acétogènes	<i>Acetitomaculum ruminis</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Eubacterium oxidoreducens</i> , <i>Ruminococcus schinkii</i> , <i>Peptostreptococcus productus</i>
Sulfatoréductrices	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Desulfovibrio sp.</i> , <i>Desulfotomaculum ruminis</i> , <i>Syntrophococcus sucromutans</i>

Tableau 4 : Principales espèces bactériennes hydrogénotrophes isolées du rumen (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

Les espèces bactériennes *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas sp.*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Butyrivibrio sp.* et *Treponema sp.* isolées du rumen possèdent une activité uréasique connue (Wozni et al 1977). Wallace et Cotta (1988) ont montré l'existence d'autres genres microbiens, au niveau des cellules épithéliales, qui étaient capables d'hydrolyser l'urée pour produire de l'ammoniac tels que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium* et *Corynebacterium*. D'autres genres bactériens ont une activité uréolytique faible comme *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Bifidobacterium*. L'ammoniac produit est utilisé par les bactéries pour leur croissance.

Au sein de la phase solide du rumen :

-Le phylum des *Firmicutes* comprend un grand nombre d'espèces bactériennes cellulolytiques et hémicellulolytiques, comme *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* et non cellulolytiques, comme *Selenomonas ruminantium*, (bactérie amylolytique et protéolytique).

-Le phylum *Bacteroidetes* majoritairement représenté par *Prevotella* au sein du rumen (Stevenson et Weimer, 2007) possède des activités hémicellulolytiques et amylolytiques.

-Le phylum *Spirochaetes* dominé par *Treponema bryantii* catabolise le glucose en pyruvate, pour le dégrader ensuite et former de l'acétate, du formate et du succinate (démonstré *in vitro*, Stanton, 1984).

-Le phylum des *Proteobacteria* dont une des espèces la plus connue est *Succinivibrio dextrinosolvens* est plutôt amylolytique et/ou lipolytique.

-Le phylum *Fibrobacteres* fortement représenté dans le rumen par *Fibrobacter succinogenes*, espèce fortement cellulolytique (Varel et Dehority, 1989).

Au sein de la phase liquide du rumen, les espèces bactériennes présentes sont les mêmes que celles de la phase solide mais avec des abondances relatives différentes. Les mêmes voies métaboliques sont également observées. On y retrouve :

-Le phylum des *Firmicutes* avec des genres bactériens cellulolytiques et hémicellulolytiques comme *Butyrivibrio* et *Ruminococcus* ou encore des espèces bactériennes amylolytiques, protéolytiques et lactiques comme *Selenomonas ruminantium*

-Le phylum *Bacteroidetes* avec les genres *Bacteroides* et *Prevotella* dont l'espèce *Prevotella ruminicola* qui hydrolyse les hémicelluloses et l'amidon.

Chapitre 3 - Facteurs de variation du microbiote et de son activité

Des recherches sur des animaux adultes, notamment la vache, ont tenté d'évaluer les effets de certains facteurs de variations afin d'éviter les troubles digestifs de l'animal ou améliorer l'efficacité des productions (de lait par exemple) tout en préservant le bien-être des animaux. Ces facteurs de variation sont souvent l'alimentation des animaux ou des additifs alimentaires comme des microorganismes.

I. Chez le ruminant adulte

1. Composition de la ration (ratio fourrages / concentrés)

Comme exposé précédemment, les bactéries du rumen ont un panel important d'activités enzymatiques pour dégrader des substrats spécifiques. L'activité des bactéries s'exprime en fonction des substrats arrivant au niveau du rumen et donc la composition de la ration que l'animal ingère va affecter la population microbienne du rumen. La ration alimentaire apporte les substrats et la prédominance de certains substrats peut privilégier certaines bactéries.

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet de différents types de ration (riches en fourrage vs. riches en concentré) sur le nombre de bactéries totales dans le rumen. La densité bactérienne est plus importante dans le rumen des animaux alimentés avec des rations riches en concentré (20% de foin et 80% de céréales) ce qui serait concordant avec l'augmentation de l'apport énergétique par ces rations (Bryant et Burkey, 1953 ; Goad et al., 1998). Par contre, ces études montrent aussi que pour des rations moins riches en concentré (80% de foin et 20% de céréales) cette augmentation n'est pas constatée et Dehority et Orpin (1988) n'observent même aucune évolution de la densité bactérienne totale du rumen avec des rations riches en fibres (80% de foin et 20% de concentré) par rapport à des rations riches en concentré (20% de foin et 80% de céréales). Par contre Dehority et Orpin (1988) ont montré des différences de réponses dans la composition de genres dominants bactériens du rumen chez les vaches en fonction de rations identiques : riche en fibres (80% de foin) ou riche en concentrés (80% de maïs) dans 3 études différentes (Tableau 5). Le pourcentage de concentré dans la ration, la quantité d'aliment distribuée, et les variations entre individus, pourraient influencer les concentrations bactériennes, et faire que les comparaisons entre les études réalisées précédemment sont difficiles à réaliser. De plus, Tamate et al. (1962) ont montré que l'apport de fourrage au niveau du rumen, par rapport à l'apport d'une ration riche en

concentré, entraîne une augmentation du volume ruminal et pourrait conduire à des dilutions de la densité bactérienne.

Genres	en % de genres bactériens totaux isolés					
	Caldwell et Bryant 1966		Latham et al., 1971		Latham et al., 1972	
	RF	RC	RF	RC	RF	RC
<i>Butyrivibrio</i>	23	9	38	10	25	2
<i>Selemonas</i>	0	16	5	12	7	19
<i>Prevotella</i>	22	26	8	9	11	4
<i>Ruminococcus</i>	0	1	4	4	11	10
<i>Peptostreptococcus</i>	0	0	0	8	6	14
<i>Streptococcus</i>	0	0	3	6	4	8
<i>Lactobacillus</i>	0	4	2	17	6	20

RF = Alimentation riche en fibres ; RC = Ration riche en concentrés

Tableau 5 : Distribution des genres dominants bactériens du rumen chez des vaches en fonction de la ration (Dehority et Orpin, 1988).

Une autre étude sur des vaches, dont le but était de comparer l'effet d'une alimentation supplémentée en céréales (33% de foin avec 7% de paille et avec 40% d'orge) et une alimentation témoin riche en fourrage (93% de foin et 7% de paille) a montré, chez les vaches alimentées avec la ration supplémentée en céréales, une diminution de l'activité fibrolytique (polysaccharidases et glycosidases) dans le rumen, une diminution de la vitesse de dégradation du foin alors que la densité des 3 espèces cellulolytiques majeures (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*) n'était pas modifiée (Martin et al., 2001).

D'autres études sur des changements brusques de ration (passage d'une ration riche en fibres « 3,5 kg de foin, 1 kg de foin en cube, et 1,5 kg de concentré nourris deux fois par jour » vers une ration riche en concentré « 0,5 kg de foin, 2,4 kg de concentré, et 3,6 kg d'orge »), utilisant des techniques de quantification moléculaire, ont montré chez les

ruminants une évolution de la population bactérienne (Tajima et al., 2000 ; Tajima et al., 2001) avec une :

- chute de la quantité de bactéries cellulolytiques tel que *R. flavefaciens* et *F. succinogenes*. Ceci est donc contradictoire avec les résultats Martin et al. (2001) sans doute en raison des types de rations utilisées (40% de concentrés dans la ration de Martin et al., 2001 contre 25% dans les rations de Tajima et al., 2000 et 2001), ce qui implique la présence différentielle de substrats au sein du rumen et pourrait expliquer les variations observées

- chute du nombre de *T. bryantii* (spirochete saccharolytique) similaire aux bactéries cellulolytiques

- diminution du nombre de *P. ruminicola*, genre qui reste cependant majoritaire

- augmentation du nombre bactéries amylolytiques (*P. bryantii*, *Prevotella* et *S. bovis*)

- diminution du nombre de bactéries xylanolytiques (*E. ruminantium* et *S. dextrinosolvens*).

Des études plus récentes avec des techniques utilisant l'ADN 16S, ont montré des variations des communautés bactériennes du rumen chez les ruminants avec des changements de rations allant de rations riches en fibres vers des rations riches en concentrés. Une étude réalisée chez des bouvillons montre des changements de certaines espèces bactériennes dans le rumen chez les animaux alimentés avec une ration fibre (dont majoritairement *Prevotella* et *Rikenella-like*) que chez ceux alimentés avec une ration à base de blé et plus riche en protéines (dont majoritairement *Prevotella*) (Pitta et al., 2010). Chez des bovins avec une adaptation graduelle d'une ration riche en fibres vers une ration riche en concentrés, il est montré que les populations bactériennes du rumen diffèrent entre les animaux alimentés avec 80% de fibres et ceux alimentés avec 80% de concentrés et que seulement 24 OTU sont communs sur les 398 et 315 OTU observés avec ces deux régimes (Fernando et al., 2010). Les bovins alimentés avec une ration riche en fibres possèdent une population bactérienne ruminale majoritairement composée par le phylum *Fibrobacteres* alors que le phylum *Bacteroidetes* est majoritaire chez des animaux recevant une ration riche en concentrés (Fernando et al., 2010). Cette étude montrait aussi que les espèces bactériennes *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* et *Prevotella bryantii* augmentent quand les animaux passent d'une ration riche en fibres vers une ration riche en concentrés alors que des espèces comme *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Fibrobacter succinogenes* diminuent. De même, une autre étude montre, avec une analyse des populations bactériennes du rumen par pyroséquençage, que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* diminue quand les rations des animaux sont de plus en plus riches en concentrés, en même temps une

augmentation du genre *Bacteroides* et une diminution du genre *Succinivibrio* et une majorité de *Prevotella* chez les animaux avec la ration la plus riche en concentrés (Callaway et al., 2010). Une étude plus récente chez des vaches taries dont la population bactérienne du rumen a été analysé par pyroséquençage montre que les animaux alimentés avec une ration riche en amidon conduit à l'augmentation de l'abondance relative de 3 genres bactériens: *Barnesiella*, *Oribacterium* and *Olsenella* et une diminution de l'abondance relative de nombreux autres genres bactériens minoritaires comme *Rikenellaceae_RC9* et *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio* (Zened et al., 2012).

2. Les additifs microbiens

Des organismes naturels et vivants (bactéries, champignons, levures) peuvent être ajoutés à la ration pour pallier les troubles digestifs des animaux. Certaines suppléments peuvent initier des effets digestifs bénéfiques (mise en place d'un microbiote désirable, modification des conditions environnementales dans lesquelles évoluent les microorganismes...) et empêcher l'établissement d'organismes pathogènes nuisibles (Vandevorde et al., 1991). Ils appartiennent au groupe des probiotiques (micro-organismes vivants (bactéries ou levures) ajoutés comme suppléments à l'alimentation, exerçant un effet bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale, Fuller, 1989) et sont souvent qualifiés de Direct Fed Microbials = DFM. Leurs effets sont variables mais souvent bénéfiques en alimentation animale pour augmenter le gain de poids vif ou la production laitière (Wallace, 1994). Ces microorganismes peuvent agir par :

- production de composés antibactériens comme des acides ou des bactériocines
- compétition avec les organismes indésirables pour la colonisation intestinale et/ou pour les nutriments
- production et/ou stimulation de certaines enzymes
- stimulation de la réponse immunitaire chez l'hôte
- métabolisation et détoxification de composés indésirables (Fuller, 1989).

a. Les bactéries

- *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Enterococcus diacetyladiis* et *Bacillus subtilis* ont été testés comme DFM chez les ruminants. Il s'est avéré qu'ils avaient peu d'effets sur les fermentations ruminales (Ware et al., 1988). Un effet positif de diminution de l'implantation des microorganismes pathogènes intestinaux a été observé chez des animaux « stressés » (Vandervorde et al., 1991). Ils permettent une recolonisation de l'environnement intestinal et

un retour à des fonctions observées chez un animal non stressé. Chez des vaches en début de lactation avec des régimes acidogènes et des bilans énergétiques négatifs, l'addition de *L. acidophilus* engendre une augmentation de la production de lait (Jacquette et al., 1988 ; Ware et al., 1988).

- *Megasphaera elsdenii* est une bactérie, utilisant le lactate, présente dans le rumen des bovins alimentés avec des régimes riches en céréales. In vitro, en présence de glucides rapidement fermentescibles, *M. elsdenii* prévient l'accumulation de l'acide lactique et inverse les voies fermentaires : de l'acétate et propionate vers le butyrate et le valérate (Kung et Hession, 1995). Un changement d'alimentation d'une ration riche en fourrage vers une ration riche en concentré, conduit souvent chez les bovins à des problèmes d'acidoses dues à l'accumulation de lactate. L'activité de *M. elsdenii* de façon générale ne suffit pas alors à métaboliser le lactate produit en grande quantité (Kung et Hession, 1995).

Les effets des bactéries DFM restent très variables (Dawson, 1989). Les bactéries DFM sont de nos jours très peu utilisées en élevage de ruminant car elles sont difficiles à produire en grandes quantités.

b. Les champignons

Martin et Streeter (1995) ont suggéré que les cultures fongiques améliorent l'utilisation du lactate par *Selenomonas ruminantium* en fournissant une source d'acides dicarboxyliques (comme l'acide malique). Chez des vaches en lactation, avec l'ajout d'extraits fongiques à partir d'*Aspergillus oryzae*, une augmentation de la production de lait a été observée (Kung, 2006) à l'inverse de l'étude de Sievert et Shaver (1993) qui n'observent pas d'effet sur la production de lait chez des vaches, en début de lactation, alimentées avec un régime à base d'ensilage de luzerne. L'addition d'*Aspergillus oryzae* dans l'alimentation chez certains ruminants n'a montré aucun effet de celui-ci sur l'ingestion (Sievert et Shaver, 1993 ; Varel et Kreikemer, 1994 ; Chiquette, 1995), la dégradation des fibres (Varel et Kreikemer, 1994), la dégradation de la paille de blé (Gomez-Alarcon et al., 1990), sur le nombre total de bactéries dans le rumen (Chiquette, 1995), sur le nombre total de bactéries cellulolytiques dans le rumen (Varel et Kreikemer, 1994), sur le nombre de protozoaires et de champignons anaérobies dans le rumen (Fondevila et al., 1990), sur le pH ruminal (Fondevila et al., 1990 ; Varel et Kreikemer, 1994) et sur certains produits fermentaires du rumen comme les AGV et l'ammoniac (Fondevila et al., 1990 ; Gomez-Alarcon et al., 1990 ; Varel et Kreikemer, 1994). A l'inverse, d'autres études ont montré un effet de l'addition d'*Aspergillus oryzae* dans

l'alimentation des ruminants sur la digestibilité des fibres (Wiedmeier et al., 1987 ; Gomez-Alarcon et al., 1990), sur le nombre total de bactéries du rumen sans modification du nombre de bactéries cellulolytiques (Fondevila et al., 1990), sur le nombre de bactéries anaérobies du rumen (Varel et Kreikemer, 1994), sur le pourcentage de microorganismes du rumen cellulolytiques (Wiedmeier et al., 1987) et sur certains paramètres fermentaires comme la concentration en AGV et en ammoniac du rumen (Chiquette, 1995).

Ces différentes études révèlent un effet variable de la supplémentation en champignons chez les bovins sur les différents paramètres étudiés mais laissent supposer une possible action bénéfique de cette supplémentation. De nouvelles études dans les années à venir devraient permettre de confirmer ou d'infirmer les effets déjà observés par l'utilisation de nouvelles approches analytiques.

c. Les levures

Depuis de nombreuses années, les levures sont de plus en plus utilisées en alimentation du bétail. Elles sont désormais très souvent ajoutées directement dans les aliments du commerce.

Chez le ruminant (pour la production de viande ou de lait), les levures utilisées appartiennent presque toujours à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (figure 14). C'est un champignon unicellulaire se reproduisant par bourgeonnement ou par fission, appartenant à la classe des ascomycètes, avec une croissance optimale à des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 5,0. Il se développe en conditions aérobie ou anaérobie.

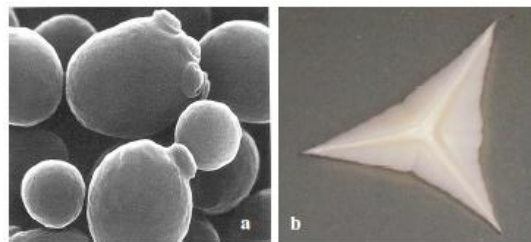


Figure 14 : Image de *Saccharomyces cerevisiae* : (a) en microscopie électronique et (b) sur milieu gélosé (Site internet N°4).

L'action de la levure dépend de sa concentration dans le rumen (CFU/g de contenu ruminal frais) qui doit être supérieure à 10^6 - 10^7 selon Jouany et al. (1994).

i Effet de la levure sur la production et la composition du lait et sur la production de bovins de boucherie :

L'incorporation de levures dans la ration chez des vaches laitières entraîne le plus souvent une augmentation de la production de lait de 0,7 à 2,4 kg de lait/jour (Williams et al., 1991 ; Piva et al., 1993 ; Wallace et Newbold, 1993 ; Durand-Chaucheyras et al., 1997 ; Robinson et Garrett, 1999 ; Dawson, 2000). Une tendance à l'augmentation de la production de lait est observée par Erasmus et al. (1992) et Dann et al. (2000). A l'inverse, une autre étude réalisée par Erasmus et al. (2005) sur 60 vaches, ne montre aucun effet de l'incorporation de levures sur la production laitière. Cette observation montre qu'il existe des différences d'effets de l'incorporation de levures dans les rations sans doute dues à la composition des rations mais aussi à des doses variables ou même à l'utilisation de souches différentes.

Chez la vache laitière, l'incorporation de la levure à la ration n'entraîne pas de changement du TP (taux protéique) mais par contre entraîne une augmentation du TB (taux butyreux) du lait produit par les animaux (Ali Haimoud-Lekal et al., 1999). Chez la bufflonne, Kumar et al. (1992) ont rapporté une augmentation du TP lors d'apport de levures et chez la chèvre, Giger-Reverdin et al. (1996) et Stella et al. (2007) ont observé une augmentation du TB. Ces observations suggèrent que la levure influence aussi la composition biochimique du lait.

La levure semble donc avoir un effet bénéfique, en conditions acidogènes principalement comme décrit dans d'autres études (Mosoni et al., 2007 ; Stern et al., 2007 ; Marden et al., 2008), ce qui serait cohérent avec son pH optimal.

Une supplémentation en levure entraîne une augmentation du gain moyen quotidien (GMQ) quand des taurillons sont alimentés avec une ration acidogène (El Hassan et al., 1993 ; Hancock et al., 1994). Inversement, chez des taurillons alimentés avec une ration contenant 50% de fourrage et 50% de concentré, la levure ne produit aucun effet sur le GMQ (Adams et al., 1981) ni sur l'IC (Indice de consommation ; Edwards et al., 1990). De même, aucun effet de l'incorporation de la levure n'a été observé chez des animaux alimentés avec de la paille d'avoine ou en pâture (Plata et al., 1994 ; Cabrera et al., 2000). Ces études révèlent le besoin de conditions acidogènes pour observer un effet positif des levures.

ii Effet de la levure sur le fonctionnement ruminal :

Chez la vache laitière alimentée avec 50% de concentré, l'incorporation de levure à la ration augmente la digestibilité de la MS, la MAT et le NDF (Weidmeier et al., 1987 ; Gomez-Alarçon et al., 1988 ; Mir et Mir, 1994). Inversement, d'autres études ont montré qu'il

n'y avait aucun effet de la levure sur ces mêmes paramètres chez des ruminants alimentés avec des niveaux de concentrés supérieurs à 50% (Edwards et al., 1990 ; Doreau et Jouany, 1998 ; Beauchemin et al., 2003). Les différences d'effets de la levure sont probablement dues aux différences d'alimentations entre les études avec plus ou moins de fibres et/ou de concentrés mais aussi à la dose et au type de levures utilisées.

La dégradation de la matière azotée conduit à la production d'ammoniac (NH₃) dans le rumen. Chez des animaux supplémentés en levure et recevant une ration riche en concentré, Erasmus et al. (1992) et Arcos-Garcia et al. (2000) ont observé une diminution de la concentration ruminale en NH₃. Inversement, chez des animaux recevant une ration riche en fibres, il n'y a pas d'effet de la levure sur ce même paramètre (Moloney, 1990). La diminution de concentration en ammoniac serait due à une utilisation plus importante par les microorganismes pour la synthèse de protéines microbiennes, associée à une augmentation de la biomasse bactérienne avec la levure, mais n'est pas lié à une diminution de l'activité protéolytiques du microbiote (Harrison et al., 1988 ; Williams et al., 1990).

In vitro, la levure augmente la vitesse de dégradation de la cellulose par stimulation des bactéries cellulolytiques (Callaway et Martin, 1997), avec une augmentation de certaines activités fibrolytiques (xylanases et CMCases, Michalet-Doreau et al., 1997).

L'apport de levure, chez des vaches laitières alimentées avec une ration riche en concentré, conduit à une augmentation de la teneur ruminale en AGV (Doreau et Jouany, 1998) comme chez le bufflon (Koul et al., 1998) et la brebis (Arcos-Garcia et al., 2000). Chez la vache laitière, il a été observé lors d'apport de levures une augmentation de la propionogénèse, ainsi qu'une diminution du ratio acétate : propionate et une légère augmentation de la proportion d'acétate (Erasmus et al., 2005 ; Piva et al., 1993).

La variabilité observée dans l'effet de l'incorporation de la levure à la ration pourrait s'expliquer par le stade physiologique des animaux (Williams et Newbold, 1990) et la nature de la ration (Dawson, 1989). Ainsi, les jeunes ruminants (génisses, vaches laitières en première lactation) qui ne sont pas en phase de production intense telle que la lactation, présentent une fréquence moins importante de troubles alimentaires et une exposition moindre à des rations acidogènes ce qui n'optimise sans doute pas l'action de la levure. Les rations acidogènes riches en amidon et/ou pectines sont utilisés par *S. bovis* pour produire plus d'AGV, ce qui conduit à une diminution du pH et conduit *S. bovis* à produire plus de

lactate, diminuant fortement le pH. Cette diminution de pH engendre une diminution d'activité de *S. bovis* (Cotta, 1992). Dans ces conditions, l'apport de levure stimule *S. ruminantium* et *M. elsdenii*, qui vont utiliser le lactate et donc faire remonter le pH (Russel et Dombrowski, 1980 ; Fiems et al. 1993). Avec une ration riche en fibres, la levure n'a aucun effet sur le pH (Miranda et al., 1996). D'autres études ont montrés que la supplémentation en levures vivantes induisait une stabilisation du pH ruminal et diminuait le risque d'acidose (Chaucheyras-Durand et al., 2008 ; Marden et al., 2008).

Chez des vaches laitières supplémentées en levures et recevant une alimentation acidogène, le nombre de bactéries dans le rumen augmente par rapport au lot témoin sans levures (Weidmeier et al., 1987 ; Harrison et al., 1988). Par contre chez des vaches supplémentées avec la levure recevant une alimentation riches en fibre, la quantité de bactéries dans le rumen ne varie pas entre le lot levure et le lot témoin (Dawson, 1989). Chez des moutons alimentés avec une ration acidogène et supplémentés avec de la levure, la quantité de bactéries cellulolytiques (*F. succinogene*, *R. albus* et *R. flavefasciens*) est supérieure par rapport aux moutons témoins (Chaucheyras et al., 1997). *In vitro*, la croissance de la bactérie utilisatrice de lactate *M. elsdenii* est stimulée par la présence des levures (Rossi et al., 1995). Des synthèses récentes montrent que la supplémentation en levures vivantes agit directement sur les communautés qui dégradent les fibres au sein du rumen par son action au niveau de la consommation d'oxygène (Chaucheyras-Durand et al., 2008 ; Marden et al., 2008), l'utilisation des sucres et la production de vitamines (comme des vitamines du groupe B) permettant d'augmenter leurs densités et promouvoir l'activité fibrolytique (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010).

Chez des béliers supplémentés en levures, un effet est observé sur le pourcentage de différents types de protozoaires dans le rumen avec une augmentation significative du pourcentage de *Diplodinium*, de *Dasytrichia*, une diminution de *Epidinium* et une tendance vers une diminution de *Entodinium* (Galip, 2006).

Au vu des résultats concernant l'effet de la supplémentation en levure sur de nombreux paramètres, Wallace (1994) propose différents modes d'actions possibles de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur les performances des animaux (Figure 15).

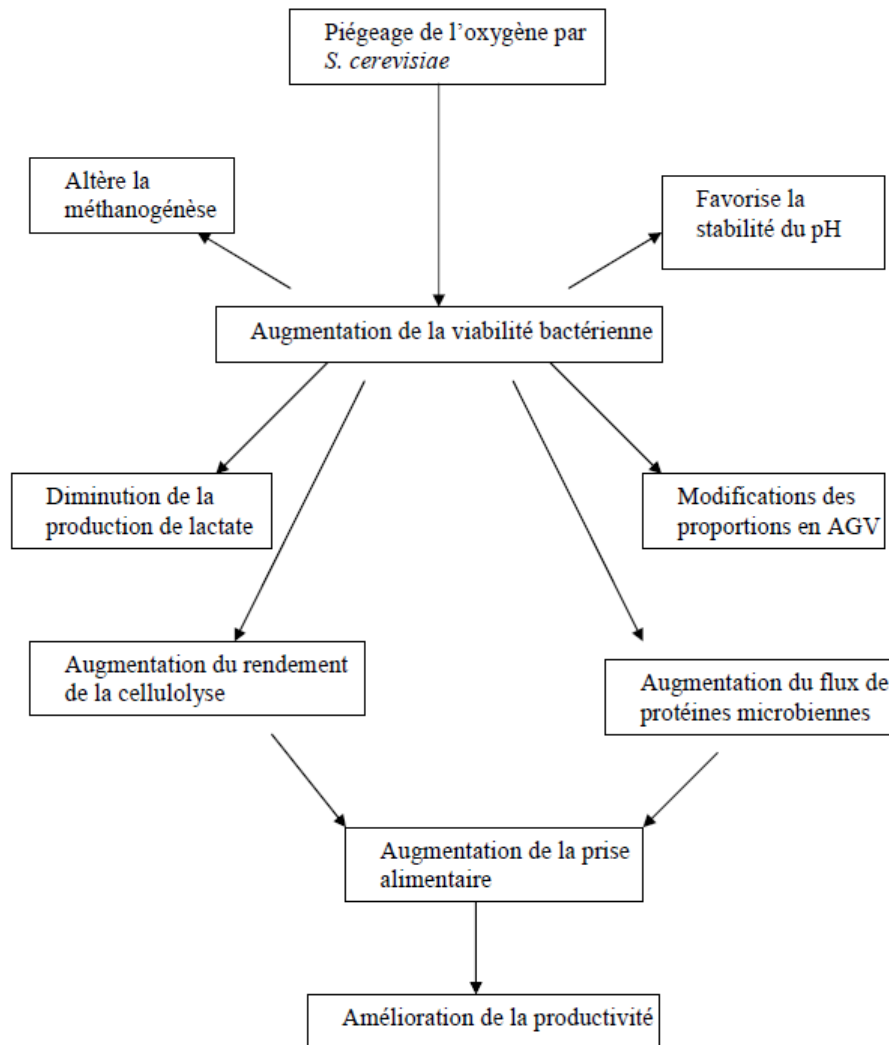


Figure 15 : Mode d'action présumé de *S. cerevisiae* sur les performances de l'animal (d'après Wallace, 1994).

3. Autres facteurs de variation qui influencent la composition du microbiote ruminal

De nombreuses études ont montré qu'il existe une forte variabilité entre les espèces hôtes. En effet, le microbiote ruminal présente des similarités entre les ruminants domestiques et sauvages (Dehority and Orpin, 1988 ; Nelson et al., 2003), de même les espèces amylolytiques et hémicellulolytiques sont proches entre les ovins et les bovins (Leedle et Hespell, 1980). Mais ces communautés ruminales présentent aussi des différences, chez les ovins, la part de *Firmicutes* varie entre 42 et 73%, la part de *Bacteroidetes* varie entre 25 et 54%, la part de *Spirochaetes* varie de 0 à 19% et celle de *Proteobacteria* entre 0 et 3% alors que chez les bovins, la part de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* est similaire et il est observé

plus de *Proteobacteria* (0 à 27%) que de *Spirochaetes* (0 à 4%). Par exemple chez le Yak, il n'est pas retrouvé de *Proteobacteria* (An et al., 2005). Sultan et al. (2006) a montré que la densité bactérienne dans rumen est plus élevée chez les caprins que chez les ovins.

Il existe aussi au niveau du microbiote ruminal une variabilité inter-individuelle comme démontré chez le mouton (Edwards et al., 2005) ; cette variabilité est aussi observée dans le colon de l'homme et du chien (Zoetendal et al., 1998 ; Simpson et al., 2002 respectivement). Il a été aussi démontré une forte variabilité au niveau des communautés bactériennes attachées à l'épithélium ruminal chez des vaches (McCowan et al., 1980) et une étude réalisé par Larue et al. (2005) montre que 40% des communautés bactériennes varient entre les individus d'une même espèce étudiée (Larue et al., 2005). Mais cette variabilité inter-individuelle semble être de faible ampleur chez l'homme car sa flore dominante varie peu (Zoetendal et al., 1998).

II. Chez le jeune ruminant

Différents facteurs peuvent influencer la colonisation du rumen chez le jeune ruminant.

1 Effet de la ration :

Singh et al. (1988) ont montré, chez le veau alimenté au lait, qu'un apport précoce d'aliment concentré engendre un changement plus rapide d'une population bactérienne dite « juvénile » vers une population bactérienne dite « adulte » que chez des veaux alimentés uniquement avec du lait (apparition de la population microbienne de l'adulte à partir de 30 à 45 jours vs. 90 jours). Chez des jeunes buffles, 3 alimentations différentes ont été testées : une alimentation au lait uniquement, une alimentation par du lactoreplaceur et une alimentation avec un aliment de démarrage pré-sevrage. Il a été observé chez les jeunes buffles alimentés avec un lactoreplaceur ou un aliment de démarrage concentré, que les souches cellulolytiques prédominent dans le rumen, ce qui n'est pas le cas chez des animaux alimentés au lait uniquement (Sudhakar et al., 1983 ; tableau 6).

Espèce bactérienne	Type d'aliment			Global
	Lait entier	Lactoreplaceur	Aliment pré-sevrage	
	(Pourcentage d'incidence)			
<i>F. succinogenes</i>	9,1	13,0	8,9	10,4
<i>R. flavefaciens</i>	10,0	15,0	24,5	14,9
<i>R. albus</i>	13,6	21	13,9	16,3
<i>R. amylophilus</i>	6,4	1,0	6,3	4,5
<i>S. amylolytica</i>	6,4	1,0	5,2	4,2
<i>M. elsdenii</i>	0,9	-	-	0,4
<i>C. lachheadii</i>	-	1,0	-	0,4
<i>C. longisporum</i>	-	-	3,8	1,0
<i>L. multiparus</i>	-	1,0	-	0,3
<i>B. fibrisolvens</i>	17,3	21	8,9	7,6
<i>P. ruminicola</i>	11,3	2,0	8,9	7,6
<i>S. ruminantium</i>	1,8	-	1,3	1,0
<i>S. dextrinosolvens</i>	2,7	-	-	1,0
<i>S. bovis</i>	13,6	21,0	16,4	16,9
<i>E. ruminantium</i>	0,9	2,0	2,5	1,7
<i>Lactobacillus</i> spp.	2,7	1,0	-	1,4
Non identifiée	2,7	-	2,5	1,7

Tableau 6 : Composition de la population bactérienne ruminale chez le jeune en fonction de l'alimentation (d'après Sudhakar, 1983).

Chez les veaux sevrés précocement, le pH ruminal est plus faible que chez des veaux sevrés tardivement car il y a une accumulation d'AGV et une capacité tampon (salive, volume

ruminal et diffusion par la paroi ruminale) pas assez forte (Eadie et Mann, 1970). La capacité tampon du rumen devient plus forte vers 5 semaines chez ces animaux.

De plus chez des animaux sevrés conventionnellement (à 3 mois d'âge), il est observé plus de Lactobacilles que chez des veaux sevrés précocement (à 2 mois d'âge) (Anderson et al., 1987). Eadie et Mann (1970) ont montré que les veaux sevrés avec une alimentation à base de fourrage et de concentré ont une densité plus importante de Lactobacille et *M. elsdenii* (consommateur de lactate) que les veaux recevant uniquement du concentré. Ces auteurs supposent que les populations bactériennes chez les jeunes sevrés précocement ne perdurent pas dans le temps au sein de la flore ruminale.

2 Influence des probiotiques :

Chez les jeunes ruminants, deux types d'additifs alimentaires ont été très étudiés dans la littérature : une bactérie, *Lactobacillus spp.* (dont l'action s'exerce au niveau de l'intestin où elle entre en compétition avec les pathogènes et pourrait diminuer l'incidence des diarrhées) et une levure, *Saccharomyces cerevisiae* (qui stimule les microorganismes du rumen et conduit à une meilleure efficacité alimentaire). Ce deuxième cas sera détaillé dans cette partie car son action serait importante au niveau du rumen.

Des variations au niveau des paramètres fermentaires du rumen (Quigley et al., 1992 ; Kumar et al., 1997) ont été observées en présence de *Saccharomyces cerevisiae* dans la ration respectivement sur des veaux Prim'Holstein de 12 semaines sevrés et des jeunes buffles sevrés de 100 kg. *Saccharomyces cerevisiae* conduit à une augmentation du pH ruminal (Williams et al., 1991) sans avoir d'effet sur l'épithélium ruminal (Leismester et al., 2004).

Chez l'agneau, Chaucheyras-Durand et Fonty (2002) ont observé une stimulation de la croissance des bactéries cellulolytiques lors de l'addition de levures (*Sacharomyces cerevisiae*) avec une implantation de celles-ci plus précoce et une tendance à être plus importantes en nombre jusqu'à 11 jours d'âge chez les agneaux supplémentés par rapport aux agneaux témoins. De même, l'implantation des protozoaires ciliés était plus précoce dans le rumen des agneaux supplémentés en levure que chez les témoins (10 jours pour le groupe levure et 12 jours pour le groupe témoin) (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002). En ce qui concerne l'implantation des bactéries anaérobies, il n'y avait pas de différences entre les animaux supplémentés et les témoins avec une implantation dans les deux cas dès les

premières 48 heures après la naissance (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002). Le pH ruminal était plus bas chez les agneaux supplémentés en levure que chez les témoins la première semaine de vie et à 21 jours d'âge. En parallèle, le E_h ruminal était plus bas chez les agneaux supplémentés au cours des premiers jours après la naissance et durant la période d'accès à l'alimentation solide (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002). Parmi les paramètres fermentaires du rumen, les concentrations en AGV totaux avaient une tendance à être plus hautes chez les animaux supplémentés que chez les témoins de la naissance à 11 jours d'âge avec plus d'acétate, moins de butyrate en proportion et pas de différence pour la proportion de propionate. La concentration en ammoniac ruminal était plus basse chez les agneaux supplémentés en levure que chez les agneaux témoins, sauf à 2 jours d'âge (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002). Ces changements liés à l'apport de levure montrent une accélération de la fonctionnalité et une amélioration de stabilité de l'écosystème ruminal chez le jeune ruminant.

Chez le veau, de la naissance au sevrage, la supplémentation en levure n'a pas eu d'effet sur le gain de poids, l'efficacité alimentaire et le pH ruminal par contre l'ingestion de la matière sèche était plus importante et la concentration en ammoniac, propionate et butyrate était augmentée par rapport aux veaux témoins (Pinos-Rodriguez et al., 2008). L'addition de levure chez le veau entraînerait donc une modification des fermentations ruminales sans impact sur les performances de production en période pré-sevrage.

Chez des agneaux gnotobiotiques (organisme élevé dans un environnement contrôlé, de manière à ce que sa microflore et microfaune soient spécifiques et connues dans leur entièreté), l'effet de levures sur l'implantation de bactéries cellulolytiques inoculées après la naissance et l'évolution des paramètres fermentaires a été étudié (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2001a et 2001b). Dans le groupe supplémenté en levure, le nombre de bactéries cellulolytiques (*F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens*) avait tendance à augmenter plus rapidement dans le rumen que dans le groupe témoin au cours du premier mois après leur inoculation (entre 12 et 42 jours après la naissance des animaux). Ces variations étaient accompagnées, en présence de levure, d'une moindre concentration en azote ammoniacal, d'une plus forte concentration en AGV entre 20 et 50 jours d'âge et d'une augmentation des activités fibrolytiques. Comme chez l'adulte, ces variations sont probablement dues : i) aux nutriments apportés par la levure, ii) à la consommation de l'oxygène par la levure conduisant à un milieu plus propice à leur implantation iii) à un pH ruminal plus adapté au développement des bactéries cellulolytiques.

D'autres probiotiques ont été étudiés comme *Aspergillus oryzae*, avec des effets variables : augmentation du nombre de bactéries anaérobies, hémicellulolytiques et pectinolytiques et une tendance vers l'augmentation de la population bactérienne cellulolytique (Beharka et al., 1991).

3 Autres facteurs de variations chez le jeune ruminant qui influencent la mise en place de l'écosystème ruminal :

Fonty et al. (1987) ont étudié l'implantation du microbiote ruminal chez l'agneau dans différentes conditions de ferme :

- un groupe d'agneaux en troupeau avec leurs mères dont les jeunes tètent directement le lait et qui ont accès à l'aliment solide dès la naissance (groupe 1)
- un groupe d'agneaux en box avec leurs mères dont les jeunes tètent directement le lait et qui ont accès à l'aliment solide à partir de 2 semaines d'âge (groupe 2)
- un groupe d'agneaux en box avec des moutons dont les jeunes sont alimentés uniquement avec un lait de vache (groupe 3)
- et un groupe d'agneaux isolé dont les jeunes sont alimentés avec un aliment d'allaitement uniquement (groupe 4).

Cette étude s'est surtout intéressée à l'implantation des bactéries cellulolytiques et a montré une implantation différentielle entre le groupe 4 et les autres groupes. En effet les agneaux du groupe 4 ne présentaient aucune implantation des bactéries cellulolytiques entre 7 et 56 jours d'âge alors que les groupes 1 et 2 présentent une flore cellulolytique dès 4 et 7 jours d'âge respectivement et dès la fin de la première semaine de vie pour le groupe 3. Des animaux du groupe 4 ont été mis en présence d'animaux du groupe 3, et 5 jours après ce contact, les animaux du groupe 4 dépourvus de bactéries cellulolytiques avant contact présentaient une flore cellulolytique plus faible en densité mais qui dès 10 jours après le contact devenait semblable entre les animaux des différents groupes. Cette étude montre bien que le lien avec la mère ou le contact avec d'autres animaux plus âgés ou même l'environnement des jeunes animaux peut conduire à une implantation différentielle de certaines communautés du microbiote ruminal. Par contre, le peu de différences entre les groupes 1 et 2 montre que l'implantation des bactéries cellulolytiques du rumen n'est pas en lien direct avec l'aliment solide.

Bryant et al. (1958) ont observé que, chez des veaux isolés, il n'y a pas d'implantation des protozoaires ciliés, mais que cela ne modifie pas la capacité digestive de ces animaux. Les protozoaires ciliés apparaissent chez ces animaux quand ils sont mis en présence d'animaux adultes. Des agneaux, mis dans des conditions stériles dès la naissance, ont une implantation de la microflore atypique par rapport à des animaux en conditions classiques. Leur microbiote est composé de nombreuses bactéries aérobies, anaérobies facultatives et anaérobies strictes dont par exemple *Streptococci*, *E. coli*, *Bacteroides* sp., *Bifidobacterium*, *Clostridium* sp., *Clostridium clostridioforme*, *Propionibacterium acnes* qui sont prédominantes et dans une moindre mesure *Lactobacilli* et *Ruminococcus* (Dehority et Orpin, 1988 ; Fonty et al., 1987). La colonisation par des bactéries anaérobies strictes peut avoir lieu même sans contact direct avec d'autres animaux. La stabilisation de cette population est alors plus tardive (Eadie et Mann, 1970).

Un autre facteur de variation a été aussi étudié et joue un rôle dans la maturation du microbiote ruminal chez le jeune ruminant : le sevrage. Anderson et al. (1987) ont montré que les veaux sevrés précocement (4 semaines) ou plus tardivement (6 semaines) ont une mise en place similaire de l'écosystème ruminal mais les veaux sevrés précocement semblent posséder une activité microbienne plus importante que les veaux sevrés plus tardivement. Les variations observées sur certains paramètres fermentaires ou au sein du microbiote du rumen après le sevrage montrent que le passage d'une alimentation à base de lait et d'aliment solide à une alimentation uniquement solide induit un développement graduel de l'écosystème ruminal avec les variations induites par l'apport de nouveaux substrats (Vasquez-Anon et al., 1993).

En résumé, le rumen chez des animaux adultes est un écosystème dense et complexe dont le microbiote (bactéries, archées, protozoaires et champignons) permet de dégrader et fermenter les aliments ingérés par l'animal. Le microbiote ruminal possède un large spectre d'activités enzymatiques qui permet de dégrader les fibres, l'amidon (hydrolyses, fermentations, hydrogénations) et les protéines (protéolyse) des rations alimentaires. La dégradation fermentaire par le microbiote conduit à la formation de produits utilisables par l'animal ou le microbiote lui-même (AGV, ammoniac etc.) et qui conditionnent en partie le pH du rumen. Cet écosystème est en constante associations et

toute variation des substrats dans le milieu ruminal peuvent l'impacter. Chez le jeune ruminant, cet écosystème semble s'implanter très rapidement dès les premières 48 heures après la naissance par contamination liée à l'environnement extérieur à l'animal (contact ou non avec la mère, alimentation, autres animaux, air etc.). Cette implantation est séquentielle et temporelle comme observé chez l'agneau majoritairement et le microbiote devient stable à partir de 3 mois d'âge.

L'implantation des micro-organismes du rumen est fortement dépendante de l'environnement et de l'alimentation de l'animal. Pour qualifier cela, les travaux ont permis de montrer l'impact de la ration ou d'additifs alimentaires sur les paramètres physico-chimiques, fermentaires et le microbiote du rumen (bactéries et des protozoaires surtout) par des méthodes culturales. Pour le moment, peu d'études se sont intéressées à la mise en place et l'effet de l'alimentation et/ou des additifs sur les activités enzymatiques et sur le microbiote ruminal dans sa globalité (bactéries, archées, protozoaires) dès le plus jeune âge, et ce par des techniques de biologie moléculaire.

ÉTUDE

EXPÉRIMENTALE

Chapitre 1- PRÉSENTATION GÉNÉRALE - OBJECTIFS

Chez l'agneau, la colonisation du microbiote ruminal a été grandement décrite comme temporelle et séquentielle. Cette colonisation du rumen est très rapide car dès les premières 24 heures après la naissance, une population bactérienne apparaît (avec une part importante de bactéries anaérobies facultatives et aérobies). Suite à cette première colonisation du rumen, d'autres communautés bactériennes s'implantent (dont les anaérobies stricts). Ces communautés bactériennes sont plus complexes et connues fonctionnellement comme les bactéries fibrolytiques, amylolytiques, utilisatrices de lactate et bien d'autres. Rapidement l'implantation des bactéries est suivie par la colonisation des champignons et des archées bien avant l'arrivée de l'alimentation solide. Plus tard, les protozoaires s'implantent dans le rumen au moment de l'augmentation de l'alimentation solide. Les études chez le veau, révèlent aussi une mise en place précoce des microorganismes dans le rumen. Ces études se sont surtout intéressées, à des âges précoces, à qualifier la présence de communautés bactériennes aux fonctions connues comme les bactéries fibrolytiques, amylolytiques, ou encore utilisatrices de lactate. Un manque important de données persiste sur la séquence précise et temporelle d'implantation taxonomique des différentes composantes des communautés dans le rumen, surtout au cours des premiers jours de vie.

Les approches culturelles, limitées par la connaissance des conditions de cultures des micro-organismes étudiés, s'opposent aux approches taxonomiques basées sur le séquençage du matériel génétique. Le développement des techniques de biologie moléculaire offre à la fois une vision globale (à la limite de l'exhaustivité) et une vision précise d'une communauté microbienne, notamment via les techniques de pyroséquençage et de qPCR. Ces techniques semblent adaptées pour étudier la colonisation temporelle d'un écosystème riche et complexe, comme l'est l'écosystème ruminal. Ces nouvelles techniques permettent une caractérisation du microbiote étudié plus en profondeur, rapidement et sur un grand nombre d'échantillons.

Au regard de ces éléments, ce travail propose de contribuer à l'apport de connaissances sur la colonisation et l'acquisition des fonctions du rumen chez le veau de race laitière dès la naissance.

Ainsi, les objectifs de ce travail sont triples : i) caractériser par des méthodes moléculaires la colonisation temporelle et fonctionnelle de l'écosystème ruminal chez le veau d'élevage laitier de la naissance au sevrage ii) caractériser par des méthodes moléculaires la maturation de l'écosystème ruminal chez le veau d'élevage laitier en période post-sevrage, et

ii) étudier l'impact de l'apport d'une flore exogène (la levure *Saccharomyces cerevisiae*) sur la colonisation temporelle et fonctionnelle de l'écosystème ruminal chez le veau d'élevage laitier en périodes pré- et post-sevrage.

Pour répondre à ces objectifs, deux expérimentations ont été réalisées : la première expérimentation a été mise en place afin de caractériser la colonisation de l'écosystème ruminal par des techniques de microbiologie moléculaire pour l'étude de la composition taxonomique et de la densité totale des communautés bactériennes et des archées et par dénombrement pour les protozoaires. Dans cette même étude, la caractérisation du microbiote ruminal a été complétée par l'étude des paramètres physico-chimiques de l'environnement du rumen (pH et Eh) ainsi que les paramètres fermentaires (AGV et l'ammoniac) et les principales activités enzymatiques (fibrolytique, amylolytique, protéolytique et uréolytique).

Une deuxième expérimentation a été mise en place avec l'objectif d'étudier les effets d'un facteur de variation potentiel de la colonisation du rumen par le microbiote. Comme vu dans la partie bibliographique, certains facteurs de variation, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou bien les changements alimentaires, ont été souvent étudiés chez les ruminants avec des efficacités plus ou moins démontrées. Pour cela, les paramètres envisagés lors de l'expérimentation 1 ont été utilisés pour étudier l'effet de la supplémentation d'un probiotique (*Saccharomyces cerevisiae*). Cette expérimentation s'est poursuivie au-delà du sevrage, permettant ainsi d'étudier la maturation de l'écosystème ruminal et l'effet des levures sur celle-ci en période post-sevrage.

Dans un premier temps les matériels et méthodes des différentes expérimentations réalisées seront présentés. Dans un deuxième temps, les différents résultats des deux études seront présentés sous forme d'articles (acceptés, soumis ou en préparation).

Chapitre 2- MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dans cette partie seront abordées les modalités générales des méthodes expérimentales et des deux protocoles réalisés, ainsi que les méthodes analytiques utilisées. L'essai 1 porte sur l'étude de l'implantation du microbiote ruminal (bactéries, archées et protozoaires) et la mise en place des paramètres et fonctions ruminales (pH/ E_{it} , AGV, ammoniac, activités xylanases, amylases, uréases et protéases). L'essai 2 porte sur l'étude de l'effet de l'addition de levures vivantes par voie orale sur la colonisation du rumen (avec les mêmes paramètres que pour l'essai 1) en période pré- et post-sevrage. Les calculs et les analyses statistiques effectuées à partir des données de chaque essai seront détaillés dans chaque article.

Les 2 essais sur les veaux, que ce soit en terme de logement ou de manipulation des animaux, ont été réalisés en conformité avec les lignes directrices pour la recherche animale du Ministère français de l'Agriculture (Anonyme, 1988).

I. Animaux et plan expérimental

Les 2 essais se sont déroulés sur le domaine de Borret de l'INP-ENSAT à Poucharramet (France) sur la période décembre 2009-mai 2010 pour l'essai 1 et janvier 2011-novembre 2011 pour l'essai 2. Ces 2 essais ont été réalisés sur des veaux de race Prim'Holstein (race laitière couramment utilisée en France) immédiatement séparés de leurs mères à la naissance, avec un poids moyen à la naissance de $45,8 \pm 1,7$ kg et $46,5 \pm 2,3$ kg respectivement pour les essais 1 et 2. La séparation des veaux des mères à la naissance est une pratique courante en élevage de génisse. Dans notre expérimentation, elle permettait aussi d'éviter des différences de contamination des veaux par les mères. Les veaux ont été logés dans une nurserie, dans des box individuels ($1,05 \times 2,30$ m, sur litière paillée) permettant d'éviter le contact direct entre les veaux et avec les animaux adultes (ce qui permettait de standardiser l'expérimentation). Cependant dans l'essai 2, les veaux ont été transférés en box commun à 90 jours. Une préparation des locaux a été réalisée 15 jours avant le début de chaque essai, avec un nettoyage minutieux à haute pression, et une désinfection au grésil (à 5%). Ce nettoyage a été suivi par une semaine de vide sanitaire. Avant le début de l'expérimentation, un veau sain de 2 semaines d'âge a été mis une journée entière dans chaque box individuel afin de réaliser une pré-contamination des box et de l'environnement, afin que les premiers veaux entrés en essai ne soient pas dans un environnement initial moins contaminé que les derniers veaux.

- Essai 1 : L'étude a été réalisée sur 5 mâles et 1 femelle, de la naissance (J1) à J83 (avant le sevrage). Pour des raisons d'approvisionnement, les entrées en expérimentation ont été réparties entre le mois de décembre 2009 et le mois de février 2010 (figure 16).

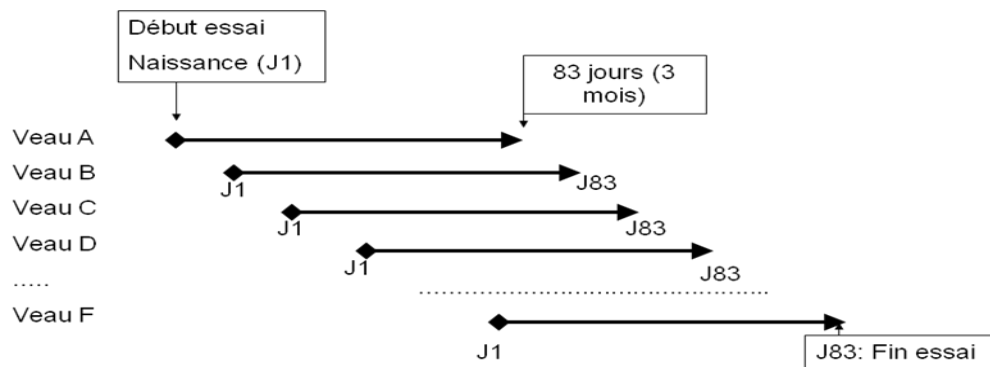


Figure 16 : planning de l'entrée des veaux en essai.

- Essai 2 : l'étude a été réalisée sur 12 mâles, de la naissance au sevrage (2 mois d'âge) puis du sevrage à 4 mois d'âge. Entre la naissance (J1) et 3 mois d'âge, les veaux ont été logés en box individuels, puis en box communs entre 3 et 4 mois. Les veaux ont été répartis en deux lots de 6 veaux, un lot témoin et un lot levures. Au fur et à mesure des naissances, les veaux ont été affectés à un des lots de façon alternée (Figure 17). Pour des raisons d'approvisionnement, les entrées en expérimentation ont été étalées entre le mois de janvier 2011 et le mois de juin 2011. Jusqu'à l'âge de 3 mois, les levures (levures vivantes Sc 47 Actisaf®, 10^{10} CFU/g de sphérules, 1,4 g/jour/veau) ont été mises en suspension dans 30 ml d'eau à 40°C et administrées aux veaux du lot levures juste avant le repas de lait du matin à l'aide d'une seringue droguese, directement dans la bouche de l'animal. Le lot témoin recevait un placebo (30 ml d'eau à 40°C, administrés de façon identique). Après l'âge de 3 mois, les levures ont été distribuées en mélange avec une petite quantité (20 g) de tourteau de soja, avant le début du repas et le lot témoin recevait 20 g de tourteau de soja seul. A 3 mois d'âge, les veaux du lot témoin ont été transférés dans un box commun, et ceux du lot levures dans un autre box commun (figure 17). L'administration de la levure ou du placebo aux veaux n'a pas été réalisée en double aveugle.

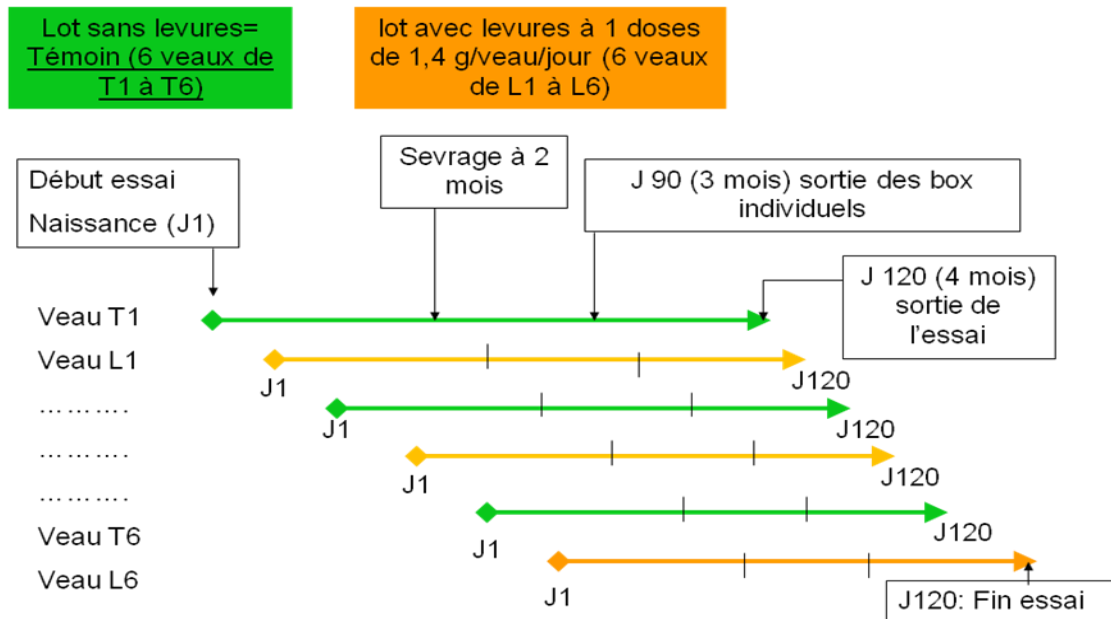


Figure 17 : Planning de l'essai 2, avec 6 veaux témoins et 6 veaux dans le lot levures

II. Alimentation

Dans les deux essais, l'alimentation des veaux a été réalisée de la façon suivante : une période d'alimentation colostrale a été suivie d'une période avec une ration comprenant un aliment d'allaitement du commerce, du concentré de démarrage en granulé et du foin de prairie temporaire. Le colostrum, l'aliment d'allaitement reconstitué et le concentré ont été distribués en seaux individuels à 8 heures et 17 heures pour le colostrum, à 8 heures et 16 heures pour l'aliment d'allaitement et à 9 heures et 17 heures pour le concentré, y compris lorsque les veaux étaient en box collectifs, après l'âge de 3 mois dans l'essai 2. Le foin était distribué en râtelier à 9h et 17h. Chaque veau avait à sa disposition de l'eau potable renouvelée quotidiennement. Toutes les quantités distribuées de lait, de concentré de démarrage et de foin ont été enregistrées individuellement tous les jours ainsi que les refus. Les quantités d'aliments distribuées aux animaux ont été ajustées aux recommandations habituelles pour l'élevage des génisses avant et après sevrage. La composition chimique du lait de remplacement, du foin et du concentré a été déterminée à partir d'échantillons prélevés tous les 15 jours au cours de chaque période expérimentale et poolés avant analyses.

- Essai 1 : Le premier repas après la naissance a été distribué à moins de 2 h après la naissance avec 2 litres de colostrum. Le colostrum était un colostrum de mélange (avec une teneur moyenne en protéines de $33,7 \pm 7,1\%$ de la matière sèche) qui a été congelé juste avant

le début de l'essai et décongelé juste avant la distribution afin que tous les veaux reçoivent le même colostrum (pour standardiser l'expérimentation). La teneur en IgG n'a pas été déterminée au cours de l'essai. Jusqu'à 3 jours après la naissance, chaque veau recevait deux fois par jour un repas de 1,5 litre de colostrum décongelé. De 4 à 83 jours, tous les veaux ont été nourris avec un aliment d'allaitement selon le plan d'alimentation recommandé par le fournisseur (tableau 7). Le lait a été reconstitué à 124 g de poudre de lait / litre d'eau chaude (à 50°C). En parallèle chaque veau a reçu quotidiennement un concentré de démarrage en granulé et du foin de prairie temporaire au cours du premier, deuxième et troisième mois après la naissance avec respectivement 0,4 et 0,125 kg / jour ; 2,4 et 0,4 kg / jour et 5,8 et 0,8 kg / jour.

- Essai 2 : Les deux premiers repas après la naissance étaient constitués de colostrum maternel (1,5 litre/repas) : le premier repas était réalisé dans les 2 heures après la naissance (avec une teneur en protéine moyenne de $58,59 \pm 1,56\%$ de matière sèche). Le choix d'utiliser du colostrum maternel dans cet essai est dû à un problème de stockage du pool congelé de colostrum (réalisé comme dans l'essai 1) avant le début du deuxième essai. De plus le choix de distribuer le colostrum qu'une journée est due à la difficulté lors du deuxième essai d'être limité en quantité de colostrum maternel chez les éleveurs. De 2 à 60 jours, tous les veaux ont été nourris avec un aliment d'allaitement selon le plan de rationnement recommandé par le fournisseur, mais avec un sevrage plus précoce que dans l'essai 1 (tableau 7). Le lait a été reconstitué à 124 g de poudre de lait / litre d'eau chaude (50°C) et à partir du 61^{ème} jour, le lait n'était plus distribué (sevrage). De 4 à 90 jours, chaque veau a reçu quotidiennement un concentré de démarrage en granulés et du foin de prairie temporaire : respectivement 0,25 et 0,25 kg / jour, 0,50 et 0,50 kg / jour, 1,00 et 2,00 kg / jour le premier, deuxième et troisième mois après la naissance. Au cours du 4^{ème} mois, chaque veau recevait 2,50 kg / jour de concentré de démarrage et du foin de prairie temporaire à volonté.

<u>Périodes</u> (Mois)	<u>Périodes</u> (semaine)	Poudre de lait distribuée (g/jour) <u>Essai 1</u>	Poudre de lait distribuée (g/jour) <u>Essai 2</u>
<u>1 mois</u>	1	A partir de 4 jours 620 g	A partir de 2 jours 620 g
	2	620 g	620 g
	3	750 g	750 g
	4	880 g	880 g
<u>2 mois</u>	5	880 g	750 g
	6	880 g	500 g
	7	750 g	375 g
	8	500 g	250 g
<u>3 mois</u>	9	370 g	
	10	370 g	
	11	240 g	
	12	240 g	

Tableau 7 : Quantité d'aliment d'allaitement distribuée aux animaux dans les essais 1 et 2.

III- Mesures et échantillonnages

Dans les deux essais, des échantillons de contenu ruminal (environ 500 ml) ont été prélevés à l'aide d'une sonde œsophagienne (diamètre intérieur 13 mm et 1,5 mètre de longueur), stérilisée avant l'utilisation avec du Stéranios à 2% (Centravet 803910, bactéricide, fongicide, sporicide et virucide, utilisé pour la désinfection du matériel chirurgical et médical ou des équipements d'endoscopie), 1 h après le repas de lait du matin et juste avant la distribution de foin et de concentré de démarrage. L'horaire de prélèvement a été choisi suite à des pré-essais afin d'éviter une gêne à l'animal suite à l'intubation. Il permettait aussi d'avoir du contenu ruminal à prélever, surtout au cours des premiers jours de vie de l'animal, et d'obtenir un contenu ruminal homogène. Les échantillons de contenu ruminal prélevé ont été séparés en deux fractions égales (figure 18).

La première a été utilisée directement pour la mesure du pH et du potentiel redox. Le pH, le potentiel redox (E_h), et la température ont été mesurés en utilisant 3 électrodes : une électrode de pH en verre (pH Unitrode LL, 60259100, Metrohm, Villebon-sur-Yvette, France), une électrode de platine E_h (Pt SC, 60351100, Metrohm), et une thermo-électrode (Pt 1000, 61110100, Metrohm) connectées à un pH-mètre numérique (modèle Metrohm 713, Herisau, Suisse) plongées dans un récipient en verre rempli complètement et fermé hermétiquement afin de limiter le contact de l'échantillon avec l'air. Les valeurs de pH et E_h ont été enregistrées après 20 min de stabilisation comme recommandé par Andrade et al. (2002) et Kimse et al. (2009). Comme l'électrode de référence Ag-AgCl a été utilisée pour mesurer le potentiel redox du contenu ruminal, toutes les différences de potentiel mesurés directement ont été corrigées à l'aide de la formule : $E_h = E_0 + C$, où E_0 est le potentiel de l'électrode de platine, et C est le potentiel de l'électrode de référence Ag-AgCl par rapport à l'électrode standard à hydrogène, c'est-à-dire + 199 mV à 39°C. En ce qui concerne l'essai 2 uniquement, après la mesure du pH et du E_h , le contenu ruminal a été récupéré et filtré à travers un tissu en polyester (250 μ m de maille) et de ce filtrat, 10 g de contenu a été additionné à 2.5g de glycérol puis conservé à -20°C jusqu'au dénombrement des levures.

La seconde fraction de contenu ruminal (environ 250 ml) a été filtrée sur un tamis métallique (1,6 mm de maille). A partir de la fraction filtrée, 5 échantillonnages ont été réalisés et rapidement conservés (à -20°C ou -80°C) avant leur analyse comme présentés dans la figure 18. Une portion représentative (50 g) a été mélangée avec 25 ml d'un tampon MES de pH 6,5 [0,025 M, l'acide 2 - (N-morpholino) éthanesulfonique] pour la détermination des activités enzymatiques selon le procédé de Martin et al. (1995) et de la teneur en matière sèche (48 h à 104°C). Cette partie n'est pas réalisée en anaérobiose comme conseillé dans la littérature car des pré-essais ont montré des résultats similaires en anaérobiose ou non. Par contre, accroître la durée de conservation de l'échantillon brut entraînait une diminution rapide de l'activité. Suite à ces pré-essais (données non publiés), le dosage des activités enzymatiques a été réalisée le plus tôt possible après la prise de l'échantillon, avec un délai identique pour tous les échantillons. Huit mL du filtrat ont été échantillonnés avec 10% de chlorure mercurique (à 2% en poids / volume) pour la détermination ultérieure des AGV et de l'ammoniac ruminal ; 0,2 g a été recueilli dans un eppendorf stérile (avec 0,2 g de billes de verre de broyage de 0,1 mm de diamètre et 4 perles de verre de 4 mm de diamètre) pour l'extraction d'ADN ; 3 ml d'échantillon de contenu ruminal tamisé ont été mélangés avec 3 ml de solution de formol-methylgreen (3,5% de formaldéhyde, Sigma, France; 0,14 M de NaCl,

Sigma, France; 0,92 mM de methylgreen, Sigma, France) pour le dénombrement des protozoaires. Enfin, 3 mL de filtrat des échantillons du rumen (filtration sur tamis à 1,6 mm de maille) ont été mélangés avec 13 mL de solution tampon (19,5 g/L de Na₂HPO₄ 12H₂O, 9,24 g/L de NaHCO₃, 0,705 g/L de NaCl, 0,675 g/L de KCl, 0,108 g/L de CaCl₂ 2H₂O, et 0,180 g/L de MgSO₄ 7H₂O, Sigma, France) préchauffée à 39°C à pH 6,8 pour la mesure *in vitro* de la production de gaz.

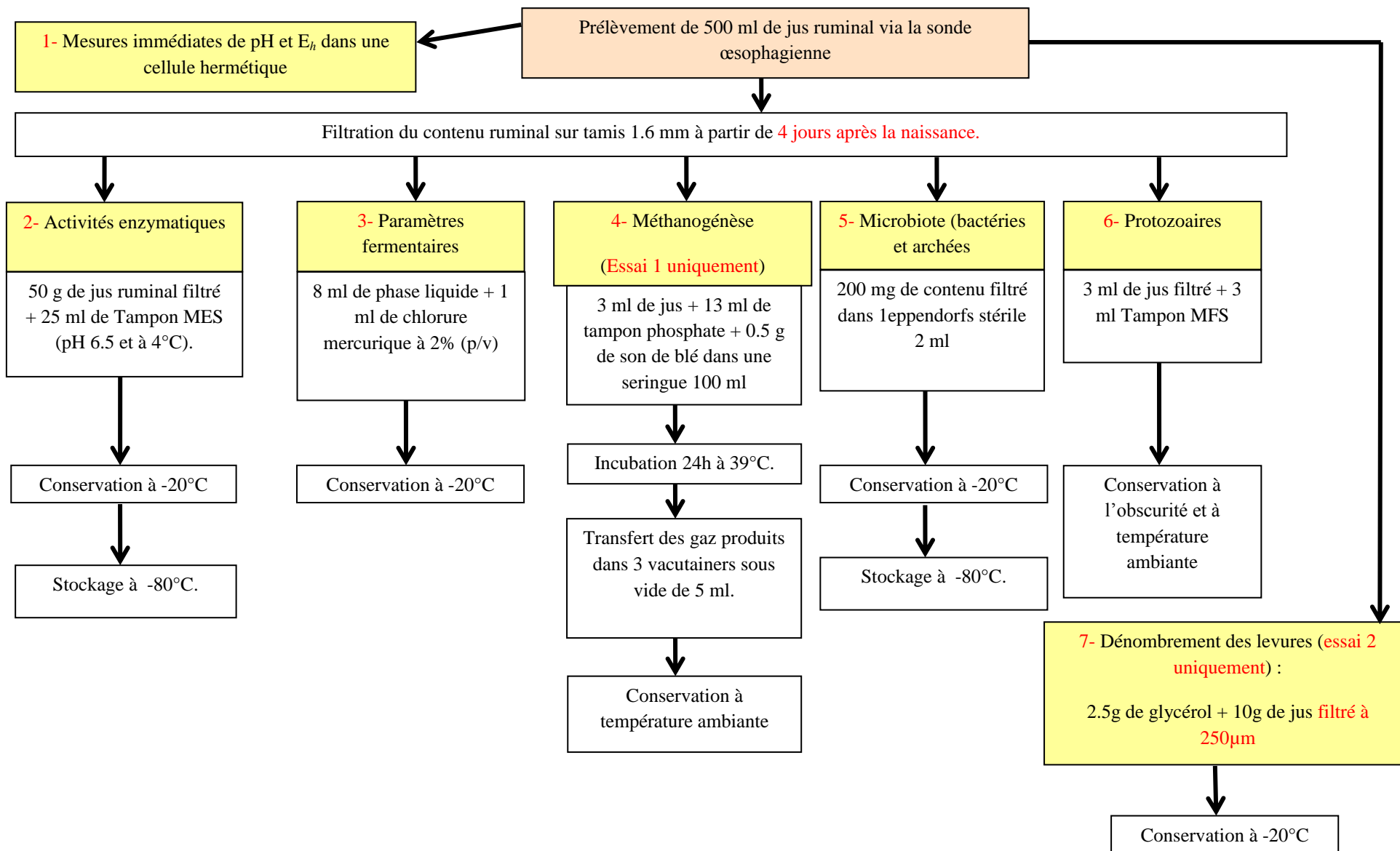


Figure 18 : Récapitulatif de la répartition et du traitement des prélèvements de contenu ruminal dans les essais 1 et 2.

- Essai 1 :

Les prélèvements destinés à l'analyse des paramètres fermentaires, du pH/E_h, des activités enzymatiques et du microbiote (qPCR archées et bactéries, protozoaires) ont été réalisés pour chaque veau tous les jours entre 1 et 10 jours et ensuite, les jours 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50, 55, 62, 69, et 83. Les échantillons de contenu ruminal destinés à l'analyse par pyroséquençage des archées et des bactéries ont été prélevés sur chaque veau tous les jours de 1 à 10 jours d'âge et par la suite les jours 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 50, 62 et 83. Ces jours diffèrent de ceux utilisés pour les autres prélèvements car seulement 132 échantillons peuvent être pyroséquencés en même temps.

- Essai 2 :

Lors de cet essai, les jours prélèvements de contenu ruminal ont été réajustés en fonction des résultats observés lors de l'essai 1, ce qui a permis de diminuer le nombre de certains prélèvements en période pré-sevrage et d'en réaliser plus en période post-sevrage. Les prélèvements destinés à l'analyse des paramètres fermentaires, du pH/E_h, des activités enzymatiques et du microbiote (qPCR archées et bactéries, protozoaires) ont été réalisés pour chaque veau les jours 1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 40, 60, 63, 70, 80, 90 et 120. Les échantillons de contenu ruminal destinés à l'analyse par pyroséquençage ont été prélevés sur chaque veau les jours 2, 7, 12, 18, 22, 40, 60, 70, 80, 90 et 120.

IV-Analyses chimiques

Les concentrations en AGV ont été déterminées en utilisant la méthode de chromatographie en phase gazeuse d'après Playne (1985) et modifié par Marden et al. (2008). La détermination de la concentration en ammoniac ruminal a été basée sur la réaction de Berthelot avec la méthode Skalar à l'aide d'un test colorimétrique, d'après Krom (1980).

V-Détermination des activités enzymatiques

Pour les deux essais, les échantillons de contenu ruminal ont été décongelés à température ambiante et une partie a été soumise à désintégration par ultrasons à 4°C (4 cycles de 30 s avec 30 s de repos entre chaque cycle), puis centrifugés (20 000 g, 15 min à 4°C) pour séparer les débris cellulaires et les enzymes (Martin et Michalet-Doreau, 1995).

Seul le surnageant (appelé échantillon enzymatique) a été utilisé pour le dosage des activités enzymatiques et a été congelé à -80°C jusqu'au dosage. L'autre partie de l'échantillon a permis de déterminer la teneur en matière sèche (48 h à 104°C).

Les activités xylanase et amylase (μmol de sucre réducteur libéré / h / g de matière sèche du contenu ruminal) ont été déterminées selon la méthode décrite par Martin et al. (1994) mesurant la libération de sucres réducteurs à partir de substrats (xylane et amidon, respectivement Sigma X-0502 et S-2004; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) pendant 1 h à 39°C avec 1 ml de l'un des deux substrats (2 mg / ml dans du tampon MES, pH 6,5 à 0,0025 M) et 0,1 mL d'échantillon enzymatique. Le mélange était ensuite mis à incuber 7 min à 100°C pour arrêter la réaction d'hydrolyse. Les sucres réducteurs ont été quantifiés par spectrophotométrie à 410 nm après une réaction avec l'acide 4-hydroxybenzoïque hydrazide pendant 15 min à 75°C (Lever, 1977).

L'activité protéolytique [unités de densité optique à 420 nm / h / g de matière sèche de contenu ruminal] a été mesurée après l'hydrolyse de 0,5 mL d'azocaséine (2% poids / volume de 0,1 M de tampon phosphate citrate à pH 6,8) avec 0,4 ml d'échantillon enzymatique pendant une heure à 39°C . La réaction a été stoppée par addition de 0,5 ml d'acide trichloracétique (15% poids / volume). L'hydrolyse de l'azocaséine (Sigma A-2765, Saint Quentin Fallavier, France) libère un groupement « azo » qui induit une coloration jaune mesurée par spectrophotométrie à 420 nm (Eun et Beauchemin, 2005).

L'activité uréolytique (μg de $\text{NH}_3\text{-N}$ libéré / min / g de matière sèche de contenu ruminal) a été déterminée uniquement dans l'essai 1, en mesurant la production de $\text{NH}_3\text{-N}$ après 15 min d'incubation à 37°C de 0,125 ml d'échantillon enzymatique + 0,125 ml d'urée (15 mg d'urée Sigma U-5378 et de 8 mg d'EDTA Sigma E-9884 dans 25 ml de tampon phosphate) + 0,25 ml de tampon phosphate. La réaction a été stoppée par addition de 2,5 ml de solution de phénol (1 g de phénol et de 5 mg de $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau distillée) et de 2,5 ml d'une solution de NaOH (0,5 g de NaOH et 0,84 ml de NaClO dans 100 ml d'eau distillée). La mesure de la libération de $\text{NH}_3\text{-N}$ a été réalisée par spectrophotométrie à 665 nm (Moharrery et Das, 2001).

Les activités enzymatiques peuvent être exprimées en activité totale (par heure et par g de matière sèche de contenu ruminal ou par heure et par ml de contenu ruminal frais) ou spécifique (par heure et par mg de protéines dans le contenu ruminal). Les trois modes d'expression ont été testés, mais les expressions par ml de contenu frais ou par mg de

protéines ont conduit à une forte variabilité en raison de la variabilité de la teneur en matière sèche du contenu ruminal et de la variabilité de la teneur en protéines. Il a donc été choisi d'exprimer les activités enzymatiques par g de matière sèche de contenu ruminal.

VI- Mesure et analyse *in vitro* de la production de méthane

Cette mesure n'a été réalisée qu'au cours de l'essai 1. Les contenus ruminiaux prélevés les jours 1, 5, 10, 15, 22, 29, 33, 36, 40, 43, 50, 62 et 83 du contenu ruminal ont été utilisés pour mesurer la production de gaz *in vitro*. Les échantillons de contenu ruminal et de tampon phosphate ont été incubés pendant 4 heures à 39°C dans une seringue de 100 mL fermée hermétiquement, dépourvue d'oxygène, et contenant 0,5 g de son de blé comme substrat (2 répétitions par échantillon). Le gaz total produit lors de l'incubation a été mesuré puis transféré dans 5 vacutainers de 5 ml (sous vide et secs, Centravet, France) afin d'éviter toute perte et toute contamination externe, puis stockés à température ambiante jusqu'à l'analyse. Les concentrations de cinq gaz (CO₂, H₂, O₂, N₂ et CH₄) ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse (µGC Varian CP4900, Pays-Bas) avec de l'argon comme gaz vecteur et une colonne concentrique divisé en 2 (Alltech colonne CTR1, Alltech, France). La colonne interne, garnie de silice, permet la séparation du CO₂ des autres gaz. La colonne externe, contenant un tamis moléculaire, permet la séparation des autres gaz : O₂, N₂, H₂ et CH₄. Aucune quantification n'a été tentée, mais nous avons seulement caractérisé l'absence ou la présence de méthane.

VII-Dénombrement des protozoaires

Le comptage des protozoaires, a été fait en utilisant une cellule de Thomas (Fisher Scientific, France) sous microscope (Leitz Biomed microscope, Nuremberg, Allemagne). Les protozoaires ciblés étaient les protozoaires ciliés : entodiniomorphes (*Entodinium* de taille inférieure à 100 µm et les *Entodinium* de taille supérieure à 100 µm) et les holotriches (*Dasytricha* et *Isotricha*). Si le nombre de protozoaires dépassait 300 dans une cellule de comptage, l'échantillon était dilué avec un facteur adéquat dans du tampon phosphate salin (PBS, 0,01 M à pH 7,4, Sigma, France). Le comptage de l'échantillon dilué était alors réalisé à nouveau.

VIII-Quantification des bactéries et des archées

1. Extraction de l'ADN

L'ADN total de chaque échantillon de contenu ruminal a été extrait par combinaison d'une action mécanique, chimique, et une lyse thermique par l'action du FastPrep (MP Biomedicals, Illkirch, France) et du QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) dans les conditions décrites par le fabricant. L'échantillon d'ADN obtenu a été élué dans un volume final de 25 µl de tampon AE (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) et conservé à -20°C. La pureté et la quantité d'ADN extrait dans chaque échantillon ont ensuite été déterminées avec le spectrophotomètre Nano-Drop ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, Allemagne). La concentration en ADN extrait dans les échantillons variait entre 1,22 et 1430,93 ng / µL de contenu ruminal frais pour l'essai 1 et entre 7,2 et 726,5 ng / µL de contenu ruminal frais pour l'essai 2. La forte variabilité de la quantité d'ADN extrait dans les échantillons aurait rendu difficile l'analyse de densités bactériennes, aussi les résultats ont été exprimés en abondances relatives, c'est-à-dire que pour chaque échantillon la somme des abondances relatives de tous les taxa observés est de 100%.

2. qPCR en temps réel

La quantité absolue des bactéries totales par qPCR a été mesurée à partir de l'ARNr 16S et est exprimée en nombre de copies de gène d'ARNr 16S / g de contenu ruminal frais. Les analyses ont été effectuées avec le système ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France) à l'aide d'une plaque optique de 384 puits dans un volume final de 10 µL. La technologie en qPCR par le SYBR Green a été utilisée et le mélange réactionnel contient l'ADN matrice (2,5 µL d'ADN de l'échantillon extrait), un couple d'amorces spécifiques à 100 nM pour le sens 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' (position 338-357 sur E. coli) et l'antisens 5' ATTACCGCTGCTGG 3' (position 518-534 sur E. coli) d'après Fierer et al. (2005) et 1 X de PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Le programme de la PCR se composait de 10 min à 95°C, suivies de 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C. Une courbe de dissociation a été ajoutée au dosage SYBR Green pour vérifier la spécificité de l'amplification. Puis, les résultats ont été comparés avec une courbe standard pour obtenir le nombre de copies dans l'échantillon. La courbe d'ADN standard a été générée par l'amplification d'une série de dilution (facteur 10) d'un plasmide de référence contenant l'ARNr 16S cibles (N° d'accèsion EF445235 : *Prevotella*

bryantii). Les résultats de qPCR ont été analysés à l'aide du logiciel SDS version 2.3 (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France).

La quantité absolue d'archées totales a été mesurée à partir du nombre de copies de gène ARNr 16S/g de contenu ruminal frais. Les analyses ont été effectuées à l'aide de l'appareil ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) avec des plaques optiques de 384 puits dans un volume final de 10 µL. La technologie qPCR TaqMan a été utilisée pour la quantification des archées. Le mélange réactionnel contient l'ADN des échantillons à analyser, un mélange d'amorces (100 nM) et de 250 nM de la sonde TaqMan (5' CTCCCCCGCCAATT 3', position chez E coli = 818-931, d'après Combes et al., 2011) et une TaqMan® universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). Le programme de la PCR consistait en 10 min à 95°C, suivies de 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60°C. Les amorces spécifiques des archées utilisées sont pour le sens 5' GGYCGCAAGGCTGAACTTAA 3' (position 894-914 chez E. coli) et l'antisens 5' CAGGCTCCACSCGTTGT 3' (position 935-951 chez E. coli) (Combes et al., 2011). Les résultats ont été comparés avec une courbe standard pour obtenir le nombre de copies cibles dans l'échantillon. La courbe d'ADN standard a été générée par l'amplification d'une série de dilution (facteur 10) d'un plasmide de référence contenant l'ARNr 16S cible (N° d'accension DSM861 : *Methanobrevibacter smithii*). L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel SDS version 2.3 (Applied Biosystems, Saint Aubin, France).

Chaque échantillon a été analysé en double pour le dosage en qPCR et ré-analysé à la fois pur et dilué en cas de valeurs aberrantes.

Les différences de méthodes utilisées pour les qPCR proviennent du choix des amorces. En effet, la méthode de qPCR par la Taq Man est plus spécifique que la méthode par SYBR Green mais plus difficile à mettre en œuvre. La sonde Taq Man doit s'hybrider sur une zone conservée comprise entre les 2 amorces d'intérêt et avoir une température d'hybridation de 10°C supérieure à celle des amorces utilisées, ce qui est le cas avec la qPCR archées. De plus les amorces utilisées pour la qPCR bactéries sont très spécifiques et ne forment aucun dimère et donc l'approche SYBR Green a été préférée. Les qPCR ainsi utilisées fonctionnent de façon optimale dans les 2 cas et sont spécifiques des populations ciblées.

IX-Characterisation du microbiote par pyroséquençage 454

1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des échantillons de contenu ruminal était la même que pour la qPCR (partie VIII 1).

2. Marquage de l'ADN cible par PCR

Pour le pyroséquençage 454 de la population des bactéries, les échantillons d'ADN ont été amplifiés avec deux amorces spécifiques ciblant les régions hypervariables V3-V4 sur les gènes d'ARNr 16S et reliés avec l'identificateur de multiplexage (MID tag : 11 pb) qui est unique pour chaque échantillon (selon le modèle suivant : 5' A-MID tags-NN-primer sens 3' et 5' A-MID tags-NN-primer antisens 3'; Eurogentec, Angers, France). Les amorces spécifiques des bactéries totales utilisées étaient en sens 343F (5' TACGGRAGGCAGCAG 3'; d'après Liu et al, (2007)) et en antisens 784R (5' TACCAGGGTATCTAATCCT 3'; d'après Anderson et al, (2008)) avec un amplicon estimé à 460 pb. Le mix PCR a été réalisé avec 1 µL de l'échantillon d'ADN extrait, 0,5 µM de chaque amorce, 1X de tampon PCR, 100 µM de dNTP, 0,5 unité de IsisTM DNA polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) dans un volume total de 100 µL. Le programme de la PCR réalisée a été : 2 min à 92°C, suivies de 32 cycles de 30s à 94°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C et à la fin 7 min à 72°C.

Pour le pyroséquençage 454 de la population d'archées (essai 1 seulement), l'amplification des échantillons d'ADN du contenu ruminal a été réalisée en réaction PCR nichée. La première PCR a été réalisée avec deux amorces archées pour la sens 86F (5' GCTCAGTAACACGTGG 3', d'après Zhou et al., (2009) et pour l'antisens 1040R (5' GGCCATGCACYWCYTCTC 3', adaptée de l'amorce 1000R d'après Zhou et al. (2009)). Le mélange de la première PCR contenait un mélange de 1 µL de l'échantillon d'ADN, 0,5 µM de chaque amorce, 1X de tampon PCR, 100 µM de dNTP, 0,5 unité de l'ADN polymérase IsisTM (MP Biomedicals, Illkirch, France) dans un volume total de 100 µl avec de l'eau. Le programme de la PCR consistait en : 2 min à 92°C, puis 32 cycles de 30s à 94°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C et à la fin 7 min à 72°C. La seconde PCR a été réalisée avec deux amorces spécifiques contenant les régions hypervariables V3 à V5 du gène de l'ARNr 16S et reliées avec l'identificateur de multiplexage comme présenté ci-dessus pour les bactéries. Les amorces utilisées étaient en sens 340F (5' CCCTACGGGGYGCASCAG 3'; adapté de Gantner et al. (2011)) et pour l'antisens 915R (5' GTGCTCCCCCGCCAATT 3'; adapté de Wang et Qian, (2009)). Le mélange réactionnel de la deuxième PCR a été réalisé avec 1 µl de

l'échantillon d'ADN précédemment amplifié, 0,5 μM de chaque amorce, 1X de tampon PCR, 100 μM de dNTP, 0,5 unité de l'ADN polymérase IsisTM (MP Biomedicals, Illkirch, France) dans un volume total 50 μL avec de l'eau. Le programme de la PCR réalisée était : 2 min à 92°C, puis 32 cycles de 30s à 94°C, 30s à 60°C, 30s à 72°C et à la fin 7 min à 72°C.

Pour les pyroséquençages de bactéries et d'archées, les amplicons générés à partir de chaque échantillon d'ADN ont été purifiés avec le kit MinElute PCR Purification (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne). Les tailles des amplicons purifiés ont été vérifiées sur gel d'agarose 2% (poids / volume). La pureté et la quantité des produits de PCR purifiés ont été déterminées et analysées en utilisant un spectrophotomètre ND-1000 NanoDrop. Ces même amplicons purifiés ont été quantifiés plus précisément à l'aide du Kit Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay (Invitrogen, France) sur un système de détection de séquence ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France), puis utilisé pour la préparation des mix d'ADN dans des quantités équimolaires pour une concentration finale d'ADN à 500 ng/ μL pour chaque librairie. Les amplicons de chaque librairie ont été pyrséquencés à l'aide de l'appareil 454 GS FLX Titanium (454 Sciences de la Vie-une société Roche, Branford, CT, USA) séquenceur à la plateforme GeT (Genomic et Transcriptomic) à l'INRA de Toulouse (France).

3. Analyse des séquences

Pour le run des bactéries de l'essai 1, les 16S pyrotags obtenus à partir du pyroséquenceur 454 GS FLX Titanium ont été triés en fonction de leurs tags respectifs pour former un total de 132 pyrotags représentant les 132 échantillons prélevés dans le rumen. Les séquences ont été filtrées à l'aide d'un script Python développé par la plate-forme bioinformatique de Toulouse : 16SCleaner

(<https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/wiki/ng6/index.php/16SCleaner>). Ont été exclues les séquences : qui ne correspondaient pas à la séquence d'amorces utilisée en PCR (avec 2 mésappariements souhaités), avec une longueur trop faible (moins de 150 nt), avec au moins une base ambiguë ou avec un homopolymère trop long (plus de 9 bases identiques). Pour tous les pyrotags 16S, les tags et les adaptateurs ont été supprimés. La longueur des séquences était de 407 ± 11 nt. Le nettoyage et l'alignement ont été effectués à l'aide du logiciel Mothur (V.1.17; Schloss et al., 2009) et l'affiliation taxonomique a été réalisée en utilisant le RDP-classificateur sur une base de données SILVA avec un bootstrap de 60 et seuls les taxa avec une abondance relative moyenne supérieure à 0.1% ont été considérés (Pruesse et al., 2007). Les lectures ont été assignées à des unités taxonomiques

opérationnelles (OTU, avec un cut-off de 0,03) par le calcul de la distance par paire entre les alignements de séquences. Les données taxonomiques de classification bactériennes ont été normalisées et standardisées.

Pour le run des archées de l'essai 1, les 16S pyrotags obtenus à partir du pyroséquenceur 454 GS FLX Titanium ont été triés en fonction de leurs tags respectifs pour former un total de 92 pyrotags seulement sur 138 échantillons recueillis dans le rumen (les autres échantillons n'ont pas pu être amplifiés). Les séquences ont été filtrées à l'aide d'un script R et le package Biostrings R (R Development Core Team, 2011). Les séquences qui ne correspondaient pas à la séquence d'amorces utilisée en PCR (avec 2 mésappariements souhaités), avec une longueur de séquences trop courtes (moins de 300 nt), avec au moins une base ambiguë ou avec un homopolymère trop long (plus 7 bases) ont été supprimées. Pour tous les pyrotags 16S, les tags et les adaptateurs ont été supprimés. La longueur des séquences était de 501 ± 22 nt. Le nettoyage et l'alignement ont été effectués à l'aide du logiciel Mothur (V.1.17; Schloss et al., 2009). L'affiliation taxonomique a été réalisée en utilisant le RDP-classificateur sur une base de données SILVA avec un bootstrap de 60% (Pruesse et al., 2007). Les lectures ont été assignées à des unités taxonomiques opérationnelles (OTU, avec un cut-off de 0,03) comme pour le run des bactéries. Les données taxonomiques de classification archées ont été normalisées et standardisées.

Pour le run des bactéries de l'essai 2, les 16S pyrotags obtenus à partir du pyroséquenceur 454 GS FLX Titanium ont été triés en fonction de leurs tags respectifs pour former un total de 131 pyrotags sur les 132 échantillons prélevés dans le rumen (perte d'un échantillon qu'il a été impossible d'amplifier). Les séquences ont été filtrées à l'aide d'un script Python développé par la plate-forme bioinformatique de Toulouse : 16SCleaner. Les séquences qui ne correspondaient pas à la séquence d'amorces utilisée en PCR (avec 2 mésappariements souhaités), avec une longueur trop faible (moins de 150 nt), avec au moins une base ambiguë ou avec un homopolymère trop long (plus de 9 bases identiques) ont été supprimées. Pour tous les pyrotags 16S, les tags et les adaptateurs ont été supprimés. La longueur des séquences était de 431 ± 1 nt. Le nettoyage et l'alignement ont été effectués à l'aide du logiciel Mothur (V.1.21; Schloss et al., 2009). L'affiliation taxonomique et les lectures ont été réalisées comme pour le run des bactéries de l'essai 1.

La synthèse de l'ensemble des différents travaux et expérimentations réalisés est présentée dans le tableau 8.

Travaux	Articles	Animaux	Facteurs ou paramètres étudiés	Mesures et techniques	Modèle statistique
Expérimentation 1	Article 1	Veaux Prim' holstein N=5 mâles et 1 femelle	Âge, Individus	Ingestion (mesures quotidiennes) Poids (mesures bimensuelles) pH et E _h (mesures <i>ex vivo</i>) AGV et NH ₃ (CPG et colorimétrie) Activités xylanase, amylase, protéase et uréase (réaction enzymatique et colorimétrie)	Mesures répétées Effet linéaire, quadratique et cubique de l'âge, Détermination de classes d'âge par le package TREE
	Article 2	Veaux Prim' holstein N=5 mâles et 1 femelle	Âge, Individus	Bactéries : densité, abondance relative, taxonomie et indices de diversité (qPCR SYBR GREEN, pyroséquençage 454, détermination d'OTU et indices de diversités)	Mesures répétées, Détermination de classes d'âge par le package TREE
	Article 3	Veaux Prim' holstein N=5 mâles et 1 femelle	Âge, Individus	Archées : densité, abondance relative, taxonomie et indices de diversité (qPCR TaqMan, pyroséquençage 454, détermination d'OTU et indices de diversités) Protozoaires : densité et identification (dénombrement sur cellule de Thomas) Méthanogénèse <i>in vitro</i> (<i>In vitro</i> en seringue et CPG)	Mesures répétées, Détermination de classes d'âge par le package TREE
Expérimentation 2	Article 4	Lot témoin : Veaux Prim' holstein N=6 mâles Lot levures : Veaux Prim' holstein N=6 mâles	Âge, Individus, supplémentation en levure, Sevrage	Ingestion (mesures quotidiennes) Poids (mesures bimensuelles) pH et E _h (Mesures <i>ex vivo</i>) AGV et NH ₃ (CPG et colorimétrie) Activités xylanase, amylase et protéase (Réaction enzymatique et colorimétrie)	Mesures répétées
	Article 5	Lot témoin : Veaux Prim' holstein N=6 mâles Lot levures : Veaux Prim' holstein N=6 mâles	Âge, Individus, supplémentation en levure, Sevrage	Bactéries : densité, abondance relative, taxonomie et indices de diversité (qPCR SYBR GREEN, pyroséquençage 454, détermination d'OTU et indices de diversités) Archées : densité (qPCR TaqMan) Protozoaires : densité et identification (Dénombrement sur cellule de Thomas)	Mesures répétées Détermination de classes d'âge par le package TREE

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 8 : Résumé des éléments principaux des expérimentations et du découpage en articles.

Chapitre 3- Etude expérimentale 1 : Etude de la mise en place des paramètres physico-chimiques et des paramètres fermentaires du rumen ainsi que l'implantation du microbiote ruminal chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage (à 83 jours).

ARTICLE 1

Mise en place des activités enzymatiques et de la capacité fermentaire dans le rumen chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage

(publié dans « Journal of Dairy Science »)

Afin de mieux caractériser les modalités de la mise en place de la fermentation ruminale et des activités enzymatiques chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage (à 83 jours), une première expérimentation *in vivo* a été réalisée sur 6 veaux Prim'Holstein, immédiatement séparés de leur mère à la naissance. Ces animaux ont été nourris avec du colostrum pendant 3 jours et par la suite, alimentés avec un aliment d'allaitement, du concentré de démarrage en granulés et du foin. Des échantillons de contenu ruminal de chaque veau ont été prélevés tous les jours pendant les 10 premiers jours d'âge, et ensuite les jours 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50, 55, 62, 69 et 83. Ces prélèvements ont été réalisés avec une sonde œsophagienne 1 heure après la buvée de lait du matin. Le pH et le potentiel redox (E_h) ruminal ont été immédiatement mesurés. Les concentrations en ammoniac et AGV ainsi que les activités xylanase, amylase, protéase et uréase ont également été déterminées. Le jour de la naissance, le pH ruminal était en moyenne de 6,69, le E_h ruminal était positif (+224 mV) et les AGV et les activités xylanase et amylase n'étaient pas détectés. A partir de 2 jours d'âge, des AGV et des activités xylanase et amylase ont été détectés et le E_h devenait fortement négatif, variant entre -150 à - 200 mV entre 2 et 83 jours d'âge. Entre 2 et 4 jours, les activités amylase et protéase étaient faibles. Entre 2 et 15 jours d'âge, la concentration moyenne en AGV totaux était de 19,5 mM, la concentration moyenne en ammoniac était de 60,1 mg / L avec un pic entre 4 et 22 jours. Entre 10 et 40 jours, le pH diminuait à 5,82, puis remontait à 6,34 à 43 jours et restait stable ensuite. Entre 15 et 83 jours, les concentrations en AGV et en ammoniac et les activités xylanase et amylase devenaient progressivement stables. L'activité uréolytique n'évoluait pas avec l'âge des animaux. En conclusion, les activités fermentaires et enzymatiques sont rapidement mises en place dans le rumen dès 2 jours d'âge. La plupart de ces paramètres n'évoluent plus après un mois d'âge.

Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning

M. Rey,^{*†} F. Enjalbert,^{*†1} and V. Monteils,^{*†‡}

Journal of Dairy Science 95 (2012)1500-1512.

^{*}INRA, UMR 1289 TANDEM, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[†]Université de Toulouse, INPT-ENSAT, INP-ENVT, UMR 1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[‡]Present address: VetAgro Sup Campus agronomique, Unité de recherches Elevage et Production de Ruminants, F-63370 Lempdes, France

¹**Corresponding author:** f.enjalbert@envt.fr

23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3

Phone: +33 5 61 19 32 70

Fax: +33 5 61 19 38 87

Email address: f.enjalbert@envt.fr

Interpretative summary

Establishment of **ruminal** enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves **from birth** through weaning. By *Rey et al.*, page***. The aim of this study was to characterize the establishment of fermentation parameters in dairy calves. At d 1 after birth the ruminal redox potential value was positive and xylanase or amylase activities and volatile fatty acids were not detected. At d 2 after birth, the negative ruminal redox potential as well as the presence of xylanase and amylase activities and the detection of fermentation end products (volatile fatty acids and ammonia nitrogen) reflected a fermentative activity. These activities varied from d 2 to 1 month after birth and then stabilized.

Running head: ESTABLISHMENT OF FERMENTATION PARAMETERS IN CALVES

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize the establishment of ruminal fermentation and enzymatic activities in dairy calves from birth to weaning (d 83). Six Holstein calves, immediately separated from their mother at birth, were fed colostrum for 3 d after birth, and thereafter milk replacer, starter pelleted concentrate and hay until d 83 of age. Ruminal samples were collected from each calf every day for the first 10 days, and additionally at d 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50, 55, 62, 69, and 83. Ruminal samples were collected 1h after milk feeding with a stomach tube. The pH and redox potential (E_h) were immediately measured. Samples were kept for further determination of ammonia nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$) and volatile fatty acids (VFA) concentrations, and xylanase, amylase, urease and protease activities. Ruminal pH averaged 6.69, 5.82 and 6.34, from d 1 to 9, d 10 to 40 and d 43 to 83 of age, respectively. At first day of life, the ruminal E_h value was positive (+224 mV). From d 2 to 9, d 10 to 40, and d 43 to 83 of age, ruminal E_h averaged -164, -115 and -141 mV, respectively. From d 1 to 3, d 4 to 22 and d 26 to 83 of age, $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration averaged 60.1, 179.8 and 58.2 mg/L, respectively. No VFA were detected in ruminal samples collected on d 1 of life of calves. From d 2 to 10 and d 12 to 83 of age, ruminal total VFA concentration averaged 19.5 and 84.4 mM, respectively. Neither ruminal xylanase or amylase activities were observed at d 1 of age. From d 5 to 15 and d 19 to 83 of age, the xylanase activity averaged 182.2 and 62.4 μmol of sugar released /h/g of ruminal content DM, respectively. From d 2 to 4 and d 5 to 83 of age, the amylase activity reached 3.1 and 35.4 μmol of sugar released /h/g of ruminal content DM. The ruminal ureolytic activity was observed with an average value of 6.9 μg of $\text{NH}_3\text{-N}$ released /min/g of ruminal content DM over the 83-d experimental period. From d 1 to 4 and d 5 to 83 of age, the proteolytic activity was 8.2 and 27.9 optical density units per hour per g of ruminal content DM, respectively. The fermentative and enzymatic activities were rapidly established in the rumen from d 2 after birth. Most parameters did not evolve anymore after one month of age.

Key word: dairy calf, ruminal pH and redox potential, fermentation, enzymatic activities.

INTRODUCTION

From birth to 3 wk of age, young ruminants are described as preruminants, because rumen is considered as not anatomically and physiologically mature (Warner, 1956; Bryant et al., 1958; Tamate et al., 1962), with a small volume relative to the whole digestive tract compared with adults, and the mucosa is not developed (Smith, 1961). In preruminants, the first functional compartment of the digestive system is the abomasum, which plays a major function in the digestion of milk (Longenbach and Heinrichs, 1998). The establishment of a digestive activity in the rumen needs water, a dietary substrate and a microbial activity. Passage of liquid into the abomasum of young ruminants is controlled by the esophageal groove (Orskov et al., 1970). Wise and Anderson (1939) observed that milk consumption induces the closure of the esophageal groove in calf and that milk directly passes to the abomasum. In calves drinking only milk and water in a bucket from d 20 to weaning, Wise and Anderson (1939) showed that up to 40% of milk and about 95% of water intake can enter into the rumen. Consequently milk could constitute the first substrate for fermentation in the rumen. Bryant et al. (1958) and Bryant and Small (1960) showed that there is a rapid set up of the microbiota in the rumen of calves during the first week of life. In lambs, Fonty et al. (1987) went a step further showing that there is a temporal and sequential establishment of microbiota and ruminal functions during the first 10 d after birth.

In commercial dairy herds, when solid food intake increases with age of calves, milk allowance is gradually decreased until weaning. Suarez et al. (2006) showed, in pre-weaned dairy calf, that solid feed intake stimulates microbial proliferation and VFA production in the rumen, which reflects the capacity of ruminal microbiota to degrade feedstuffs. Anderson et al. (1987), Beharka et al. (1991) and Chaucheyras-Durand and Fonty (2002) observed an increase of fermentative activity in the rumen of young calf and lamb up to 1 month of age. The main enzymatic activities (fibrolytic, amylolytic, proteolytic and ureolytic) of ruminal microbiota have been observed in the rumen as soon as d 4 (Sahoo et al., 2005) or 10 of age (Kmet et al., 1986a). However, as far as we are aware, the establishment of ruminal activity immediately after birth has not been investigated. Moreover, from the first week of life, Chaucheyras-Durand and Fonty (2002) measured a strongly negative redox potential in the rumen of lambs, which indicated that the ruminal environment already is a high reducing milieu, as observed in dairy cows (Marden et

al., 2008; Julien et al., 2010) and in heifers (Monteils et al., 2011). However, oxydo-reducing status of rumen in newborn calves at birth still remains unknown.

The aim of the present study was to characterize the establishment of fermentative ruminal functions in the pre-weaning period of dairy calves. The main physico-chemical and fermentation parameters of the rumen and the main enzymatic activities were measured from birth to the weaning day at d 83 of age with special focus between d 1 to 10 after birth in order to ascertain when the rumen becomes functional in calves.

MATERIALS AND METHODS

All animal housing and handling procedures were in accordance with the Guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 1988).

Animals, Experimental Design, and Diets

The study was carried out on 5 male and 1 female Holstein calves from birth (d 1) to d 83 (before weaning). Calves were immediately separated from their mothers at birth and weighed (mean initial BW = 45.8 ± 1.7 kg). They were housed in a nursery, in individual pens (1.05×2.30 m, bedded with straw) to avoid direct contact between calves and mature animals. The first meal after birth was given less than 2 hours after birth with 2L of frozen-thawed colostrum. Until d 3, each calf was offered twice a day a meal of 1.5 L of frozen-thawed colostrum (CP = $33.7 \pm 7.1\%$ of DM) distributed in a separate bucket at 0900 and 1700.

From d 4 to 83, all calves were fed milk replacer: 620 g/d from d 4 to 14, 750 g from d 15 to 21, 880 g from d 22 to 42, 750 g from d 43 to 49, 500 g from d 50 to 56, 370 g from d 57 to 70, and 240 g from d 71 to 83. The milk replacer was reconstituted at 124 g of milk powder / L of warm water (38°C). In addition, all calves were allocated daily a pelleted starter concentrate and a low quality meadow hay at first, second and third month after birth: 0.2 and 0.06 kg, 1.2 and 0.2 kg, and 2.9 and 0.4 kg, respectively. Feeds were distributed daily and individually, in separate buckets, in two equal meals at 0800 and 1600 for milk replacer, and at 0900 and 1700 for hay and starter concentrate. Each calf had available clean water controlled daily. All amounts of milk replacer, starter concentrate and hay offered and refused were recorded daily and individually. Chemical composition of milk replacer, hay and concentrate (Table 1) was determined from samples taken every 15 d during the experimental period.

Table 1. Chemical composition of milk replacer, starter concentrate and hay fed to calves from d 4 to 83

	Feed ingredients		
	Milk replacer ^{1,2}	Starter concentrate ^{3,4}	Hay
DM, %	94.5	88.4	90.8
	DM basis (%)		
OM	93.0	91.6	92.7
CP	22.8	17.8	8.4
NDF	ND ⁵	21.6	74.5
ADF	ND	10.2	45.1
Ether Extract	18.1	2.7	0.7
Starch	4.4	37.6	ND

¹Contained : skim milk powder SPRAY (50 %, DM basis), whey powder SPRAY, vegetable oils and fats, products and by-products of cereal grains and fructo-oligosaccharides.

²Containing Cu (10 mg/kg), Fe (45 mg/kg), butylated hydroxytoluene, vitamin A (25,000 IU/kg), vitamin D3 (5,000 IU/kg), vitamin E (100 mg/kg), vitamin B1 (10 mg/kg), vitamin B2 (8 mg/kg), vitamin C (200 mg/kg), vitamin K3 (4 mg/kg).

³On a DM basis (%): 31 barley, 15 wheat, 13 husked sunflower cake, 10 corn, 10 maize germ meal, 7 sunflower cake, 5 wheat middling's and traces of sugar cane molasses, rapeseed meal.

⁴Containing vitamin A (7,000 IU/kg), vitamin D3 (1,500 IU/kg), vitamin E (20 mg/kg), vitamin B1 (10 mg/kg).

⁵ND = not determined.

Sampling and Measurements

Samples of whole ruminal contents were obtained from each calf every day between d 1 and 10 and additionally at d 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50, 55, 62, 69, and 83 after birth. Rumen samples (approximately 500 mL) were collected via a stomach tube (internal

diameter 13 mm), sterilized before use with 2% Steranios (Centravet 803910, disinfection of surgical and medical equipment, endoscopy equipment and heat-sensitive instruments with a bactericidal, fungicidal, sporicidal and virucidal), 1 h after the milk morning meal and just before the distribution of hay and starter concentrate. It was separated in two equal fractions. The first one was used to fill completely a glass-collecting vessel in order to limit the contact of ruminal content with air. The pH, redox potential (E_h), and temperature measurements were carried out using 3 electrodes. A glass pH electrode (Unitrode pH LL, 60259100, Metrohm, Villebon-sur-Yvette, France), an E_h platinum electrode (Pt SC, 60351100, Metrohm), and a thermo-electrode (Pt 1000, 61110100, Metrohm) connected to a digital pH-meter (Metrohm model 713, Herisau, Switzerland) were dipped into the vessel without any air entrance. Both pH and E_h values were recorded after a 20 min-stabilization period as recommended by Andrade et al. (2002) in vitro and Kimse et al. (2009) in rabbit caecum content.

A representative aliquot (50 g) of the second fraction was mixed with 25 mL of a 6.5 pH-buffer [0.025 M, 2 - (N-morpholino) ethanesulphonic acid], stored at -20°C and then quickly transferred at -80°C. One representative part was used for the determination of enzyme activities according to the method of Martin et al. (1994) and the other part was used to determinate the ruminal DM content (48 h at 104°C).

The remainder fraction (approximately 200 mL) was strained through a metal sieve (1.6 mm mesh) and 8 mL of the filtrate were sampled with 10% of mercuric chloride (2% wt/vol) and stored at -20°C for subsequent VFA and ammonia ($\text{NH}_3\text{-N}$) determinations.

Chemical Analysis

The concentrations of VFA were determined using the gas chromatographic method of Playne (1985), modified by Marden et al. (2008). The determination of $\text{NH}_3\text{-N}$ was based on the modified Berthelot reaction with the Skalar Method followed by a colorimetric test (Krom, 1980).

Determination of Enzymatic Activities

Samples of rumen content were thawed at room temperature and submitted to ultrasonic disintegration at 4°C (4 cycles of 30 s separated by 30 s of rest) then centrifuged (20000 × g, 15 min at 4°C) to separate cellular debris and enzymes (Martin and Michalet-Doreau, 1995). Only the recovered supernatant was used to assay the enzymatic activities (enzymatic sample), and was frozen at -80°C until enzymatic activities measurements.

Xylanase and amylase activities (μmol of sugar released/h/g of total ruminal content DM) were determined according to Martin et al. (1994) by measuring the release of reducing sugars from substrates (xylan and starch, Sigma X-0502 and S-2004, respectively; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) during 1 h at 39°C with 1 mL substrate (2 mg/mL in MES buffer, pH 6.5, 0.0025 M) and 0.1 mL of enzymatic sample. The mixture was incubated 7 min at 100 °C to stop the hydrolysis reaction. Reducing sugars were quantified by spectrophotometry at 410 nm after reaction with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (Lever, 1977).

Ureolytic activity (μg of NH₃-N released/min/g of total ruminal content DM) was determined by measuring the production of NH₃-N after 15 min of incubation at 37°C of 0.125 mL of enzymatic sample, 0.125 mL of urea (15 mg of urea Sigma U-5378 and 8 mg of EDTA Sigma E-9884 in 25 mL of phosphate buffer) and 0.25 mL of phosphate buffer. The reaction was stopped by adding 2.5 mL of phenol solution (1 g of phenol and 5 mg of Na₂[Fe(CN)₅NO], 2H₂O in 100 mL of distilled water) and 2.5 mL of NaOH solution (0.5 g of NaOH and 0.84 mL of NaClO in 100 mL of distilled water). The measurement of NH₃-N released was performed by spectrophotometry at 665 nm (Moharrery and Das, 2001).

The proteolytic activity [optical density (at 420 nm) units/h per g of total ruminal content DM] was measured after hydrolysis of 0.5 mL of azocasein (2% wt / vol in 0.1 M of citrate phosphate buffer pH 6.8) with 0.4 mL of enzymatic sample in one hour at 39°C. The reaction was stopped by adding 0.5 mL of trichloroacetic acid (15% wt / vol). The hydrolysis of azocasein (Sigma A-2765) released an azo groupment which induced a coloration measured by spectrophotometry at 420 nm (Eun and Beauchemin, 2005).

Calculations

Because an Ag-AgCl reference electrode was used to measure ruminal E_h , all differences of potential were corrected using the formula: $E_h = E_0 + C$, where E_0 is the potential of the platinum electrode, and C is the potential of the Ag-AgCl reference electrode compared with the Standard Hydrogen Electrode, i.e. + 199 mV at 39°C.

Statistical Analysis

All data were analyzed using the SYSTAT software (SYSTAT 9, SPSS incorporated, 1998, Chicago IL) and were reported as mean values with standard error. The ruminal physico-chemical parameters, fermentation parameters, enzymatic activities and kinetics of feed intake were analyzed as repeated measures, reporting the within subjects effect of age and the linear, quadratic and cubic components of age effect. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$.

The TREES module of SYSTAT was used to generate age classes for all parameters of this study. When the TREES module put forward only 2 classes, the TREES module was restarted on each of the two classes to tentatively separate sub periods.

RESULTS

Feed Intake

Calves drank daily the total quantity of milk replacer they were allocated. From d 9 of age, on average, calves began to consume starter concentrate. The intake of starter concentrate could be divided into 3 age classes explaining 83% of total variance. From d 4 to 51, d 52 to 69 and d 70 to 83 of age, starter concentrate DM intake was 424 ± 76 , 2096 ± 190 , and 3450 ± 263 g/d, respectively (Figure 1).

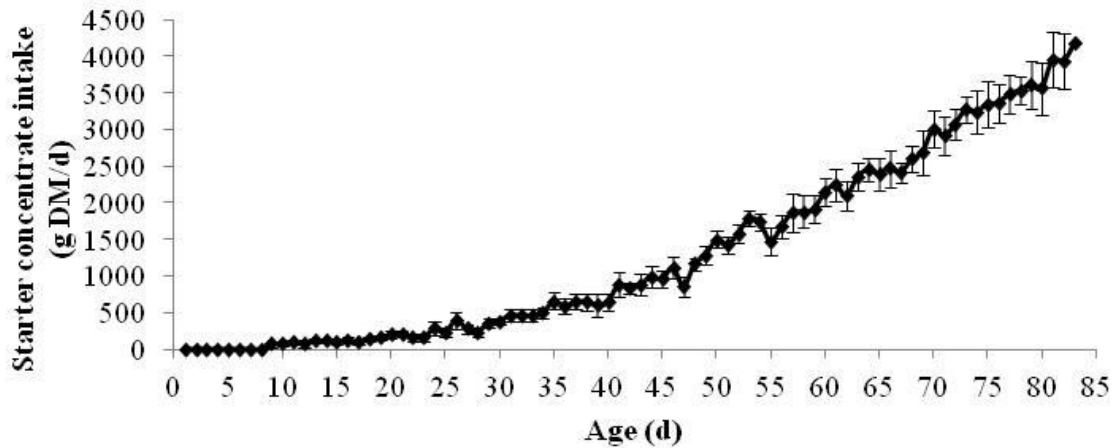


Figure 1. Kinetics of starter concentrates intake (g DM/d) of preweaned calves. Vertical bars show SE.

From d 4 of age, calves began to consume hay. The intake of hay could be divided into 4 age-classes explaining 52% of total variance. From d 4 to 30, d 31 to 57, d 58 to 75 and d 76 to 83 of age, hay DM intake was 56 ± 19 , 195 ± 50 , 360 ± 66 and 564 ± 105 g DM/d, respectively (Figure 2).

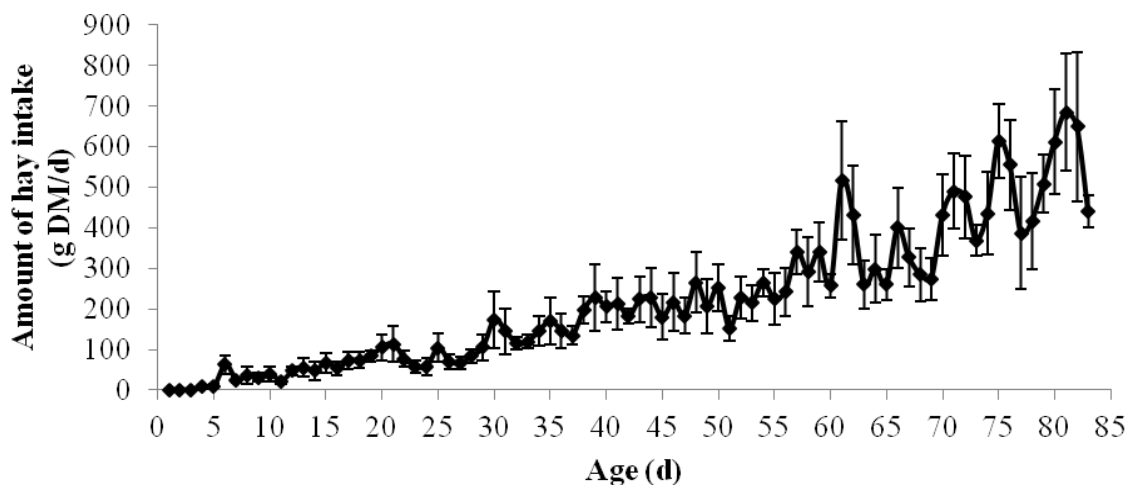


Figure 2. Kinetics of hay intake (g DM/d) of preweaned calves. Vertical bars show SE.

Physico-chemical and Fermentation Parameters

An effect of age was observed on daily ruminal pH ($P < 0.001$, Table 2). The evolution of ruminal pH with the age of calves (Figure 3a) could be divided into 3 age classes explaining 31.8% of the total variance (Figure 4). The 3 age classes observed were from d 1 to 9, from d 10 to 40 and from d 43 to 83.

An effect of age was observed on ruminal E_h ($P < 0.001$, Table 2). The ruminal E_h values recorded at d 1 of life were positive, averaging $+224 \pm 34$ mV (Figure 3b). After that, ruminal E_h values decreased drastically to become negative. The evolution of ruminal E_h between d 2 and 83 could be divided into 3 classes explaining 20.9% of the total variance (Figure 4). The 3 age classes observed were from d 2 to 9, from d 10 to 40 and from d 43 to 83 where the ruminal E_h stabilized to an average of -141 ± 20 mV.

Table 2. Average ruminal physicochemical and fermentation parameters, and enzymatic activities in calves during the total pre-weaning period

Item	Mean	SEM	<i>P</i> -value ¹			
			A	L	Q	C
Physico-chemical parameters						
pH	6.3	0.05	<0.001	0.46	0.002	0.04
<i>E_h</i> , mV	-138	3.1	<0.001	0.22	0.56	0.26
Fermentation parameters						
NH ₃ -N, mg/L	116.4	5.3	<0.001	<0.001	0.72	0.03
Total VFA, mM	61.0	2.0	<0.001	<0.001	<0.001	0.34
Acetate, mM	33.5	0.9	<0.001	0.001	0.002	0.16
Propionate, mM	21.8	0.9	<0.001	<0.001	<0.001	0.71
Butyrate, mM	3.6	0.2	<0.001	0.01	<0.001	0.15
Acetate:Propionate ratio	3.1	0.4	<0.001	0.03	0.04	0.08
Enzymatic activities						
Xylanase ²	86.0	7.8	<0.001	0.05	0.50	0.01
Amylase ²	30.5	1.7	<0.001	0.48	0.27	0.01
Ureolytic ³	6.9	0.7	0.046	0.62	0.04	0.10
Proteolytic ⁴	24.9	1.0	<0.001	0.60	<0.001	0.02

¹A= age effect; L = linear effect of age; Q = quadratic effect of age; C = cubic effect of age.

²Xylanase activity and amylase activity (μmol of reduced sugar/h/g of ruminal content DM).

³Ureolytic activity (μg of NH₃-N released/min/g of ruminal content DM).

⁴Proteolytic activity (optical density unit/h/g of ruminal content DM).

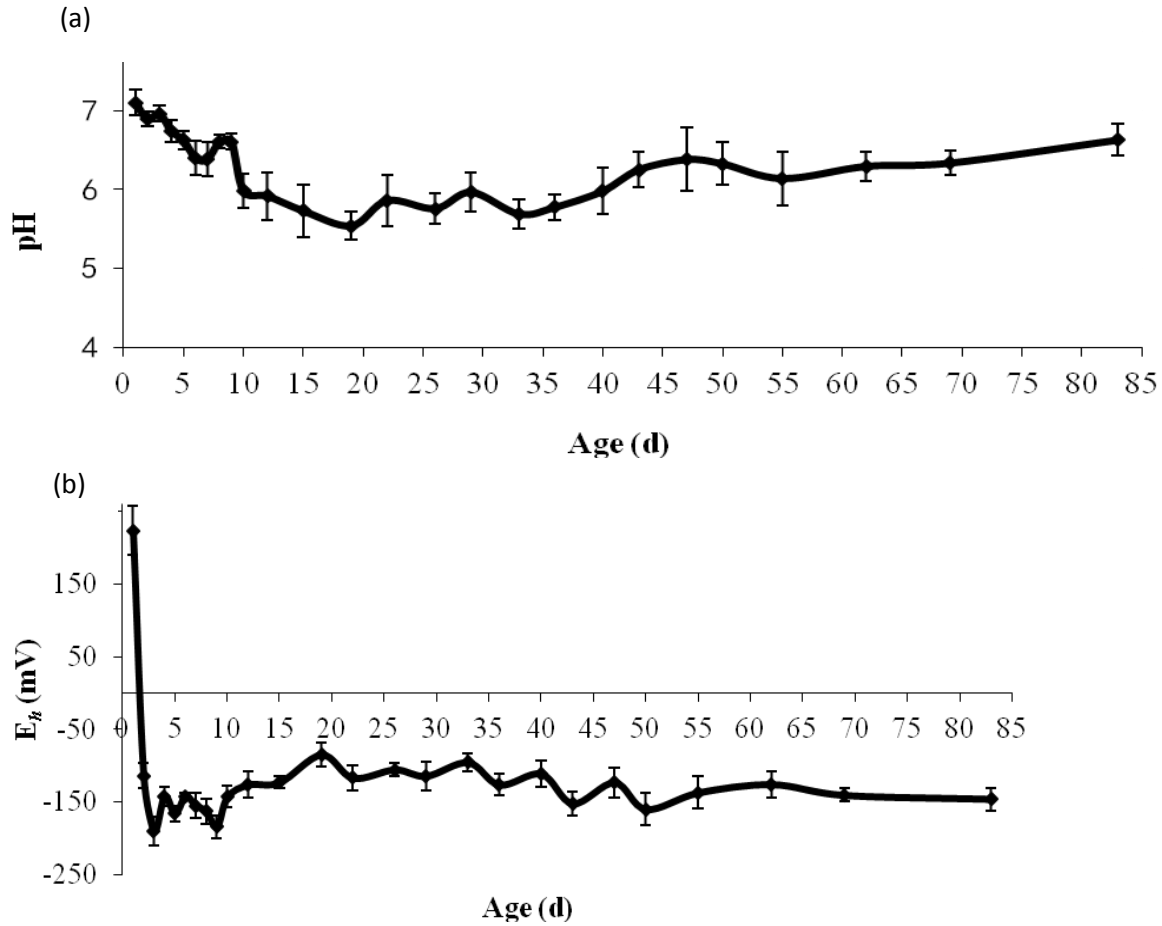


Figure 3. Evolution of pH (a), redox potential E_h (b) with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE.

There was an effect of age ($P < 0.001$, Table 2) on ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration which averaged 16.9 ± 4.2 mg/L at d 1 of birth (Figure 5). The evolution of ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration between d 1 and 83 could be divided into 3 classes explaining 42.4 % of the total variance (Figure 4). The 3 age classes determined were from d 1 to 3, from d 4 to 22 and from d 26 to 83 where $\text{NH}_3\text{-N}$ stabilized at an average value of 58.2 ± 17.2 mg/L.

Item	Age (d)																								PRE ¹
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	47	50	55	62	
Physico-chemical parameters																									
pH	6.69 ± 0.14												5.82 ± 0.25						6.34 ± 0.28						0.318
E _h , mV	+224 ± 34	-164 ± 14						-115 ± 15						-141 ± 20						0.209					
Fermentation parameters																									
NH ₃ -N, g/L	60.1 ± 21.1				179.8 ± 34.1										58.2 ± 17.2						0.424				
Total VFA, mM	-	19.5 ± 4.2						84.4 ± 11.1						0.611											
Acetate, mM	-	11.8 ± 2.5						43.4 ± 5.5						0.601											
Propionate, mM	-	5.5 ± 1.5						33.1 ± 5.3						0.586											
Butyrate, mM	-	0.7 ± 0.45						5.0 ± 1.0						0.434											
Acetate/Propionate	-	15.3 ± 9.5	3.5 ± 0.5						1.5 ± 0.2						0.419										
Enzymatic activities																									
Xylanase ²	-	6.1 ± 3.0				182.2 ± 58.9						62.4 ± 25.3						0.261							
Amylase ²	-	3.1 ± 1.9				35.4 ± 8.5						0.235													
Ureolytic ³	6.9 ± 2.7																								0.050
Proteolytic ⁴	8.2 ± 1.6						27.9 ± 5.3						0.229												
¹ Expression of total variability explained by division in age-classes. ² Xylanase activity and amylase activity (µmol of reduced sugar/h/g of ruminal content DM). ³ Ureolytic activity (µg of NH ₃ -N production/min/g of ruminal content DM). ⁴ Proteolytic activity (DO units/h/g of ruminal content DM).																									

Figure 4. Age-classes of ruminal physicochemical and fermentation parameters, and enzymatic activities (mean ± SD)

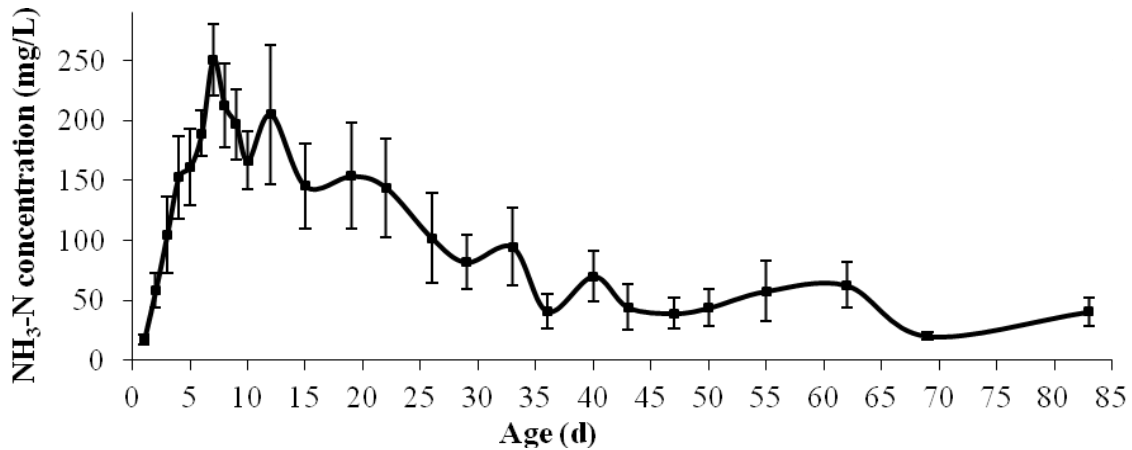


Figure 5. Evolution of ruminal NH₃-N concentration with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE.

Through the 83-d period there was an effect of age ($P < 0.001$, Table 2) on total VFA concentration. No VFA were detected in ruminal samples collected at d 1 of life of calves (Figures 6a). The evolution of total VFA in ruminal content with calf age could be divided into 2 classes explaining 61.1 % of the total variance (Figure 4). The 2 age classes were before d 10 of age and from d 12 to 83. The evolution of ruminal acetate (C2) and butyrate (C4) concentrations (Figure 6b) could be divided into 2 classes explaining 60.1 and 43.4 % of the total variance, respectively (Figure 4). The 2 age classes were before d 9 and between d 10 and 83. The evolution of ruminal propionate (C3) concentration (Figure 6b) could be divided into 2 classes (before d 12 after birth and between d 15 and 83) explaining 58.6 % of the total variance (Figure 4). The evolution of the C2/C3 ratio (Figure 6c) could be divided into 3 classes explaining 41.9 % of the total variance (Figure 4). The 3 age classes determined were d 2, d 3 to 10 and d 12 to 83.

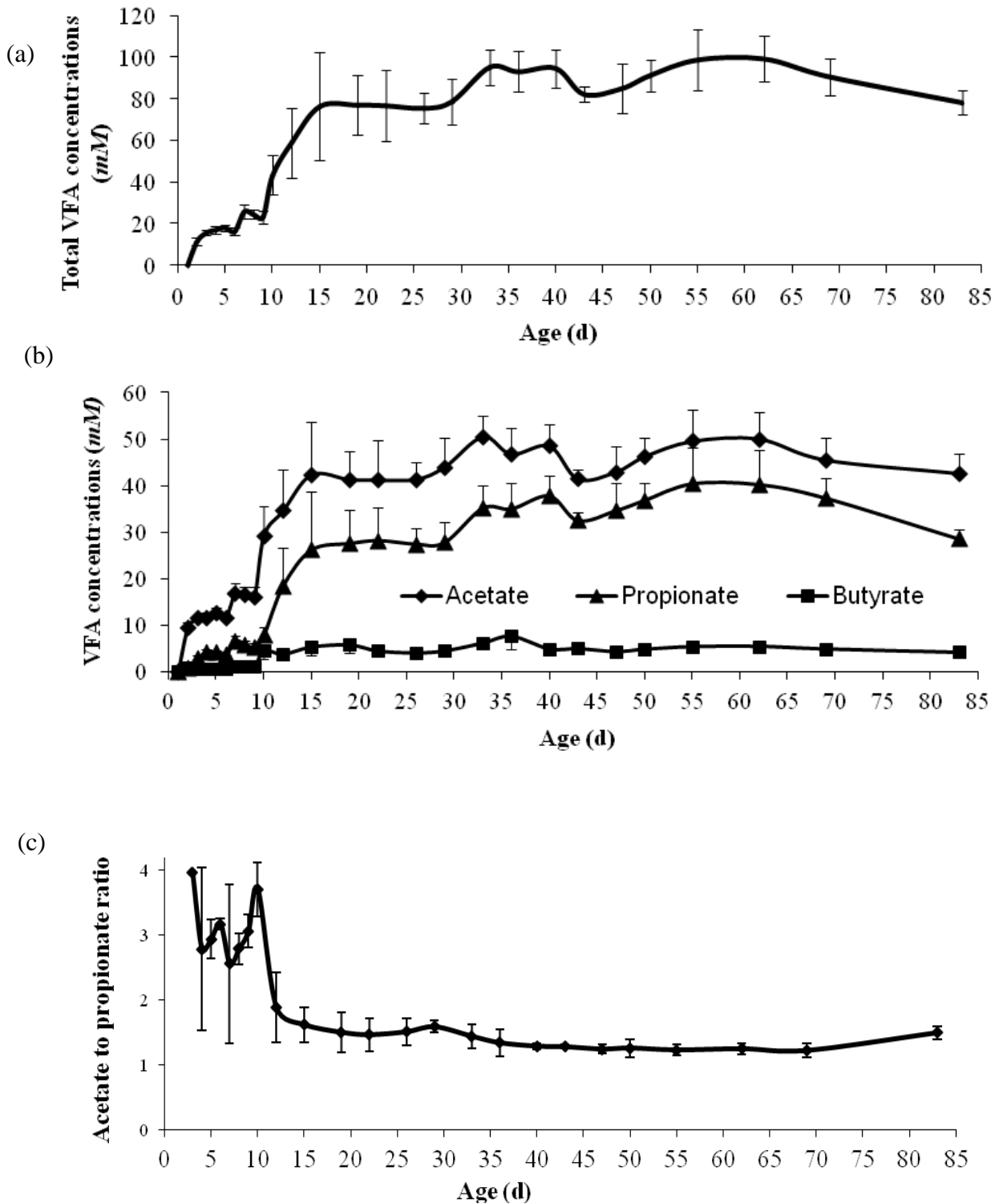


Figure 6. Evolution of total (a) and main (b) ruminal VFA concentrations, and acetate to propionate ratio (c) with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE.

Ruminal Enzymatic Activities

An effect of age (Table 2) was observed on ruminal xylanase ($P < 0.001$), amylase ($P < 0.001$) and ureolytic ($P < 0.05$) activities over the 83-d experimental period. No ruminal xylanase and amylase activities were observed at d 1 of age (Figures 7 and 8).

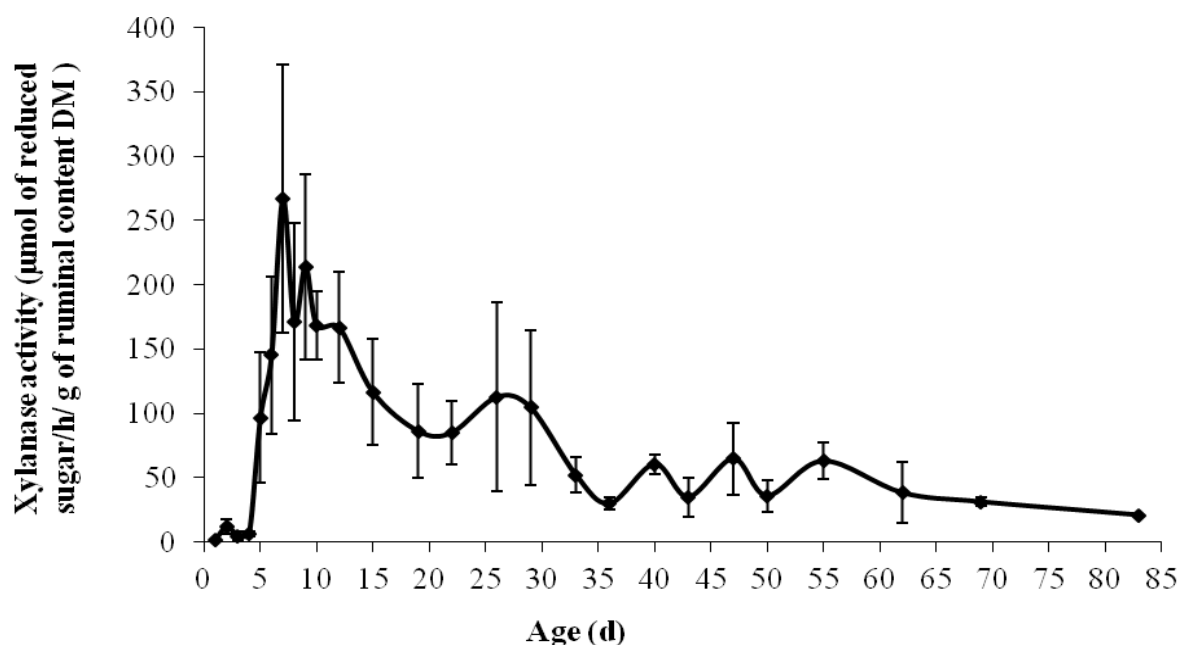


Figure 7. Evolution of ruminal xylanase activity with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE.

While the evolution of xylanase activity could be divided into 3 classes (between d 2 and d 4, d 5 and d 15 and d 19 and d 83) explaining 26.1 % of the total variance (Figure 4), that of amylase could be divided into 2 classes explaining 23.5 % of the total variance (Figure 4): from d 2 to 4 and from d 5 to 83. No different classes could be generated for explaining the total variance (Figure 4) of the evolution of ureolytic activity which averaged 6.9 ± 2.7 µg/min/g of ruminal content DM (Figure 9) over the 83 d-period.

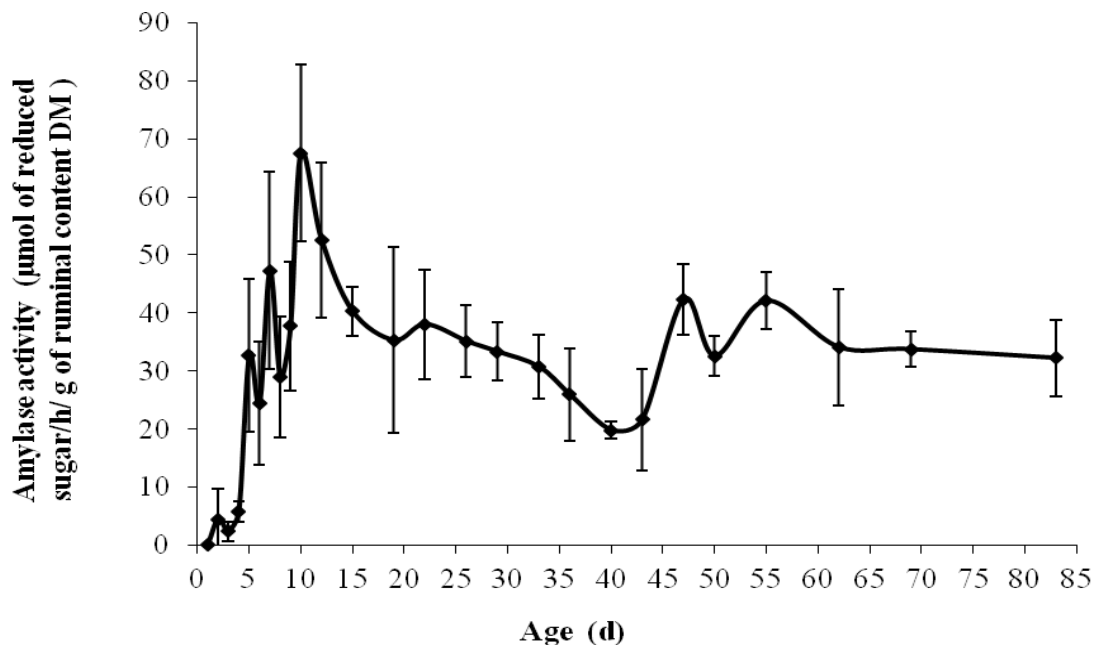


Figure 8. Evolution of ruminal amylase activity with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE.

An effect of age ($P < 0.001$, Table 2) was observed on ruminal proteolytic activity over the 83-d experimental period. The evolution of proteolytic activity (Figure 10) could be divided into 2 classes explaining 22.9 % of total variance (Figure 4). The 2 age classes observed were from d 1 to 4 and from d 5 to 83.

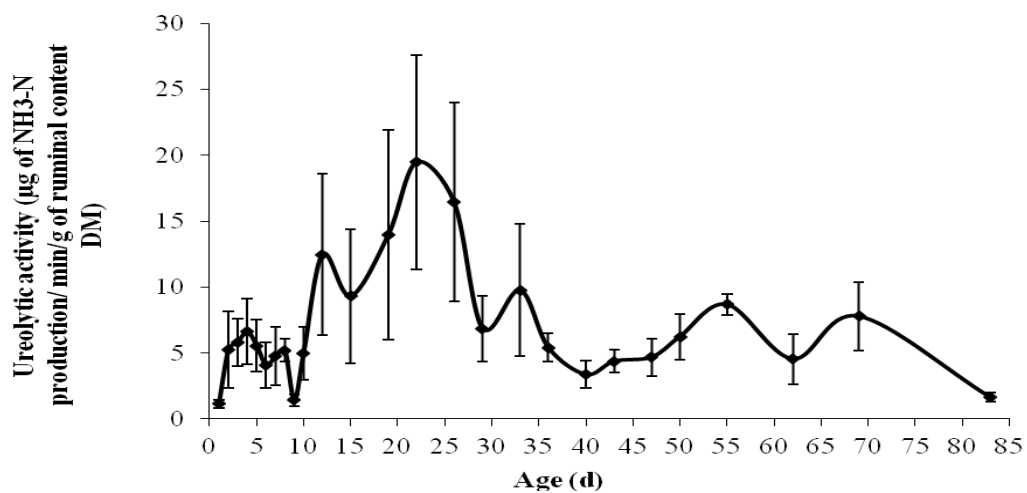
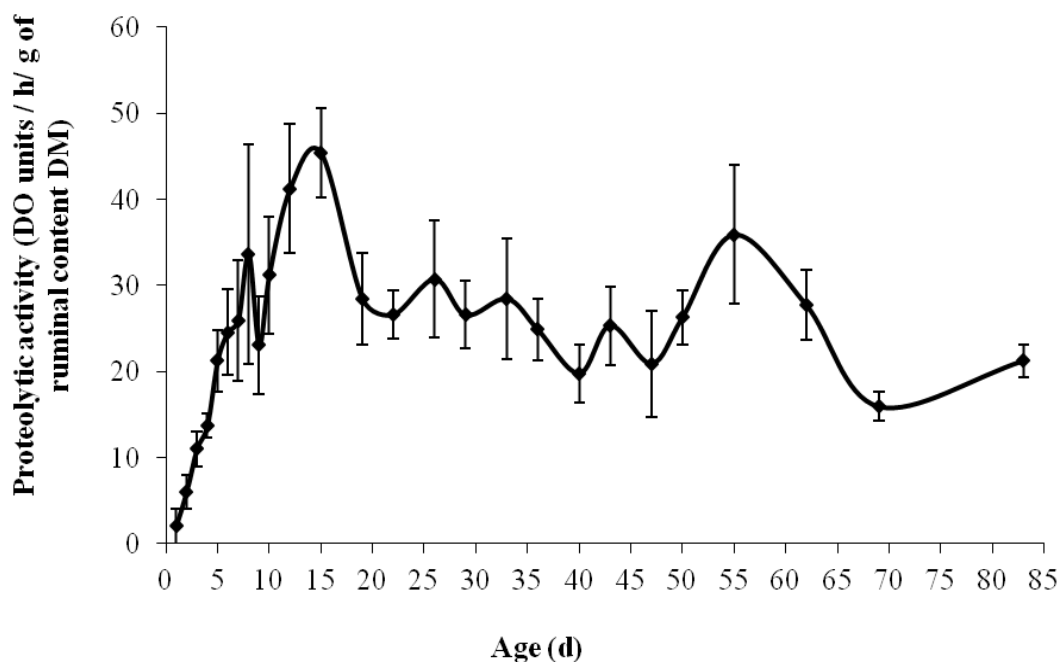


Figure 9. Evolution of ruminal ureolytic activity with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE.



Figure

10. Evolution of ruminal proteolytic activity with the age of calves during the preweaning period. Vertical bars show SE

DISCUSSION

Figure 4 shows that, for most physicochemical studied parameters, the segmentation of the pre-weaning period splitted sub-periods around d10 to 12. The TREES procedure resulted in different separation of sub-periods for ammonia, but a clear peak of values was observed around d 10 (Figure 5).

Evolution from Birth to d 10 of Age

Data showed that the ruminal milieu of early-newborn calves (d 1) was devoid of VFA and of xylanase and amylase activities, and had very low $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration and proteolytic activity. These observations reflected an absence of fermentative activity in the rumen and a weak capacity of enzymatic degradation at d 1 of life. Jarrige et al. (1995) explained that the rumen at birth only contains saliva, mucus, desquamated epithelial cells and a very little amount of usable energy substrate. In the present study, ruminal pH at d 1 was close to neutrality (7.10 ± 0.13) and the milieu was highly oxidative with a positive E_h value of $+224 \pm 34$ mV. The E_h value recorded agrees with the value of +270 mV reported by

Julien et al. (2010) in a sterilized ruminal fluid from dairy cows, reflecting the oxidative status of a milieu denied of living organisms. Ruminal E_h became drastically negative (-164 mV in average) as soon as d 2, reaching values previously reported by Marden et al. (2008) and Julien et al. (2010) in adult dairy cows, and by Monteils et al. (2011) in heifers i.e. between -110 and -220 mV according to the composition of the diet. By measuring a difference of potential, Chaucheyras-Durand and Fonty (2002) also noted an increase of reducing power in the ruminal milieu of lambs between d 2 and 10 of age. Taken together, these results suggest that the establishment and the maintenance of reducing conditions in the rumen originate from microbial activity.

The rapid change in oxydo-reducing status of the rumen observed would be related to the implantation of ruminal microflora and is supported by earlier studies which showed a sequential establishment of bacterial communities between d 2 and 10 of life in calves (Bryant et al., 1958; Jayne-Williams, 1979) and in lambs (Fonty et al., 1987). Facultative anaerobic bacteria, which first colonize the ruminal milieu (Fonty et al., 1987), were likely involved in oxygen consumption, leading to a more reducing environment. Subsequently, the anaerobic medium in the rumen becomes a propitious environment for the establishment of strictly anaerobic bacterial communities. Moreover, fibrolytic and amylolytic bacteria are known to establish in ruminal content before d 4 of age in lambs (Fonty et al., 1983) and calves (Anderson et al., 1987).

Results of the present study agree with all these observations because at d 2, xylanase and amylase activities were detected at a low level in ruminal content. These activities increased drastically from d 4 to reach a maximum value at d 7 and 10 for xylanase and amylase activities respectively, with a higher activity for xylanase (270 μmol of sugar released/h/g of total ruminal content DM) than for amylase (67 μmol of sugar released/h/g of total ruminal content DM). Because during this period calves did not consume solid food, the potential activity measured showed the existence of a degradation capacity before arrival of substrate. In the present study, C2 was detected at d 2 while C3 and C4 were first measured at d 3. Between d 2 and 10, the total VFA ruminal concentration only slightly increased, with a major proportion of C2 (80%). These data are consistent with the observations of Anderson et al. (1987). This slow evolution of VFA concentration before d 10 could be associated with the very low intake of solid food by calves, in spite of xylanase and amylase activities that were, from d 5, in the range of values observed several weeks later. This low but progressive increase in VFA concentration occurred at the same time as the drop in ruminal pH. At this

time, passage of some milk replacer into the rumen and its fermentation cannot be totally ruled out.

To our knowledge, no precise determination has been made of the times at which ureolytic and proteolytic activities take place in newborn calves. In the present study, these activities were already detected at d 1 of age. The proteolytic activity continuously increased from d 2 to 15. The early proteolytic activity observed could be explained by the first proteolytic bacteria colonizing the rumen in the middle of first week of age in calves (Anderson et al., (1987). Similarly, an ureolytic activity could be observed from d 2, and was slightly modified until d 10. During the first days of life, $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration increased. This could be explained by the proteolysis of some colostrum and milk replacer reaching the rumen and (or) muco-peptides contained in the mucus-filled rumen and (or) the breakdown of desquamated epithelial cells by adherent-bacteria (Cheng et al., 1979). Ammonia absorption may also be limited in the preruminant, resulting in the observed ruminal pH value of 6.69 at that time. The present study is consistent with the results of previous studies (Kmet et al., 1986a; Kmet et al., 1986b; Sahoo et al., 2005) which showed that the main enzymatic activities (fibrolytic, amylolytic, proteolytic and ureolytic) were observed at the end of the first week of life of calves.

Evolution from d 10 of Age to Weaning

From d 10 of age to weaning, the intake of hay and concentrate progressively increased, providing substrates to the ruminal microbiota. Between d 10 and 30, the ruminal pH decreased with a time pattern that was opposite to that of total VFA content which acidified the ruminal content. From 1 month of age, calves consumed increasing amounts of hay (from an average of 195 g at d 30 to 564 g of DM/d at d 70). Intake of hay stimulated the ruminating reflex of calves and therefore induced salivation (Anderson et al., 1987). Saliva and its buffering action in rumen are known to be linked with rumination, which only begins at the end of the second week of age (Swanson and Harris, 1958). This could have contributed to the increase of ruminal pH which reached a value higher than 6 between d 50 and 83. This increase of pH above 6 was also noted by Anderson et al. (1987) in calves at d 56 of life. The E_h value decreased from d 10 till weaning. In cows, this parameter has been shown to require a long time to evolve after a dietary change, and to remain fairly unstable (Monteils et al., 2011).

The total VFA concentration increased from d 2 to 12 of age to reach a plateau (84.4 mM). Similarly, Anderson et al. (1987) and Beharka et al. (1991) in calves, and Chaucheyras-Durand and Fonty (2002) in lambs showed that from the first week of life to 1 month of age, VFA ruminal concentration continuously increased to reach a stable value. Previous studies showed that the development of rumen papillae follows the intake of concentrate (Suarez et al., 2006) and the start of rumen fermentation (Tamate et al., 1962). Furthermore, Harrison et al. (1960) and Tamate et al. (1962) observed a lack of development of rumen papillae when calves consumed only milk between birth and 16 wk of age. The establishment of the papillae and the ruminal mucosa consecutive to the appearance of fermentation end products improves VFA absorption. Moreover, the increase of solid food intake led to an increasing ruminal volume (Tamate et al., 1962), which could have resulted in a dilution of ruminal content in the present study. The establishment of a balance between the development of the epithelium, the increasing rumen volume, the arrival of substrate via solid food intake and ruminal microbiota implantation could explain the observed stabilization of VFA concentration after one month of life. In parallel, the C2/C3 ratio decreased with the age of calves and reached 1.5 ± 0.2 . This result was in accordance with the value of 1.62 determined by Sosin-Bzducha et al. (2010) in calves between d 10 and 90 of age.

Xylanase and amylase activities decreased (from d 7 and 20 for xylanase and amylase activities, respectively) until 1 month of age and remained stable thereafter. From d 10 the intake of solid diet by calves strongly increased. The ruminal volume could have increased, diluting the enzymatic activities. From d 10 of age to weaning, the proteolytic activity was fairly stable. In spite of linear, quadratic and cubic effects of age on ureolytic activity, the TREES procedure could not separate classes, probably due to the great variability of this activity. On the contrary, Cook (1976) observed a strong increase in ureolytic activity between d 20 and 40 of age in lambs. Opposed to our observed stability of proteolytic and ureolytic activities, $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration strongly decreased from d 10 to 35. The decrease of $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration observed in spite of the increasing arrival of dietary protein to the rumen could not be attributed to a severe decrease of proteolytic activity. These changes could be the consequence of an increased absorption of $\text{NH}_3\text{-N}$ permitted by the development of papillae and (or) from an increased utilization by microorganisms for proteosynthesis. A similar evolution of ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ between d 1 and 3 month after birth was previously observed in calves (Godfrey, 1961; Vasquez-Anon et al., 1993) and lambs (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002).

CONCLUSIONS

This study showed that the establishment of ruminal functions in calves is very rapid between d 1 and 10 after birth. The main fermentative and enzymatic activities which take place from d 2 are stabilized around one month of age. The enzymatic activities were maximal between d 10 and 23 after birth and were variable until weaning. The ruminal milieu, strongly aerobic at birth, became quickly anaerobic and reducing from d 2 to 83 of age, probably reflecting the microbial activity and the dynamics of fermentation. Further work is needed 1) to identify the temporal and sequential establishment of microorganisms, and 2) to establish a relationship between the ruminal microbiota and the functions observed in this study.

Acknowledgments

We would like to thank the staff of the experimental station “Domaine de Borret Poucharramet” (Haute Garonne, France) for the excellent supervision of this study on calves, especially Brigitte Santacruz. We also thank Muriel Segura (UMR 1289 TANDEM) for the technical assistance in the analysis of samples. We also thank the Midi-Pyrénées region for the participation in the financial support of this experiment.

REFERENCES

- Anderson, K. L., T. G. Nagaraja, J. L. Morrill, T. B. Avery, S. J. Galitzer, and J. E. Boyer. 1987. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64:1215-1226.
- Andrade, P. V. D., S. Giger-Reverdin, and D. Sauvant. 2002. Relationship between two parameters (pH and redox potential) characterizing rumen status. Influence of diets. Page 332 in Proc. 9th Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France Institut de l'Elevage-INRA, Paris, France.
- Anonymous. 1988. Arrêté du 18 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. Pages 5608-5610 in Journal Officiel de la République Française. J. O, Paris.
- Beharka, A. A., T. G. Nagaraja, and J. L. Morrill 1991. Performance and ruminal fonction development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.* 74:4326-4336.
- Bryant, M. P., and N. Small. 1960. Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. *J. Dairy Sci.* 43:654-667.
- Bryant, M. P., N. Small, C. Bouma, and I. Robinson. 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.* 41:1747-1767.
- Chaucheyras-Durand, F., and G. Fonty. 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microbial Ecol. Health Dis.* 14:30-36.
- Cheng, K.-J., R. P. McCowan, and J. W. Costerton. 1979. Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *Am. J. Clin. Nutr.* 32:139-148.
- Cook, A. R. 1976. Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. *J. General Microbiol.* 92:32-48.
- Eun, J. S., and K. A. Beauchemin. 2005. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 88:2140-2153.
- Fonty, G., P. Gouet, J.-P. Jouany, and J. Senaud. 1987. Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* 133:1835-1843.
- Fonty, G., J.-P. Jouany, P. Thivend, Ph. Gouet, and J. Senaud. 1983. A descriptive study of rumen digestion in meroxenic lambs according to the nature and complexity of the microflora. *Reprod. Nutr. Dev.* 23 (5):857-873.
- Godfrey, N. W. 1961. The functional development of the calf. II. Development of rumen function in the calf. *J. Agric. Sci.* 54:177-183.
- Harrison, H. N., R. G. Warner, E. G. Sander, and J. K. Loosli. 1960. Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk. *J. Dairy Sci.* 43:1301-1312.
- Jarrige, R., Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce, and M. Journet. 1995. Nutrition des ruminants domestiques. Page 299-347 In chapter 8: L'écosystème microbien du réticulo-rumen. Fonty, G., Jouany, J.-P., Forano, E. and Gouet, Ph. INRA Editions ed.
- Jayne-Williams, D. J. 1979. The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves. *J. Appl. Microbiol.* 47:271-284.
- Julien, C., J. P. Marden, R. Moncoulon, and C. Bayourthe 2010. Redox potential measurement: A new way to explore ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 88(E-Suppl. 2) *J. Dairy Sci.* 93(E-Suppl. 1):578. (Abstr.)
- Kimse, M., V. Monteils, C. Bayourthe, and T. Gidenne. 2009. A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit caecum: Relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Sci.* 17:63-70.
- Kmet, V., K. Boda, P. Javorsky, and R. Nemcova. 1986a. The enzymatic activity of rumen microflora in calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 56:73-77.

- Kmet, V., K. Boda, P. Javorsky, and R. Gibalova. 1986b. Dynamic of enzymatic activity development in the adherent rumen microflora. *Arch. Anim. Nutr.* 36:621-628.
- Krom, M. D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia. A study of the Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105:305-316.
- Lever, M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAH β AH): effect of bismuth on the reaction. *Anal. Biochem.* 81:21-27.
- Longenbach, J. I., and A. Heinrichs. J. 1998. A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73:85-97.
- Marden, J. P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon, and C. Bayourthe. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.* 91:3528-3535.
- Martin, C., and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67:407-413.
- Martin, C., A. G. Williams, and B. Michalet-Doreau. 1994. Isolation and characteristics of the protozoal and bacterial fractions from bovine ruminal contents. *J. Anim. Sci.* 72:2962-2968.
- Moharrery, A., and T. K. Das. 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:513-529.
- Monteils, V., M. Rey, L. Cauquil, A. Troegeler-Meynadier, M. Silberberg, and S. Combes. 2011. Random changes in the heifer rumen in bacterial community structure, physico-chemical and fermentation parameters, and *in vitro* fiber degradation. *Livestock Sci.* 141:104-112.
- Ørskov, E. R., D. Benzie, and R. N. B. Kay. 1970. The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. *Brit. J. Nutr.* 24:785-795.
- Playne, M. J. 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 36:638-634.
- Sahoo, A., D. N. Kamra, and N. N. Pathak. 2005. Pre- and postweaning attributes in faunated and ciliate-free calves fed calf starter with or without fish meal. *J. Dairy Sci.* 88:2027-2036.
- Smith, R. H. 1961. The development and function of the rumen in milk-fed calves. II. Effect of wood shavings in the diet. *J. Agric. Sci.* 56:105-111.
- Sosin-Bzducha E., J. Strzetelski, F. Borowiec, J. Kowalczyk, and K. Okoń. 2010. Effect of feeding ensiled maize grain on rumen development and calf rearing performance. *J. Anim. Feed Sci.* 19:195-210.
- Suárez, B. J., C. G. Van Reenen, G. Beldman, J. van Delen, J. Dijkstra, and W. J. J. Gerrits. 2006. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets: I. animal performance and rumen fermentation characteristics. *J. Dairy Sci.* 89:4365-4375.
- Swanson, E. W., and J. D. Harris Jr. 1958. Development of rumination in the young calf. *J. Dairy Sci.* 41:1768-1776.
- Tamate, H., A. D. McGilliard, N. L. Jacobson, and R. Getty. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *J. Dairy Sci.* 45:408-420.
- Vazquez-Anon, M., A. J. Heinrichs, J. M. Aldrich, and G. A. Varga. 1993. Postweaning age effects on rumen fermentation end-products and digesta kinetics in calves weaned at 5 weeks of age. *J. Dairy Sci.* 76:2742-2748.
- Warner, A. C. I. 1956. Proteolysis by rumen micro -organisms. *J. Gen. Microbiol.* 14:749-762.

Wise, G. H., and G. W. Anderson. 1939. Factors affecting the passage of liquids into the rumen of the dairy calf. I. Method of administering liquids: drinking from open pail versus sucking through a rubber nipple. *J. Dairy Sci.* 22:697-705.

Chapitre 3- Etude expérimentale 1 : Etude de la mise en place des paramètres physico-chimiques et des paramètres fermentaire du rumen ainsi que l'implantation du microbiote ruminal chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage (à 83 jours).

ARTICLE 2

Implantation de la communauté bactérienne dans le rumen chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage à l'aide du pyroséquençage haut débit 454 GS FLX

(En préparation pour « *Applied and Environmental Microbiology* »)

L'article 1 a montré chez le veau de race laitière : i) un biotope du rumen à la naissance proche de la neutralité, non réducteur et dépourvu de produits de fermentation et d'activités xylanase et amylase, ii) une mise en place rapide des fonctions fermentaires et enzymatiques dès 2 jours d'âge, et iii) une stabilisation dès 1 mois d'âge des paramètres fermentaires et des activités enzymatiques, en même temps que l'ingestion d'aliments solides par les animaux devient importante. Afin de pouvoir expliquer ces observations, la caractérisation de l'implantation du microbiote ruminal semble essentielle. Pour cela, une deuxième étude a été réalisée dans le cadre de l'expérimentation 1, à partir des mêmes échantillons de contenu ruminal, pour décrire la mise en place des bactéries du rumen à l'aide de techniques de biologie moléculaire par qPCR et pyroséquençage 454 haut débit basé sur l'ARNr 16S. A la naissance, nous n'avons pas détecté d'ADN dans nos échantillons de contenu ruminal. Dès 2 jours d'âge, une communauté bactérienne complexe était observée avec une densité de $1,68 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. La densité bactérienne du rumen atteignait dès 7 jours d'âge une valeur moyenne de $1,41 \times 10^{11}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. Entre 2 et 3 jours, la communauté bactérienne était principalement composée par les phyla *Proteobacteria* (49%) et *Bacteroidetes* (29%) mais aussi les phyla *Actinobacteria*, *Fusobacteria* et *Firmicutes* en moindre abondance. Ensuite après 4 jours, le phylum *Bacteroidetes* (54%) devenait majoritaire, suivie par *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria* et *Spirochaetes*. Entre 4 et 15 jours d'âge, la communauté bactérienne était principalement composée du genre *Bacteroides* (24%) et d'autres genres comme *Prevotella* (13%), *Fusobacterium* (4%) et *Streptococcus* (4%). Entre 15 à 83 jours, le genre *Prevotella* devenait prédominant (42%) et de nombreux genres diminuaient ou disparaissaient. La communauté bactérienne au niveau du rumen est dense et variée dès 2 jours d'âge, c'est-à-dire bien avant que le veau ne commence à consommer des aliments solides. Cette communauté évolue avec l'âge des veaux et l'arrivée de l'alimentation solide.

Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning using high throughput 454 GS FLX pyrosequencing.

Rey Mickael^{1,2,3}, Francis Enjalbert^{3,1,2}, Sylvie Combes^{1,2,3}, Laurent Cauquil^{1,2,3}, Olivier Bouchez⁴ & Valérie Monteils^{2,1,3,5,6}.

¹ INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

² Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

⁴ INRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénée, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁵ Present address: Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

⁶ Present address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Keywords: dairy calf; rumen bacteria; 454 pyrosequencing; taxonomy, real-time PCR

Running title: Establishment of ruminal bacteria in calves

Corresponding author: Francis Enjalbert, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, UMR 1289, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France.

Phone: +33 5 61 19 32 70; Fax: +33 5 61 19 38 87, email: f.enjalbert@envt.fr

Abstract

High-throughput 454 16S rRNA-based pyrosequencing and quantitative PCR were used to describe the establishment of ruminal bacteria in dairy calves from birth to weaning (83 days). A complex ruminal bacterial community was observed from 2 days of age. The bacteria number was 1.68×10^{10} rRNA gene copy g^{-1} of fresh ruminal content at day 2 then reached a mean value of 1.41×10^{11} 16S rRNA gene copy g^{-1} of fresh ruminal content between 7 and 83 days. At 2 and 3 days, the bacterial community was mainly composed of *Proteobacteria* (49%) and *Bacteroidetes* (29%) with also *Actinobacteria*, *Fusobacteria* and *Firmicutes* phyla. From 3 to 15 days of age, the ruminal bacterial community was mainly composed of *Bacteroides* (24%) and other genera including as *Prevotella* (13%), *Fusobacterium* (4%) and *Streptococcus* (4%). From 15 to 83 days, *Prevotella* became predominant (42%) and many genera decreased or disappeared. A dense and varied rapid establishment of the ruminal bacteria from the first days of life was observed in dairy calves. This community evolved with the age of calves and the dietary changes.

Introduction

The rumen in adult cow is an important site of fermentations, carried out by a complex anaerobic microbiota, composed of bacteria, archaea, fungi and protozoa. The ruminal microbiota transforms food components into compounds used by the microbiota or the animal itself. In adults, the rumen microbial biomass is predominantly composed of bacteria (between 10^{10} and 10^{11} cells g^{-1} of ruminal content; Hungate, 1966; Habel, 1975). At birth, the calf rumen is sterile and milk is digested in the abomasum and the intestine (Logenbach & Heinrichs, 1998). The passage of liquid into the abomasum is controlled by the esophageal groove (Oskov *et al.*, 1970), but from 20 days of age, 40% of milk and 95% of water can enter the rumen (Wise & Anderson, 1939). Liquids (milk, water, saliva...) swallowed by the animal are a possible source of external contamination by bacteria. Solid food directly goes into the rumen which leads to a substrate source but also a new source of contamination. In the young ruminant, the establishments of ruminal functions in an anaerobic ruminal environment have been observed as early as at day 2, likely reflecting a microbial activity (Rey *et al.*, 2012). The colonization of the rumen by bacteria is sequential and begins between 2 and 7 days of life (Fonty *et al.*, 1987): at day 2, the number of strictly anaerobic bacteria is 10^9 CFU mL^{-1} of ruminal content and then increases during the first week. Facultative anaerobic and aerobic bacteria and lactate fermenting bacteria are dominant for the first weeks of life and then decrease to reach values observed in adults between 4 and 6 weeks (Bryant et

al., 1958; Anderson *et al.*, 1987; Fonty *et al.*, 1987; Agarwal *et al.*, 2002). The number of cellulolytic bacteria is between 10^2 and 10^7 mL⁻¹ of ruminal content between 4 and 7 days of age with a slower establishment in lambs reared in individual pens than in flock-reared lambs (Fonty *et al.*, 1987). The density of this community increases until 3 weeks (Anderson *et al.*, 1987; Bryant *et al.*, 1958). From the first week of age, the cellulolytic bacterial community is mainly composed of *Ruminococcus* (*R. albus*) and *Fibrobacter* (*F. succinogenes*) (Bryant *et al.*, 1958; Fonty *et al.*, 1991). The proportion of proteolytic bacteria varies between 1 and 2% of anaerobic total community until 10 weeks and increases to 10% after 12 weeks of age (Anderson *et al.*, 1987). The ruminal amylolytic bacterial community varies with the age and has a higher relative abundance in early weaned calves than in conventionally weaned calves (Anderson *et al.*, 1987).

A lack of knowledge is still persisting regarding the establishment of the bacterial community during the very first days of life of calves, when ruminal functions begin to establish. The knowledge in the establishment of ruminal bacterial community could help determining when and which are the favourable periods to early orientate the ruminal microbiota toward an improved digestive efficiency and, in long term, to improve the resistance of this ecosystem to digestive troubles, such as diarrhoea or acidosis in young and adult ruminant. Previous studies were based on cultivation techniques which only target bacterial species whose growth substrate is well known. On the contrary, high throughput sequencing can target a broad spectrum of bacteria without any prerequisite. The aim of this study was to describe the sequential dynamics of the early establishment of the ruminal bacterial community from birth to weaning by molecular tools.

Materials and Methods

Experimental procedures, animals and diet

Five male and 1 female Holstein calves (39.4 ± 1.7 kg) were immediately separated from their mother at birth (day 1) and placed in individual pens (1.05×2.30 m, bedded with straw) without any contact with adult animals. Until day 3, each calf was offered daily 2.5 L of frozen-thawed colostrum ($33.7 \pm 7.1\%$ of protein on a dry matter basis). From day 4 to day 83 (end of experiment), animals received a milk replacer (crude protein, 22.8; ether extract, 18.1 and starch, 4.4% on a dry matter basis), a starter pelleted concentrate (crude protein, 17.8; neutral detergent **fiber**, 21.6; ether extract, 2.7 and starch, 37.6% on a dry matter basis) and hay (crude protein, 8.4; neutral detergent **fiber**, 74.5; ether extract, 0.7% on a dry matter

basis). Each calf had access to water *ad libitum*. Feeds were distributed individually, in separate buckets, in two equal meals at 0800 and 1600 for milk replacer, and at 0900 and 1700 for hay and concentrate. The quantity of milk replacer distributed was 633 g d⁻¹ between 3 and 22 days of age, 724 g d⁻¹ between 22 and 40 days and then 240 g d⁻¹ until the weaning. The foods offered and refused at each meal were recorded daily and individually. This study was in accordance with the Guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture for all animal housing and handling procedures (Anonymous, 1988).

Ruminal sampling

Samples of ruminal contents were obtained from each calf every day from 1 to 10 days of age and thereafter at days 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 50, 62 and 83. Rumen samples (approximately 500 mL) were collected *via* a stomach tube (internal diameter 13 mm, sterilized before use with 2% Steranios (Centravet 803910, disinfection of surgical and medical equipment) 1 h after the milk morning meal and just before the distribution of hay and starter concentrate.

The ruminal samples were filtered through a metal sieve (1.6 mm mesh) and 0.2 g of each filtrate was collected into a sterile eppendorf (with 0.2 g of glass beads grinding of 0.1 mm and 4 glass beads 4 mm for DNA extraction). Ruminal samples were immediately frozen at -20 ° C and then stored at -80 ° C before DNA extraction.

DNA extraction

Total DNA from ruminal samples was extracted combining mechanical, chemical, and thermic lyses with a FastPrep instrument (MP Biomedicals, Illkirch, FR) and the QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) under the conditions described by the manufacturer's instructions. The DNA sample was eluted with 25 µL of AE buffer (Qiagen GmbH, Hilden, DE) and stored at -20°C. The quantities and qualities of DNA extracted were then measured with Nano-Drop ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE).

Total bacteria real-time qPCR

The total bacteria densities were estimated from 16S rRNA gene copy number per g of fresh ruminal content and the absolute quantification was carried out by real-time PCR. Assays were performed using the ABI Prism 7900 HT system (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR) using optical grade 384-well plates in a final volume of 10 µL. SYBR Green qPCR

technology was used for the absolute quantification of total bacteria and the assay reaction mixture contained template DNA (2.5 μL , with a DNA sample concentration that varied between 1.22 and 1430.93 $\text{ng}/\mu\text{L}$), a specific primer set at 100 nM forward 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' (*E. coli* position 338-357) and reverse 5' ATTACCGCTGCTGG 3' (*E. coli* position 518-534) from Fierer *et al.* (2005) and 1 X of Power SYBRs Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR). For SYBR Green assays, the PCR program consisted of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles with 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. A dissociation curve was added to SYBR Green assays to check the specificity of the amplification. Then, the results were compared with a standard curve to obtain the number of target copies in the sample. The standard DNA curves were generated by amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference plasmid containing the target 16S rRNA gene (accession no. EF445235: *Prevotella bryantii*). The results of qPCR were performed using SDS software version 2.3 (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR).

Barcoded PCR and 454 pyrosequencing

DNA samples were amplified with two specific primers containing hypervariable regions V3-V4 on the 16S rRNA genes (460 bp on *E. coli*) and linked with multiplex identifier (MID:11 pb nucleotide) which was unique for each sample (5' A-MID tags-NN-primer forward 3' and 5' A-MID tags-NN-primer reverse 3'; Eurogentec, Angers, FR). The bacteria primers used were forward 343F (5' TACGGRAGGCAGCAG 3'; Liu *et al.*, (2007)) and reverse 784R (5' TACCAGGGTATCTAATCCT 3'; Anderson *et al.*, (2008)) with an amplicon estimated at 460 pb. PCR reactions mixtures were realized with 1 μL of DNA sample (with a DNA sample concentration that varied between 1.22 and 1430.93 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 0.5 μM of each forward and reverse primers, 1X PCR buffer, 100 μM dNTP, 0.5 U of IsisTM DNA polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, FR) in a total volume of 100 μL . The PCR thermal program was carried out at 92°C for 2 min, with 32 cycles at 94°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 30s and at the end 72°C for 7 min. The amplicons were generated from each DNA sample and purified with MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE). The purified amplicon sizes from individual samples were checked on agar gels 2% (wt / v). The estimate quality and quantity of purified PCR products were analyzed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

The purified amplicons from individual samples were quantified using Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay kit (Invitrogen, FR) on an ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR) and then used to pool in equimolar quantities for a

final DNA concentration at 500 ng μL^{-1} for each library. The pooled amplicons were pyrosequenced using 454 GS FLX Titanium (454 Life Sciences-a Roche Company, Branford, CT, USA) sequencer at the GeT (Genomic and Transcriptomic) platform of Toulouse in France.

Sequence analysis

The 16S rDNA sequences (also referred to as 16S pyrotags) obtained from the 454 GS FLX Titanium pyrosequencing run were sorted based on their respective barcodes to form a total of 132 pyrotag libraries representing the 132 collected ruminal samples. Sequences were filtered using a Python script developed by the platform bioinformatic of Toulouse 16SCleaner (<https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/wiki/ng6/index.php/16SCleaner>), removing sequences that did not match the proximal PCR primer sequences (with 2 mismatches allowed), with a short sequencing length (less than 150 nt), with at least one ambiguous base or with a long homopolymer (greater than 9). All 16S pyrotags were then removed of their barcodes and adaptor sequences, and had an average read length of 407 ± 11 nucleotides after trimming.

Cleaning, alignment and taxonomic assignment were performed using the open-source Mothur software (V.1.17; Schloss *et al.*, 2009) and the SILVA bacteria alignment database (Pruesse *et al.*, 2007). The reads were assigned into Operational Taxonomic Unit (OTU at genera taxonomical level, cutoff 0.03) with the calculation of pairwise distance between the alignments of sequences. The taxonomical assignment was performed with a bootstrap of 60% and only taxa with a relative abundance over 0.1% were considered.

Calculations and statistical analysis

Bacterial community (density, taxonomical classification and diversity) and feed intake analysis. The bacterial taxonomic classification data were normalized and standardized. The VEGAN module of R (Community Ecology Package; Oksanen *et al.*, 2010) was used to generate the diversity indexes from clusters in OTU (Shannon, ACE and Chao). The R software (R 2.12.2, R development Core Team, 2011) was used to analyze all data in this study. Data were reported as mean values with standard error. Data relative to the ruminal bacterial community (logarithm of quantitative PCR density, taxonomic classification and OTU diversity) were analyzed as repeated measures, reporting the within subject effect of age. The TREE module of R (classification and regression trees) was used to generate age

classes for all parameters in this study with the *rpart* (Recursive Partitioning and Regression Trees, Therneau *et al.*, 2010) function.

Analysis of bacteria 454 profiles. The Statfingprints (version 2.0; Michelland *et al.*, 2009) running on R software was carried out to analyze the bacteria 454 profiles at family taxonomical level. The study of similarities between bacteria 454 profiles (at family taxonomical level) between the ages of calves was analyzed by calculation of the similarity matrix with the Euclidean distance. In all samples the similarities values were explored with non-metric multidimensional scaling (nMDS) and the Kruskal stress formula was determined for explaining the degree of the plot matched the underlying similarity matrix (Kruskal, 1964). An analysis of similarity (ANOSIM, Ramette, 2007) was used to compare bacteria profiles between ages. The heatmap analysis was produced by the Bioconductor function heatmap (Gentleman *et al.*, 2004) on the R software (R 2.12.2, R development Core Team, 2011).

Analysis of day to day stability. The Euclidean distances of family's relative abundances between two consecutive samples were used as an indicator of day to day stability. It was analyzed as repeated measures, reporting the within subject effect of age.

Differences were declared significant at $P \leq 0.05$.

Results

Feed Intake

Previously published by Rey *et al.* (2012), all offered milk was consumed by calves, the starter concentrate intake began from day 9 was 424, 2 096, and 3 450 g/day on average from 4 to 51, from 52 to 69 and from 70 to 83 days of age, respectively, and hay intake began at day 4 and was 56, 195, 360 and 564 g/day on average from 4 to 30, 31 to 57, 58 to 75 and from 76 to 83 days of age, respectively. The hay intake exceeds 100 g/day after 1 month of age.

Bacteria DNA extraction and/or amplification

The first day of age, the extraction and the amplification of DNA could not be realized, preventing both qPCR and 454 pyrosequencing. Presumably, the bacteria number or the bacterial DNA content extracted in the samples was below the thresholds for extraction and detection.

Ruminal total bacteria number

The ruminal total bacteria could be quantified from the second day of age at 1.68×10^{10} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content (Fig. 1). An effect of age was observed on ruminal total bacteria ($P < 0.05$). Using classification and regression tree analysis, the evolution of ruminal total bacteria of 16S rRNA gene copy number could be divided into 2 age classes explaining 14 % of the total variance: from day 2 to day 7 and from day 8 to day 83 with 1.09×10^{10} and 1.41×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content, respectively.

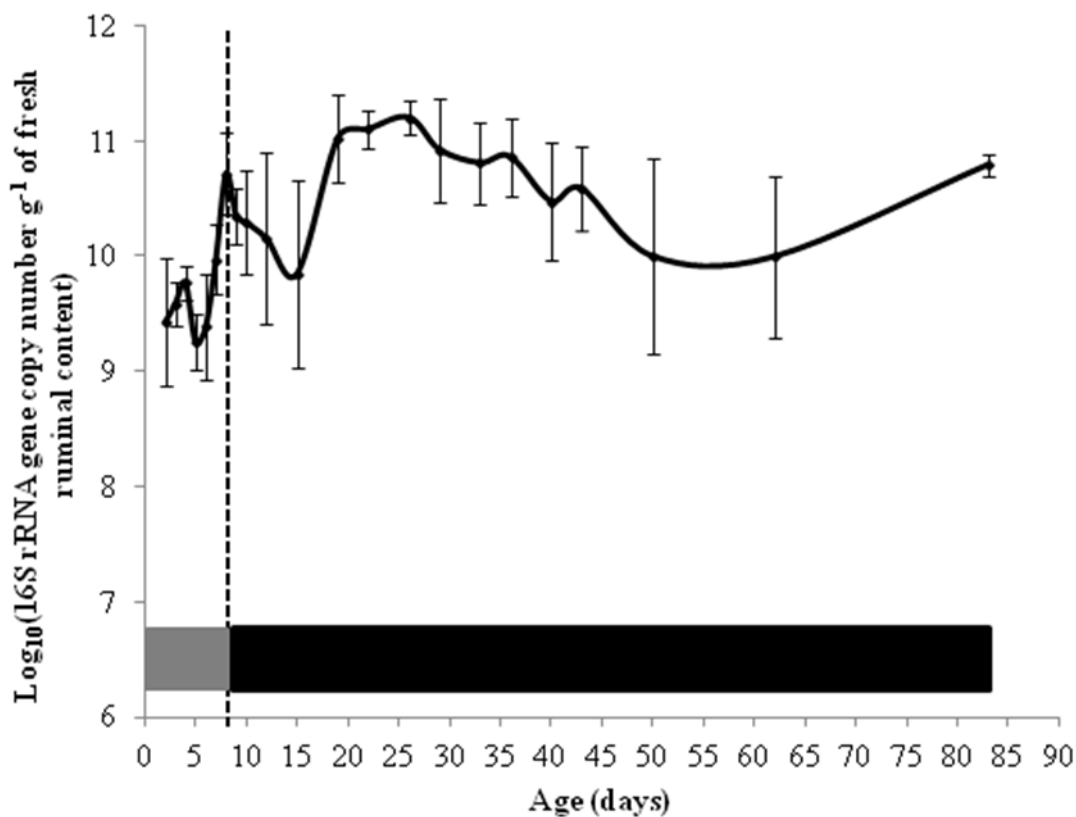


Fig. 1. Evolution of ruminal total bacteria number of 16S rRNA gene copies in calves between 2 and 83 days of age (as \log_{10}). Vertical bars show SE. The vertical dotted line represents the limit of two age groups defined by the classification and regression TREE analysis and the gray and black rectangles represented the two classes.

OTU diversity index

The number of operational taxonomic units (OTUs) at a threshold of 0.03 was 1594 ± 62 for the 132 samples with a coverage value of 91 ± 0.3 %. It did not evolve with age. The Shannon, Chao and ACE indexes did not evolve with the age of calves (5.66 ± 0.20 , 2602 ± 94 and 3359 ± 129 , respectively).

Taxonomical composition of ruminal bacterial community

A total of 1,360,770 of sequences were obtained from the 454 GS FLX Titanium pyrosequencing run. After cleaning, 1,192,263 pyrotags were obtained over the 132 samples (average 9032 ± 443 reads/ sample). Among these sequences, 432 different taxa were observed in ruminal samples, comprising 12 phyla, only 7 of them having an average relative abundance over 0.1 % (Fig. 2). Among the 131 families observed, 38 had an average relative abundance over 0.1% (Fig. 3). Among the 266 genera identified, only 58 had an average relative abundance over 0.1% (Fig. 4).

Each of the three phyla *Fibrobacteres*, *Fusobacteria* and *Spirochaetes* comprised only one family (Fig. 3) and one genus (Fig. 4). The other phyla (*Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* phyla) were composed of many families (Fig. 3) and many genera (Fig. 4). The *Actinobacteria* phylum was composed of 3 families *Actinomycineae*, *Bifidobacteriaceae* and *Coriobacterineae* (Fig. 3), for which SILVA did not permit a classification at the genus level.

Phyla	Age (days)																					PRE ^a	P-value ^b	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	50	62			83
<i>Actinobacteria</i>	5.5%																					-	*	
<i>Bacteroidetes</i>	29.1%	53.5%																				0.15	**	
<i>Fibrobacteres</i>	ND ^c	0.4%																				-	NS	
<i>Firmicutes</i>	15.9%																					-	NS	
<i>Fusobacteria</i>	4.8%							0.3%														0.27	***	
<i>Proteobacteria</i>	49.3%	15.6%							26.6%														0.22	***
<i>Spirochaetes</i>	ND ^c	1.0%							0.1%														0.08	*

^a Proportion of of variability explained by division in age-classes.

^b P value of the repeated measures analysis with *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; NS : $P > 0.05$.

^cND = no detected

Fig. 2. Age classification of calf's ruminal samples according to bacteria relative abundance (% , mean) determined with TREE package of R between 2 and 83 days of age: phylum taxonomical level.

Evolution with age of ruminal bacteria phyla, families and genera

Among the 7 phyla observed over 0.1% of relative abundance, 5 phyla significantly evolved with the age of calves: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* and *Spirochaetes* ($P < 0.05$) and *Fusobacteria*, *Proteobacteria* ($P < 0.001$) (Fig. 2). Among the 38 families observed, 25 significantly evolved with age (Fig. 3) and among the 58 genera observed over 0.1% of abundance, 33 significantly evolved with age (Fig. 4). The different age-classes defined by the TREE analyses are presented for the phyla, the families and the genera in Figures 3 to 5.

Between 2 and 3 days of age, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were the predominant phyla with relative abundances at 49.3% and 29.1% respectively. Between 4 and 83 days, the *Bacteroidetes* phylum became dominant (53.5%, Fig. 2). Between 4 and 12 days, the *Proteobacteria* phylum relative abundance decreased from 49.3% to 15.6% (corresponding to the decrease of many genera, Fig. 4). From 15 days of age, the *Proteobacteria* phylum relative abundance increased to reach 26.6%, while many genera strongly decreased or disappeared (Fig. 4) and *Succinivibrio* increased (from 0.1 to 2.1%). Among *Proteobacteria* phylum, Pasteurellaceae family was dominant (37% relative abundance) between 2 and 3 days, but *Gammaproteobacteria unclassified* became dominant (25% relative abundance) between 15 and 83 days (Fig. 3).

Among *Bacteroidetes*, *Bacteroidaceae* and *Prevotellaceae* were the predominant families (Fig. 3). *Bacteroidaceae* family was predominant (23.9%) between 2 and 12 days and then decreased to 1.8% while *Prevotellaceae* was predominant from 5 days (with 9.9, 28.8 and 46.8% between 2 and 5, 6 and 12, and 15 and 83 days, respectively). Major genera in these two families were *Bacteroides* and *Prevotella* (Fig. 4).

The *Firmicutes* phylum was observed at a constant 15.9% relative abundance over the 83 days (Fig. 4). Among *Firmicutes*, *Streptococcaceae* and *Lachnospiraceae* families were predominant (4.1 and 2.7%, respectively) between 2 and 6 days and thereafter, *Streptococcaceae* decreased to 0.9% while *Lachnospiraceae* increased to reach 10.3% from 9 days. *Granilicatella* and *Streptococcus* genera were predominant between 2 and 4 days (1.4 and 4.1%, respectively, Fig. 4).

Phyla; Classes		Age (days)																				PRE ^a	P-value ^b
Orders	Families	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	50		
Actinobacteria; Actinobacteria																							
<i>Actinobacteridae</i>	<i>Actinomycineae</i>	3.1%		7.8%		2.8%		0.3%												0.30	***		
	<i>Bifidobacteriaceae</i>	1.4%												-	*								
<i>Coriobacteridae</i>	<i>Coriobacterineae</i>	0.6%						3.4%														0.18	***
Bacteroidetes; Bacteroidia																							
<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	23.9%						1.8%														0.42	***
	<i>BS11</i>	0.3%																				-	NS
	<i>Porphyromonadaceae</i>	3.3%												0.2%								0.17	***
	<i>Prevotellaceae</i>	9.9%		28.8%						46.8%												0.46	***
	<i>Rikenellaceae</i>	0.6 ± 0.07%																				-	NS
	<i>Unclassified</i>	1.7%		3.9%						1.7%												0.26	***
Bacteroidetes; Flavobacteria																							
<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.3%												-	NS								
Fibrobacteres; Fibrobacteria																							
<i>Fibrobacterales</i>	<i>Fibrobacteraceae</i>	0.4%												-	NS								
Firmicutes; Bacilli																							
<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacteriaceae</i>	1.5%	0.1 %						ND ^c												0.31	*	
	<i>Lactobacillaceae</i>	0.99%												ND ^c								-	NS
	<i>Streptococcaceae</i>	4.1%				0.9%								ND ^c								0.18	***
	<i>Unclassified</i>	0.5%												ND ^c								0.14	***
Firmicutes; Clostridia																							
<i>Clostridiales</i>	<i>Clostridiaceae</i>	0.46%																				-	NS
	<i>Family XIII Incertae Sedis</i>	0.1%						0.2%														0.10	*
	<i>Lachnospiraceae</i>	2.7 %						10.3%														0.26	***
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	0.4%				0.1%		ND ^c												0.19	NS		
	<i>Ruminococcaceae</i>	3.4%												ND ^c								-	NS

	<i>Unclassified</i>	0.2%				-	NS	
	<i>Veillonellaceae</i>	0.9%				-	NS	
<i>Fusobacteria; Fusobacteria</i>								
<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacteriaceae</i>	4.8%		0.3%		0.27	***	
<i>Proteobacteria; Betaproteobacteria</i>								
<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	5.3%	2.7%	0.2%		0.27	***	
	<i>Comamonadaceae</i>	0.5%	0.1%			0.09	*	
<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	1.1%	3.1%	1.2%	0.1%	ND ^c	0.21	***
<i>Proteobacteria; Deltaproteobacteria</i>								
<i>Desulfovibrionales</i>	<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.3%				-	**	
<i>Proteobacteria; Epsilonproteobacteria</i>								
<i>Campylobacterales</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	0.5%				-	NS	
<i>Proteobacteria; Gammaproteobacteria</i>								
<i>Aeromonadales</i>	<i>Succinivibrionaceae</i>	1.4%				-	**	
<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	3.5%	0.2%	ND ^c		0.24	**	
<i>Pasteurellales</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	37.4%	9.2%	0.9%		0.72	***	
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	3.7%	1.1%	0.2%		0.48	***	
	<i>Pseudomonadeae</i>	0.2%	0.3%	ND ^c		0.06	*	
<i>Unclassified</i>		1.8%		24.8%		0.35	***	
<i>Spirochaetes; Spirochaetes</i>								
<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	ND ^c	1.0%	0.1%		0.08	*	

^a Proportion of variability by division in age-classes.

^b P value of the repeated measures analysis with *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; NS : $P > 0.05$.

^c ND = no detected

Fig. 3. Age classification of calf's ruminal samples according to bacteria relative abundance (average %) determined with TREE package of R between 2 and 83 days of age: orders and families taxonomical levels.

Phyla; Classes	Age (days)																					PRE ^a	P-value ^b
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	50	62		
Bacteroidetes; Bacteroidia																							
<i>Bacteroides</i>	23.9%										1.8%										0.42	***	
<i>Barnesiella</i>	0.03%										0.1%										0.12	*	
<i>Parabacteroides</i>	0.1%	0.5%			0.2%				0.03%				ND ^d						0.29	***			
<i>Porphyromonas</i>	2.2%										ND ^d						-	NS					
<i>Prevotella</i>	13.4%										41.8%										0.45	***	
<i>uncultured Prevotellaceae</i>											0.6%										-	NS	
<i>Xylanibacter</i>											2.0%										-	NS	
RC9											0.3%										-	NS	
Bacteroidetes; Flavobacteria																							
<i>Chryseobacterium</i>											0.4%										-	NS	
Fibrobacteres; Fibrobacteria																							
<i>uncultured Fibrobacteraceae</i>											0.4%										-	NS	
Firmicutes; Bacilli																							
<i>Granulicatella</i>	1.4%	0.1%				ND ^d										0.31	***						
<i>Enterococcus</i>	0.2%				ND ^d										-	NS							
<i>Lactobacillus</i>											0.5%										-	NS	
<i>Streptococcus</i>	4.1 ± 0.43%			0.4%										0.18	**								
Firmicutes; Clostridia																							
<i>Clostridium</i>	0.4%										ND ^d										-	NS	
<i>Eubacterium</i>	0.03%				0.3%			0.1%										0.18	***				
<i>Acetitomaculum</i>	0.1%										0.3%					0.9%					0.28	***	
<i>Butyrivibrio</i>											1.0%										-	NS	
<i>Coprococcus</i>	ND ^d										0.1%					0.3%					0.43	***	
<i>Incertae_Sedis Lachnospiraceae</i>											1.0%										-	NS	
<i>Lachnospira</i>	0.1%										0.4%										0.33	***	
<i>Moryella</i>	ND ^d				0.1%										-	NS							
<i>Oribacterium</i>	0.1%				1.1%			0.6%										0.31	***				
<i>Roseburia</i>											0.4%										-	NS	
<i>Syntrophococcus</i>	0.02%				0.5%										1.0%					0.25	***		
<i>uncultured Lachnospiraceae</i>											0.1 %										-	NS	
<i>Peptococcus</i>	0.2%				0.02 %										0.24	***							
<i>Peptostreptococcus</i>	0.4%				0.1%					ND ^d						0.18	***						
<i>Faecalibacterium</i>											0.3%										-	*	
<i>Incertae_Sedis Ruminococcaceae</i>	0.3%			1.4%				0.2%										0.33	***				
<i>Oscillibacter</i>	0.03%				0.2%				0.02%				ND ^d						0.19	*			
<i>Oscillospira</i>	0.1%			1.8%		0.3%		0.02%										0.10	**				

<i>Ruminococcus</i>	0.2%			-	NS	
<i>Subdoligranulum</i>	0.3%		ND ^d	-	NS	
<i>uncultured Ruminococcaceae</i>	0.1%	2.0%		0.36	***	
<i>Dialister</i>	0.5%		1.4%	0.15	*	
Fusobacteria; Fusobacteria						
<i>Fusobacterium</i>	4.1%	0.2%		0.26	***	
Proteobacteria; Betaproteobacteria						
<i>Pelistega</i>	2.6%	0.2 ±%		0.21	**	
<i>Comamonas</i>	0.1%		ND ^d	-	NS	
<i>Alysiella</i>	0.3%			-	NS	
<i>Bergeriella</i>	0.1%			-	NS	
<i>Neisseria</i>	0.3%	0.04%	ND ^d	0.33	***	
Proteobacteria; Deltaproteobacteria						
<i>Desulfovibrio</i>	0.3%			-	**	
Proteobacteria; Epsilonproteobacteria						
<i>Campylobacter</i>	0.5%			-	NS	
Proteobacteria; Gammaproteobacteria						
<i>Succinivibrio</i>	0.1%	2.1%		0.25	**	
<i>Enteric_Bacteria_Cluster</i>	3.4%	0.2%		0.24	**	
<i>Actinobacillus</i>	6.5%	0.1%	ND ^d	0.40	***	
<i>Gallibacterium</i>	1.1%			-	NS	
<i>Haemophilus</i>	1.4%	0.1%	ND ^d	0.45	***	
<i>Mannheimia</i>	4.5%	0.1%	ND ^d	0.44	***	
<i>Pasteurella</i>	4.7%	0.1%	ND ^d	0.53	***	
<i>Volucribacter</i>	0.7%	0.03%		0.29	**	
<i>Acinetobacter</i>	0.1%			-	NS	
<i>Moraxella</i>	3.3%	0.1%		0.44	***	
<i>Psychrobacter</i>	0.1%	0.4%	0.03%	0.19	**	
<i>Pseudomonas</i>	0.1%	0.4%	0.1%	ND ^d	0.07	NS
Spirochaetes; Spirochaetes						
<i>Treponema</i>	ND ^d	1.0%	0.1%	0.08	*	

^a Explained variability by division in age-classes.

^b P value of the repeated measures analysis with *** $P \leq 0.001$; ** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$; NS : $P > 0.05$.

^c No taxa assigned at genus level for *Actinobacteria* phylum.

^d ND = no detected

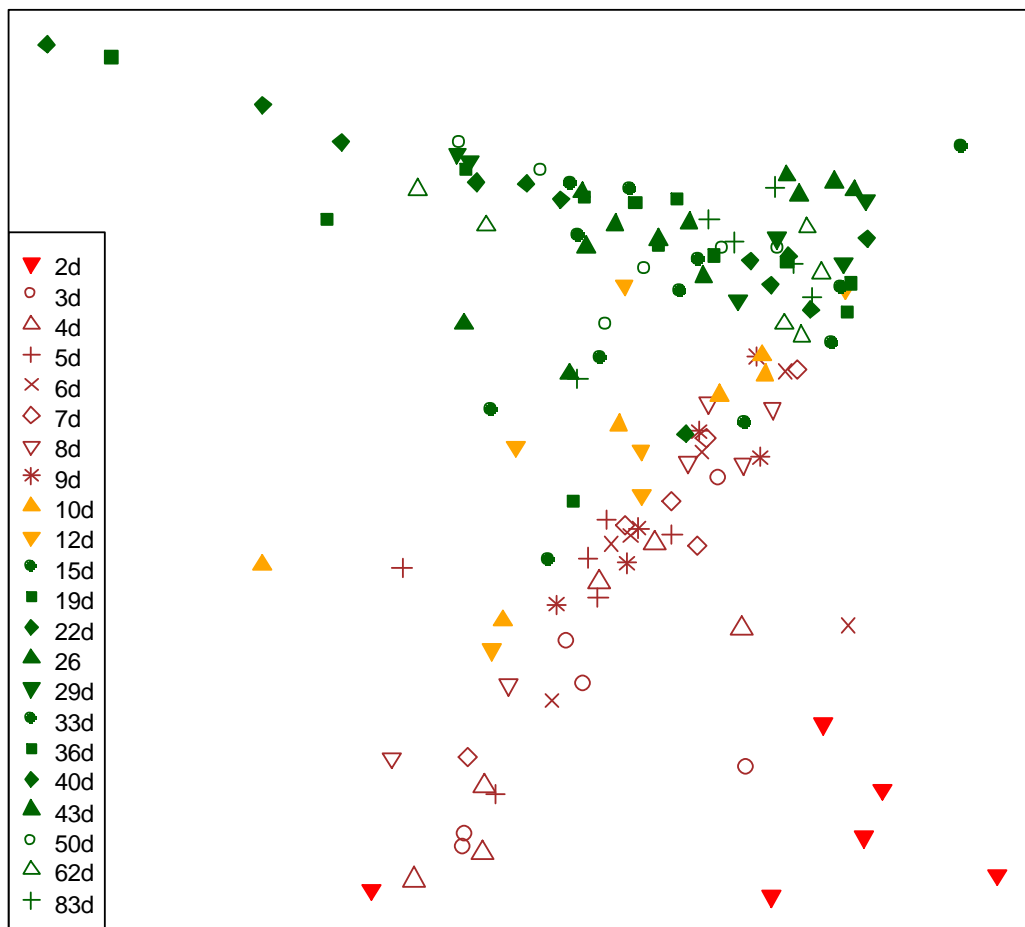
Fig. 4. Age classification of calf's ruminal samples according to bacteria relative abundance (average %) determined with TREE package of R between 2 and 83 days of age: genera taxonomical level.

The *Actinobacteria* phylum relative abundance was 5.5% on average. The main families were *Bifidobacteriaceae*, *Actinomycineae* between 2 and 9 days and *Coriobacterineae* between 15 and 83 days. The *Fusobacteria* phylum relative abundance was 4.9% between 2 and 9 days, and decreased to 0.1% after 10 days. The *Spirochaetes* phylum appeared at day 4. Between 4 and 15 days, *Treponema* was observed at a 1% abundance, which decreased to 0.1% between 19 and 83 days. The *Fibrobacteres* phylum appeared at 4 days of age (0.4% relative abundance) and did not vary over time. *Granilicatella* and *Streptococcus* were predominant between 2 and 4 days (1.4 and 4.1%, respectively, Fig. 4).

Evolution with age of ruminal bacteria profiles and bacterial community stability

The bacteria profiles at the family taxonomical level significantly evolved with age (R-ANOSIM = 0.403, P = 0.008, Fig. S1). Based on heatmap analysis (Fig. S2), three groups could be identified: day 2, days 3 to 15 and days 19 to 83. Actually, Fig. S1 emphasises that bacteria profiles at day 2 differ from subsequent profiles and that bacterial profiles are stable from day 15. More precisely, the nMDS analysis (Fig. 5) shows three main groups according to age: day 2 (Fig. 5, close red symbol), between days 3 and 9 (open red symbols), and between days 15 and 83 (green symbols), bacteria profiles at days 10 and 12 (orange symbols) being intermediate between the two later.

The Euclidian distance between days 2 and 3 was high, showing a strong evolution of the bacteria profile (Fig. 6). However, the day to day stability indicator of the family's relative abundances was not significantly affected by age over the 83 days of experiment.



stress = 12.74

Fig. 5. nMDS plot of profiles at family taxonomical level of calves bacterial community between 2 and 83 days of age (the close red symbols, the open red symbols, the orange symbols, and the green symbols represent profiles at 2, 3 to 9, 10 to 12 and 15 to 83 days of age, respectively).

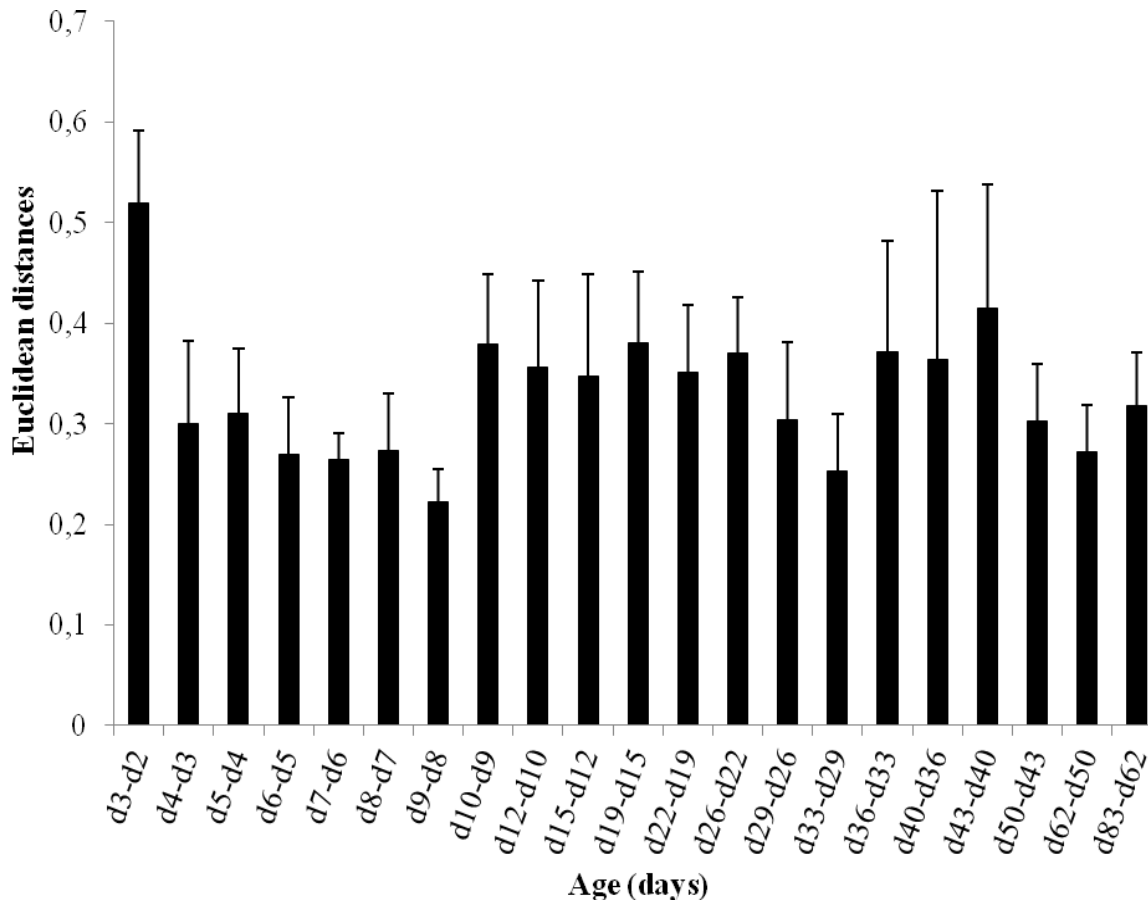


Fig. 6. Evolution of bacteria stability, expressed as Euclidean distance differences of families relative abundances between two consecutive samples, between 2 and 83 days of age.

Discussion

Evolution of ruminal bacteria density and diversity with age

In the present study, a bacterial community was detected in the ruminal content of calves from day 2, with an average concentration of 1.68×10^{10} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content that was strongly variable between calves ($SEM = 8.72 \times 10^9$). This concentration averaged 1.09×10^{10} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of ruminal content between 2 and 7 days of age. Previous studies using cultural techniques found, 2 days of age of lambs, 10^9 bacteria cells ml^{-1} of ruminal content (Fonty *et al.*, 1987), and 3 days of age of calves, 10^9 cfu of total anaerobic bacteria g^{-1} of ruminal content (Hajime *et al.*, 1992).

In our study, between 7 and 83 days of age, concentration of ruminal bacteria reached a plateau with an average value of 1.41×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal

content which is in accordance with values reported in adult cow rumen using cultivation techniques (Fonty *et al.*, 1995; Moon *et al.*, 2010). Previous studies showed that bacterial density reaches a plateau between 10 and 20 days of age in the rumen of lambs (Fonty *et al.*, 1987) and from 1 month in the rumen of calves (Anderson *et al.*, 1987). The age differences to reach the plateau of rumen bacterial density could be explained by the differences between animal species, or the direct environment of the animals (contact or not with adult or other young ruminants) and / or diets.

Neither the indexes of bacteria diversity, nor the number of OTU were affected by age of calves. The day to day indicator of stability of bacterial community did not change with age, showing that no specific period exhibited a particular day to day instability.

Evolution of ruminal bacterial community from day 2 to day 12

At day 2, bacteria belonging to *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* and *Firmicutes* phyla were already present. These phyla comprised a large part of facultative anaerobic bacteria genera (as *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus* and *Streptococcus* for example). This result is consistent with Fonty *et al.* (1987) and Hajime *et al.* (1992) who also observed a large part of both facultative and strictly anaerobic bacterial communities between 2 and 3 days of age.

Between days 3 and 12, *Bacteroides* was the predominant genus observed in the ruminal content of calves. Many other genera were detected including *Prevotella*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Enteric_Bacteria_Cluster*, *Moraxella*, *Pelistega* and the *Actinomiceneae* family. This profile strongly differed from the bacterial profile observed at day 2. A large part of bacteria genera that were predominant between 2 and 3 days were under 1% of relative abundance between 4 and 12 days, especially in the *Gammaproteobacteria* class. With the same molecular technique than ours, Li *et al.* (2011) observed that, for calves fed only milk, at day 14, *Prevotella* was the predominant genus (33.1%), followed by *Bacteroides* (18.1%), *Oscillibacter* (12.9%), *Paraprevotella* (7.1%), *Butyricimonas* (3.1%) and *Pelistega* (3%). In our study, from 4 days of age, the *Spirochaetes* phylum appeared with only the *Treponema* genus. This phylum was not observed by Li *et al.* (2011). The large differences observed among studies suggest that the bacteria establishment in the rumen is highly variable. It could be under control of the contamination by the calf's environment (diet, water, pen, others animals).

Bacteroides, *Prevotella*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* and many other genera are known to have several functions in rumen of cows, such as cellulolysis, hemicellulolysis, pectinolysis, amylolysis, ureolysis, proteolysis, ammonia production (Yokoyama & Johnson, 1988). In calves or lambs fed only milk, and using culture techniques, Anderson *et al.* (1987), Fonty *et al.* (1987) and Morvan *et al.* (1994) have already observed several functional ruminal bacteria groups during the first week of age, including cellulolytic and sulfate-reducing bacteria. In our study, calves started eating concentrate only at day 10. As described in a companion paper (Rey *et al.*, 2012), between 4 and 10 days of age, we observed important ruminal fermentative and enzymatic activities in calves. These observations imply the establishment of the main ruminal functional bacteria and the capacity to degrade solid food before the arrival of solid substrates in the rumen. Bryant *et al.* (1958) observed in calves, with a cultivation method, a larger number of cellulolytic bacteria during the first week than during weeks 3, 6, 9 and 13, where the number of cellulolytic bacteria was close to that observed in adult cows.

In our study, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Actinomycineae*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Bifidobacteriaceae* and other genera were observed with an important abundance from 2 to 10 days, which corresponds to a period of time when calves ingested only milk. *Prevotella* and other less abundant genera which are known to be part of ruminal adult community (Kong *et al.*, 2010, Zened, 2011) were observed from 2 days of age. Because Rey *et al.* (2012) showed that, from day 2, both E_h and pH are in the range of values observed in adult animals; this suggests that the rumen environment becomes very quickly suitable for the establishment of digestive functions. Actually, this complex bacterial community would be able to perform extensive enzymatic activities, including cellulolysis, amylolysis, and proteolysis, demonstrating the establishment of ruminal functions before the arrival of solid foods.

Evolution of ruminal bacterial community from day 15 to day 83

The bacteria profiles before and after 15 days of age were different. Most bacteria families and genera that were predominant until day 15 declined or disappeared between 15 and 83 days of age: *Granulicatella* and *Enterococcus* disappeared and *Bacteroides*, *Actinomycineae*, *Streptococcus*, *Fusobacteria*, *Pelistega* and *Treponema* declined to reach 1.8, 0.3, 0.4, 0.2, 0.2 and 0.1% relative abundances, respectively. At the same period *Proteobacteria* phyla increased to reach 25.4% with a predominance of *Gammaproteobacteria unclassified*. *Prevotella* genus and *Coriobacterineae* family increased

to achieve 41.8 and 3.4% relative abundances, respectively. These modifications appeared around 15 days of age, at the same time as the starter pelleted concentrate intake by calves increased, and when Rey *et al.* (2012) noted a strong acidification of the rumen, the pH decreasing from 6.69 to 5.82.

From 1 month of age, 13 genera disappeared, belonging in a large part to *Proteobacteria* and *Firmicute* phyla. At the same time, *Coprococcus* and *Moryella* genera appeared and *Dialister* and *Syntrophococcus* increased to achieve 1.4 and 1% relative abundances, respectively. At this age-period in our study, calves ate more and more starter concentrate and started eating some hay leading to a significant increase of ruminal pH value (increasing from 5.82 to 6.34, Rey *et al.*, 2012). Consequently, starter pelleted concentrate and hay intake seemed to cause disruption in the bacterial community: a selection phase of bacterial community would be set up with bacterial taxa that were more specific and adapted to these new substrates.

In our study, from 15 days of age, the *Bacteroidetes* phylum was mainly composed of *Prevotella*. This was not in accordance with the results of Li *et al.* (2011) who observed, at 42 days of age that *Bacteroides* was predominant in the rumen of calves eating only milk replacer; whereas *Prevotella* had a very low abundance (5.1%). Our observed predominance of *Prevotella* was in accordance with results obtained with the 454 pyrosequencing techniques and taxonomical analysis on steers by Pitta *et al.* (2012) or on 12-months-old bulls by Li *et al.* (2011) or in adult dairy cows (Zened, 2011), suggesting that this genus is associated with diets containing solid food. Similarly, the differences of *Bacteroides* abundance between our study and that of Li *et al.* (2011) could be explained by differences in animal diet. These observations suggest that the earlier the calves start eating solid food, the earlier their ruminal bacterial community tends to be similar to that of adults. A large abundance (25%) of *Gammaproteobacteria unclassified* was observed in our study between 19 and 83 days of age, which was different from that observed in the rumen of adult cows where it represented only 3% (Zened, 2011). This high abundance could rely on differences between pre-weaned calves diets and adult diets, like the forage: concentrate ratio or the presence of milk in the rumen.

In adult cows fed maize silage based diet, Zened (2011) showed that the ruminal microbiota was composed predominantly by the genera *RC9* (11.3% vs. 0.3% in our calves), *Prevotella* (10.9% vs. 41.8% in our calves), *Lachnospiraceae uncultured* (6.7% vs. 0.1% in our calves), *Ruminococcaceae Incertae_Sedis* (4.2% vs. 0.2% in our calves), *Butyrivibrio* (2.4% vs. 1.0% in our calves), *Lachnospiraceae Incertae_Sedis* (1.9% vs. 1.0% in our calves), *Barnesiella* (1.0% vs. 0.1% in our calves), *Ruminococcus* (0.9% vs. 0.2% in our calves),

Lachnospira (0.6% vs. 0.4% in our calves) and *Treponema* (0.2% vs. 0.3% in our calves). The ruminal bacteria genera observed in calves between 15 and 83 days of age tended to be close to the ruminal adult community but differed in relative abundance. Rey *et al.* (2012) showed that the ruminal fermentative and enzymatic functions become time-stable from 1 month of age. Taken together, these results suggest a differentiation between ruminal bacterial functions (enzymatic activity) that stabilized at one month near values observed in adults, and the ruminal bacteria profiles that become stable at 15 days of age, but with relative abundances not similar to that of adults. These results suggest that the bacterial community of preweaning calves could have the same enzymatic capacity than that of adults in spite of different bacterial profiles.

Conclusion

This study showed that the establishment of a ruminal bacterial community in calves is rapid after birth. At day 2, the ruminal bacterial community was complex. At this period, the establishment was probably dependent on the contamination from both external environment and diet. Rapidly, between 2 and 15 days, the ruminal community was composed of many bacteria known in the mature rumen for their cellulolytic, hemicellulolytic, pectinolytic, amylolytic, ureolytic and proteolytic activities. These data show that bacteria responsible on degradation of feedstuffs are established before the arrival of any solid substrate, in relation with a rapid establishment of favourable conditions in the ruminal environment. Between 10 and 15 days, calves began eating solid food, which was associated with a progressive change of bacterial community. From 15 days, the community was stable. The ruminal bacteria genera tended to be close to that previously reported in adults but with different relative abundances, as opposed to functions that were reported to be stable from one month of age and similar to that of adults. This suggests that different genera would have the same enzymatic potential than in adults even if the bacterial community is not mature.

Acknowledgements

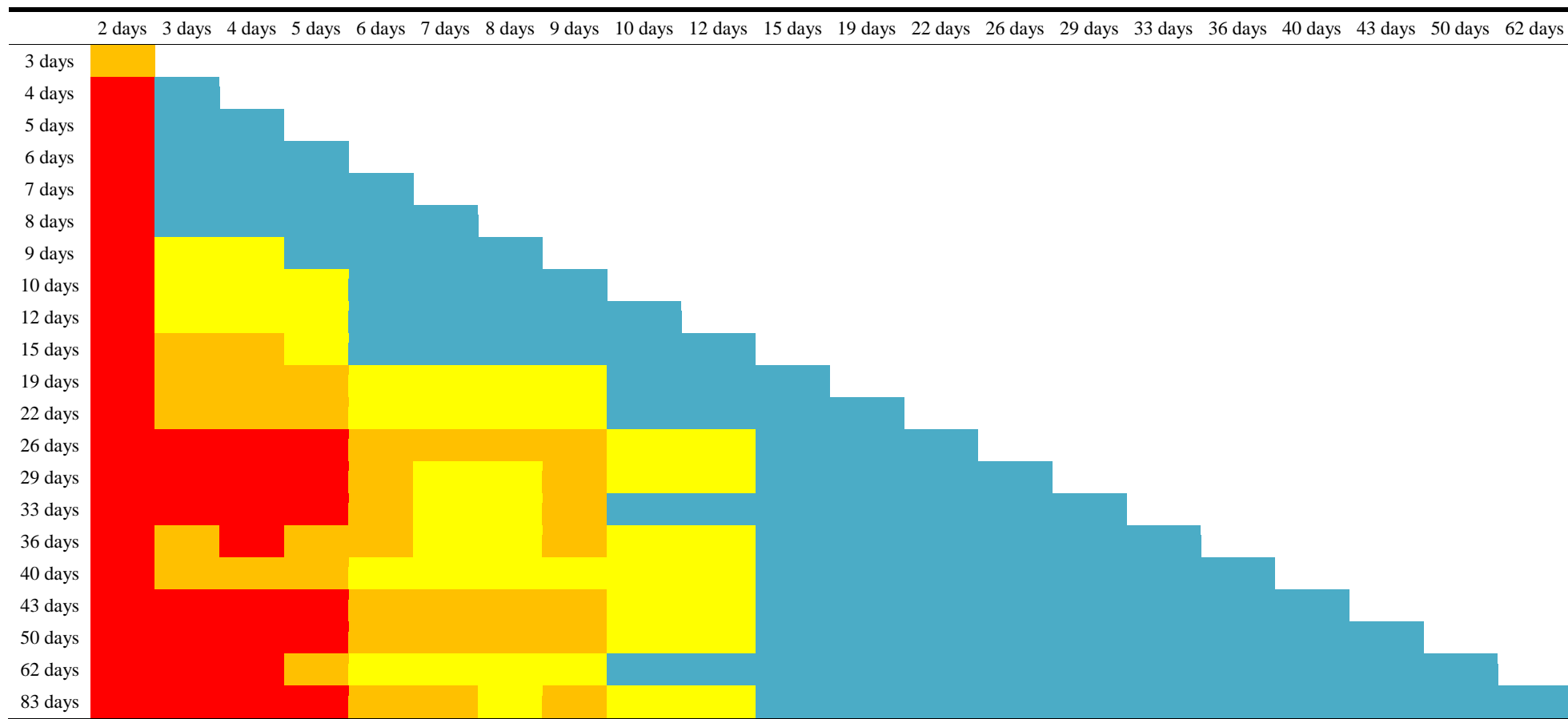
We thank the Midi-Pyrénées region for the financial support in this project. We would like to thank the staff of the experimental station “Domaine de Borret Poucharramet” (France). We would like to thank all staff for technical assistance in sample preparation, particularly Beatrice Gabinaud and Nina Munster (INRA technician and student respectively, France).

References

- Anderson, KL, Nagaraja TG & Morrill L (1987) Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J Dairy Sci* **70**: 1000-1005.
- Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyren P & Engstrand L (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS ONE* **3**: e2836. doi:10.1371/journal.pone.0002836.
- Anonymous. 1988. Arrêté du 18 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. pp.5608-5610 in Journal Officiel de la République Française. J. O, Paris.
- Agarwal N, Kamra DN, Chaudhary LC, Agarwal I, Sahoo A & Pathak NN (2002) Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. *Lett Appl Microb* **34**:329-336.
- Bryant MP, Small N, Bouma C & Robinson I (1958) Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J Dairy Sci* **41**:1747-1767.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4117-4120.
- Fonty G, Gouet P, Jouany J-P & Senaud J (1987) Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J Gen Microbiol* **133**:1835-1843.
- Fonty G, Jouany J-P, Chavarot M, Bonnemoy F & Gouet P (1991) Development of the rumen digestive functions in lambs placed in a sterile isolator a few days after birth. *Reprod Nutr Dev* **31**: 521-528.
- Fonty G, Jouany JP, Forano E & Gouet P (1995) L'écosystème microbien du réticulorumen. In: Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce M-H & Journet M (Eds.) Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. Paris, France, pp.299-348.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH & Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**:R80
- Habel RE (1975) The anatomy of the domestic animals, Saunders, Philadelphia.
- Hajime M, Mokoto O, Shoji S, Hisao I, & Makoto M (1992) Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *J Gen Appl Microbiol* **38**: 447-456.
- Hungate RE (1966) The rumen and its Microbes. New York and London: Academic Press.
- King Y, Teather R, Forster R (2010) Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol Ecol* **74**: 612-622.
- Kruskal JB (1964) Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* **29**: 1-27.
- Li RW, Connor EE, Li C, Baldwin RL & Sparks ME (2011) Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ Microbiol* **14**: 129-139.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: e120doi:10.1093/nar/gkm541.
- Longenbach, JI & Heinrichs AJ (1998) A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. *Anim Feed Sci Technol* **73**:85-97.

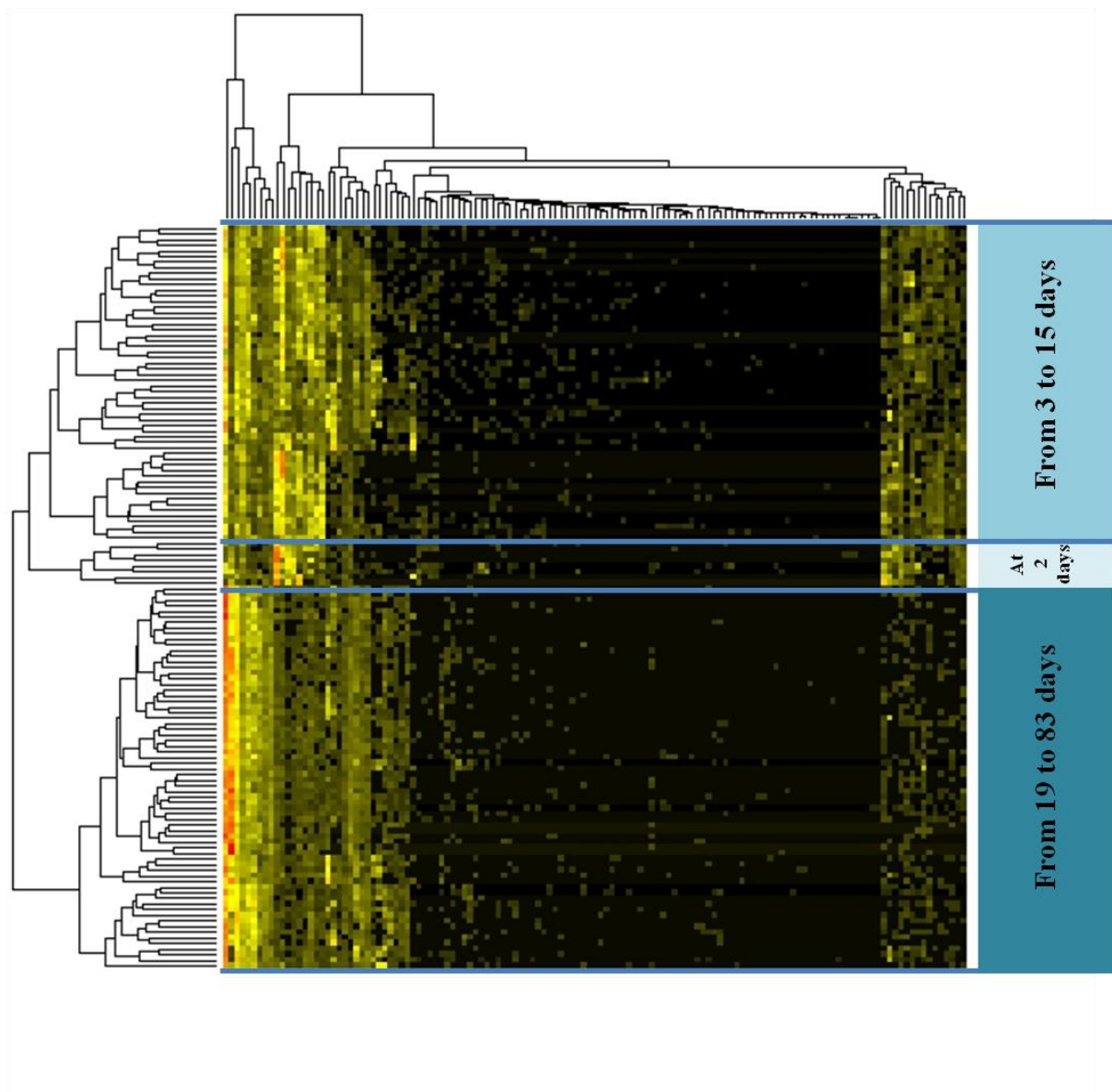
- Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe & Cauquil L (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analyses of microbial fingerprint profiles. *Mol Ecol Resour* **9**: 1359-1363.
- Moon YH, Ok JU, Lee SJ, Ha JK & Lee SS (2010) Comparative study on the rumen microbial populations, hydrolytic enzyme activities and dry matter degradability between different species of ruminant. *Anim Sci J* **81**: 642-647
- Morvan B, Dore J, Rieu-Lesme F, Foucat L, Fonty G & Gouet P (1994) Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiol Lett* **117**: 249-256.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H & Wagner H (2010) Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17.4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ørskov ER, Benzie D & Kay RNB (1970) The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. *Brit J Nutr* **24**:785-795.
- Pitta DW, Pinchak WE, Dowd SE, Osterstock J, Gontcharova V, Youn E, Dorton K, Yoon I, Min BR, Fulford JD, Wickersham TA & Malinowski DP (2010) Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb Ecol* **59**: 511-522.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J & Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188–7196.
- Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 142-160
- Rey M, Enjalbert F & Monteils V (2012) Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. *J Dairy Sci* **95**: 1500-1512.
- Schloss PD (2009) A High-Throughput DNA Sequence Aligner for Microbial Ecology Studies. *PLoS ONE* **4**: e8230. doi:10.1371/journal.pone.0008230.
- Therneau TM & Atkinson B (2010) R port by Brian Ripley, rpart: Recursive Partitioning. R package version 3.1-48, <http://CRAN.R-project.org/package=rpart>.
- Wise GH & Anderson GW (1939) Factors affecting the passage of liquids into the rumen of the dairy calf. I. Method of administering liquids: drinking from open pail versus sucking through a rubber nipple. *J Dairy Sci* **22**:697-705.
- Yokoyama MT & Johnson KA (1988) Microbiology of the rumen and intestine. In: The ruminant animal digestive physiology and nutrition, D.C. Church Eds. pp.125-143.
- Zend 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. PhD Thesis, Université de Toulouse, France.

Supporting Information, Figure S1. Similarity values (R-ANOSIM) between the different ages in calves between 2 and 83 days of age, at family taxonomical level. (R-ANOSIM between 0 and 0.25 ="blue", between 0.25-0.50 ="yellow", between 0.50-0.75 ="orange", greater than 0.75 ="red")



Supporting Information, Figure S2: **Euclidian distances between the relative abundances of taxa (family taxonomical level) across all samples over 83 days of experiment.**

The heatmap shows the Euclidian distances between the relative abundances of families in calves ruminal samples between 2 and 83 days of age. Color intensity for all panels is proportional to the relative abundances (low relative abundance = "black", high relative abundance = "red", medium relative abundance = "yellow"). Each line corresponds to one of the 132 samples and each column to one of the 131 taxonomical groups (128 families + 2 *unclassified* classes + 1 *unclassified* order). The blue rectangles and lines represent the age groups of calves (at day 2 = "light blue", between 3 and 15 days = "medium blue" and between 19 and 83 = "dark blue").



Chapitre 3- Etude expérimentale 1 : Etude de la mise en place des paramètres physico-chimiques et des paramètres fermentaire du rumen ainsi que l'implantation du microbiote ruminal chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage (à 83 jours).

ARTICLE 3

Implantation de la communauté des protozoaires et des archées dans le rumen chez les veaux de race laitière de la naissance au sevrage (en préparation pour « *Applied and Environmental Microbiology* »)

Au vu des résultats observés dans les articles 1 et 2 issus de l'expérimentation 1, il a été mis en évidence la mise en place rapide dès 2 jours d'âge des activités enzymatiques principales (xylanase, amylase et protéase) et des paramètres fermentaires (ammoniac et AGV) qui coïncident avec une implantation dense et complexe de la communauté bactérienne du rumen. Chez les ruminants adultes, l'écosystème ruminal est composé par d'autres communautés au sein du microbiote comme les protozoaires et les archées qui jouent un rôle important au sein de cet écosystème. Il semblait donc nécessaire de compléter nos connaissances sur la mise en place de l'écosystème ruminal chez le jeune veau et donc d'étudier aussi l'implantation des autres communautés du rumen. Dans ce but, une troisième étude a été réalisée à partir des échantillons de contenu ruminal de l'expérimentation 1. Le but de cette étude était d'approfondir et de décrire l'implantation des archées et des protozoaires ciliés. La caractérisation des archées a été réalisée à l'aide de techniques de biologie moléculaire : qPCR et pyroséquençage 454 haut débit basé sur l'ARNr 16S, alors que celle des protozoaires a été faite par dénombrement sur cellule de comptage. Durant toute la période expérimentale, aucun protozoaire cilié n'a été observé. A partir de 2 jours d'âge, la communauté des archées a été observée avec une densité comprise entre $1,22 \times 10^4$ et $3,27 \times 10^5$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. Cette densité augmentait jusqu'à 29 jours pour atteindre une valeur de $3,01 \times 10^6$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. Dès 2 jours d'âge, le genre *Methanobrevibacter* était prédominant (90%) avec deux autres populations importantes observées: la famille *VadinCA11_gut_group* (7%) et le genre *Methanosphaera* qui évoluait avec l'âge (2% entre 2 et 22 jours, 9% entre 22 et 83 jours). Dans cette étude, la mise en place de la communauté des archées était variable entre les veaux et évoluait avec l'âge. La communauté des archées du rumen s'implante donc dès les premiers jours après la naissance, avant la prise d'aliments solides. Sa composition chez les jeunes pré-ruminants est proche taxonomiquement de celle observée chez les adultes, mais avec des abondances relatives différentes, peut être en raison de l'absence de protozoaires.

Establishment of protozoal and archaeal communities in the rumen of dairy calves from birth to weaning

Mickael Rey^{a,b,c}, Francis Enjalbert^{c,a,b,*}, Sylvie Combes^{a,b,c}, Laurent Cauquil^{a,b,c}, Olivier Bouchez^d & Valérie Monteils^{b,a,c,e,f}.

^a INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

^b Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

^c Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

^d INRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénée, F-31326 Castanet-Tolosan, France

^e Present address: Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

^f Present address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Keywords: dairy calves; rumen archaea; 454 pyrosequencing; protozoa

* Corresponding author: Francis Enjalbert, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, UMR 1289, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France. Phone: +33 5 61 19 32 70; Fax: +33 5 61 19 38 87, email: f.enjalbert@envt.fr

Abstract

In this study, quantitative PCR and high-throughput 454 16S rRNA-based pyrosequencing were used to characterize the establishment of ruminal archaea and protozoa in dairy calves from birth to 83 days (weaning). Six Holstein calves were immediately separated from their mother at birth and placed in individual pens. Calves received colostrum during the first 3 days of age and thereafter a milk replacer, a starter pelleted concentrate and hay. Ruminal samples were taken 1 hour after milk feeding every day between days 1 and 10 and thereafter at days 12, 15, 19, 22, 26, 33, 36, 40, 43, 50, 62 and 83. No protozoa were observed over the 83 days of experiment. From day 2, ruminal archaea were observed at a density comprised between 1.22×10^4 and 3.27×10^5 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content, which increased to 3.01×10^6 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content from day 29. From day 2, *Methanobrevibacter* genus was the predominant ruminal archaea in all calves with a 90% relative abundance. Two other ruminal communities were observed in all samples as predominant: the *VadinCA11_gut_group* family at 7% and the *Methanosphaera* genus that evolved with the age of calves (2% between 2 and 22 days; 9% between 22 and 83 days). In this study, the establishment of archaeal community was variable between calves and evolved with age. The ruminal archaeal community established on the first days after birth, before solid food intake, and had the same genera but with different relative abundances than previously described in adults probably due to absence of ciliated protozoa.

1. Introduction

In the cow rumen, a complex ecosystem is present with a diverse and dense microbial community composed of bacteria, archaea, fungi and protozoa. These microorganisms ferment feedstuff components to provide the energy and other nutrients required by the host animal. Within this ecosystem, the communities densities are between 10^{10} and 10^{11} , 10^7 and 10^9 , 10^4 and 10^6 , and 10^3 and 10^5 cells/g of ruminal content for bacteria, archaea, ciliated protozoa and fungi zoospores, respectively [1, 2, 3, 4]. In the rumen, the largest part of plant cell wall breakdown is due to ruminal fibrolytic bacteria, and involves hydrogen producing biochemical pathways [5, 6]. The hydrogen produced is rapidly transformed to methane by the methanogen population, composed of archaea [7, 8]. Methane production by archaeal

community causes a loss of dietary energy and contributes to the production of global greenhouse gases [9, 10, 11], resulting in both nutritional and environmental concerns in the livestock industry [12].

At birth in the young ruminant, the rumen is non functional and sterile. Before weaning, the young ruminant mainly consumes milk. Due to the oesophageal groove closure, milk directly passes to the abomasum and is digested in the abomasum and the small intestine [13]. However, the oesophageal groove closure is not complete, allowing a small part of saliva and ingested liquid to pass into the rumen [14]. This is the first exchange between the rumen and external environment, leading to a contamination by bacteria, protozoa, fungi and archaeal communities. Later, when solid food intake begins, it arrives directly to the rumen, representing a further source of contamination. In newborn ruminants, several studies have shown that the establishment of ruminal bacteria and their functions in the rumen are rapid and sequential, with a high density of anaerobic bacteria population as early as 2 days of age [15, 16, 17, 18]. In lambs, the ruminal archaeal community is observed from the first day of life with 10^4 methanogens/g of ruminal content at the end of the first week [17, 19], and between 10^8 and 10^9 methanogens/g of ruminal content at 3 weeks of age [17]. The first observed archaea are mainly *Methanobrevibacter* spp. (*Methanobacteriales* orders) [17].

In adult bovine rumen, *Methanobacteriales* is also the predominant archaea order, the *Methanomicrobiaceae* family is predominant in the rumen epithelium associated archaea and *Methanobacteriaceae* family is predominant in the ruminal fluid [20, 21, 22]. In ruminants, Morgavi et al. [23] and Ohene-Adjei et al. [24] have shown a relationship between protozoal and archaeal communities and those changes of composition of ruminal protozoal community induce changes in the archaeal community composition. In cattle, Tymensen and McAllister [25] showed that *Methanobrevibacter* and *RCC* are the predominant archaea taxa associated with ruminal protozoa.

Most previous studies relative to ruminal archaea have focused on the effect of diet and feed additives on this population and methane gas production in adults, and data relative to the establishment of this community in young animals are mainly available in lambs. In consequence, the aim of this study was to 1) describe the establishment of the archaeal community in the calf rumen from birth to weaning using molecular tools, 2) investigate the possible link between ruminal archaea establishment and solid food intake and 3) investigate the possible link between archaea and protozoa establishments.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental design and ruminal sampling

The experiment was realized in accordance with the Guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture for animal housing and handling procedures [26]. Five male and 1 female Holstein calves (initial weight 39.4 ± 1.7 kg) immediately separated from their mother at birth, were placed in individual pens (1.05×2.30 m, bedded with straw) without any contact with adult animals. The first 3 days of age, calves received daily 2.5 litres of frozen-thawed colostrum. Between 4 and 83 days (end of the study), calves received milk replacer, starter pelleted concentrate and hay as described by Rey *et al.* [2012]. Samples of ruminal content (approximately 500 mL) were collected *via* a stomach tube (internal diameter 13 mm) sterilized before use with 2% Steranios (Centravet 803910, disinfection of surgical and medical equipment), 1 h after the milk morning meal and just before the distribution of hay and starter concentrate every day from 1 to 10 days and at 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 50, 62 and 83 days of age.

2.2. Protozoa samples and protozoa counting

One part of ruminal fluid samples was strained through a polyester monofilament fabric (250 μm mesh aperture) and 3 mL of ruminal fluid samples were mixed with 3 mL of methylgreen-formalin solution (3.5% formaldehyde, Sigma, France; 0.14M NaCl, Sigma, France; 0.92 mM methylgreen, Sigma, France). The mixed samples were stored at room temperature in the dark. Counting was done, using Thomas cellular enumeration chamber (Fisher Scientific, France) under a microscope (Leitz Biomed Microscope, Nurnberg, Germany) with x10, x40 and x100 enlargments for *Entodinium* greater than 100 μm , *Dasytricha* and *Isotricha*, and *Entodinium* smaller than 100 μm , respectively.

2.3. In vitro measure of methane production and methane analysis

At 1, 5, 10, 15, 22, 29, 33, 36, 40, 43, 50, 62 and 83 days, gas production from calves ruminal fluid was measured *in vitro*. One part of ruminal samples was strained through a metal sieve (1.6-mm mesh) and 3 mL of the filtrate were mixed with 13 ml of bicarbonate buffer solution (19.5 g of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, 9.24 g of NaHCO_3/L , 0.705 g of NaCl/L , 0.675 g of KCl/L , 0.108 g of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, and 0.180 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$, Sigma, France)

prewarmed at 39 °C with a pH at 6.8. Two replicates of ruminal samples were incubated for 4 hours at 39 °C in a 100 mL – closed syringe, devoid of oxygen, and containing 0.5 g wheat bran as substrate. The gas produced during incubation was entirely transferred to 5 mL - vacutainer tubes (vacuum and dry, Centravet, France) to avoid any loss and external contaminations (5 tubes by syringe on average). The vacutainer tubes were stored at room temperature until analysis. Methane was detected by Micro Gas Chromatography (μ GC Varian CP4900, Netherland) with argon as the carrier gas and a column composed of two concentric columns (Alltech column CTR1, Alltech, France). The inner column, topped with Silicagel, was used to separate CO₂ from other gases. The external column was packed with a molecular sieve and used to separate CH₄. No quantification was attempted, but only the presence was qualitatively assessed.

2.4. Microbial samples and total DNA extraction

The ruminal samples, every day between 2 and 10 days and at 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 50, 62 and 83 days of age, were strained through a metal sieve (1.6 mm mesh) and 0.2 g of the filtrate was collected into sterile eppendorf with glass beads for DNA extraction. Ruminal samples were immediately stored at -20 °C and thereafter transferred at -80 °C in laboratory until DNA extraction.

Total DNA from ruminal samples was extracted combining thermic and mechanical effects with a FastPrep instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France) and chemical lyses with the QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. At the end of extraction, DNA samples were eluted on 25 μ L of AE buffer (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at -20°C. The quantities and qualities of DNA extracted were measured with NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, Germany).

2.5. Total archaea real time PCR

The total archaea were estimated from number of copies of 16S rRNA gene /g of fresh ruminal content and the quantification was carried out by realtime PCR. Assays were performed using the ABI Prism 7900 HT system (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) using optical grade 384-well plates in a final volume of 10 μ L. TaqMan qPCR technology was used for the archaea quantification. The TaqMan reaction mixture contained template

DNA, a mix of primer (200 nM forward 5' GGYCGCAAGGCTGAACTTAA 3' *E coli* position 894-914, and reverse 5' CAGGCTCCACSCGTTGT 3' *E coli* position 935-951), and of 250nM of TaqMan probe (5' CTCCCCCGCCAATT 3', *E coli* position 818-931, [27], and a TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). The PCR program consisted of 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles with 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Then, the results were compared with a standard curve to obtain the number of target copies in the sample. The standard DNA curves were generated by amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference genomic DNA containing the target 16S rRNA gene (accession no. DSM861: *Methanobrevibacter smithii*). Data analysis was performed using SDS software version 2.3 (Applied Biosystems, Saint Aubin, France).

2.6. *Barcoded PCR and 454 pyrosequencing*

The amplification of extracted ruminal samples was realized in Nested PCR reaction. The first PCR was realized with two archaea primers: forward 86F (5' GCTCAGTAACACGTGG 3', [28]) and reverse 1040R (5' GGCCATGCACYWCYTCTC 3', adapted of primer 1000R in [28]). The first PCR reaction mixtures were realized with 1 µL of DNA sample, 0.5 µM of each forward and reverse primers, 1X PCR buffer, 100 µM dNTP, 0.5 U of IsisTM DNA polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) in a total volume 50 µl with water. The PCR thermal program was carried out at 92 °C for 2 min, followed by 32 cycles at 94 °C for 30s, 60 °C for 30s and 72 °C for 30s and finished at 72 °C for 7 min. The second PCR was realized with two specific primers allowing the amplification of V3, V4 and V5 hypervariable regions on the 16S rRNA genes (592 bp on *E. coli*) and linked with multiplex identifier (MID:11 pb nucleotide) which was unique for each sample (5' MID tags-NN-primer forward 3' and 5' MID tags-NN-primer reverse 3'; Eurogentec, Angers, France). The archaea primers used were forward 340F (5' CCCTACGGGGYGCASCAG 3'; (adapted from [29])) and reverse 915R (5' GTGCTCCCCCGCCAATT 3'; (adapted from [30])). The second PCR reactions mixtures were realized with 1 µL of sample from previous amplification, 0.5 µM of each forward and reverse primers, 1X PCR buffer, 100 µM dNTP, 0.5 U of IsisTM DNA polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) in a total volume 50µL with water. The PCR thermal program was carried out at 92 °C for 2 min, followed by 32 cycles at 94 °C for 30s, 60 °C for 30s and 72 °C for 30s and finished at 72 °C for 7 min. The amplicons were generated from each DNA sample separately and purified with MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), the individual purified amplicons

samples were checked on agarose gel 2% (w/v) and the quality and quantity of purified PCR products were analysed using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Over the 132 samples collected, only 92 amplicons could be quantified and were amplified and pyrosequenced.

The individual and purified samples were precisely quantified using Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay kit (Invitrogen, France) on an ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Saint Aubin, France) and then pooled in equimolar quantities at 500 ng/ μ L for each library (final DNA concentration). The pooled amplicons were pyrosequenced using 454 GS FLX Titanium (454 Life Sciences-a Roche Company, Branford, CT, USA) sequencer at the GeT platform of Toulouse in France (Genomic and Transcriptomic).

2.7. *Sequence analysis*

The 16S rDNA sequences (also referred to as 16S pyrotags) obtained from the 454 GS FLX Titanium pyrosequencing run were sorted based on their respective barcodes to form a total of 92 pyrotag libraries representing the 92 ruminal samples used. Sequences were filtered using an R script (R Development Core Team [31]) and the Biostrings package R [32], removing sequences that did not match with PCR primer sequences (2 mismatches allowed), with a short sequencing length (less than 300 nt), with at least one ambiguous base or with a long homopolymer (greater than 7). The 16S reads selected had an average read length of 501 ± 22 nucleotides after trimming. The open-source Mothur software (V.1.12; [33]) and the SILVA archaea alignment database [34] were used for cleaning, alignment and taxonomic assignment. The taxonomic affiliation was performed using the RDP-classifier [35] on the SILVA database with a bootstrap of 60%. Finally, sequences were assigned to Operational Taxonomic Unit (OTU, cutoff 0.03) with the calculation of pairwise distance between the alignments of sequences.

2.8. *Calculations and statistical analysis*

The VEGAN package of R [36] was used to generate diversity indexes from clusters in OTU (Shannon, ACE and Chao). Logarithms of qPCR densities, relative abundances of taxa and OTU diversity indexes were analyzed with the R software (R 2.12.2, R development Core Team, 2011), and results are reported as mean values with standard error. Age effect was

analyzed using repeated measures analysis and the TREE package of R (classification and regression trees) with the rpart (Recursive Partitioning and Regression Trees, [37]) procedure was used to generate age classes. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Feed Intake

The pattern of feed intake has been reported in a companion paper [18]. Briefly, calves drunk all milk distributed, the starter concentrate intake began from day 9 and was 363, 2 095, and 4 173 g/day on average at 30, 60 and 83 days of age, respectively. Hay intake was under 100 g/day during the first month, and was 431 and 440 g/day on average at 60 and 83 days of age, respectively.

3.2. Ruminal ciliate protozoa

Over the 83 days, no *Isotricha* sp., *Dasytricha* sp., and *Entodinium* sp. were observed.

3.3. In vitro methanogen activity

At day 1, no methane gas production was detected in ruminal fluids incubated *in vitro* (Table 1). From day 5 to day 83, gas methane was detected in all other incubates.

Table 1: PCR 454, real-time PCR and methanogen activity detection of archaeal community in calf's rumen sample between 1 and 15 days of age.

Age (days)	PCR 454 Archaea ¹	Real-time PCR archaea ¹	<i>In vitro</i> methanogen activity after 4h of incubation ²
1	ND	ND	0/6
2	4/6	6/6	ND
3	2/6	5/6	ND
4	1/6	4/6	ND
5	1/6	5/6	6/6
6	2/6	5/6	ND
7	1/6	2/6	ND
8	3/6	3/6	ND
9	3/6	4/6	ND
10	3/6	5/6	6/6
12	4/6	6/6	ND
15	4/6	6/6	6/6

¹Number of calves for which the amplification was possible / number of calves tested.

² Number of calves whose rumen samples resulted in methane production *in vitro* / number of calves tested.

ND = not determined

3.4. Density of total archaea in the rumen

At day 2, archaea were present in all calves (Table 1) with a variable density ranging from 1.22×10^4 to 3.27×10^5 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content (Fig. 1). From day 3 to 10, some calves had no more archaea, and all calves had archaea again from 12 days of age. The density evolved with age ($P < 0.001$), with 2 age classes explaining 46% of the total variance: from day 2 to 12 and from day 15 to 83 with 7.65×10^5 and 5.05×10^6 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content, respectively.

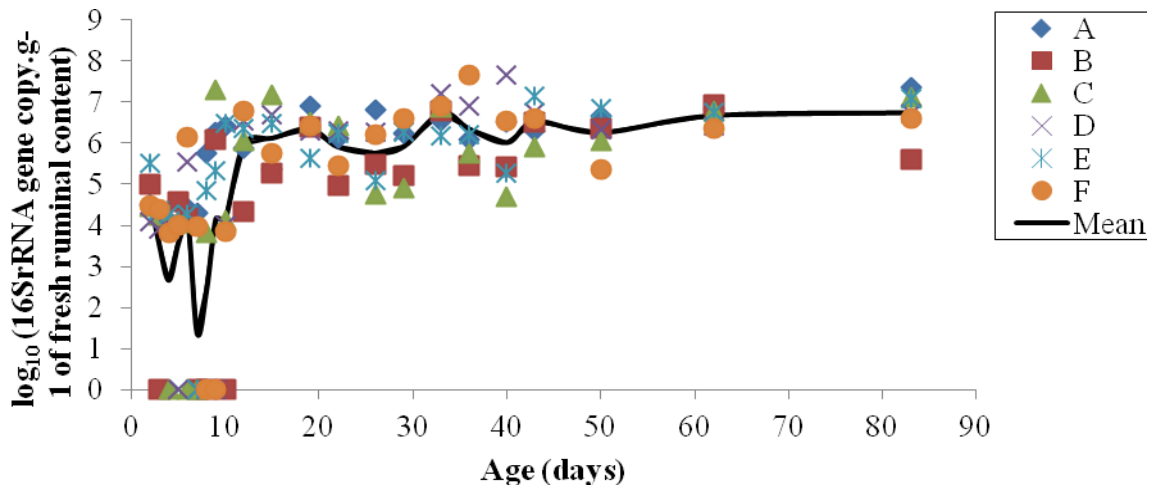


Fig. 1: Evolution of the density of the ruminal archaeal community in calves between 2 and 83 days of age. A, B, C, D, E and F represent the 6 calves.

3.5. OTU diversity index and evolution with age

The number of operational taxonomic units (OTUs) at a distance of 0.03 did not evolve with age and was 403 ± 31 for the 92 samples with a coverage value of $96 \pm 0.3\%$. The ACE and Chao indexes did not evolve with the age of calves and were 741 ± 54 and 609 ± 45 respectively. The Shannon index (Fig. 2) evolved with age ($P = 0.02$) and could be divided into 3 age classes explaining 56% of total variance: from day 2 to day 8, from day 9 to day 29 and from day 33 to day 83 with 4.64 ± 0.28 , 3.62 ± 0.26 and 4.02 ± 0.45 respectively.

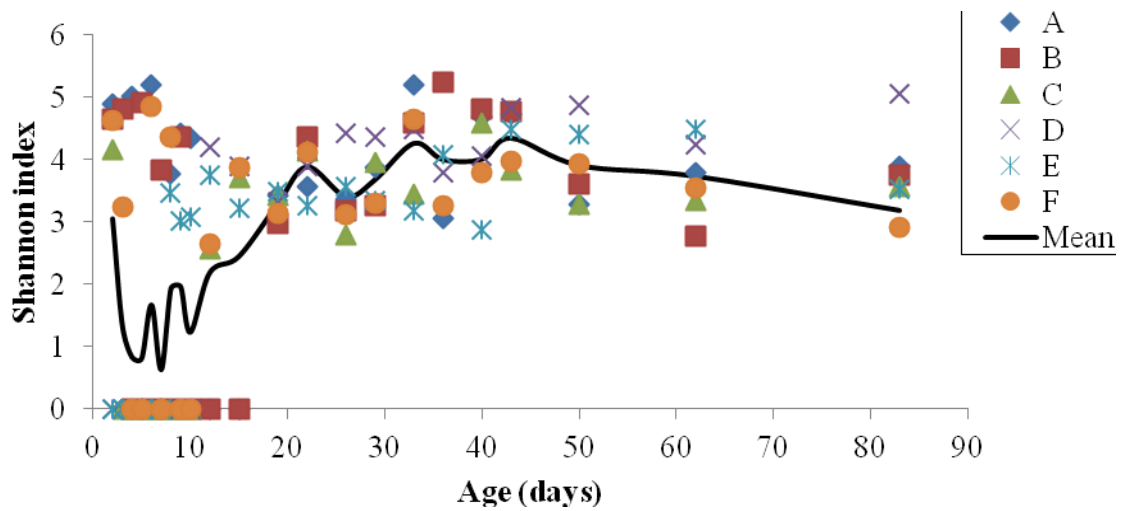


Fig. 2: Evolution of Shannon diversity index of ruminal archaeal community in calves between 2 and 83 days of age. A, B, C, D, E and F represent the 6 calves.

3.6. Taxonomical composition of ruminal archaeal community and evolution with age

A total of 1,035,599 sequences were obtained from the 454 GS FLX Titanium pyrosequencing run. After cleaning, 674,361 pyrotags were obtained over the 92 samples (average 7330 ± 2000 reads/samples). Among these sequences, 34 different taxa were observed with 2 phyla (*Crenarchaeota* and *Euryarchaeota*, Table 2) comprising 10 classes (including 2 unclassified), 14 orders (5 unclassified), 20 families (8 unclassified and 1 uncultured) and 18 genera (7 unclassified and 1 uncultured).

Table 2: Average relative abundances of archaea taxa observed in calf's rumen sample between 2 and 83 days of age.

Phylum;Class;Order; Family;Genus	Mean relative abundance (%)
<i>Crenarchaeota;Miscellaneous_Crenarchaeotic_Group;unclassified</i>	<0.01
<i>Crenarchaeota;Soil_Crenarchaeotic_GroupSCG;unclassified</i>	<0.01
<i>Crenarchaeota;Thermoprotei;Desulfurococcales;Desulfurococcaceae;unclassified</i>	<0.01
<i>Crenarchaeota;Thermoprotei;Desulfurococcales;unclassified</i>	<0.01
<i>Crenarchaeota;Thermoprotei;unclassified</i>	0.01
<i>Crenarchaeota;unclassified</i>	0.02
<i>Euryarchaeota;Halobacteria;Halobacteriales;Halobacteriaceae;Halococcus</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Halobacteria;Halobacteriales;Halobacteriaceae;unclassified</i>	0.01
<i>Euryarchaeota;Halobacteria;Halobacteriales;unclassified;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae;Methanobrevibacter</i>	85.57
<i>Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae;Methanosphaera</i>	5.91
<i>Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae;unclassified</i>	0.12
<i>Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanobacteriaceae;uncultured</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;Methanothermaceae;Methanothermus</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanobacteria;Methanobacteriales;unclassified;unclassified</i>	0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;AK5;unclassified;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;D;C06;unclassified;unclassified</i>	0.02
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanomicrobiales;Methanomicrobiaceae;Methanoculleus</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanomicrobiales;unclassified;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanomicrobiales;uncultured;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanosarcinales;Methanosaetaceae;Methanosaeta</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanosarcinales;Methanosarcinaceae;Methanimicrococcus</i>	0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanosarcinales;Methanosarcinaceae;Methanosalsum</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanosarcinales;Methanosarcinaceae;Methanosarcina</i>	0.26
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanosarcinales;Methanosarcinaceae;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;Methanosarcinales;unclassified;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Methanomicrobia;unclassified;unclassified;unclassified</i>	0.05
<i>Euryarchaeota;Thermococci;Thermococcales;Thermococcaceae;Thermococcus</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Thermoplasmata;Thermoplasmatales;20c.4;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;Thermoplasmata;Thermoplasmatales;Terrestrial_Miscellaneous_GpTMEG;unclassified</i>	0.02
<i>Euryarchaeota;Thermoplasmata;Thermoplasmatales;unclassified;unclassified</i>	0.38
<i>Euryarchaeota;Thermoplasmata;Thermoplasmatales;vadinCA11_gut_group;unclassified</i>	7.16
<i>Euryarchaeota;Thermoplasmata;unclassified;unclassified;unclassified</i>	<0.01
<i>Euryarchaeota;unclassified;unclassified;unclassified;unclassified</i>	0.44

Over the 83 days, the *Euryarchaeota* phylum was predominant and represented 99.98% of the total observed sequences. Among the 34 observed taxa, *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* genera and *vadinCA11_gut_group* family were predominant with 85.57, 5.91 and 7.16% relative abundances, respectively. Nineteen taxa had a relative abundance under 0.01% and the others varied between 0.01 and 0.44% (Table 2).

An archaeal community was observed from day 2. The repartition of relative abundances of predominant taxa differed among calves, especially between 10 and 43 days of age. For example, calves A, B and D exhibited much higher relative abundances of *Methanobrevibacter* than calf C (Fig. 3), which on the contrary had a high relative abundance of *VadinCA11_gut_group* family (Fig. 4). Throughout the 83 days of experiment, calf A had much lower *Methanosphaera* relative abundances than calves E and F (Fig. 5).

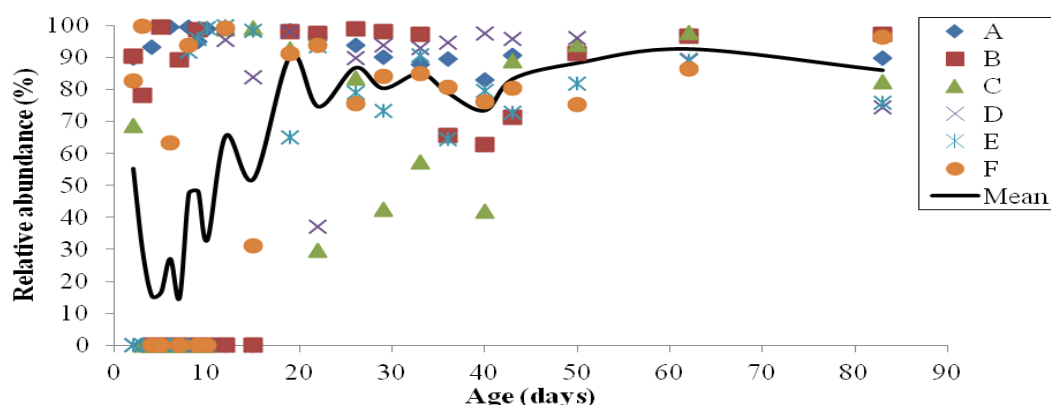


Fig. 3: Evolution of ruminal *Methanobrevibacter* genus relative abundance in calves between 2 and 83 days of age. A, B, C, D, E and F represent the 6 calves.

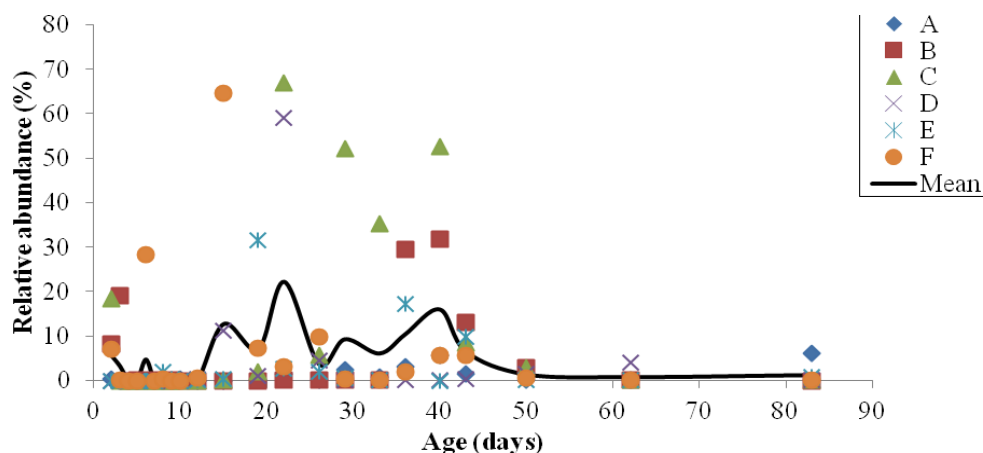


Fig. 4: Evolution of ruminal *VadinCA11_gut_group* family relative abundance in calves between 2 and 83 days of age. A, B, C, D, E and F represent the 6 calves.

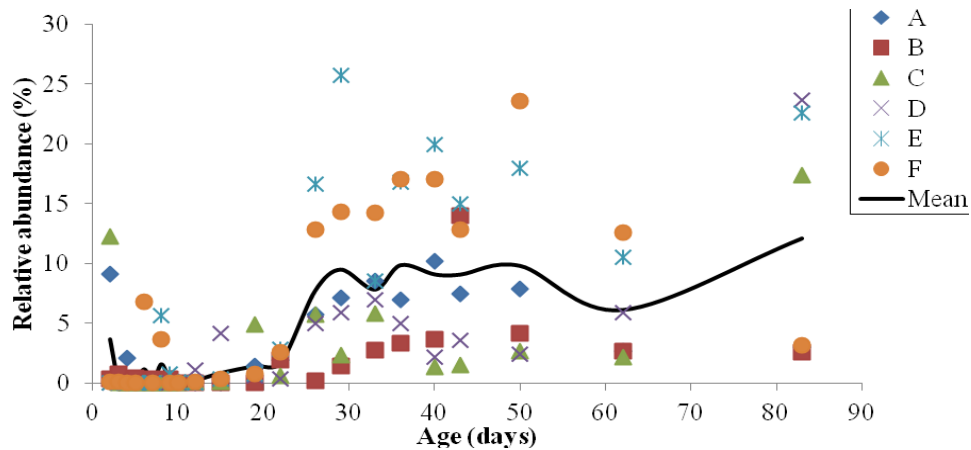


Fig. 5: Evolution of ruminal *Methanosphaera* genus relative abundance in calves between 2 and 83 days of age. A, B, C, D, E and F represent the 6 calves.

Among the *Euryarchaeota* phylum, 8 taxa significantly evolved with the age of calves but only 4 of them had a relative abundance over 0.05%: *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* and *Methanosarcina* genera and an *unclassified* class (Fig. 6). *Methanobrevibacter* relative abundance significantly increased over time and represented more than 90% of total archaea from day 12. The *Methanosphaera* relative abundance increased strongly and abruptly (Fig. 5 and 6) from day 22. On the contrary, *Methanosarcina* nearly disappeared from day 9. The *VadinCA11_gut_group* family relative abundance did not evolve with the age of calves ($P = 0.643$). From 15 days of age, the other observed taxa had a low relative abundance compared to the 3 main taxa, and many of them were *unclassified* (Table 2).

Phylum; Class; Order; Family; Genus	Age (days)																					PRE ¹	P-value ²
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	19	22	26	29	33	36	40	43	50	62		
<i>Euryarchaeota</i> ; <i>Methanobacteria</i> ; <i>Methanobacteriales</i> ; <i>Methanobacteriaceae</i> ; <i>Methanobrevibacter</i>	83.4 ± 2.5										92.2 ± 2.8											0.39	<0.001
<i>Euryarchaeota</i> ; <i>Methanobacteria</i> ; <i>Methanobacteriales</i> ; <i>Methanobacteriaceae</i> ; <i>Methanosphaera</i>	1.8 ± 0.07										9 ± 0.47											0.30	0.031
<i>Euryarchaeota</i> ; <i>Methanomicrobia</i> ; <i>Methanosarcinales</i> ; <i>Methanosarcinaceae</i> ; <i>Methanosarcina</i>	2.1 ± 0.12					0.01 ± 0.00																0.24	<0.001
<i>Euryarchaeota</i> ; <i>unclassified</i> ; <i>unclassified</i> ; <i>unclassified</i> ; <i>unclassified</i>	0.17 ± 0.00			1.3 ± 0.01			0.62 ± 0.01					0.26 ± 0.01										0.23	0.022

¹Expresses the proportion of total variability explained by division into age-classes

²P value of the repeated measures analysis.

Fig. 6: Age-classes of relative abundances (% , mean \pm SE) of ruminal archaea genera that evolved with the age of calves and were over 0.05% relative abundance, determined with TREE package of R between 2 and 83 days of age.

4. Discussion

4.1. Evolution of the density of the ruminal archaea and protozoa with age

The archaeal community was observed from day 2; it could originate from an external contamination by the colostrum or the environment, showing that ruminal archaeal community appears before arrival of solid diet, which began at day 9 in our experiment. At day 2, the archaeal community density was between 1.22×10^4 and 3.27×10^5 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content. Anderson et al. [38] also detected an archaeal community in the rumen of calves from 3 days of age in small quantities (above 10^2 cells/g of ruminal content) by a counting technique. In our study, between day 2 and day 12, the archaea density was 7.65×10^5 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content in average, consistent with data previously reported in lambs one week after birth [17, 19]. In our study, between 2 and 12 days of age, archaea sporadically disappeared or were below the detection threshold in some calves (Table 1). This instability of archaea colonization could be due to a lack of substrate since arrival of milk into the rumen depends on the closure of the esophageal groove and intake of solid food was negligible before day 9. Actually, the concentrations of short chain fatty acids were low during this period [18], reflecting a low fermentative activity.

The archaeal community density reached 5.05×10^6 16S rRNA gene copy number/g of fresh ruminal content from day 15 to day 83. This was much lower than observed in previous studies in lambs [17, 19], but in these studies, lambs were not separated from their mothers, which could have greatly increased the external contamination.

The archaea density could be affected by the interaction between archaeal community and other rumen micro-organisms. Indeed, in adult ruminants, the ruminal archaeal community interacts with: i) ruminal bacteria (archaea use hydrogen produced by bacteria) [39] and ii) ruminal ciliate protozoa, with a symbiotic relationship between ciliate protozoa and archaea that attach to the surface of protozoa [40]. The bacterial communities are known to colonize the rumen during the first days of life [16, 19, 41]. In our study, we did not observe protozoa over the 83 days of experiment, consistent with observations of Bryant et al. [41] studying calves placed in individual stalls until 13 weeks of age. Similarly, Anderson et al. [38] did not observe rumen protozoa in calves rapidly separated from their dams within 24 h postpartum and placed in calf hutches. On the contrary, Minato et al. [16] observed protozoa between 8 and 10 weeks of age in calves reared with their mother for 24h and thereafter separated from their mother and reared in individual pens, in a cattle house which contained their mothers

and other cattle. Bryant et al. [41] observed an establishment of protozoa in calves in contact with mature animal after 13 weeks of age. This suggests that protozoa establishment needs physical contacts between calves and mature animals because protozoa are not present in the outside environment. The lack of protozoa in our pre-ruminant calves could have limited the establishment of the archaeal community.

4.2. Evolution of the taxonomical composition of the ruminal archaea

In our study, between days 2 and 15, the archaeal community analyzed with 454 pyrosequencing was variable between calves and according to age. From day 2, archaeal community was predominantly composed of *Methanobrevibacter*. Skillman et al. [17] also observed an early presence of the *Methanobrevibacter* genus in all lambs between 3 and 13 days of age. In our study, from 2 to 15 days, the *Methanosphaera* genus and the *VadinCA11_gut_group* family were observed as the other predominant taxa with an important variability according to age and calves (ranging from 0 to 20% and from 0 to 65% relative abundances, respectively).

The relative abundance of the three predominant taxa was also highly variable among calves and according to age between 15 and 83 days. During this period, the archaeal community was predominantly composed of *Methanobrevibacter* (83%). The *Methanosphaera* genus increased to reach 9% of total archaea with a high variability between calves between 26 and 83 days of age. The *VadinCA11_gut_group* family varied considerably between calves especially between 15 and 43 days. Thereafter its relative abundance became more stable in all calves (7% of total archaea) when they began to intake solid food. In a flock of grazing sheep, at 7 weeks of age, only the *Methanobrevibacter* genus was observed in lambs [17]. The *Methanobrevibacter* genus was also predominant in mature ruminants [21, 28, 42] whereas *Methanobrevibacter* spp. was not detected and *Methanomicrobium* spp. was predominant in the study of Shin et al. [43]. In another study, *Methanomicrobium mobile* and *Thermoplasma* were predominant, *Methanobrevibacter* exhibiting a low abundance [20]. In the adult ruminant, other archaeal communities have been observed as *Methanosphaera* spp., or *Methanimicrococcus* spp. and many *unclassified* or *uncultured* archaea taxa [20, 21, 43]. In our study the *Methanosarcina* genus was observed at a low abundance whereas in mature Holstein dairy cows' rumen this genus was not observed by Tajima et al. [20], Whitford et al. [21] and Shin et al. [43]. The differences between young and adult ruminants could suggest

that the archaeal community of the rumen does not reach its maturity before weaning and could also be explained by the presence of non-ciliated protozoa in young ruminant.

In adult ruminants, many ruminal archaea are associated with ruminal ciliated protozoa and the archaeal community can vary with the density and the diversity of protozoa [40, 23, 24]. Using fauna-free sheep, Ohene-Adjei et al. [24] observed a link between the establishment of different archaea genera and inoculated protozoa. For example: 1) the inoculation with *Entodinium* protozoa favored *uncultured* archaea, or 2) the inoculation with *Holotrich* protozoa led to the emergence of *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter ruminantium*, and *Methanobacterium bryantii*. Except *Methanobrevibacter* that was predominant, the other archaea described by Ohene-Adjei et al. [24] had a low abundance or were not observed in our study. As a consequence, the lack of protozoa in our study could at least in part explain that our observed ruminal archaeal community differed from previous studies in calves or adults.

4.3. *In vitro* methane production by ruminal sample

In our study, from day 5, a methanogen activity was measured *in vitro* in all ruminal samples. The presence of an archaeal community from day 2 and the *in vitro* production of methane from day 5 suggested that archaea can rapidly develop the capacity to produce methane if an adequate substrate is available. The ruminal facultative or strictly anaerobic bacteria population is established from day 2 with a large density and diversity in both lambs and calves [5, 44, 45]. Furthermore, Rey et al. [18] showed a rapid appearance of fermentation products (short chain fatty acids, ammonia) and the establishment of enzymatic activities from 2 days of age. In spite of a low availability of substrate due to the closure of the esophageal groove and the very low solid food intake, early fermentations can occur in the rumen, producing hydrogen and CO₂. These gases could be used by archaeal community [8], explaining the ability of archaea to colonize the rumen from the very first days of calf life.

5. Conclusion

This study showed that the establishment of ruminal archaeal community occurs early after birth, before solid food intake, and even in the absence of ruminal ciliated protozoa. However, this establishment exhibited a high variability among calves and strongly evolved

with age. The archaeal community growth was probably allowed by the hydrogen originating from fermentations carried out by the first bacteria that colonize the rumen very early in the calf's life. The *Methanobrevibacter* genus was predominant followed by the *Methanosphaera* genus and the *VadinCA11_gut_group* family. No ciliate protozoa were observed and because this population is known to interact with archaeal community in mature ruminant, the observed archaeal community could be specific of our management conditions and differ from that of adult animals.

Acknowledgements

We would like to thank the staff of the experimental station “Domaine de Borret Poucharramet” (UMR 1289 Tandem) and all technical staff for the assistance in sample preparation particularly Beatrice Gabinaud (UMR 1289 Tandem). We thank the Midi-Pyrénées region for the financial support. We thank the Laboratory of Environmental Biotechnology (INRA, Narbonne, France) for the analysis of methane.

References

- [1] R.E. Habel, *The anatomy of the domestic animals*, Saunders, Philadelphia, 1975.
- [2] J.P. Jouany, Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen: leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le ruminant, Thèse d'Etat, Université de Clermont-Ferrand II, 1978.
- [3] R.I. Mackie, B.A. White, 1997, *Gastrointestinal microbiology*, in: Chapman & Hall Microbiol Series (Ed.), Chapter 2: Gut environment and evolution of mutualistic fermentative digestion, New York, vol. 1: Gastrointestinal ecosystems and fermentations, 1997, pp. 13-20.
- [4] D.N. Kamra, Rumen microbial ecosystem, *Curr. Sci.* 89 (2005) 124-135.
- [5] C.S. Stewart, M.P. Bryant, The rumen bacteria, In: P.N. Hobson (ed.), *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Appl. Sci., London, 1988, p. 343-359.
- [6] G. Fonty, K.N. Joblin, Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion, in: T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (Eds.), *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: proceedings of the seventh international symposium on ruminant physiology*. Academic Press, San Diego, California, 1991, pp. 655–680.
- [7] C.S. Stewart, H.J. Flint, M.P. Bryant, The rumen bacteria, In P.N. Hobson, S.C. Stewart (eds.), *The rumen microbial ecosystem*, London: Chapman & Hall, 1997, pp. 10-72.
- [8] R. Hedderick, W. Whitman, *Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea*, In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes*, volume 2, 3rd ed. Springer, New York, 2006, pp. 1050-1079.
- [9] K.A. Johnson, D.E. Johnson, Methane emissions from cattle, *J. Anim. Sci.* 73 (1995) 2483-2492.
- [10] K.R. Lassey, M.J. Ulyatt, R.J. Martin, C.F. Walker, I.D. Shelton, Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand, *Atmos. Environ.* 31 (1997) 2905-2914.
- [11] A.R. Moss, J.P. Jouany, J. Newbold, Methane production by ruminant: its contribution to global warming, *Ann. Zootech.* 49 (2000) 231-253.
- [12] H. Steinfeld, P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, C. de Haan, *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. FAO, Rome, Italy, 2006.
- [13] J.I. Longenbach, A.J. Heinrichs, A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73 (1998) 85–97.
- [14] G.H. Wise, G.W. Anderson, Factors affecting the passage of liquids into the rumen of the dairy calf, I. Method of administering liquids: drinking from open pail versus sucking through a rubber nipple, *J. Dairy Sci.* 22 (1939) 697-705.
- [15] G. Fonty, J.P. Jouany, J. Senaud, Ph. Gouet, J. Grain, The evolution of microflora, microfauna and digestion in the rumen of lambs from birth to 4 months, *Can. J. Anim. Sci.* 64 (1984) 165–6.
- [16] H. Minato, M. Otsuka, S. Shirasaka, H. Itabashi, M. Mitsumori, Colonisation of microorganisms in the rumen of young calves. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38 (1992) 447–56.
- [17] L.C. Skillman, P.N. Evans, G.E. Naylor, B. Morvan, G.N. Jarvis, K.N. Joblin, 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs, *Anaerobe* 10 (2004) 277–285.
- [18] M. Rey, F. Enjalbert, V. Monteils, Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning, *J. Dairy Sci.* 95 (2012) 1500-1512.
- [19] G. Fonty, P. Gouet, J.P. Jouany, J. Senaud, Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs, *J. Gen. Microbiol.* 133 (1987) 1835-1843.

- [20] K. Tajima, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, R.I. Aminov, Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens, *FEMS Microbiol. Lett.* 200 (2001) 67–72.
- [21] M. Whitford, R. Teather, R. Forster, Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 1 (2001) 5–9.
- [22] C.S. Eun, B.R. Choia, W.J. Lima, S.Y. Honga, C.L. Ana, K.M. Choa, Y.K. Kima, J.M. Ana, J.M. Kanga, S.S. Lee, H. Kim, H.D. Yun, Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence, *Anaerobe* 10 (2004) 313–319.
- [23] D.P. Morgavi, J.P. Jouany, C. Martin, M.J. Ranilla, Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep, *Int. Congr. Ser.* 1293 (2006) 127–130.
- [24] S. Ohene-Adjei, R.M. Teather, M. Ivan, R.J. Forster, Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 4609–4618.
- [25] L.D. Tymensen, T.A. McAllister. Community structure analysis of methanogens associated with rumen protozoa reveals bias in universal archaeal primer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (2012) 4051-4056.
- [26] Anonymous, Arrêté du 18 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter, In *Journal Officiel de la République Française. J. O, Paris* (1988) 5608-5610.
- [27] S. Combes, R.J. Michelland, V. Monteils, L. Cauquil, V. Soulié, N.U. Tran, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe, Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity, *FEMS Microbiol. Ecol.* 77 (2011) 680–689.
- [28] M. Zhou, E. Hernandez-Sanabria, L.L. Guan, Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009): 6524–6533.
- [29] S. Gantner, A.F. Andersson, L. Alonso-Sáez, S. Bertilsson, Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples, *J. Microbiol. Meth.* 84 (2011) 12–18.
- [30] Y. Wang, P.Y. Qian, Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies, *PLoS ONE* 4 (2009) e7401, [DOI:10.1371/journal.pone.0007401](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401).
- [31] R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- [32] H. Pages, P. Aboyoun, R. Gentleman and S. DebRoy. Biostrings: String objects representing biological sequences, and matching algorithms, R package version 2.22.0 , 2011.
- [33] P.D. Schloss, A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies, *PLoS ONE* 4 (2009) e8230, [DOI:10.1371/journal.pone.0008230](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008230).
- [34] E. Pruesse, C. Quast, K. Knittel, B.M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, F.O. Glöckner, SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB, *Nucleic Acids Research.* 35 (2007) 7188–7196.
- [35] Q. Wang, G.M. Garrity, J.M. Tiedje, J.R. Cole, Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 5261-7.
- [36] J. Oksanen, F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, R.B. O'Hara, G.L. Simpson, P. Solymos, M. Henry, H. Stevens, H. Wagner, Vegan: community ecology package. R package version 1.17.4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2010.

- [37] T.M. Therneau, B. Atkinson. R port by Brian Ripley, rpart: recursive partitioning. R package version 3.1-48, <http://CRAN.R-project.org/package=rpart>, 2010.
- [38] K.L. Anderson, T.G. Nagaraja, L. Morril, T.B. Avery, S.J. Galitzer, J.E. Boyer, Ruminal microbial development in conventionally or early weaned calves, *J. Anim. Sci.* 64 (1987) 1215-1226.
- [39] M.J. Wolin, T.L. Miller, C.S. Stewart, In: P.N. Hobson, C.S. Stewart (eds.), *The rumen microbial ecosystem*, London, Chapman and Hall, (1997) 467-491.
- [40] I. Chagan, M. Tokura, J.P. Jouany, K. Ushida, Detection of methanogenic archaea associated with rumen ciliate protozoa, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45 (1999) 305-308.
- [41] M.P. Bryant, N. Small, C. Bouma, I. Robinson, Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves, *J. Dairy Sci.* 41 (1958) 1747-1767.
- [42] P.H. Janssen, M. Kirs, Structure of the archaeal community of the rumen, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 3619-3625.
- [43] E.C. Shin, B.R. Choi, W.J. Lim, S.Y. Hong, C.L. An, K.M. Cho, Y.K. Kim, J.M. An, J.M. Kang, S.S. Lee, H. Kim, H.D. Yun, Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence, *Anaerobe* 10 (2004) 313-319.
- [44] G. Fonty, J. Senaud, J.P. Jouany, P. Gouet, Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions, *Can J. Microbiol.* 64 (1988) 1737-1742.
- [45] M. Rey, F. Enjalbert, S. Combes, L. Cauquil, O. Bouchez, V. Monteils, The establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning using a high throughput 454 GS FLX pyrosequencing, (submitted for publication).

Chapitre 4- Etude expérimentale 2 : Etude de l'effet de la supplémentation en levures vivantes (*Sacharomyces cerevisiae*) sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen ainsi que sur le microbiote ruminal chez les veaux de race laitière en période pré- et post-sevrage (sevrage à 60 jours).

ARTICLE 4

Effets d'une supplémentation en levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*) en pré- et post-sevrage sur les activités enzymatiques et la capacité fermentaire du rumen chez les veaux de race laitière sevrés à 60 jours. (en préparation pour « *Journal of Dairy Science* »)

Une utilisation croissante d'additifs alimentaires microbiens est observée en élevage de ruminants pour améliorer les performances et palier les maladies associées aux régimes riches en concentré, comme l'acidose ruminale. L'expérimentation 1, a montré que chez les veaux pré-ruminants, l'implantation des micro-organismes au sein du rumen était rapide après la naissance et induisait parallèlement la mise en place des activités enzymatiques principales. Notre hypothèse pour ce deuxième essai était que la supplémentation en levures vivantes à partir de la naissance pourrait améliorer et accélérer la mise en place des activités enzymatiques principales avant le sevrage, se traduisant par des effets sur les produits de fermentation, et pourrait stabiliser et améliorer les fonctions fermentaires après sevrage. Pour cela, 12 veaux Prim'Holstein, immédiatement séparés de leur mère à la naissance, ont été nourris avec du colostrum maternel le jour de la naissance puis avec un aliment d'allaitement jusqu'à 59 jours. De 2 jours à 120 jours d'âge un aliment concentré de démarrage en granulés et du foin ont été distribués aux animaux. Les animaux ont été répartis en un groupe témoin (groupe C) qui n'a pas reçu de levures, et un groupe levures (groupe SC) qui recevait des levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*, 1,4g de SC 47/jour) une fois par jour avant le repas du matin. Les échantillons de contenu ruminal ont été prélevés avec le même dispositif que dans l'expérimentation 1, les jours : 1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 40, 60, 63, 70, 80, 90 et 120. Les mesures et analyses ont été réalisées comme dans l'expérimentation 1 article 1. **Avant sevrage**, la consommation de concentré de démarrage était 20% moins élevée dans le groupe SC que dans le groupe C alors que les ingestions de foin étaient similaires. Le pH, le E_h ruminal, les activités xylanase et amylase ainsi que les concentrations en ammoniac et en AGV totaux n'étaient pas été affectés par la supplémentation en levures. En revanche, l'apport de levures avait augmenté la proportion d'acétate au détriment du propionate et du valérate. Enfin, l'activité protéolytique du rumen était plus faible dans le groupe SC que dans

le groupe C. **Après sevrage**, la consommation de foin, la proportion de valérate et l'activité xylanase étaient plus importantes dans le groupe SC que dans le groupe C et le pH ruminal et la proportion d'acétate avaient une tendance à être plus élevés. Ces données suggèrent, que la supplémentation en levures vivantes chez des veaux augmente la consommation de foin et oriente les fermentations ruminales et les activités enzymatiques vers une meilleure capacité fibrolytique et une diminution de l'activité protéolytique.

Interpretative summary

Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves weaned at 60 days. By Rey et al., page*.** The aim of this study was to characterize the effects of live yeast supplementation on the establishment of fermentation and enzymatic parameters in dairy calves. During the pre-weaning period, live yeast reduced the proteolysis activity but increased the fibrolytic activity, increased ruminal acetate proportion and decreased of ruminal propionate and valerate proportions. During the post-weaning period, live yeast supplementation increased xylanase activity and tended to increase acetate proportion and ruminal pH.

Running head: YEAST EFFECT ON THE RUMINAL PARAMETERS IN CALVES

Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves weaned at 60 days.

M. Rey,^{*†‡} V. Monteils,^{*†‡§#} C. Bayourthe,^{†*‡} J. P. Marden,[‡] and F. Enjalbert,^{‡*†1}

^{*} INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[†] Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

[‡] Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

[§] Present address: Clermont Université, VetAgro Sup, UMR1213 Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

[#] Present address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

[‡] Lesaffre Feed Additives, 282 Avenue de la Marne, F-59700 Marcq-en-Baroeul, France

¹Corresponding author: f.enjalbert@envt.fr

23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3

Phone: +33 5 61 19 32 70

Fax: +33 5 61 19 38 87

Email address: f.enjalbert@envt.fr

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize the effect of live yeast supplementation on the establishment of ruminal fermentation and enzymatic activities in dairy calves during the pre- and post-weaning periods. Twelve Holstein calves, immediately separated from their mother at birth, were fed colostrum on the first day of age, and thereafter milk replacer until d 60 (weaning), and starter pelleted concentrate and hay until d 120. The control group (C group) did not receive yeast and the yeast group (SC group) was supplemented with live yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-4407), once a day before milk feeding. Ruminal samples were collected with a stomach tube 1h after milk feeding from each calf at d 1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 40, 60, 63, 70, 80, 90 and 120. The pH and redox potential (E_h) were immediately measured and the rest of ruminal samples were used to determine ammonia nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$), volatile fatty acids (VFA) concentrations, and xylanase, amylase and protease activities. During the pre-weaning period, intake of starter concentrate was lower in the SC group than in the C group (440 and 540 g of DM /d, respectively). Hay intake was similar between groups (188 g of DM/d in both groups). Ruminal pH and E_h were not affected by yeast supplementation. Ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ and total VFA concentration were not affected by yeast supplementation (147.4 mg/L of ruminal content for $\text{NH}_3\text{-N}$ and 37.5 mM for total VFA in both groups), but acetate, propionate and valerate proportions differed between C and SC groups: acetate proportion was higher in the SC group than in the C group (67.8 and 64.1%, respectively) and propionate and valerate proportions were lower in the SC group than in the C group (24.6 and 27.4% for C3 and 1.6 and 1.9% for C5, respectively). Xylanase and amylase activities were not affected by treatment. Ruminal protease activity was lower in the SC group than in the C group. During the post-weaning period, hay intake and ruminal valerate proportion were higher in the SC group than in the C group (750 and 650 g/d for hay intake; 3.1 and 2.5% for C5, respectively) and the ruminal pH and acetate proportion tended to be higher in the SC group than C group. The xylanase activity was higher in the SC group than C group. These data suggest that live yeast supplementation of calves increases hay intake and drives ruminal fermentation and enzymatic activities toward a better fibrolytic capacity but a lower proteolytic activity.

Key word: live yeast, dairy calves, ruminal pH and redox potential, fermentation, enzymatic activities.

INTRODUCTION

An increasing interest toward microbial additives, including live yeast, is observed in ruminant production to improve performance and limit diseases associated with high concentrate diets, as ruminal acidosis. Studies on the effect of yeast addition to the diet carried out in weaned ruminants or in vitro have shown an improvement of DMI, ruminal pH, digestive efficiency (Callaway and Martin, 1997; Kumar et al., 1997; Dann et al. 2000; Marden et al. 2008; Williams et al, 1991), milk production (Stella et al., 2007; Nocek et al., 2011) ruminal fermentation parameters with an increase of VFA and acetate concentrations, acetate:propionate ratio and a decrease of NH₃-N concentration (Quigley et al., 1992; Kumar et al., 1997). On the contrary, other studies did not report any effect on similar parameters (Arambel and Kent, 1990; Swarz et al., 1994). Yeast addition to the diet of ruminants could result in various responses among studies because of different physiological stages of animals (Williams and Newbold, 1990) and different characteristics of the diet which influence the ruminal environment (Dawson, 1989). For example, live yeast led to increased DMI for high yielding animals (Erasmus et al., 2005) and had a positive effect on ruminal pH with acidosis inducing diets (Marden et al., 2008).

In pre-ruminant animals an effect of live yeast addition to the diet has been observed on DMI and growth (Wagner et al., 1990; Lesmeister et al., 2004), with no effect on the development of rumen epithelium papillae (Lesmeister et al., 2004). Moreover, yeast supplementation hastened the establishment of rumen micro-organisms in newborn lambs (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2001).

A recent study on calves showed that fermentative capacity and main enzyme activities establish from the very first days of life and thereafter change with age (Rey et al., 2012). For the present study, our hypothesis was that live yeast supplementation of calves from birth could affect fermentative capacity and enzymatic activities of rumen microflora from their establishment to the post-weaning period. Consequently, the aim of the present study was to characterize the effects of supplementation with live *Saccharomyces cerevisiae* (SC) on ruminal fermentation (physico-chemical and fermentation parameters, and main enzyme activities) during the pre-weaning (from birth to weaning at 60 days) and the post-weaning (until 120 days of age) periods.

MATERIALS AND METHODS

All animal housing and handling procedures were in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 1988).

Animals, Experimental Design, and Diets

The study was carried out on 12 male Holstein calves from birth to d 120; calves were weaned at d 60. Calves were immediately separated from their mothers at birth and were housed in individual pens (1.05 × 2.30 m, bedded with straw) without contact with other calves or mature animals from d 1 to d 90. From d 90, calves were housed in collective boxes according to the treatment with mature animals in the same building. The first meal was given less than two hours after birth, and the two first meals were 1.5 L of maternal colostrum (CP = 58.59 ± 1.56 % of DM).

From d 2 to d 59, all calves were fed milk replacer: 620, 750, 880, 750 and 500 g/d from d2 to 14, d 15 to 21, d 22 to 42, d 43 to 49 and d 50 to d 59, respectively. The milk replacer was reconstituted at 124 g of milk powder/L of warm water (50°C). From d 4, all calves were allocated a starter pelleted concentrate: 250, 500, 1,000 and 2,500 g/d during the first, second, third and fourth month, respectively. From d 4, all calves were allocated low quality meadow hay: 250, 500 and 2,000 g/d during the first, second and third month, respectively and *ad libitum* during the fourth month. Clean water was available *ad libitum* throughout the experiment. Feedstuffs were distributed daily in individual and separate buckets in two equal meals at 0800 and 1600 h for milk replacer, and at 0900 and 1700 h for hay and starter concentrate. Amounts of refused food were recorded daily and individually except from d 90, when calves were housed in collective boxes according to the treatment and were blocked with headlocks before the distribution of concentrate as individual portions in the feeder. Chemical compositions of feedstuffs were determined every 15 d throughout the experiment (Table 1). Animals were weighed at birth and every 15 d thereafter.

Calves were assigned randomly to two groups. Six calves received daily 1.4 g of Actisaf[®] SC 47/d, containing 10¹⁰ CFU of live *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-4407 (Lesaffre Feed Additive, France) from d 2 to d 120 after birth (SC group). The six other calves were used as a control (C group) and received a placebo (only water). Live yeast

CNCM I-4407 (1.4 g of Actisaf[®] / d calf) or placebo were administered orally in 30 ml of water 10 minutes before the morning milk feeding to each calf.

Table 1. Chemical composition of milk replacer, starter pelleted concentrate and hay

Composition	Feedstuffs		
	Milk replacer ^{1,2}	Starter pelleted concentrate ^{3,4}	Hay
DM (%)	93.3	88.9	91.1
DM basis (%)			
OM	91.9	91.3	95.19
CP	22.3	21.2	4.7
NDF	ND ⁵	35.0	80.6
ADF	ND	11.5	47.6
Ether extract	17.8	4.1	ND
Starch	5.4	21.1	ND

¹Contained skim milk powder (40%, DM basis), whey powder, palm and coconut oils, wheat starch, dextrose, and wheat gluten.

²Contained Cu (8.5 mg/kg), butylated hydroxytoluene, vitamin A (25,000 IU/kg), vitamin D3 (8,000 IU/kg), vitamin E (50 IU/kg), vitamin C (180 mg/kg), vitamin K3 (5 mg/kg), vitamin B1 (15 mg/kg).

³Contained bran, wheat middlings, corn germ meal, barley, rapeseed meal, corn co-products, sugar, molasses, corn malt, calcium carbonate and sodium chloride.

⁴Contained Fe (15 mg/kg), iodine (0.5 mg/kg), manganese (20 mg/kg), zinc (30 mg/kg), vitamin A (8,000 IU/kg) and vitamin D3 (1 500 IU/kg).

⁵ND = not determined.

Sampling and Measurements

Ruminal content samples (approximately 500 mL) were obtained from each calf at d 1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 40, 60, 63, 70, 80, 90 and 120 and were collected via a stomach tube (internal diameter 13 mm) 1 h after the milk morning meal, i.e. before the distribution of hay and starter pelleted concentrate. Samples were divided into two equal parts. The first one was immediately used for measurements of pH and redox potential (E_h). These measurements were done with caution to limit the contact with air and after a 20 min-stabilization period according to Andrade et al. (2002) and Kimse et al. (2009). A pH-meter (Metrohm model 713, Herisau, Switzerland) was connected with a glass pH electrode, an E_h platinum electrode, and a thermo-electrode, as described by Rey et al. (2012). The second part was filtered through a metal sieve (1.6 mm mesh). Then 50 g of representative filtrate was mixed with 25 mL of a 6.5 pH-buffer MES as described by Rey et al. (2012), and stored at -80°C . This fraction was used to measure enzymatic activities and to determine ruminal DM content. Eight mL of the liquid fraction were added to 1 mL of mercuric chloride (2% wt/vol) and stored at -20°C until VFA and ammonia ($\text{NH}_3\text{-N}$) analysis.

Chemical Analysis

The concentrations of ruminal VFA and $\text{NH}_3\text{-N}$ were determined by gas chromatography (Playne, 1985 and Marden et al., 2008) and by the Skalar Method (Krom, 1980), respectively, as described by Rey et al. (2012).

Determination of Enzymatic Activities

The ruminal samples were thawed and submitted to ultrasonic disintegration (4 cycles of 30 s separated by 30 s of rest, with Ultra Turrax, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and centrifuged ($20,000 \times g$, 15 min at 4°C). The supernatant (enzymatic sample) was used to measure enzymatic activities and stored at -80°C .

Xylanase and amylase activities (μmol of sugar released/h/g of total ruminal content DM) were determined by measuring the release of reducing sugars from substrates (xylan and starch, Sigma X-0502 and S-2004, respectively; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) by

spectrophotometry at 410 nm after reaction with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (Lever, 1977) during 1 h at 39°C as described by Rey et al. (2012).

The proteolytic activity (optical density units/h/g of total ruminal content DM) was measured by the hydrolysis of azocaseine (Sigma A-2765, Saint Quentin Fallavier, France) as described by Rey et al. (2012).

Calculations

The potential difference directly measured by the pH-meter with Ag-AgCl reference electrode was corrected using the following formula: $E_h = E_0 + C$, where E_0 is the platinum electrode potential, and C the Ag-AgCl reference electrode compared with the Standard Hydrogen Electrode (i.e. + 199 mV at 39°C).

Statistical Analyses

All data were analyzed using the R software (R 2.12.2, R development Core Team, 2011) and were reported as mean values. The kinetics of feed intake, ruminal physico-chemical parameters, ruminal fermentation parameters and ruminal enzymatic activities were analyzed as repeated measures, reporting the effects of yeast supplementation, age and interaction between age and yeast supplementation during two periods: the pre-weaning period (samples taken from d 1 to d 40) and the post-weaning period (from d 60 to d 120). Weight was analyzed as repeated measures using birth weight as a covariate, reporting the effect of age, yeast supplementation, and interaction between age and yeast supplementation over the 120 days of experimentation. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$ and a tendency was declared at $P < 0.1$.

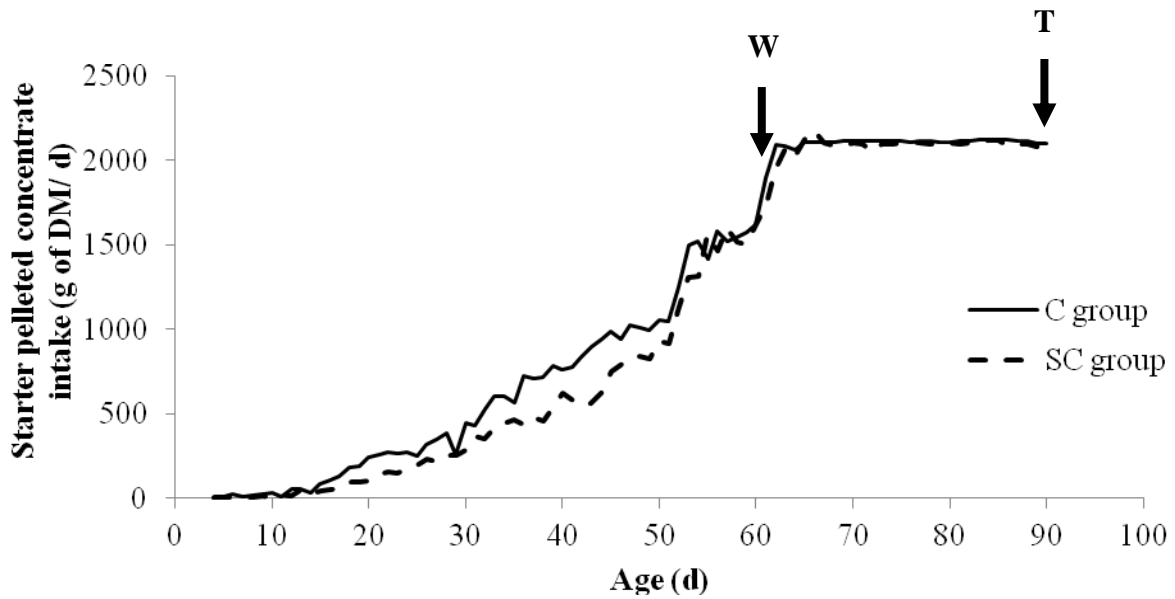


Figure 1. Evolution of starter pelleted concentrate intake throughout the first 90 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

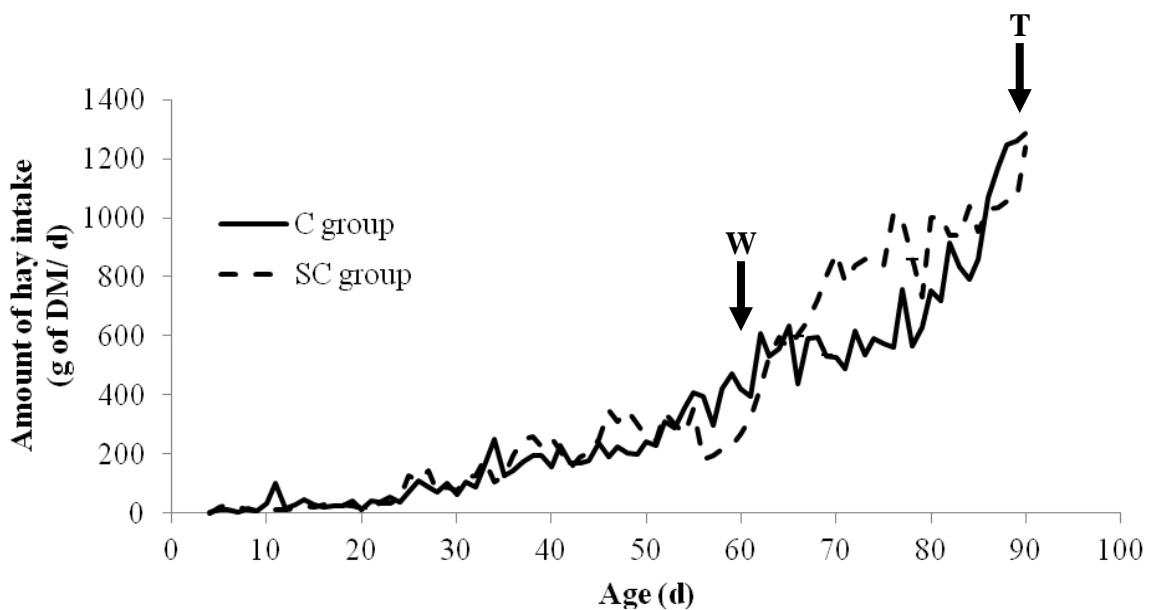


Figure 2. Evolution of hay intake throughout the first 90 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

RESULTS

Weight

At d 1, the weights were 49.7 ± 2.6 and 43.4 ± 2.1 kg in C and SC groups, respectively. The average weight over the entire period did not depend on yeast supplementation ($P = 0.84$) but depended on individual birth weight ($P = 0.01$), and no age \times yeast interaction was observed ($P = 0.93$). At d 120, the final weights were 188 ± 5 and 185 ± 3 kg in C and SC groups, respectively.

Feed Intake

All milk replacer allocated was drunk by calves. During the pre-weaning period, from d 10 of age on average, calves began to consume starter concentrate in both groups (Figure 1). Intake of starter concentrate increased with age ($P < 0.001$) and was lower in the SC group than in the C group (440 and 540 g/d on average, respectively, $P < 0.001$). No interaction was observed between age and yeast supplementation. After weaning (d 60), control and SC calves had a similar intake of starter concentrate (1,850 g/d on average, $P = 0.14$) and from d 90, they consumed entirely the 2,500 g of concentrate that were allocated.

In both groups, calves began to consume hay from d 20 (Figure 2). Hay intake increased with age during the pre-weaning period ($P < 0.001$) but was not affected by yeast supplementation (188 g/d on average across groups, $P = 0.65$). A trend toward an interaction between age and yeast was observed ($P = 0.09$). During the post-weaning period, hay intake became higher in the SC group than in the C group (650 and 750 g/d on average for the C and SC groups, respectively, $P < 0.001$).

Physicochemical Parameters

For all assayed physicochemical parameters, no age \times yeast interaction was observed during the pre- and post-weaning periods (Tables 2 and 3).

During the pre-weaning period, the ruminal pH was not affected by yeast supplementation and changed with age (Table 2). At d 1 of life, the ruminal pH was 7.01 on average across groups (Figure 3a). From d 2, the ruminal pH decreased and reached 5.69 at d

20 and 5.64 at d 22 in the C and SC groups, respectively. Then the ruminal pH increased to achieve 7.18 on average at d 60 across groups. During the post-weaning period, the ruminal pH was more stable (Figure 3a) and tended to be higher in the SC group than in the C group (7.20 and 7.41 on average in the C and SC groups, respectively, $P = 0.09$, Table 3).

The ruminal E_h was not affected by yeast supplementation during the pre- and post-weaning periods (Tables 2 and 3) and changed with the age of calves only during the pre-weaning period (Table 2). At d 1 of life, the ruminal E_h was positive (+ 196 mV on average across groups, Figure 3b). At d 2 of age, the ruminal E_h decreased drastically to become negative (-76 mV on average across groups). From d 3 to d 60 and during the post-weaning period, the ruminal E_h stabilized between -150 and -200 mV in both groups (Figure 3a).

Rey-Figure 3.

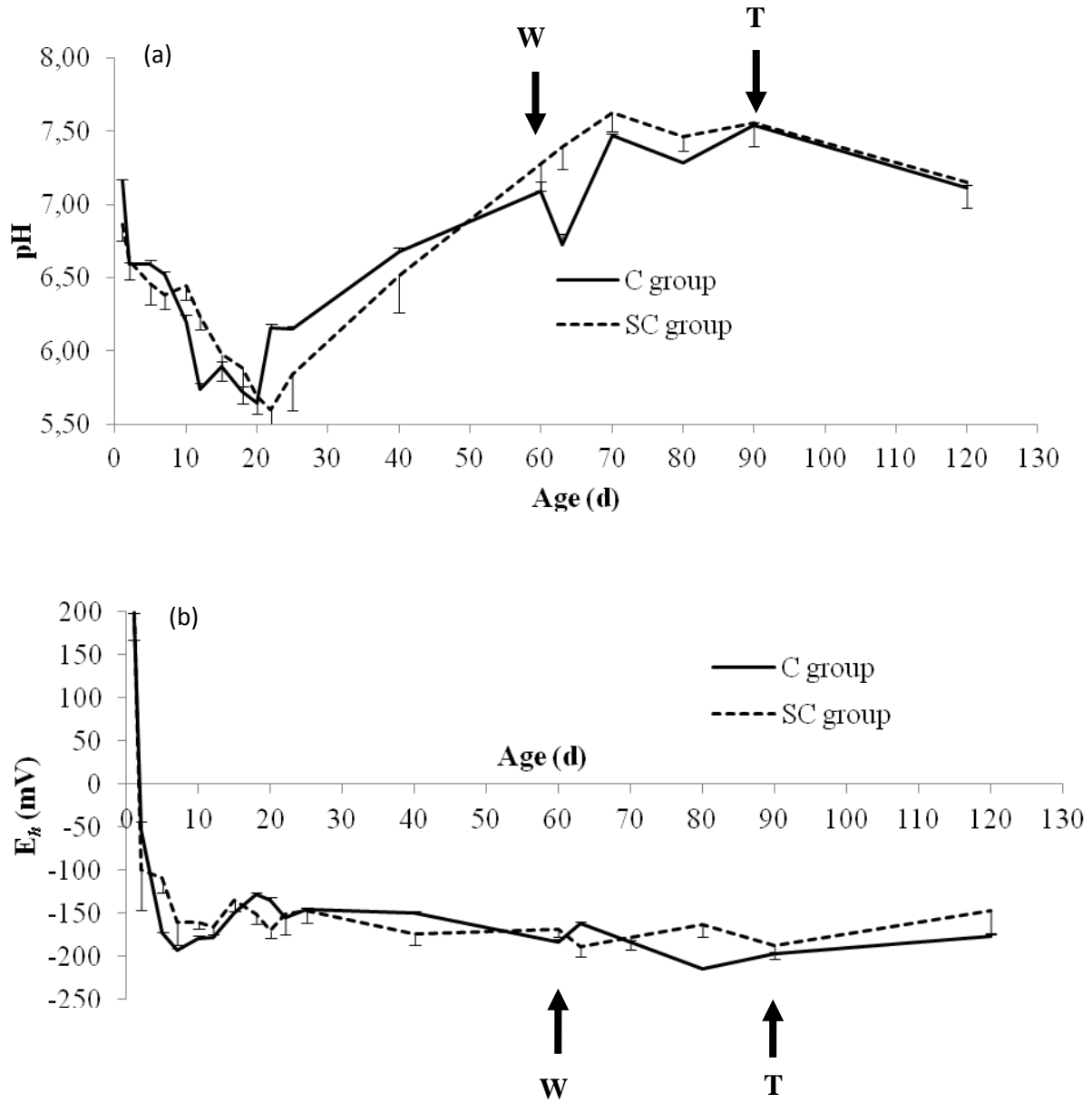


Figure 3. Evolution of ruminal pH (a) and redox potential (E_h , b) throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC). Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

Table 2. Effect of age and live yeast on ruminal physicochemical and fermentation parameters during the pre-weaning period (between d 1 and 40 d of age).

Items	Treatment ¹		SEM	P value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
Physico-chemical parameters						
pH	6.3	6.3	0.1	<0.001	0.79	0.42
E _h ³ (mV)	-125	-122	8.7	<0.001	0.84	0.57
Fermentation parameters						
NH ₃ -N (mg/L)	158.4	136.3	9.1	<0.001	0.20	1.00
Total VFA (mM)	40.3	36.8	2.4	<0.001	0.14	0.88
Acetate:propionate ratio ⁴	2.1	2.5	0.1	<0.001	0.03	<0.01
Acetate (% of VFA)	64.1	67.7	1.1	<0.001	<0.01	0.86
Propionate (% of VFA)	27.4	24.6	0.9	<0.001	0.01	0.94
Butyrate (% of VFA)	4.9	4.6	0.2	<0.001	0.27	0.42
Valerate (% of VFA)	1.9	1.6	0.1	<0.001	0.01	0.45
Iso-Butyrate (% of VFA)	0.8	0.8	0.1	<0.001	0.80	0.81
Iso-Valerate (% of VFA)	0.9	0.8	0.1	<0.001	0.57	0.64
Enzymatic activities						
Protease ⁵	33.7	21.6	3.0	0.12	0.04	0.62
Xylanase ⁴	133.3	164.1	16.5	<0.001	0.32	0.66
Amylase ⁴	54.8	47.4	6.7	0.006	0.56	0.44

¹C= control group; SC= yeast group

²A= age effect; Y = yeast effect; A × Y = age by yeast interaction.

³E_h = redox potential

⁴Acetate:propionate ratio was calculated between d 5 and d 60 of age, because between no propionate was detected at d1 and d2.

⁵Proteolytic activity (optical density units/h/g of ruminal content DM).

⁶Xylanase and amylase activities (μmol of reduced sugar/h/g of ruminal content DM).

Table 3. Effect of age and live yeast on ruminal physicochemical and fermentation parameters during the post-weaning period (between d 60 and 120 d of age).

Items	Treatment ¹		SEM	P value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
Physico-chemical parameters						
pH	7.2	7.4	0.1	0.09	0.09	0.70
E _h ³ (mV)	-186	-172	4.6	0.46	0.13	0.26
Fermentation parameters						
NH ₃ -N (mg/L)	64.1	55.7	4.9	0.04	0.38	0.41
Total VFA (mM)	40.7	40.2	2.7	0.01	0.93	0.96
Acetate: propionate ratio	2.2	2.3	0.1	<0.001	0.23	0.77
Acetate (% of VFA)	58.2	60.2	0.9	<0.001	0.08	0.95
Propionate (% of VFA)	29.2	27.8	0.7	<0.001	0.26	0.73
Butyrate (% of VFA)	7.3	6.8	0.3	0.001	0.22	0.39
Valerate (% of VFA)	3.1	2.5	0.1	<0.001	<0.01	0.49
Iso-Butyrate (% of VFA)	1.1	1.2	0.1	0.06	0.66	0.36
Iso-Valerate (% of VFA)	1.1	1.1	0.1	0.53	0.96	0.08
Enzymatic activities						
Protease ⁵	31.8	28.7	3.6	0.27	0.68	0.51
Xylanase ⁴	119.2	164.8	11.8	0.13	0.05	0.43
Amylase ⁴	45.2	45.6	5.8	0.08	0.83	0.44

¹C= control group; SC= yeast group

²A= age effect; Y = yeast effect; A × Y = age by yeast interaction.

³E_h = redox potential

⁴Proteolytic activity (optical density units/h/g of ruminal content DM)

⁵Xylanase and amylase activities (μmol of reduced sugar/h/g of ruminal content DM).

Fermentation Parameters

For all fermentation parameters, except the acetate:propionate ratio, no age x yeast interaction was observed during the pre- and post-weaning periods (Tables 2 and 3). For the acetate: propionate ratio this interaction was only significant during the pre-weaning period ($P = 0.003$, Table 2).

The ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was not affected by yeast supplementation and was affected by the age of calves during the pre- and post-weaning periods (Tables 2 and 3). During the pre-weaning period, the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was highly variable among calves in both groups (Figure 4) and was not affected by yeast (Table 2). At d 1 of life, the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration was 38.6 mg/L on average across groups. From d 2, the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration increased and peaked at 208.0 mg/L at d 9 and 189.4 mg/L at d 10 in the C and SC groups, respectively. Then the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration decreased until d 60 and reached 71.6 mg/L on average across groups. During the post-weaning period, the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration decreased from d 60 to d 80 of age (36.5 mg/L on average across groups) and then increased to 89.4 mg/L on average across groups.

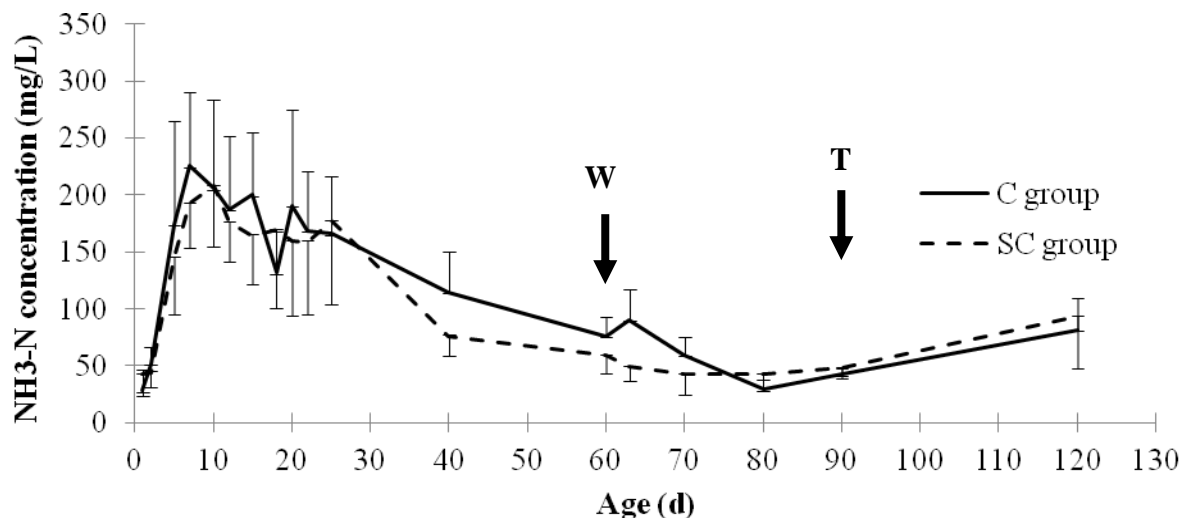


Figure 4. Evolution of ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

The ruminal total VFA concentrations were similar among groups during the pre- and post-weaning periods and were affected by the age of calves in both periods (Tables 2 and 3). The general evolution of total VFA concentrations with age could be divided into 4 age-periods: an increase from d 1 to d 20, a stabilization or a small decrease from d 20 to d 63, a decrease from d 63 to d 90 and an increase from d 90 to d 120 (Figure 5a).

Because propionate was under our detection level at d 1 and d 2 in some calves, the acetate:propionate ratio was only calculated and statistically analyzed from d 5 to d 120 of age. During the pre-weaning period, the acetate:propionate ratio was highly variable between d 5 and d 7 of age (Figure 5b) and was higher in the SC group than in the C group before d 60 (2.5 and 2.1 on average in the SC and C groups, respectively). During the post-weaning period, the acetate:propionate ratio depended on the age of calves and no effect of yeast supplementation was observed (Table 3).

During the pre-weaning period, the acetate percentage was higher in the SC group (67.7 and 64.1% on average for the SC and C groups, respectively, $P = 0.004$, Table 2). At the opposite, the propionate and valerate percentages were lower in the SC group than in the C group (24.6 and 27.4 % for propionate, $P = 0.012$, and 1.6 and 1.9% for valerate, $P = 0.005$, for SC and C groups respectively, Table 2). No effect of yeast supplementation was observed on butyrate percentage (Table 2). During the post-weaning period, the acetate percentage tended to be higher in the SC group (60.2 and 58.2% for SC and C groups, respectively, $P = 0.08$, Table 3). At the opposite, the valerate percentage was lower in the SC group than in the C group (2.5 and 3.1 % for SC and C groups, respectively, $P < 0.1$, Table 3). No effect of yeast supplementation was observed on propionate and butyrate proportions (Table 3).

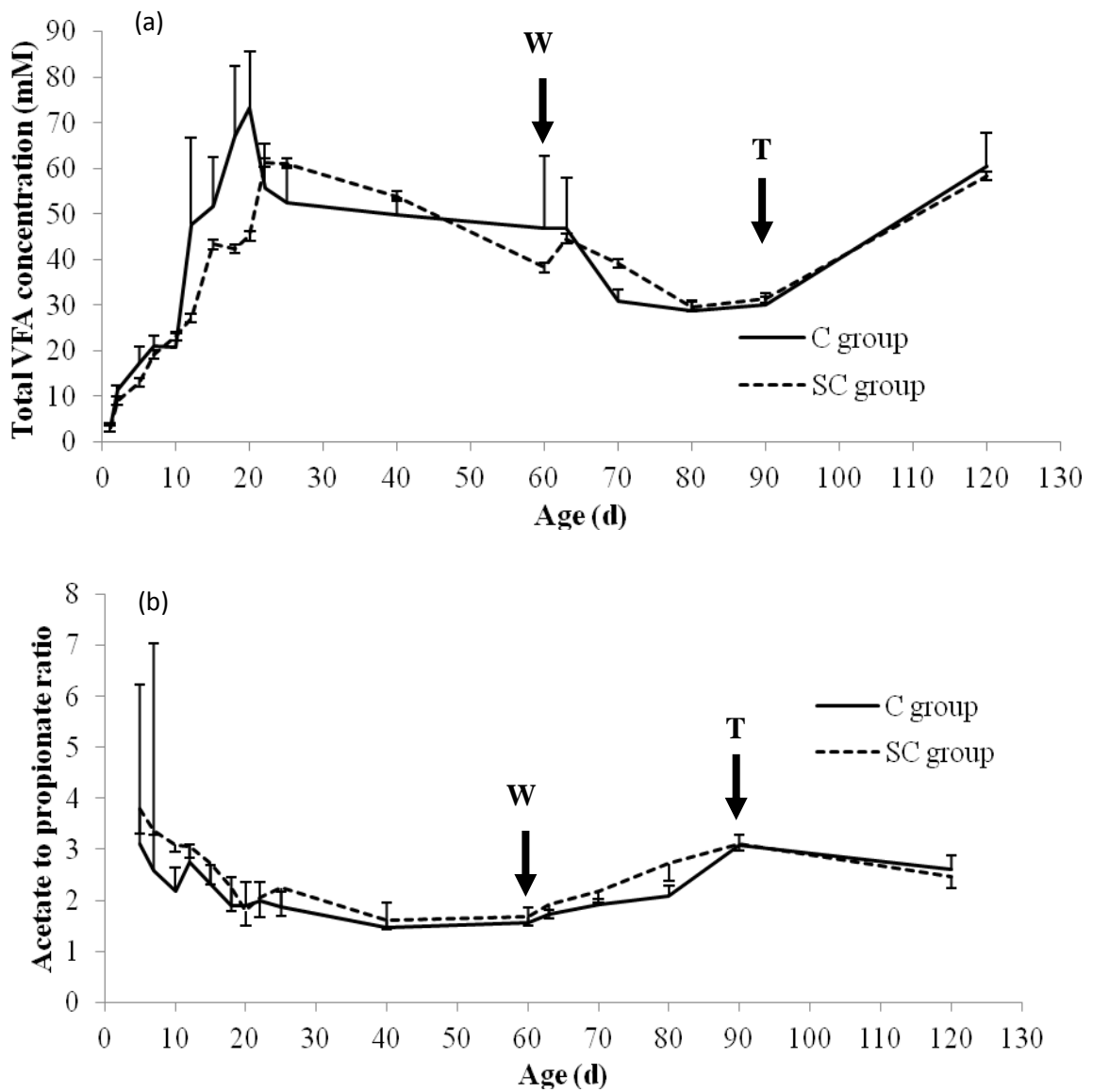


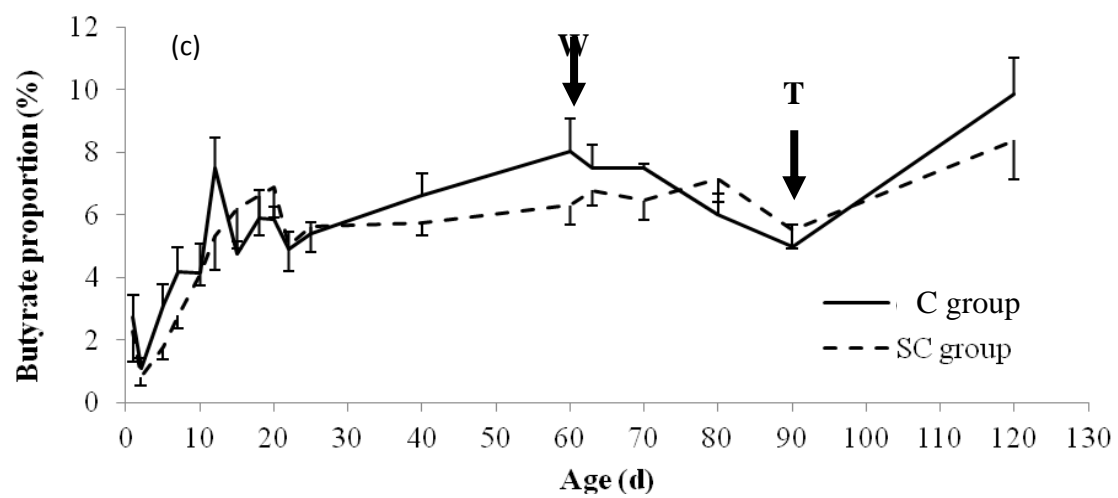
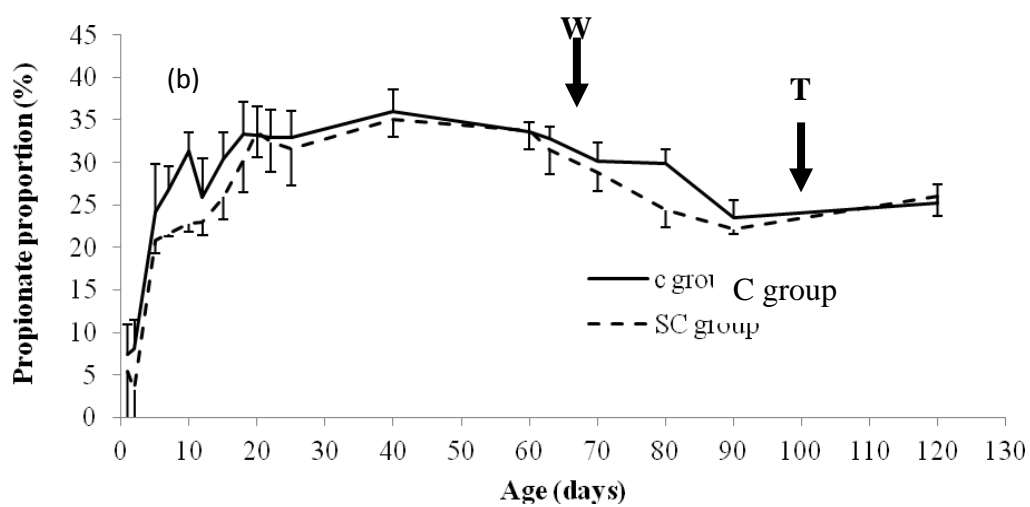
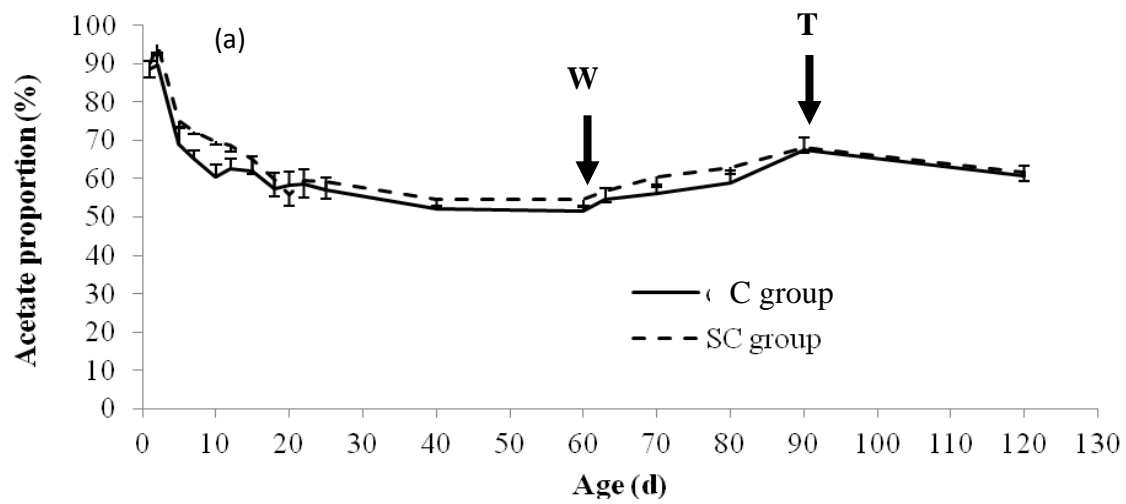
Figure 5. Evolution of ruminal total VFA concentration (a) and acetate-to-propionate ratio (b) throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

The evolution with age of calves of acetate, propionate, butyrate and valerate percentages according to the treatment are presented in figure 6. The percentage of acetate decreased and the percentages of propionate and butyrate increased from d 1 to d 20, the proportions of acetate, propionate and butyrate were stable from d 20 to d 60. Post-weaning, the percentage of acetate increased and the percentages of propionate and butyrate decreased from d 63 to d 90 and the percentages of acetate and propionate were stable and the percentage of butyrate increased from d 90 to d 120 (Figures 6a, b and c). The valerate proportion increased from d 1 to d 60, decreased from d 63 to d 90 and was stable from d 90 to 120 (Figure 6d).

Ruminal Enzymatic Activities

No interaction between age and yeast supplementation was observed on assayed enzymatic activities during the pre- and post-weaning periods (Tables 2 and 3).

During the pre-weaning period, the protease activity did not depend on age ($P = 0.12$). It was lower in the rumen of calves in the SC group than in the C group (21.6 and 33.7 optical density units/h/g of ruminal content DM for the SC and the C groups, respectively, $P = 0.04$), especially before d 40 (Figure 7). During the post-weaning period, the ruminal protease was not affected by age or yeast supplementation (Table 3).



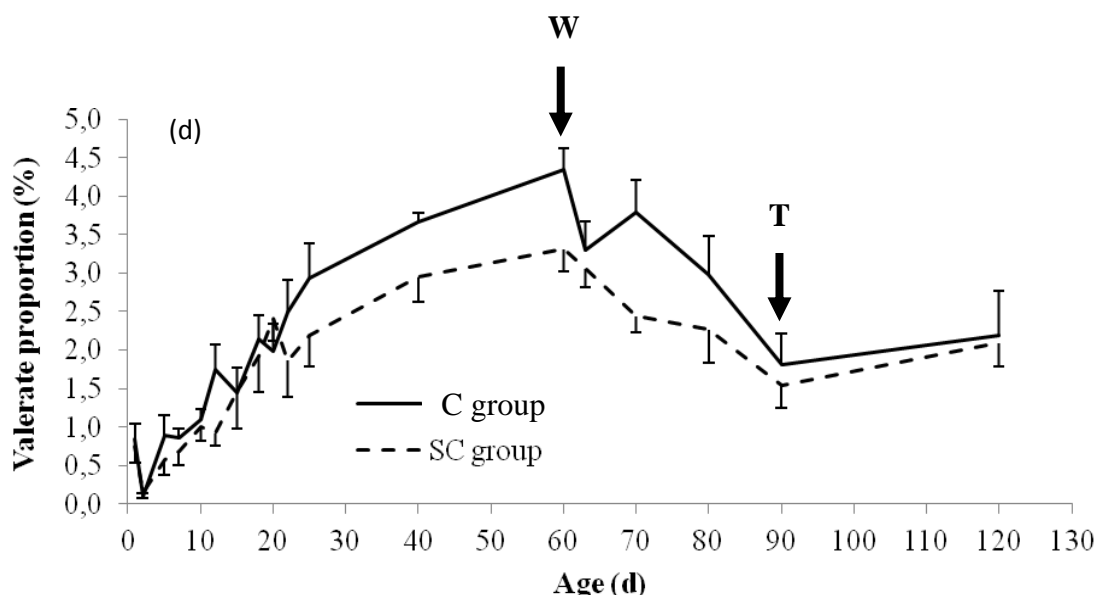


Figure 6. Evolutions of acetate (a), propionate (b), butyrate (c), and valerate (d) ruminal VFA proportions (%) throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

During the pre-weaning period, an effect of age was observed on ruminal xylanase activity ($P < 0.001$), which was similar in both groups. The highest values were observed between d 7 and d 15 (Figure 8). Thereafter, the ruminal xylanase activity decreased until d 60. During the post-weaning period, the ruminal xylanase activity was less variable than before weaning, and was higher ($P = 0.05$) in the SC group than in the C group.

No ruminal amylase activity was detected at d 1 of age in both groups (Figure 9). During the pre-weaning period an effect of age was observed ($P < 0.01$) but yeast supplementation had no effect. The highest values were observed between day 7 and d 12. Thereafter, the ruminal amylase activity decreased and stabilized in both groups until d 60. Overall the post-weaning period, the ruminal amylase activity did not depend on treatment, but for the C group, a peak was observed at d 63. After d 80, the ruminal amylase activity was stable in both groups.

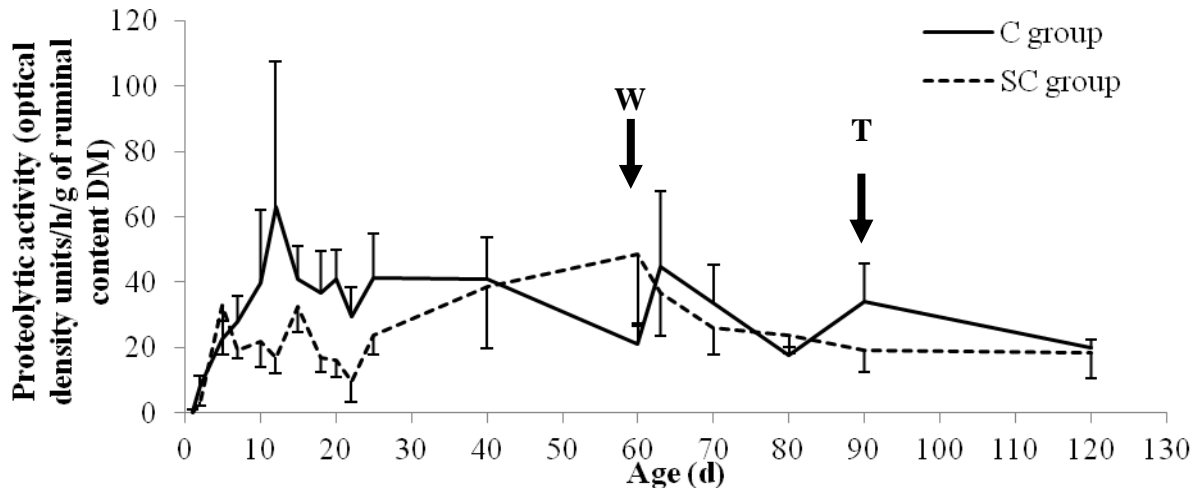


Figure 7. Evolution of ruminal proteolytic activity throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

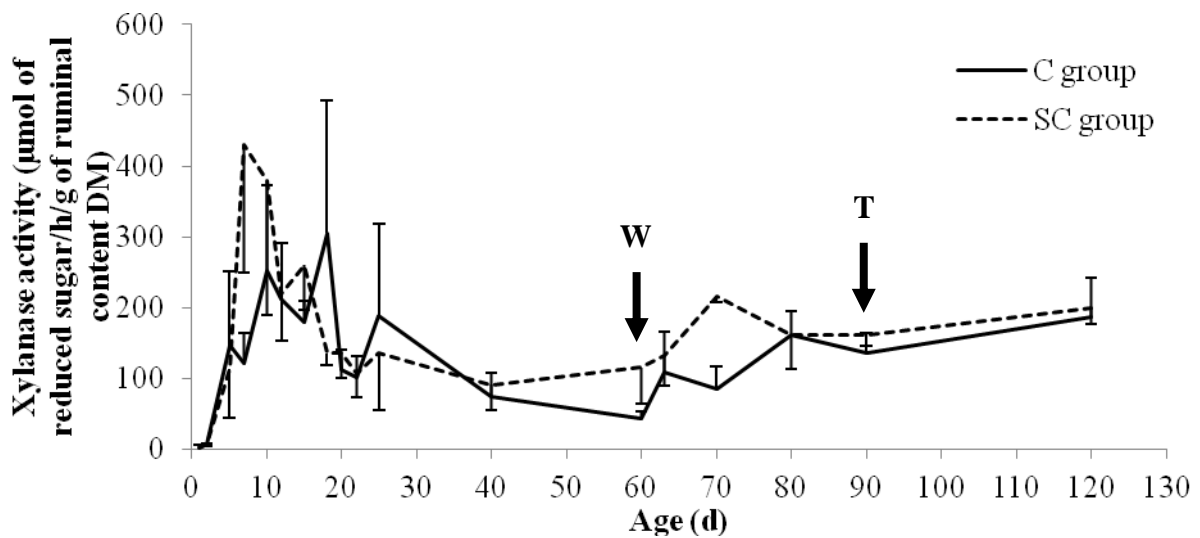


Figure 8. Evolution of ruminal xylanase activity throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

DISCUSSION

Effect of yeast supplementation during the pre-weaning period

In our study, hay intake was not affected by yeast supplementation. Calves in the SC group had a lower starter concentrate intake than in the C group, but the growth rates were similar before weaning. Pinos-Rodriguez et al. (2008) also showed no effect of yeast supplementation on calf's growth but observed an increased concentrate intake. Lesmeister et al. (2004) showed that yeast supplementation had no effect on concentrate intake and daily weight gain in calves between d 1 and weaning at d 35 of age. Differences of effects of yeast on solid food intake among experiments: i) may be due to contact with mothers since Pinos-Rodriguez et al. (2008) separated calves from dams at 3 days of age, which could have allowed an implantation of ruminal micro-organisms more suitable to promote faster degradation of solid food than in our study or that of Lesmeister et al. (2004), where calves were separated from their mothers at birth ii) could be influenced by the method of administration of yeast, mixed with concentrate in the experiment of Lesmeister et al. (2004) or directly introduced into the mouth in our experiment and that of Pinos-Rodriguez et al. (2008).

In our study, the ruminal pH was neutral at d 1 and rapidly became acid, reaching a 5.6 at d 20, thereafter increasing to reach neutral values at weaning. In parallel, at d 1 of age, the ruminal E_h was strongly positive in both groups and became strongly negative from d 2 of age. After d 3, the ruminal E_h ranged between -150 and -200 mV, reaching values previously reported in adult dairy cows by Marden et al. (2008) and Julien et al. (2010), and in heifers by Monteils et al. (2011). These evolutions of ruminal pH and E_h from birth to weaning were similar to that observed by Rey et al. (2012). No differences between groups were observed for ruminal pH and E_h during the pre-weaning period. Pinos-Rodriguez et al. (2008) and Hucko et al. (2009) also observed no effect of yeast supplementation on calf's ruminal pH. These data on calves contrasted with observation in adult animals, exhibiting a higher ruminal pH in yeast supplemented dairy cows (Marden et al., 2008; Thrune et al., 2009) and a lower ruminal E_h in yeast supplemented sheep (Mathieu et al., 1996) and cows (Marden et al., 2008). However, the pH increase due to yeast supplementation is not always described (Lascano and Heinrichs, 2009). The difference between calves and adult animals may depend on the diet of the animal and/or the initial pH prior to supplementation of yeast. In adult ruminants fed acidosis inducing diets, the effect of yeast is enhanced because the low pH is

favorable for yeast action (Mosoni et al., 2007; Marden et al., 2008). Milk based diets for unweaned calves probably do not meet these conditions. Moreover an effect of yeast was observed on ruminal pH and E_h by Mathieu et al. (1996) only when protozoa were detected in the rumen. In our experimentation, the early colonization of protozoa with yeast supplementation (Rey et al., unpublished data) did not generate a beneficial effect on ruminal pH and E_h .

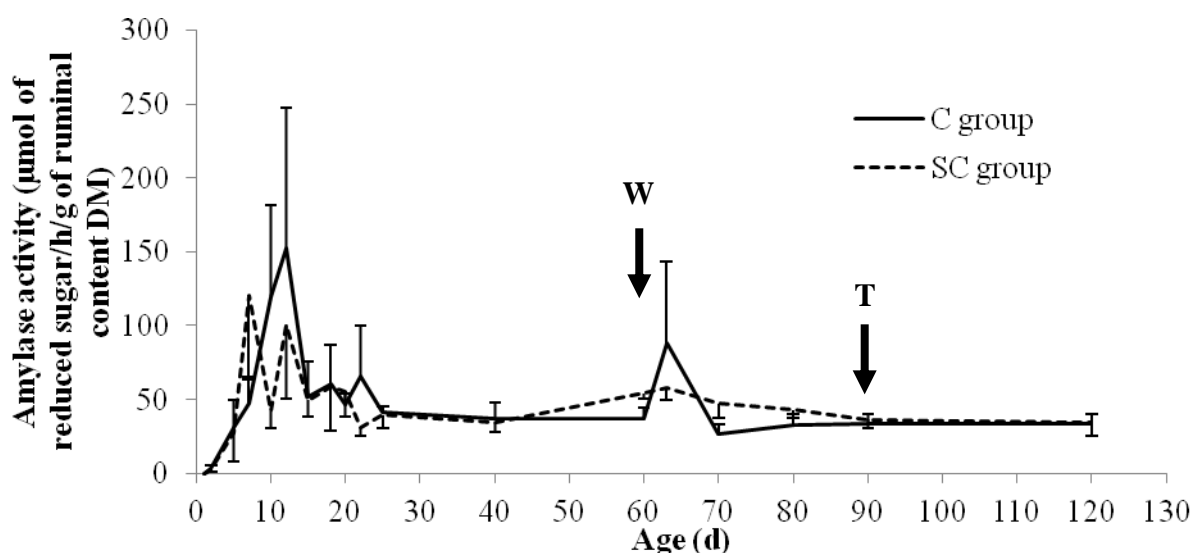


Figure 9. Evolution of ruminal amylase activity throughout the first 120 days of life in control (C) and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented (SC) calves. Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

The values and age changes of total VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations and protease, xylanase and amylase activities were similar to that previously observed by Rey et al. (2012). Yeast supplementation had no effect on the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration during the pre-weaning period. On the contrary, Pinos-Rodriguez et al. (2008) observed greater ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration with yeast supplementation in calves receiving milk and a starter concentrate between d 4 and d 60 of age. The difference of effects of yeast on ammonia concentration between our experiment and that of Pinos-Rodriguez et al. (2008) could be a result of the increased concentrate intake by yeast supplemented calves in the experiment of Pinos-Rodriguez et al. (2008), as opposed to our results. Both these results in calves contrast with data on weaned animals, showing decreased ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentrations in yeast supplemented animals (Quigley et al., 1992; Kumar et al., 1997). Lack of decrease of $\text{NH}_3\text{-N}$ in our calves receiving yeast cannot be explained by a higher proteolysis, since in our experiment, the protease activity was lowered by yeast supplementation. It could be due to a

decreased disappearance due to a low absorption by the ruminal mucosa and/or a low microbial utilization for protein synthesis, which is probably less efficient in young calves than in adult ruminants.

In our study, the total VFA concentration did not differ between the C and SC groups during the pre-weaning period but the VFA proportions differed between groups. The proportion of acetate was greater in the SC group than in the C group whereas the proportions of propionate and valerate were lower in the SC group than in the C group. Pinos-Rodriguez et al. (2008) observed an increase of the acetate:propionate ratio in calves supplemented by *S. cerevisiae*, which fitted with our results. The observed changes in VFA proportions suggest that yeast supplementation of calves could have promoted fiber digestion. However, the ruminal xylanase activity was not affected by yeast. These changes could also reflect shifts of degradation pathways of the starch carried out by the starter concentrate.

Effect of yeast supplementation during the post-weaning period

Hay intake was greater in the SC group than in the C group and concentrate intake was not affected by yeast supplementation after weaning. Similarly, Williams et al. (1991) showed an increased forage DMI with the addition of yeast to the diet of dairy cows. In our study, no effect of yeast supplementation was observed on rumen E_h , $\text{NH}_3\text{-N}$, total VFA concentration, propionate and butyrate proportions and amylase and protease activities. Chaucheyras-Durand et al. (2001) also showed no effect of yeast supplementation on the ruminal $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration (except after 80 d of age) and on the ruminal total VFA concentration in weaned gnotobiotic lambs.

Acetate proportion and rumen pH tended to be higher and valerate proportion was lower in yeast supplemented calves than in control calves. As previously discussed, the effects of yeast supplementation on rumen pH are variable among experiments and diets. In our study, the ruminal pH was high in the control group, which probably limited the possible effects of yeast.

The xylanase activity was increased by yeast supplementation. Williams et al. (1991) also showed that yeast supplementation increased forage degradation rate in dairy cows. Similarly, Chaucheyras-Durand et al. (2001) showed that yeast addition to the diet increased fibrolytic activity, number of ruminal cellulolytic bacteria and *in sacco* rumen degradability of wheat straw in weaned gnotobiotic lambs. Marden et al. (2008) observed an increased fiber digestibility due to a higher reducing ruminal environment when supplementing dairy cows

with live yeast. As suggested by Callaway and Martin (1997), this increased fibrolytic activity could be due to B vitamins, amino acids and organic acids, i.e. malate, carried out by yeast, that could stimulate the growth of fibrolytic bacteria. This increased capacity of fiber degradation could in turn explain the trend toward higher acetate proportion and the higher forage intake observed in our experiment in yeast supplemented weaned calves.

CONCLUSIONS

The supplementation of dairy calves from birth to 120 days of age with live *S. cerevisiae* (1.4 g of Actisaf[®] /d) affected the establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity. Before weaning at d 60, yeast supplementation decreased concentrate intake and proteolysis, increased ruminal acetate proportion and decreased propionate proportion. During the post-weaning period, yeast supplementation increased hay intake, xylanase activity and acetate proportion. Live *S. cerevisiae* given from birth could improve fiber digestion in the rumen of calves.

Acknowledgments

We thank Midi-Pyrénées region for the financial support of this experiment. We would like to thank the staff of the experimental station “Domaine de Borret Poucharramet” (UMR 1289 Tandem) for the excellent supervision of this study on calves, especially Brigitte Santacruz. We also thank Muriel Segura and Valérie Degand (UMR 1289 Tandem) for the technical assistance in the analysis of samples.

REFERENCES

- Andrade, P. V. D., S. Giger-Reverdin, and D. Sauvant. 2002. Relationship between two parameters (pH and redox potential) characterizing rumen status. Influence of diets. Page 332 in Proc. 9th Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France. Institut de l'Élevage – INRA, Paris, France.
- Anonymous. 1988. Arrêté du 18 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. Pages 5608-5610 in Journal Officiel de la République Française. J. O, Paris.
- Arambel, M. J., and B. A. Kent. 1990. Effect of a yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early to mid lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 1560-1563.
- Callaway, E. S., and S. A. Martin. 1997. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80: 2035-2044.
- Chaucheyras-Durand, F., and G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 57–68.
- Dann, H. M., J. R. Prockley, G. C. McCoy, M. F. Hutjens, and J. E. Garrett. 2000. Effects of yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83: 123-127.
- Dawson, K.A. 1989. Modification of rumen function and animal production using live microbial cultures as feed supplements. *California Anim. Nutr. Conf.* pp 25.
- Erasmus L. J., P. H. Robinson, A. Ahmadi, R. Hinders, and J. E. Garrett. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122 : 219–239.
- Hucko, B., V. A. Bampidis, A. Kodes, V. Christodoulou, Z. Mudrik, K. Poláková, and V. Plachy, 2009. Rumen fermentation characteristics in pre-weaning calves receiving yeast culture supplements. *Czech J. Anim. Sci.* 54: 435–442.
- Julien, C., J. P. Marden, R. Moncoulon, and C. Bayourthe. 2010. Redox potential measurement: A new way to explore ruminal metabolism. *J. Dairy Sci.* 93(E-Suppl. 1):578. (Abstr.)
- Kimse, M., V. Monteils, C. Bayourthe, and T. Gidenne. 2009. A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit caecum: Relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Sci.* 17:63-70.
- Krom, M. D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia. A study of the Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* 105:305-316.
- Kumar, U., V. K. Sareen, and S. Singh. 1997. Effect of yeast culture supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73:231–236.
- Lascano, G. J., and A. J. Heinrichs, 2009. Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. *Livest. Sci.* 124: 48-57.
- Lesmeister, K. E., A. J. Heinrichs, and M. T. Gabler. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87: 1832-1839.
- Lever, M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAH β AH): effect of bismuth on the reaction. *Anal. Biochem.* 81:21-27.

- Marden, J. P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon, and C. Bayourthe. 2008. How Does Live Yeast Differ from Sodium Bicarbonate to Stabilize Ruminal pH in High-Yielding Dairy Cows? *J. Dairy Sci.* 91:3528–3535.
- Mathieu, F., J. P. Jouany, J. Senaud, J. Bohatier, G. Bertin, and M. Mercier. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep: protozoal and probiotics interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:271–287.
- Monteils, V., M. Rey, L. Cauquil, A. Troegeler-Meynadier, M. Silberberg, and S. Combes. 2011. Random changes in the heifer rumen in bacterial community structure, physico-chemical and fermentation parameters, and *in vitro* fiber degradation. *Livest. Sci.* 141:104–112.
- Mosoni, P., F. Chaucheyras-Durand, C. Bera-Maillet and E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103:2676–2685.
- Nocek, J. E., M. G. Holt, and J. Oppy. 2011. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94 :4046–4056.
- Pinos-Rodríguez J. M., P. H. Robinson, M. E. Orteg, S. L. Berry, G. Mendoza, and R. Barcena. 2008. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰⁷⁷ or *Saccharomyces boulardii*¹⁰⁷⁹. *Anim. Feed Sci. Technol.* 140: 223–232.
- Playne, M. J. 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 36:638-634.
- Quigley, J. D., III, L. B. Wallis, H. H. Dowlen, and R. N. Heitmann. 1992. Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 75:3531–3538.
- Rey M, F. Enjalbert, and V. Monteils. 2012. Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. *J. Dairy Sci.* 95: 1500-1512.
- Stella, A.V., R. Paratte, L. Valnegri, G. Cigalino, G. Soncini, E. Chevaux, V. Dell’Orto, and G. Savoini. 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research* 67: 7–13.
- Swartz, D. L., L. D. Muller, G. W. Rogers, and G. A. Varga. 1994. Effect of yeast cultures on performance of lactating dairy cows: a field study. *J. Dairy Sci.* 77: 3073-3080.
- Throne, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M. D. Stern, and J. G. Linn, 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows yeast supplementation on rumen fermentation. *Livest. Sci.* 124: 261-265.
- Wagner, D. G., J. Quinonez, and L. J. Bush. 1990. The effect of corn or wheat-based diets and yeast culture on performance, ruminal pH, and volatile fatty acids in dairy calves. *Agri-Pract.* 11:7–12.
- Williams, P. E. V., and C. J. Newbold. 1990. Rumen probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: *Recent Advances in Animal Nutrition* (Eds.: Haresign, W., and Cole, D.J.A.). Butterworths, London, 211-227.
- Williams P. E. V., C. A. G. Tait, G. M. Innes, and C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69 (1991) 3016–3026

Chapitre 4- Etude expérimentale 2 : Etude de l'effet de la supplémentation en levures vivantes (*Sacharomyces cerevisiae*) sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen ainsi que sur le microbiote ruminal chez les veaux de race laitière en période pré- et post-sevrage (sevrage à 60 jours).

ARTICLE 5

Effets de la supplémentation en levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*) en pré- et post-sevrage sur le microbiote ruminal (bactéries, archées et protozoaires) chez les veaux de race laitière sevré à 60 jours. (en préparation pour « *Applied and Environmental Microbiology* »)

L'article 4 a montré un effet de l'addition de levures SC caractérisé par une augmentation de la consommation de foin, une orientation des fermentations ruminales et des activités enzymatiques vers une meilleure capacité fibrolytique et une diminution de l'activité protéolytique. Les articles 2 et 3 ont montré une implantation d'un microbiote complexe et dense. On peut donc supposer que la supplémentation en levures vivantes conduirait à des variations importantes du microbiote en raison de la sélection de certaines populations, et permettrait de comprendre l'origine des changements décrits dans l'article 4. Pour cela, nous avons étudié l'effet des levures sur le microbiote ruminal à partir des mêmes échantillons de contenu ruminal, pour caractériser l'effet de la supplémentation en levures vivantes (SC) sur la mise en place des communautés bactériennes, d'archées et protozoaires ciliés du rumen chez les veaux de race laitière, en périodes pré- et post-sevrage. En **période pré-sevrage**, l'implantation des protozoaires a été plus précoce et la densité d'archées plus élevée pour le groupe SC par rapport au groupe C. La communauté des bactéries ne différait pas en termes de diversité et de densité avec l'addition de levures. En revanche l'abondance de certains taxa bactériens minoritaires, connues comme acétogènes et fermentant le glucose, était accrue par l'addition de levures. En **période post-sevrage**, la densité des protozoaires ciliés du rumen augmentait avec l'âge et la densité des archées était plus élevée pour le groupe SC que le groupe C. Inversement la communauté bactérienne avait une densité plus faible lors de l'apport de levures. La supplémentation en levures favoriserait la mise en place de bactéries amylolytiques, proteolytiques, pectinolytiques et cellulolytiques en fonction des substrats présents dans le rumen. Ces résultats suggèrent que l'addition de levures chez les veaux, engendre des conditions ruminales plus favorables à une implantation plus rapide des protozoaires ciliés et plus riche en densité pour les archées. L'apport de levures aurait une action sur la régulation de la colonisation, la diversité et les abondances relatives au sein de la communauté bactérienne en périodes pré- et post-sevrage en faveur des voies métaboliques adaptées au substrat dominant.

Effect of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation on pre- and post-weaning ruminal microbiota (bacteria, archaea and protozoa) in dairy calves weaned at 60 days.

Rey Mickael^{1,2,3}, Francis Enjalbert^{3,1,2}, Sylvie Combes^{1,2,3}, Laurent Cauquil^{1,2,3}, Olivier Bouchez⁴, Jean-Philippe Marden⁵ & Valérie Monteils^{2,1,3,6,7}.

¹ INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

² Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

⁴ INRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁵ Lesaffre Feed Additives, 90 rue de Lille, F-59520 Marquette-Lez-Lille, France

⁶ Present address: Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France

⁷ Present address: INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Keywords: Yeast; dairy calf; rumen bacteria; 454 pyrosequencing; taxonomy, real-time PCR

Running title: Yeast effect on the establishment of ruminal microbiota in calves

Corresponding author: Francis Enjalbert, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, UMR 1289, 23 chemin des Capelles, BP 87614, 31076 Toulouse cedex 3, France.

Phone: +33 5 61 19 32 70; Fax: +33 5 61 19 38 87, email: f.enjalbert@envt.fr

Abstract

The objectives of this study were to characterize the effects of live yeast supplementation on the establishment of ruminal bacteria, archaea and protozoa communities in dairy calves during the pre- and post-weaning periods. Twelve Holstein calves, immediately separated from their mother at birth, were fed colostrum on the first day of age, and thereafter milk replacer until day 60 (weaning), starter pelleted concentrate and hay until day 120. The control group did not receive yeast and the yeast group was supplemented with live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, 1.4g of Sc 47/day, 10^{10} CFU/g), once a day before milk morning feeding. Ruminal samples were collected via a stomach tube 1h after milk morning feeding from each calf at days 1, 2, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 40, 60, 63, 70, 80, 90 and 120. In the pre-weaning period, the establishment of protozoa was earlier and the density of ruminal archaea was greater in the rumen of calves in yeast supplemented than in control calves. The diversity and density of ruminal bacteria community did not differ between groups but yeast influenced the abundance of some minor ruminal bacteria taxa. In the post-weaning period, protozoa established in control calves to reach similar values than yeast supplemented calves. The archaea community was more abundant in yeast supplemented than in control calves, as opposed to the bacterial community that had a lower density in the rumen of yeast supplemented calves. Yeast supplementation of calves could have induced more favourable conditions for the establishment by protozoa and archaea and regulated the establishment, diversity and taxonomical profile of the bacteria community.

Introduction

In young ruminants, the establishment of ruminal microbiota has mainly been studied before weaning and begins early after birth and is sequential (Fonty *et al.*, 1987; Rey *et al.*, submitted 2012b). In weaned ruminants, dietary microbial additives, including *Saccharomyces cerevisiae*, can improve performances and prevent some diseases, such as ruminal acidosis. Numerous studies in weaned ruminant have shown that live yeast supplementation had beneficial effects on milk production (Nocek *et al.*, 2011), dry matter intake, digestive efficiency, ruminal pH (Callaway and Martin, 1997; Dann *et al.*, 2000; Marden *et al.*, 2008) and fermentation parameters (Quigley *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 1997). Moreover, *in vitro* (Chaucheyras *et al.*, 1995; Newbold *et al.*, 1995; Newbold *et al.*, 1996) or *in vivo* (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997; Marden *et al.*, 2008) studies have observed that live yeast stimulate cellulolytic bacteria. By contrast, other studies have shown no effect of yeast supplementation on dry matter intake, milk production, milk composition and body weight (Arambel and Kent, 1990; Swartz *et al.*, 1994). Discrepancies between studies could be due to effects of dietary yeast strongly depending on the physiological status of animals (Williams and Newbold, 1990) and their diet, which in part determine the environmental conditions of the rumen (Dawson, 1989).

In young pre-ruminant, yeast supplementation increased dry matter intake (Leismeister *et al.*, 2004) and average daily gain (Wagner *et al.*, 1990) but did not affect the development of volume and papillae in the rumen (Leismeister *et al.*, 2004). In gnotobiotic lambs that are inoculated with only cellulolytic bacteria, yeast supplementation stimulates the development of cellulolytic microflora and enhances microbial activity of these bacteria between 20 and 50 days of age (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2001). In young lambs, supplementation with yeast accelerates the ruminal colonization by microorganisms and improves the stability of the composition of the rumen ecosystem when calves switch over from the milk diet to solid food were suggested by Chaucheyras-Durand and Fonty (2001).

These results suggest that, in pre-ruminants, yeast supplementation has similar effects than in adults, stimulating the development of rumen function. Such an effect could be due to an acceleration of the establishment of ruminal microbiota, a stimulation of some microbial populations, or a stabilization of the ruminal ecosystem. However, data relative to the post-weaning evolution of ruminal microbota and the possible effects of yeast supplementation is scarce (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002).

In consequence the aims of the present study were to characterize the establishment of ruminal microbiota (bacteria, archaea and ciliated protozoa) in the pre- and post-weaning

periods in dairy calves and to investigate the effects of live *Saccharomyces cerevisiae* dietary supplementation.

Materials and Methods

All animal housing and handling procedures in this study were realized in accordance with the Guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 1988).

Experimental procedures, animals and diet

Twelve male Holstein calves were immediately separated from their mothers at birth and were housed in individual pens (1.05 × 2.30 m, bedded with straw) without contact with other animals from 1 to 90 days. From day 90 to day 120, calves were housed in two collective boxes according to the treatment, with mature animals in the same building. From day 1 to day 90 the diet was distributed in individual buckets and all offered and refused feedstuffs were weighed daily and individually. After d 90, animals were blocked with headlocks before the distribution of concentrate as individual portions in the feeder. The chemical composition was determined on food samples every 15 days. The first meal was given less than two hours after birth, and the two first meals were 1.5 L of maternal colostrum. From 2 to 59 days, calves were fed a milk replacer (620, 750, 880, 750 and 500 g/day from 2 to 14 days, from 15 to 21 days, from 22 to 42 days, from 43 to 49 days and from 50 to 59 days, respectively). Calves were weaned at 60 days of age. From 4 to 120 days, all calves were allocated daily 250 and 250 g, 500 and 500 g, 1,000 and 2,000 g, and 2,500 g and *ad libitum*, a starter pelleted concentrate and hay at first, second, third and four month of age, respectively. Clean water was available *ad libitum* throughout the experiment. Feedstuffs were distributed daily and individually, in two equal meals at 0800 and 1600h for milk replacer, and at 0900 and 1700h for hay and starter concentrate. Calves were assigned randomly into two groups: six calves received daily 1.4 g of Actisaf[®] SC 47/day, containing 10¹⁰ CFU of live *Saccharomyces cerevisiae* Sc. 47/g (Lesaffre Feed Additive, France) in 30 ml of water from 2 to 120 days of age (SC group). The six other calves were used as a control (C group) and received water as a placebo. Live yeast SC 47 (1.4 g of Actisaf[®] SC 47/day per calf) and placebo were administered orally 10 minutes before the morning milk feeding.

Ruminal sampling

At days 1, 2, 5, 7, 12, 15, 18, 20, 22, 25, 40, 60, 63, 70, 80, 90 and 120 of age, ruminal content samples (approximately 500 mL) were collected on each calf via a stomach tube (internal diameter 13 mm) 1 h after the milk morning meal and before the distribution of hay and starter pelleted concentrate. The ruminal samples collected were divided into 2 representative fractions. The first fraction of ruminal fluid was strained through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture). Three mL of filtered ruminal fluid were mixed with 3 mL of methylgreen-formalin solution (3.5% formaldehyde, Sigma, France; 0.14M NaCl, Sigma, France; 0.92 mM methylgreen, Sigma, France). The mixed samples were stored at room temperature in the dark until protozoa counting. At days 2, 7, 12, 18, 22, 40, 60, 70, 90 and 120 of age, the second part of ruminal fluid was strained through a metal sieve (1.6 mm mesh), and 0.2 g of this filtrate fraction was collected into a sterile eppendorf (with 0.2g of glass beads grinding of 0.1 mm and 4 glass beads 4 mm for DNA extraction) and stored at -80°C before DNA extraction.

Protozoa counting

Counting was done using a Thomas cellular enumeration chamber (Fisher Scientific, France) under a microscope (Leitz Biomed Microscope, Nurnberg, Germany) with x10, x40 and x100 enlargements for *Entodinium* greater than 100µm, *Dasytricha* and *Isotricha*, and *Entodinium* smaller than 100 µm, respectively. When the protozoa count was over 300 in a counting chamber, the samples were diluted in phosphate buffered saline (PBS, 0.01M at pH 7.4, Sigma, France) and counting was restarted.

DNA extraction

Total DNA from ruminal samples was extracted by mechanical (FastPrep instrument (MP Biomedicals, Illkirch, FR)), chemical and thermic lyses (QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) under the conditions described by the manufacturer. The quantities and qualities of extracted DNA were then measured with a Nano-Drop ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE). The total DNA extracted samples were stored at – 20°C until using.

Total bacteria and archaea real-time qPCR

The total bacteria and archaea communities were quantified from 16S rRNA gene copy number per g of ruminal content by real-time PCR using the ABI Prism 7900 HT system

(Applied Biosystems, Saint Aubin, FR) with optical grade 384-well plates (final volume = 10 μL). The total bacteria real-time qPCR SYBR Green qPCR technology was used on a template DNA (2.5 μL , with a DNA sample concentration that varied between 7.2 and 726.5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). The specific primer used were forward 5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3' (*E. coli* position 338-357) and reverse 5' ATTACCGCTGCTGG 3' (*E. coli* position 518-534) from Fierer *et al.* (2005). The assay reaction mixture contained DNA, 100 nM specific primer set of forward and reverse and 1 X of Power SYBRs Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR). The results were compared with a standard curve (generated by amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference plasmid containing the target 16S rRNA gene (accession no. EF445235: *Prevotella bryantii*) to obtain the number of target copies in the sample. TaqMan technology was used on a template DNA (2.5 μL , with a DNA sample concentration that varied between 7.2 and 726.5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). The specific primer used were forward 5' GGYCGCAAGGCTGAACTTAA 3' (*E. coli* position 894-914) and reverse 5' CAGGCTCCACSCGTTGT 3' (*E. coli* position 935-951) describe by Combes *et al.* (2011). The TaqMan reaction mixture contained DNA, primers at 200 nM, TaqMan probe (5' CTCCCCCGCCAATT 3', *E. coli* position 818-931, Combes *et al.* (2011)) at 250 nM and 1_X of TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR). The amplifications were compared with a standard curve (amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference plasmid containing the target 16S rRNA gene (accession no. DSM861: *Methanobrevibacter smithii*). For SYBR Green and TaqMan assays, the PCR thermal program consisted of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles with 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The results of the both qPCR were performed using SDS software version 2.3 (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR).

Bacteria barcoded PCR and 454 pyrosequencing

DNA samples were amplified with two specific primers containing hypervariable regions V3-V4 on the 16S rRNA genes (460 pb on *E. coli*) and linked with multiplex identifier (MID: 11 pb nucleotide) which was unique for each sample (5' A-MID tags-NN-primer forward 3' and 5' A-MID tags-NN-primer reverse 3'; Eurogentec, Angers, FR). The bacteria primers used were forward 343F (5' TACGGRAGGCAGCAG 3'; Liu *et al.*, (2007)) and reverse 784R (5' TACCAGGGTATCTAATCCT 3'; Andersson *et al.*, (2008)) with an amplicon estimated at 460 pb. PCR reactions mixtures (100 μL) were realized with 1 μL of DNA sample (with a DNA sample concentration that varied between 7.2 and 726.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 0.5 μM of each forward and reverse primers, 1X PCR buffer, 100 μM dNTP, 0.5 U of IsisTM DNA

polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, FR). The PCR thermal program was 92°C for 2 min, with 32 cycles at 94°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 30s and at the end 72°C for 7 min. The amplicons (for each DNA samples) were purified with MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) and were checked on agar gels 2% (wt / v) individually to validate the amplification. The quality and quantity of purified PCR products were estimated with the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer and precisely quantified using Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay kit (Invitrogen, FR) on an ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Saint Aubin, FR). The purified amplicons were used to pool in equimolar quantities for a final DNA concentration at 500 ng μL^{-1} for each library and pyrosequenced using 454 GS FLX Titanium (454 Life Sciences-a Roche Company, Branford, CT, USA) sequencer at the GeT (Genomic and Transcriptomic) platform of Toulouse in France.

Sequence analysis

The 16S pyrotags sequences (also referred to as 16S pyrotags) obtained by pyrosequencing run were sorted based on their respective barcodes to form a total of 119 pyrotag libraries representing the 120 collected ruminal samples (one sample in calves on C group at 7 day of age was removed as too little DNA extracted). Sequences were filtered by Python Script (developed by the platform bioinformatic of Toulouse 16SCleaner, <https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/wiki/ng6/index.php/16SCleaner>), removing sequences that not have primer (with 2 mismatches allowed), with a short sequencing length less than 150 nt, with at least one ambiguous base or with a long homopolymer (greater than 9). The average read was length of 431 ± 1 nucleotides after trimming.

Cleaning, alignment and taxonomic assignment (bootstrap of 60%) were performed using the open-source Mothur software (V.1.20; Schloss *et al.*, 2009) and the SILVA bacteria alignment database (Pruesse *et al.*, 2007). Operational Taxonomic Unit (OTU at genera taxonomical level, cutoff 0.03) was determined for each read with the calculation of pairwise distance between the alignments of sequences. Only the taxa with a relative abundance over 0.1% were considered.

Calculations and statistical analysis

The bacterial taxonomic classification data were normalized and standardized. The VEGAN module of R (Community Ecology Package; Oksanen *et al.*, 2010) was used to generate the

diversity indexes from clusters in OTU (Shannon, ACE and Chao). The R software (R 2.12.2, R development Core Team, 2011) was used to analyze all data in this study. Mean values with standard error were reported for all data. The density of ruminal bacteria and archaea communities was transformed to logarithm for the statistical analysis. All parameters were analyzed pre-weaning (from 1 to 40 days) and post-weaning periods (from 60 to 120 days), as repeated measures, reporting the effects of yeast addition, age and interaction between age and yeast addition. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$ and a tendency was declared at $P < 0.1$. The TREE module of R (classification and regression trees) was used to generate age classes for ruminal bacteria taxonomic classification community, with the rpart function (Recursive Partitioning and Regression Trees, Therneau *et al.*, 2010) on the taxa that evolved with the age of calves within pre- and post-weaning periods.

Table 1. Effect of age and live yeast supplementation on ruminal bacteria community at the phylum taxonomical level during the pre-weaning period (between 2 and 40 days of age). Only the phyla with relative abundance over 0.1% were shown.

Phyla	Treatment ¹		SEM	P-value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
<i>Actinobacteria</i>	2.25	2.47	0.30	0.43	0.74	0.700
<i>Bacteroidetes</i>	54.10	59.39	2.30	0.37	0.21	0.82
<i>Fibrobacteres</i>	0.12	0.43	0.23	0.67	0.38	0.47
<i>Firmicutes</i>	18.19	15.75	0.95	0.50	0.13	0.82
<i>Fusobacteria</i>	0.66	0.44	0.16	0.01	0.46	0.57
<i>Proteobacteria</i>	24.42	21.29	2.47	0.34	0.50	0.62
<i>Spirochaetes</i>	0.26	0.22	0.09	0.69	0.82	0.15

¹C= Control group; SC= Yeast group

²A= age effect; Y = yeast effect; A x Y = age x yeast interaction.

Table 2. Effect of age and live yeast supplementation on ruminal bacteria community at the phylum taxonomical level during the post-weaning period (between 60 and 120 days of age). Only the phyla with relative abundance over 0.1% were shown.

Phyla	Treatment ¹		SEM	P-value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
<i>Actinobacteria</i>	3.09	2.48	0.45	0.93	0.60	0.35
<i>Bacteroidetes</i>	53.71	55.30	2.58	0.98	0.81	0.21
<i>Fibrobacteres</i>	1.03	0.56	0.21	<0.01	0.73	0.09
<i>Firmicutes</i>	17.00	15.55	1.32	0.68	0.54	0.26
<i>Proteobacteria</i>	16.11	15.19	2.21	0.56	1.00	0.80
<i>Spirochaetes</i>	0.27	0.56	0.12	0.56	0.32	0.50

¹C= Control group; SC= Yeast group

²A= age effect; Y = yeast effect; A x Y = age x yeast interaction.

Results

Feed Intake

These results have been presented in a companion paper (Rey et al., unpublished, 2012a). All offered milk was consumed by calves until weaning at 60 days of age. Starter concentrate and hay intake began at day 10 and day 20, respectively, and thereafter increased with age in both groups. Before weaning calves in the SC group consumed less starter concentrate than calves in the C group and after weaning, concentrate intakes were similar among groups. After 90 days of age, all calves entirely consumed the 2,500 g/day of distributed starter concentrate. Hay intakes were similar among groups during the pre-weaning period, and became higher in the SC group than in the C group after weaning.

Ruminal protozoa

Isotricha were only observed in 2 calves of the C group at day 120, at 2.22×10^1 and 1.00×10^3 protozoa mL⁻¹ of fresh ruminal fluid. Over the 120 days of experiment, no *Dasytricha* was found in rumen contents in both groups.

Regarding the Entodiniomorphs community, no large *Entodinium* were observed in any sample. During the pre-weaning period, no small *Entodinium* was observed in the C group while in the SC group, small *Entodinium* were observed from day 22 in one calf (1.22×10^1 protozoa mL⁻¹ of fresh ruminal content) and from day 40 in 3 other calves (6.22×10^1 protozoa mL⁻¹ of fresh ruminal content). In the 2 other calves of the SC group no small *Entodinium* was observed. In the post-weaning period, a tendency toward an interaction between age and yeast addition was observed ($P = 0.08$): small *Entodinium* appeared at 90 days in one calf and 120 days in the other calves of the C group, as opposed to an appearance at 60 days in 4 calves and 90 days in the two other calves of the SC group. The density of the small *Entodinium* ranged between 1.09×10^5 and 1.59×10^6 protozoa mL⁻¹ of fresh ruminal fluid at day 120 of age in both groups.

Table 3. Effect of age and live yeast addition on the abundances of ruminal bacterial taxa during the pre-weaning period (between 2 and 40 days of age). Only the taxa with relative abundance over 0.1% were shown.

Phylum.Class.Order.family.genus	Treatment ¹		SEM	P-value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Actinomycineae</i>	0.34	0.40	0.09	<0.001	0.72	0.81
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Corynebacterineae</i>	0.58	0.22	0.16	0.46	0.27	0.46
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Micrococcineae</i>	0.09	0.17	0.04	0.71	0.30	0.54
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Bifidobacteriales.Bifidobacteriaceae</i>	0.34	0.82	0.24	0.22	0.45	0.15
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteridae.Coriobacteriales.Coriobacterineae</i>	0.73	1.09	0.20	0.04	0.56	0.52
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Bacteroidaceae.Bacteroides</i>	6.26	6.56	1.25	0.001	0.90	0.67
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.BS11.unclassified</i>	0.09	0.75	0.20	0.51	<0.10	0.49
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Marinilabiaceae.Anaerophaga</i>	0.22	0.00	0.10	0.45	0.29	0.44
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyromonadaceae.Parabacteroides</i>	0.28	0.41	0.08	<0.01	0.35	0.53
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyromonadaceae.Porphyromonas</i>	1.51	0.64	0.32	0.01	0.16	0.72
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyromonadaceae.unclassified</i>	0.17	0.18	0.07	0.02	0.95	1.00
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella</i>	34.28	31.32	2.77	<0.001	0.22	0.61
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.unclassified</i>	3.03	2.76	0.32	<0.001	0.68	0.11
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.uncultured</i>	0.35	0.30	0.07	0.15	0.82	0.41
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Xylanibacter</i>	0.80	0.91	0.11	0.06	0.56	0.63
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.RF16.unclassified</i>	0.07	0.04	0.02	0.145	0.38	0.65
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.Alistipes</i>	0.23	0.20	0.05	0.001	0.74	0.53
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.RC9</i>	0.08	0.18	0.04	0.69	0.25	0.53
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.unclassified</i>	0.33	0.27	0.06	0.05	0.86	0.69
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.S24.7.unclassified</i>	0.08	0.05	0.03	0.34	0.69	0.73
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.unclassified.unclassified</i>	1.81	1.71	0.28	0.06	0.90	0.98
<i>Bacteroidetes.Flavobacteria.Flavobacteriales.Flavobacteriaceae.unclassified</i>	0.11	0.13	0.03	0.07	0.73	<0.1
<i>Bacteroidetes.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.46	0.35	0.05	0.09	0.26	0.45
<i>Fibrobacteres.Fibrobacteria.Fibrobacterales.Fibrobacteraceae.uncultured</i>	0.11	0.43	0.13	0.56	0.21	0.66
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Bacillaceae.Geobacillus</i>	0.10	0.19	0.04	0.71	0.30	0.47
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Bacillaceae.unclassified</i>	0.08	0.12	0.02	<0.001	0.35	0.38
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Paenibacillaceae.Paenibacillus</i>	0.07	0.13	0.03	<0.01	0.33	0.32

Suite tableau 3

Phylum.Class.Order.family.genus	Treatment ¹		SEM	P-value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Staphylococcaceae.Staphylococcus</i>	0.55	0.26	0.20	0.60	0.48	0.38
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Carnobacteriaceae.Granulicatella</i>	0.35	0.74	0.27	0.003	0.44	0.51
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Enterococcaceae.Enterococcus</i>	0.07	0.43	0.10	0.06	0.06	0.14
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Lactobacillaceae.Lactobacillus</i>	0.14	1.29	0.55	0.34	0.30	0.39
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Streptococcaceae.Streptococcus</i>	1.46	1.66	0.31	<0.001	0.66	0.32
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.unclassified.unclassified</i>	0.15	0.18	0.04	0.009	0.68	0.70
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiaceae.Clostridium</i>	0.22	0.25	0.06	0.09	0.76	0.15
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Family_XIII_Incertae_Sedis.Eubacterium</i>	0.39	0.05	0.10	0.009	0.04	0.01
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Acetitomaculum</i>	0.08	0.21	0.04	0.08	0.08	0.19
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Blautia</i>	0.06	0.13	0.03	0.19	0.20	0.32
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Butyrvibrio_Pseudobutyrvibrio</i>	0.33	0.05	0.10	0.41	0.16	0.42
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Butyrvibrio</i>	0.48	0.55	0.13	0.18	0.49	0.79
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Incertae_Sedis</i>	0.48	0.58	0.09	0.006	0.46	0.98
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Lachnospira</i>	0.10	0.04	0.01	0.009	0.002	0.87
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Moryella</i>	0.05	0.06	0.01	0.007	0.73	1.00
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Oribacterium</i>	0.27	0.21	0.04	0.222	0.98	0.83
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Roseburia</i>	0.24	0.46	0.14	0.067	0.37	0.73
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Syntrophococcus</i>	0.45	0.75	0.16	0.04	0.25	0.03
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.unclassified</i>	2.39	2.23	0.30	<0.01	0.92	0.89
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.uncultured</i>	0.07	0.11	0.02	0.53	0.25	0.58
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Faecalibacterium</i>	0.03	0.21	0.04	0.66	0.05	0.53
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Incertae_Sedis</i>	0.30	0.30	0.05	0.001	0.98	0.64
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Oscillospira</i>	0.27	0.19	0.07	<0.01	0.58	0.72
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Ruminococcus</i>	0.46	0.22	0.11	0.68	0.51	0.33
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.unclassified</i>	0.72	0.68	0.14	0.13	0.89	0.71
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.uncultured</i>	1.03	0.69	0.15	0.27	0.20	0.92
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.unclassified.unclassified</i>	0.33	0.26	0.03	0.18	0.32	0.40
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Dialister</i>	1.23	0.93	0.17	0.24	0.25	0.51
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Mitsuokella</i>	0.69	0.57	0.16	0.09	0.51	1.00

Suite 2 tableau 3

Phylum.Class.Order.family.genus	Treatment ¹		SEM	P-value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Selenomonas</i>	0.05	0.06	0.02	0.27	0.69	0.48
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.unclassified</i>	0.15	0.18	0.03	0.02	0.54	0.38
<i>Firmicutes.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.10	0.08	0.01	0.14	0.25	0.45
<i>Fusobacteria.Fusobacteria.Fusobacteriales.Fusobacteriaceae.Fusobacterium</i>	0.66	0.44	0.16	<0.001	0.41	0.90
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.Pelistega</i>	0.36	0.37	0.12	<0.001	0.97	0.95
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.unclassified</i>	0.12	0.11	0.04	<0.001	0.80	0.97
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Comamonadaceae.Comamonas</i>	0.60	0.48	0.16	0.13	0.71	0.09
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Comamonadaceae.unclassified</i>	0.28	0.13	0.06	0.10	0.20	0.03
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Oxalobacteraceae.Massilia</i>	0.24	0.08	0.11	0.50	0.47	0.38
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Hydrogenophilales.Hydrogenophilaceae.Hydrogenophilus</i>	0.28	0.58	0.14	0.68	0.29	0.32
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Neisseriales.Neisseriaceae.Alysiella</i>	0.44	0.20	0.11	0.21	0.29	0.49
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Neisseriales.Neisseriaceae.Neisseria</i>	0.12	0.15	0.03	0.002	0.67	0.94
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Neisseriales.Neisseriaceae.unclassified</i>	0.21	0.36	0.10	0.17	0.45	0.38
<i>Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae.Desulfovibrio</i>	0.26	0.26	0.04	0.05	0.94	0.62
<i>Proteobacteria.Epsilonproteobacteria.Campylobacteriales.Campylobacteraceae.Campylobacter</i>	0.20	0.05	0.03	0.13	<0.01	0.14
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae.Succinivibrio</i>	2.63	2.43	0.65	0.03	0.96	1.00
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Enterobacteriales.Enterobacteriaceae.Enteric_Bacteria_cluster</i>	0.57	0.37	0.16	<0.001	0.44	0.70
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Actinobacillus</i>	0.21	0.48	0.11	<0.001	0.05	0.001
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Gallibacterium</i>	0.18	1.33	0.25	0.02	0.01	0.12
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Haemophilus</i>	0.14	0.12	0.04	<0.001	0.76	0.96
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Mannheimia</i>	1.78	1.77	0.77	<0.001	1.00	1.00
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Pasteurella</i>	0.91	2.11	0.55	<0.001	0.14	0.06
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.unclassified</i>	3.80	3.59	1.07	<0.001	0.89	1.00
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Volucribacter</i>	0.28	0.08	0.10	0.32	0.33	0.55
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Acinetobacter</i>	0.35	0.45	0.09	0.07	0.52	0.44
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Enhydrobacter</i>	0.13	0.23	0.07	0.32	0.45	0.52
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Moraxella</i>	0.74	0.39	0.31	0.04	0.56	0.90
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Psychrobacter</i>	0.15	0.11	0.06	0.37	0.69	0.43
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.Azomonas</i>	0.17	0.17	0.02	<0.001	0.59	0.40
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.Pseudomonas</i>	1.94	4.57	0.84	0.001	0.08	0.65

Suite 3 tableau 3

Phylum.Class.Order.family.genus	Treatment ¹			P-value ²		
	C	SC	SEM	A	Y	A x Y
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.unclassified</i>	0.09	0.10	0.02	<0.001	0.55	0.36
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified</i>	12.62	10.08	1.95	<0.01	0.99	0.33
<i>Proteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.18	0.14	0.02	0.40	0.35	0.86
<i>Spirochaetes.Spirochaetes.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Termite_Treponema_cluster</i>	0.05	0.06	0.02	0.49	0.73	0.50
<i>Spirochaetes.Spirochaetes.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Treponema</i>	0.21	0.16	0.05	0.22	0.66	0.97

¹C= Control group; SC= Yeast group

²A= age effect; Y = yeast effect; A x Y = age x yeast interaction.

Ruminal total archaeal density

During the pre-weaning period, archaeal density were higher in the SC group than in the C group ($P < 0.001$). At day 2 of age, archaeal density averaged 3.44×10^{11} and 2.35×10^9 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content in the SC and C groups, respectively (Fig. 1). Then, the archaeal density increased until day 18 to around 7.60×10^{12} and 5.49×10^{10} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content in the SC and C groups, respectively.

During the post-weaning period, age and yeast interacted ($P < 0.001$) on the ruminal total archaeal density: between 60 and 80 days, archaeal density decreased in the C group but increased in the SC group. At day 120, the ruminal total archaeal density averaged 7.93×10^{10} and 5.24×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content in the C and SC groups, respectively.

Ruminal total bacterial density

During the pre-weaning period, age and yeast addition did not interact ($P = 0.67$) on bacterial density, which was similar between SC and C groups ($P = 0.84$) and increased with age ($P < 0.001$). At day 2 of age, bacterial density averaged 1.80×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content (Fig. 2). Thereafter, the ruminal total bacterial density increased until day 18 of age to reach a peak (average value of both groups: 1.54×10^{13} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content). After d 18 and until weaning the evolutions of bacterial density were opposed for both groups.

During the post-weaning period, age and yeast did not interact ($P = 0.60$) on the ruminal total bacterial density, which varied with the age without clear trend ($P < 0.001$). The ruminal total bacterial density was always lower in the SC group than in the C group ($P = 0.02$). Between 60 and 80 days the bacterial density increased in both groups, between 80 and 90 days, the bacterial density decreased and after 90 days of age, the bacterial density averaged of 3.53×10^{12} and 5.98×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content in the C and SC groups, respectively (Fig. 2).

Table 4. Effect of age and live yeast addition on the abundances of ruminal bacterial taxa during the post-weaning period (between 60 and 120 days of age). Only the taxa with relative abundance over 0.1% were shown.

Phylum.Class.Order.family.genus	Treatment ¹		SEM	P-value ²		
	C	SC		A	Y	A x Y
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Corynebacterineae</i>	0.07	0.04	0.02	0.66	0.58	0.33
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Bifidobacteriales.Bifidobacteriaceae</i>	1.49	0.34	0.20	<0.001	<0.001	<0.001
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacterineae</i>	2.00	1.19	0.31	<0.001	0.12	0.49
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Bacteroidaceae.Bacteroides</i>	0.15	0.46	0.14	0.18	0.27	0.25
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.BS11.unclassified</i>	1.54	1.16	0.41	0.01	0.58	0.01
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyrromonadaceae.Barnesiella</i>	0.14	0.28	0.07	0.19	0.31	0.15
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella</i>	55.33	51.57	2.16	0.58	0.35	0.01
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.unclassified</i>	3.78	3.15	0.43	0.09	0.44	0.12
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.uncultured</i>	0.67	0.93	0.21	0.02	0.52	0.99
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Xylanibacter</i>	1.34	1.15	0.10	<0.01	0.28	0.12
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.RF16.unclassified</i>	0.19	0.65	0.29	0.20	0.42	0.61
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.RC9</i>	0.65	0.68	0.20	<0.01	0.93	0.61
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.unclassified</i>	0.31	0.19	0.05	0.80	0.20	0.26
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.S24.7.unclassified</i>	0.16	0.17	0.04	<0.01	0.87	0.99
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.unclassified.unclassified</i>	1.43	1.33	0.19	<0.001	0.77	0.30
<i>Bacteroidetes.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.44	0.45	0.03	0.21	0.86	0.19
<i>Fibrobacteres.Fibrobacteria.Fibrobacterales.Fibrobacteraceae.uncultured</i>	1.03	0.56	0.21	<0.001	0.11	<0.001
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Staphylococcaceae.Staphylococcus</i>	0.07	0.08	0.02	0.72	0.68	0.19
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Streptococcaceae.Streptococcus</i>	0.12	0.12	0.03	0.74	0.99	0.13
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Family_XIII_Incertae_Sedis.Eubacterium</i>	0.10	0.05	0.01	0.02	0.03	0.06
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Family_XIII_Incertae_Sedis.unclassified</i>	0.07	0.05	0.01	0.02	0.25	0.17
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Acetitomaculum</i>	0.96	0.18	0.29	0.13	0.15	0.07
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Butyrvibrio_Pseudobutyrvibrio</i>	0.10	0.14	0.03	<0.01	0.47	0.03
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Butyrvibrio</i>	0.78	1.42	0.23	0.29	0.17	0.67
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Coprococcus</i>	0.13	0.15	0.02	0.47	0.60	0.95
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Incertae_Sedis</i>	0.82	0.62	0.11	0.02	0.36	0.40
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Lachnospira</i>	0.21	0.11	0.02	0.29	0.01	0.21

<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Moryella</i>	0.08	0.11	0.02	0.02	0.39	0.38
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Oribacterium</i>	0.48	0.60	0.07	0.11	0.40	0.72
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Roseburia</i>	0.19	0.29	0.06	0.36	0.43	0.31
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Syntrophococcus</i>	0.88	0.64	0.12	0.01	0.25	0.06
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.unclassified</i>	4.14	4.20	0.37	0.31	0.94	0.05
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.uncultured</i>	0.41	0.22	0.10	0.02	0.30	0.09
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Fastidiosipila</i>	0.28	0.27	0.11	0.06	0.96	0.11
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Incertae_Sedis</i>	0.16	0.16	0.03	0.02	0.92	0.02
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Ruminococcus</i>	1.26	1.07	0.20	0.001	0.56	0.18
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.unclassified</i>	0.65	0.62	0.10	0.02	0.86	0.02
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.uncultured</i>	2.58	1.94	0.25	<0.001	0.11	0.20
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.unclassified.unclassified</i>	0.60	0.53	0.06	0.001	0.48	0.44
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Dialister</i>	1.52	1.07	0.24	0.02	0.32	0.95
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Mitsuokella</i>	0.64	0.29	0.14	0.29	0.20	0.62
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Selenomonas</i>	0.11	0.09	0.04	0.02	0.81	0.54
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.unclassified</i>	0.09	0.10	0.02	0.51	0.99	0.39
<i>Firmicutes.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.13	0.14	0.02	0.03	0.63	0.08
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Comamonadaceae.Comamonas</i>	0.01	0.16	0.07	0.38	0.27	0.37
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Hydrogenophilales.Hydrogenophilaceae.Hydrogenophilus</i>	0.05	0.18	0.03	0.21	0.06	0.34
<i>Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae.Desulfovibrio</i>	0.16	0.16	0.03	0.23	0.96	0.22
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae.Succinivibrio</i>	1.14	1.15	0.18	0.06	0.96	0.65
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.unclassified</i>	0.02	0.21	0.09	0.42	0.32	0.43
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Acinetobacter</i>	0.05	0.15	0.03	0.01	0.03	0.002
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Enhydrobacter</i>	0.03	0.21	0.10	0.30	0.27	0.33
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.Azomonas</i>	0.10	0.17	0.02	0.23	0.07	0.41
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.Pseudomonas</i>	0.67	1.68	0.33	0.13	<0.10	0.12
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified</i>	6.96	13.84	1.93	0.001	0.04	0.43
<i>Proteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.07	0.10	0.01	0.004	0.17	0.43
<i>Spirochaetes.Spirochaetes.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Termite_Treponema_cluster</i>	0.12	0.10	0.03	0.006	0.70	0.17
<i>Spirochaetes.Spirochaetes.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Treponema</i>	0.54	0.20	0.13	0.05	0.15	0.50

¹C= Control group; SC= Yeast group

²A= age effect; Y = yeast effect; A x Y = age x yeast interaction.

OTU diversity indexes

The number of operational taxonomic units (OTUs) at a threshold of 0.03 was $2,055 \pm 88$ for the 131 samples with a coverage value of 87 ± 0.4 %. It did not depend on age, was similar between groups and age and yeast did not interact. During the pre-weaning period, the Shannon and Chao indexes, did not depend on age ($P=0.35$ and $P=0.13$, respectively) and were similar between groups ($P=0.13$ and $P=0.11$, respectively) with 5.5 ± 0.06 and $4,817 \pm 242$ average values, respectively. The ACE index increased with age from 2,911 to 20,991 ($P=0.05$) and was similar between groups ($P=0.22$). During the post-weaning period, the Chao and ACE indexes did not change with age ($P=0.23$ and $P=0.26$, respectively) and were similar between groups ($P=0.95$ and $P=0.88$, respectively) with $5,582 \pm 407$ and 9806 ± 751 , average values, respectively. The Shannon index tended to be affected by an interaction between age and yeast addition ($P=0.09$): it was lower in the SC group than in the C group at all ages except at day 70.

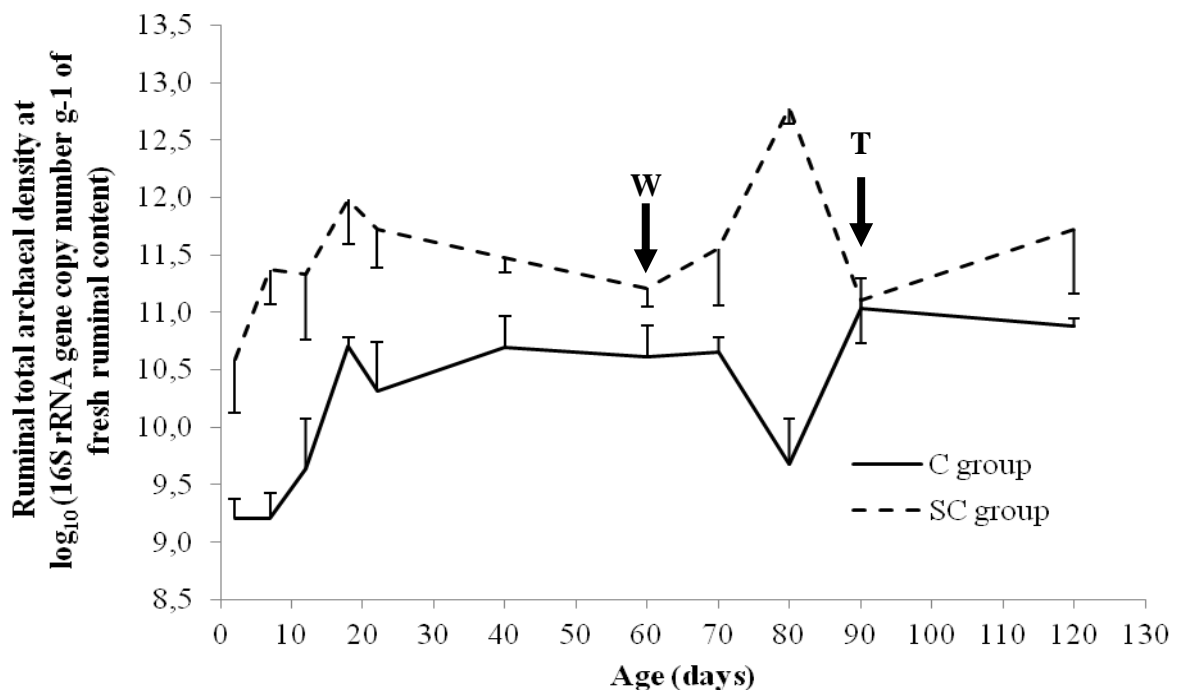


Fig. 1. Evolution of ruminal total archaeal density throughout the first 120 days of life of the calves in the Control and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented groups (C and SC groups respectively). Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

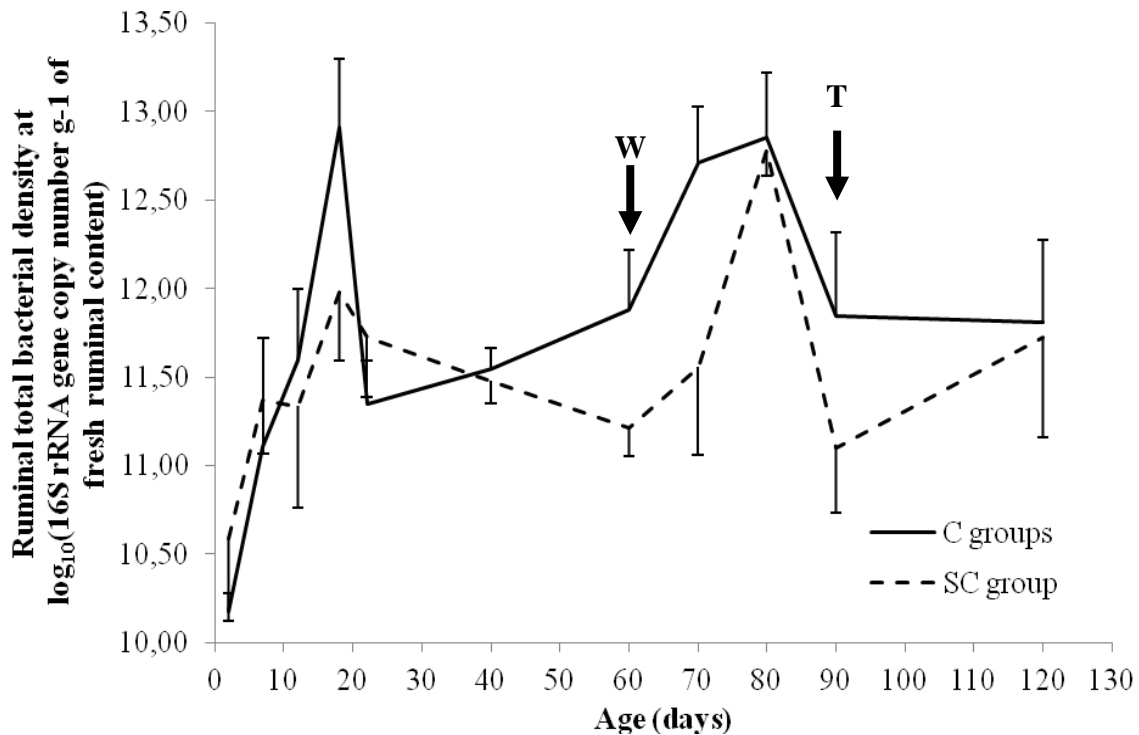


Fig. 2. Evolution of ruminal total bacterial density throughout the first 120 days of life of the calves in the Control and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented groups (C and SC groups respectively). Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

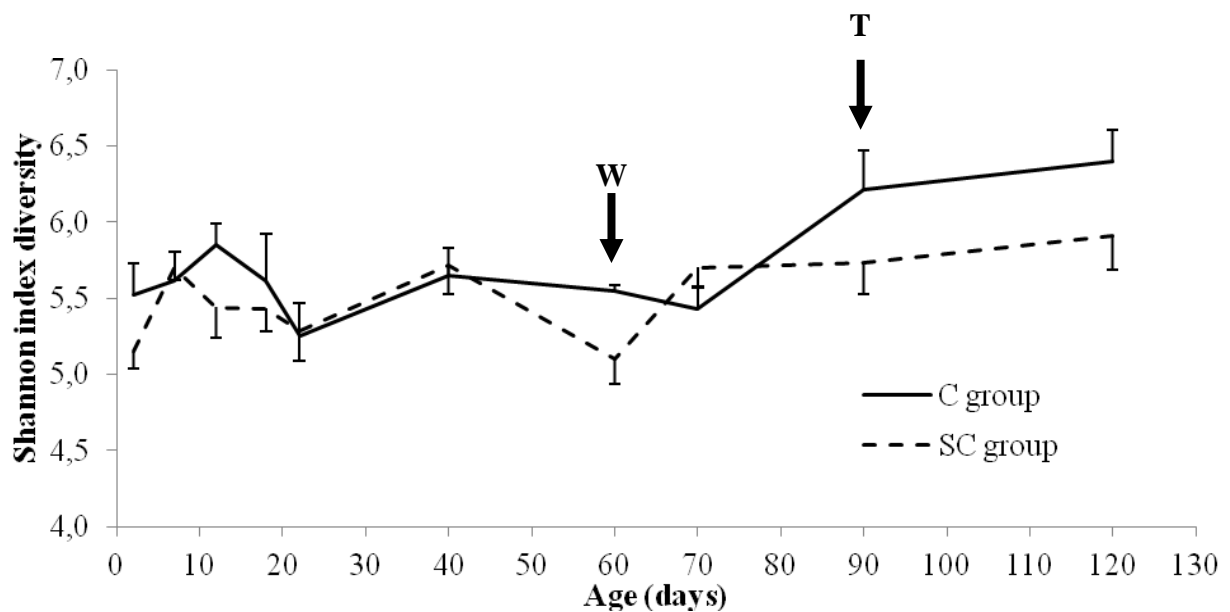


Fig. 3. Evolution of Shannon index diversity on the ruminal bacteria community throughout the first 120 days of life of the calves in the Control and *Saccharomyces cerevisiae* supplemented groups (C and SC groups respectively). Vertical bars show standard error (up for group C and down to SC group). (W = weaning and T = transfer from individual to common boxes).

Taxonomical composition of ruminal bacteria community

A total of 1,460,604 sequences were obtained from 454 GS FLX Titanium pyrosequencing run. After cleaning, 1,248,107 of pyrotags were obtained over 131 samples (with $10,358 \pm 470$ reads/ sample, on average). Among these sequences, 600 different taxa were observed in ruminal samples, corresponding to 14 phyla with only 7 and 6 of them having an average relative abundance over 0.1 % in the pre- and post- weaning periods, respectively (Tables 1 and 2). Among the 165 families observed, 41 and 24 have an average relative abundance over 0.1% in the pre- and post- weaning periods, respectively (Tables 3 and 4). Among the 508 genera identified, 62 and 37 had an average relative abundance over 0.1% in the pre- and post- weaning periods, respectively (Tables 3 and 4).

Each of the two *Fibrobacteres* and *Fusobacteria* phyla comprised only one family and one genus (Tables 3). The *Spirochaetes* phylum was composed of one family (*Spirochaetaceae*) with two genera (*Termite_Treponema_cluster* and *Treponema*). The Actinobacteria phylum was composed of 5 families (*Actinomycineae*, *Corynebacterineae*, *Micrococcineae*, *Bifidobacteriaceae* and *Coriobacterineae*), for which SILVA did not permit a classification at the genus level. The other phyla (*Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*) were composed of many families and genera (Table 3 and 4).

During the pre-weaning period, none of the 7 phyla was affected by yeast addition or by an interaction between age and yeast addition. Only the *Fusobacteria* phylum changed with age ($P=0.01$, Table 1); it was composed of the *Fusobacterium* genus that appeared from day 2, increased until day 7 to reach 2.32% relative abundance and then decreased to zero at day 40 in both groups. During the post-weaning period, only the *Fibrobacteres* phylum tended to be affected by an interaction between age and yeast addition ($P=0.09$, Table 2). It was composed of *Fibrobacteraceae uncultured* that increased peaked at 1.18% relative abundance at 90 days in the SC group and increased to 3.55% at 120 days in the C group.

During the pre-weaning period, the relative abundances of the 5 families of the Actinobacteria phylum were similar between SC and C groups (Table 3). *Actinomycineae* and *Coriobacterineae* families relative abundances depended on age (Fig. 4). During the post-weaning period, the Actinobacteria phylum was only composed of 3 families (Table 4). The *Bifidobacteriaceae* family relative abundance was less abundant in the SC group than in the C group. The *Coriobacterineae* and *Bifidobacteriaceae* families relative abundances increased between 60 and 80 days and decreased between 90 and 120 days (Fig. 5). *Bifidobacteriaceae*

family was affected by an interaction between age and yeast addition due to a less abundant increase of relative abundance between 60 and 70 days in the SC group than in the C group. During the pre-weaning period, 18 taxa of the *Bacteroidetes* phylum were similar between SC and C groups and only *BS.11 unclassified* tended to be more abundant in the SC group than in the C group (Table 3). As presented in the Fig. 4, the relative abundances of 11 taxa changed with age. The most abundant were: *Bacteroides* that was predominant (5.5%) between 2 and 12 days of age and decreased after 18 days, and *Prevotella* that increased from 5.9% at day 2 to 45.4% after 18 days. The *Alistipes* genus disappeared from day 40 in both groups. During the post-weaning period, the *Bacteroidetes* phylum was only composed of 13 taxa, due to the disappearance of 6 taxa observed before weaning and the appearance of a new taxon (Table 4), and taxa relative abundances were similar in the C and SC groups. Among the 13 taxa, 6 changed with age (Fig. 5) and 3 were among the most abundant: *Prevotellaceae unclassified* (3.47% on average), *Bacteroidales unclassified* (1.38% on average) and *Xylanibacter* (1.24% on average). The *Prevotella* genus and *BS.11 unclassified* were affected by an interaction between age and yeast addition ($P < 0.01$, Table 4). *Prevotella* genus was the most abundant taxon (53.45% on average). In the SC group, it increased between 60 and 70 days (from 46 to 62.86%), decreased between 70 and 90 to reach 43.03% and increased between 90 and 120 to reach 54.40%. On the contrary, in the C group, it decreased between 60 and 70 days (from 63.63 to 51.42%), increased between 70 and 90 days to 61.27% and decreased between 90 and 120 days to reach 44.99%. In the SC group, *BS.11 unclassified* increased between 60 and 90 days from 0.08 to 4.25% and then decreased to reach 0.20% whereas in the C group, it increased between 60 and 120 days from 0.11 to 4.32%.

During the pre-weaning period, 35 *Firmicute* taxa were identified, 4 of them being affected by yeast addition: *Lachnospira* was less abundant in the SC group than in the C group (Table 3) and *Faecalibacterium*, *Enterococcus* and *Acetivomaculum* were more abundant in the SC group than in the C group (Table 3). Seventeen taxa were affected by age (Fig. 4). *Streptococcus* and *Granicutella* were the predominant genera between 2 and 7 days with 5.8 and 3% relative abundances, respectively, and then decreased under 1%. *Lachnospiraceae unclassified* increased between 2 and 18 days from 1.3% to 4.4% and then decreased to 2.6%. Two taxa were affected by an interaction between age and yeast addition (Table 3): *Eubacterium* was less abundant in SC than C groups and *Syntrophococcus* was more abundant in SC than C groups at 7 and 40 days but were similar between groups on the other ages. During the post-weaning period, the *Firmicute* phylum was composed of 27 taxa, with 11 taxa observed before weaning that disappeared and 3 that appeared, the most

abundant being *Lachnospiraceae unclassified* (4.2% on average), *Ruminococcaceae uncultured* (2.2% on average), *Dialister* (1.30% on average), *Ruminococcus* (1.2% on average) and *Butyrivibrio* (1.1% on average). *Lachnospira* relative abundance was less abundant in the SC group than in the C group (Table 4). Eight taxa were affected by age (Fig. 5), including *Dialister*, *Ruminococcus*, and *Ruminococcaceae uncultured*. Nine taxa were affected by an interaction between age and yeast addition (Table 4), especially *Lachnospiraceae unclassified* that increased from 2.7 to 6.1% between 60 and 70 days and then decreased to reach 3.5% at 120 days in the C group and inversely decreased between 60 and 70 days from 3.4 to 3.1% and then increased to reach 6.2% in the SC group.

During the pre-weaning period, 29 different taxa were identified in the *Proteobacteria* phylum. *Pseudomonas* (3.3% on average) tended to be more abundant in the SC group than in the C group (4.6 and 1.9 %, respectively, $P=0.08$, Table 3). *Campylobacter* was less abundant in the SC group than C group (0.1 and 0.2 %, respectively) and *Gallibacterium* was more abundant in the SC group than C group (1.3 and 0.2 %, respectively). Seventeen taxa were affected by age (Fig. 4), including 5 most abundant taxa: *Gammaproteobacteria unclassified*, *Pasteurellaceae unclassified*, *Succinivibrio*, *Mannheimia* and *Pasteurella* (mean relative abundances were 11.6, 3.7, 2.5, 1.8 and 1.5% respectively). *Actinobacillus*, *Comamonas* and *Comamonadeceae unclassified* were affected by an interaction between age and yeast addition (Table 3). *Actinobacillus* at day 2 was more abundant in the SC group than in the C group (2.6 and 1.0%, respectively), *Comamonas* was more abundant in the SC group than in the C group before 22 days and less abundant thereafter, and *Comamonadeceae unclassified* was more abundant at day 7 in the SC group than in the C group (1.0 and 0.1%, respectively). During the post-weaning period, the *Proteobacteria* phylum was composed of 11 taxa (18 taxa disappeared), *Succinivibrio* (1.15%), *Pseudomonas* (1.2%) and *Gammaproteobacteria unclassified* (10.4%) being the most abundant. *Hydrogenophilus*, *Azomonas*, *Pseudomonas* and *Gammaproteobacteria unclassified* were more abundant in the SC group than in the C group (Table 4). Three taxa were affected by age (Table 4), including the most abundant *Succinivibrio* and *Gammaproteobacteria unclassified* (Fig. 5). *Acinetobacter* was affected by an interaction between age and yeast addition (Table 4): Its abundance was very variable between 60 and 120 days with a maximum at 90 days (0.4%) in the SC group and at 120 days (0.1%) in the C group.

During the pre-weaning period, 2 genera were identified in the *Spirochaetes* phylum: *Termite_Treponema_cluster* (0.1% on average) and *Treponema* (0.2% on average). Their abundances were similar between groups and did not depend on age (Table 3). During the post-weaning period, the *Spirochaetes* phylum was composed of *Termite_Treponema_cluster* and *Treponema* genera, that did not depend on yeast addition (Table 4) but were affected by age (Fig. 5).

Phylum.Class.Order.Family.Genus	Age (days)						PR E ^a
	2	7	12	18	22	40	
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Actinomycetales.Actinomycineae</i>	0.15%	1.30%	0.20%				0.15
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacterineae</i>	0.31%		1.51%				0.13
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Bacteroidaceae.Bacteroides</i>	5.50%		1.51%				0.20
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyromonadaceae.Parabacteroides</i>	0.04%	0.50%			0.01%		0.06
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyromonadaceae.Porphyromonas</i>	0.77%	2.62%	0.14%				0.17
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Porphyromonadaceae.unclassified</i>	0.69%	0.07%					0.16
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Prevotella</i>	5.90%	27.39%	45.36%				0.38
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.unclassified</i>	0.57%	5.7%	2.80%				0.15
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Xylanibacter</i>	0.66%			1.26%			0.09
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.Alistipes</i>	0.02%	0.44%	0.18%		ND ^b		0.06
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.unclassified</i>	0.10%		0.50%				0.15
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.unclassified.unclassified</i>	0.27%	2.80%	1.60%				0.14
<i>Bacteroidetes.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.10%	0.46%					0.11
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Bacillaceae.unclassified</i>	0.35%	0.05%					0.34
<i>Firmicutes.Bacilli.Bacillales.Paenibacillaceae.Paenibacillus</i>	0.37%	0.05%					0.18
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Carnobacteriaceae.Granulicatella</i>	2.96%	0.07%					0.22
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Enterococcaceae.Enterococcus</i>	0.94%	0.11%					0.13
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.Streptococcaceae.Streptococcus</i>	5.8%	0.71%					0.52
<i>Firmicutes.Bacilli.Lactobacillales.unclassified.unclassified</i>	0.28%		0.05%				0.11
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Clostridiaceae.Clostridium</i>	0.59%	0.16%					0.10
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Acetitomaculum</i>	0.04%		0.25%				0.11
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Incertae_Sedis</i>	0.22%	1.24%	0.64%	0.36%			0.12
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Lachnospira</i>	0.04%		0.15%	0.08%			0.16
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Moryella</i>	0.02%		0.16%	0.05%			0.11
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Roseburia</i>	0.14%		1.28%	0.19%			0.07
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.unclassified</i>	1.34%		4.35	2.60%			0.18

			%		
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Incertae_Sedis</i>	0.10%	0.55%	0.21%		0.10
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Oscillospira</i>	0.02%	0.56%	0.08%		0.08
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Mitsuokella</i>	0.26%	1.60%	0.55%		0.06
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.unclassified</i>	0.11%	0.18%	0.35%	0.13%	0.10
<i>Fusobacteria.Fusobacteria.Fusobacteriales.Fusobacteriaceae.Fusobacterium</i>	0.62%	2.32%	0.10%	ND ^b	0.36
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.Pelistega</i>	<0.01%	1.56%	0.48%	0.04%	0.19
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Burkholderiales.Alcaligenaceae.unclassified</i>	<0.01%	0.49%	0.14%	0.02%	0.11
<i>Proteobacteria.Betaproteobacteria.Neisseriales.Neisseriaceae.Neisseria</i>	0.44%		0.10%		0.21
<i>Proteobacteria.Deltaproteobacteria.Desulfovibrionales.Desulfovibrionaceae.Desulfovibrio</i>	0.05%		0.30%		0.08
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae.Succinivibrio</i>	0.58%	7.04%		2.33%	0.08
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Enterobacteriales.Enterobacteriaceae.Enteric_Bacteria_cluster</i>	2.48%		0.07%		0.46
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Gallibacterium</i>	0.20%	1.85%		0.21%	0.07
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Haemophilus</i>	0.55%		0.05%		0.35
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Mannheimia</i>	10.17%		0.10%		0.33
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.Pasteurella</i>	8.60%		0.08%		0.47
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pasteurellales.Pasteurellaceae.unclassified</i>	19.36%		0.56%		0.61
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Acinetobacter</i>		0.75%		0.23%	0.10
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Moraxellaceae.Moraxella</i>	2.87%		0.11%		0.16
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.Azomonas</i>	0.35%		0.14%		0.22
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.Pseudomonas</i>	10.63%		1.78%		0.22
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Pseudomonadales.Pseudomonadaceae.unclassified</i>	0.26%		0.06%		0.25
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified</i>		4.84%		17.86%	0.16

^a Proportion of variability by division in age-classes.

^b ND = no detected

Fig. 4. Age classification according to taxonomical level of bacteria relative abundance (average % in both groups) that evolved with the age of calves in both groups (with the model of repeated measures), determined with TREE package of R during the pre-weaning period (between 2 and 40 days of age).

Phylum.Class.Order.Family.Genus	Age (days)					PRE ^a
	60	70	80	90	120	
<i>Actinobacteria.Actinobacteria.Coriobacteriales.Coriobacterineae</i>	1.12%		3.67%		0.8%	0.16
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.unclassified</i>		2.44%			4.49%	0.12
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.uncultured</i>		0.18%			1.41%	0.18
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Prevotellaceae.Xylanibacter</i>		0.94%			1.55%	0.19
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.Rikenellaceae.RC9</i>			0.25%		1.89%	0.26
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.S24.7.unclassified</i>		0.04%		0.20%	0.39%	0.26
<i>Bacteroidetes.Bacteroidia.Bacteroidales.unclassified.unclassified</i>		0.70%		1.60%	2.51%	0.34
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Family_XIII_Incertae_Sedis.unclassified</i>			0.04%		0.10%	0.16
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Incertae_Sedis</i>	0.25%			0.88%		0.12
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Lachnospiraceae.Moryella</i>		0.05%		0.14%		0.16
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.Ruminococcus</i>		0.47%		1.86%		0.26
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Ruminococcaceae.uncultured</i>	1.73%		4.09%		1.61%	0.19
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.unclassified.unclassified</i>		0.36%			0.77%	0.28
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Dialister</i>		2.02%			0.58%	0.20
<i>Firmicutes.Clostridia.Clostridiales.Veillonellaceae.Selenomonas</i>			0.02%		0.32%	0.20
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.Aeromonadales.Succinivibrionaceae.Succinivibrio</i>		0.99%		2.00%	0.65%	0.08
<i>Proteobacteria.Gammaproteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified</i>	21.99%			6.54%		0.26

<i>Proteobacteria.unclassified.unclassified.unclassified.unclassified</i>	0.14%	0.07%	0.23
<i>Spirochaetes.Spirochaetes.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Termitre_Treponema_cluster</i>	0.02%	0.20%	0.23
<i>Spirochaetes.Spirochaetes.Spirochaetales.Spirochaetaceae.Treponema</i>	0.03%	0.71%	0.15

^a Proportion of variability by division in age-classes.

Fig. 5. Age classification according to taxonomical level of bacteria relative abundance (average % in both groups) that evolved with the age of calves in both groups (with the model of repeated measures), determined with TREE package of R during the post-weaning period (between 60 and 120 days of age).

Discussion

Protozoal, bacterial and archaeal densities during the pre-weaning period

No protozoa were observed before 22 days of age, as already observed by Bryant *et al.* (1958), Anderson *et al.* (1987) and Rey *et al.* (unpublished data) when calves are separated at birth from their dams or adult animals. A slightly earlier (from 2 weeks of age) protozoal establishment has been reported in lambs not separated from adults (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002; Minato *et al.*, 1992), emphasizing the importance of a direct contamination from other animals. Our observed earlier establishment of protozoa in yeast supplemented animals is consistent with the observations of Chaucheyras-Durand and Fonty (2002). This yeast effect could suggest that the ruminal environment of supplemented calves was more favorable for the colonization by protozoa. Protozoa are known to be inhibited by a low pH (Dehority, 2003) but in our experiment, the rumen pH was not affected by yeast addition (Rey *et al.*, unpublished data, 2012d), so that the precise reason of this earlier establishment remain unclear.

Bacteria and archaea were detected in the rumen in our first sample after birth, i.e. at day 2, with 1.80×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content for bacteria in both groups and 2.35×10^9 and 3.44×10^{11} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content for archaea in the C and SC groups, respectively. The colonization occurred well before ingestion of solid food, likely due to contamination by external environment and milk diet. Rey *et al.* (submitted, 2012b; data not published, 2012c) also observed an early colonization of bacteria and archaea, but with lower densities (1.7×10^{10} and between 1.2×10^4 and 3.3×10^5 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content for bacteria and archaea at day 2, respectively) than in the present study. The differences between these studies could be explained by a higher contamination associated with colostrum, because in the present study, we used maternal colostrum while in the study of Rey *et al.* (2012b, submitted) the colostrum was a frozen and stored for several weeks. Studies using cultivation techniques also found lower bacterial densities: 10^9 bacteria cells ml^{-1} of ruminal content in 2 days old lambs (Fonty *et al.*, 1987) and 10^9 cfu of total anaerobic bacteria g^{-1} of ruminal content in 3 days old calves (Hajime *et al.*, 1992).

Between 2 and 18 days of age, the ruminal bacterial density increased to reach 1.54×10^{13} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content in both groups on average. Thereafter, it decreased to reach 1.92×10^{12} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content in both groups on average at 40 days of age. Contrasting with our data, the ruminal

bacterial density has been shown to reach a plateau between 10 and 20 days of age in lambs (Fonty *et al.*, 1987) and from 1 month in calves (Anderson *et al.*, 1987). In our study, the ruminal bacterial density observed at 40 days of age was higher than previously reported in adult cows (Stewart *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2010), showing that colonization by rumen bacteria has not reached maturity. In our study, the ruminal bacterial density was not affected by yeast addition, consistent with the observations of Chaucheyras-Durand and Fonty (2001) in unweaned lambs. On the contrary, in 4 and 11 days old lambs, the ruminal bacterial density tended to be greater with yeast addition than in controls whereas after 16 days of age, when lambs intake solid food, the ruminal bacterial density was not affected by yeast addition (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002). Our observed archaeal density was also higher than the 10^4 archaea g^{-1} of ruminal content between 2 and 6 days of age and the 10^8 - 10^9 archaea g^{-1} of ruminal content at 3 weeks of age reported by Skillman *et al.* (2004) and Fonty *et al.* (1987). Between 2 and 40 days of age, the ruminal archaeal density was higher in the SC group than in the C group, reaching 7.60×10^{12} and 5.49×10^{10} 16S rRNA gene copy number g^{-1} of fresh ruminal content at day 18 in SC and C groups, respectively. The ruminal archaea community is known to have a symbiotic relationship with protozoa because archaea attach to the surface of protozoa (Changan *et al.*, 1999), so that in our yeast supplemented calves, the earlier establishment of protozoa could in, part explain the greater archaeal community density. However, in spite of this symbiosis, protozoa are not a prerequisite for archaea establishment since they were observed as early as day 2, far before the establishment of protozoa.

Protozoal, bacterial and archaeal densities during the post-weaning period

In the C group, ruminal protozoa only appeared from day 90 and reached 10^5 protozoa ml^{-1} of fresh ruminal content at day 120, close to values reported in adult cows (McAllister and Cheng, 1996; Williams and Coleman, 1997; Moon *et al.*, 2010). In spite of this later establishment, protozoal density was similar in C and SC calves at 120 days.

Between 60 and 120 days of age, in our study, the ruminal total bacterial density increased with age to reach values higher than previously observed in the adult cow (Stewart *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2010). The higher bacterial density observed in calves at day 120 than in adult ruminant showing that the rumen bacterial community is still not mature at 2 months after weaning. In our study, the bacterial density was lower in the SC group than in the C group, contrasting with the lack of yeast effect reported by Chaucheyras-Durand and Fonty (2002) in weaned lambs.

As for the bacteria, the archaeal community did not seem to be similar to that of adults 2 months after weaning since the density was higher than previously reported in adults (Denman *et al.*, 2007). The ruminal archaea density between 60 and 90 days had opposite patterns between SC and C groups, but in both groups, the archaeal density strongly but temporarily increased at the same time when protozoa appeared. Thereafter the ruminal archaea density stabilized around 2.29×10^{12} and 3.96×10^{10} in the SC and C groups respectively. As discussed for the pre-weaning period, the higher protozoal density in the SC than the C group could have promoted the archaeal density.

Ruminal bacterial community during the pre-weaning period

Between 2 and 40 days of age, *Bacteroidetes* was the predominant phylum with a 57% average relative abundance, followed by *Proteobacteria* (23%), *Firmicutes* (17%), *Actinobacteria* (2%). This is consistent with Rey *et al.* (Submitted, 2012b). These phyla were composed of a large part of facultative anaerobic bacteria genera as *Bacteroides*, *Prevotella* or *Ruminococcus* as observed by Fonty *et al.* (1987) in lambs and Hajime *et al.* (1992) in calves from 2 and 3 days of age. The age changes of a large part of predominant genera (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Succinivibrio*, *Mannheimia*, *Pseudomonas* or *Gammaproteobacteria unclassified* for example) was consistent with Rey *et al.* (submitted, 2012b) in similar conditions and with Li *et al.* (2011) in calves fed only milk but the relative abundances of these bacteria genera differed between the present study and Rey *et al.* (submitted, 2012b). Wu *et al.* (2012) also found different taxonomical profiles of bacteria in the rumen of 42 days old calves fed milk replacer, *Bacteroides* was also the predominant genus but *Prevotella* had a low 2% relative abundance as opposed to 45% in our study between 18 and 40 days. The differences of relative abundance of predominant bacterial genera between studies could be due to different diets and/or to differences in contamination at birth.

The most abundant bacterial groups, including *Bacteroides*, *Prevotella*, *Actinobacteria*, and *Streptococcus*, are known to comprise many species with wide range of functions in the rumen in ruminant adults (as cellulolysis, hemicellulolysis, pectinolysis, amylolysis, proteolysis; Yokoyama and Johnson, 1988). Their establishment together with the beginning of solid food intake could explain that, in our study, from days 7-10, the ruminal fermentation products (VFA, ammonia) and enzymatic activities increased (Rey *et al.*, Data unpublished). In lambs, yeast supplementation has been shown to stimulate the establishment of cellulolytic bacteria (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*,

Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002) from day 10 of age. In our study, these ruminal bacteria (*Fibrobacteres* phyla and *Ruminococcus* genera) were similar in SC and C groups. Besides, in our study, 8 genera had or tended to have higher relative abundances in the SC group than the C group: *BS.11 unclassified*, *Enterococcus*, *Acetitomaculum*, *Faecalibacterium*, *Gallibacterium* and *Pseudomonas*. These genera comprise species known to ferment glucose or to be acetogenic. Similarly, *Comamonas*, *Comamonadaceae unclassified* and *Actinobacillus* which are known for by species that degrade polysaccharides, except cellulose, and participate in glucose fermentation, were more abundant in the SC group before 22 days of age. On the contrary, *Lachnospira* (saccharolytic bacteria) and *Campylobacter* (pectin utilizing bacteria) had lower relative abundances in the SC group than in the C group. As a whole, these differences suggest an improvement of the relative abundance of minor taxa involved in glucose utilization. This could represent an adaptation of the microbiota to the composition of dietary intake, that contained low amounts of fiber but growing amounts of cytoplasmic carbohydrates due to the rapid increase of concentrate intake as opposed to the slow increase of hay intake pre-weaning.

Ruminal bacterial community during the post-weaning period

At the phylum level, during this period, the ruminal bacteria community was composed of *Bacteroidetes* (55% average relative abundance), *Proteobacteria* (15%), *Firmicutes* (16%), *Actinobacteria* (2.8%), *Fibrobacteres* (0.8%) and *Spirochaetes* (0.4%). The *Fusobacteria* phylum, present in the pre-weaning period, was not observed after weaning. In 12 months old calves (Li et al., 2011) or adult animals (Zened, 2011; Jami and Mizrahi, 2012), *Bacteroidetes* is also the major phylum, but *Firmicutes* are more abundant (42 to 48%) and *Proteobacteria* are less abundant (0.9 to 5%), suggesting that during our post-weaning period, the calf ruminal bacteria community had not reached maturity.

From weaning, 38 taxa observed during the pre-weaning period were no more observed: 2 taxa in the *Actinobacteria* phylum, 6 taxa in the *Bacteroidetes* phylum, 11 taxa in the *Firmicutes* phylum and 18 taxa in the *Proteobacteria* phylum. These taxa were no observed in the rumen of adult cows receiving a low starch diet (Zened, 2011) or in 12-months-old bulls calves (Li et al., 2011). On the contrary, 4 taxa appeared after weaning (2 *Bacteroidetes*: *Barnesiella* and *Family_XIII_Incertae_Sedis unclassified* and 2 *Firmicutes*: *Coprococcus* and *Fastidiosipila*). These evolutions of ruminal bacteria taxa could suggest an adaptation of the ruminal bacteria population to the end of milk intake and the rapid increase of solid food intake. However, the rumen functions of the genera that appeared or disappeared at weaning are unknown, which precludes any definitive conclusion about the reasons for these changes.

Our observed bacterial profile differed from previous observations in adult animals, which exhibit much higher abundances of *Prevotella* (from 11 to 50%), *Fibrobacter* (from 4.3 to 10%), *Succinivibrio* (from 0.3 to 6%) and *Ruminococcus* (from 0.6 to 5%, Zened *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). *Prevotella*, *Fibrobacter*, *Succinivibrio* and *Ruminococcus* These results could suggest that the taxonomical composition of rumen bacteria of weaned calves tend to approach that of adult microbiota but with differences in relative abundance that could relate to the diets. The abundances of the ruminal bacteria phyla did not change with age and were not affected by yeast addition. Many taxa which comprised mainly bacterial community were affected by age in both groups (Fig. 4). Comparing the relative abundances of taxa between 60 and 80 days and after 90 days showed an increase of several bacteria known for species involved in amylolytic or proteolytic activities (*Gammaproteobacteria unclassified* decreased, *Prevotellaceae unclassified* increased), in dextrin and maltose fermentation (*Succinivibrio*, increased and decreased) and in fibrolysis (*Ruminococcus*, *Xylanibacter*, *Ruminococcaceae uncultured*) that increased. Many taxa with fibrolytic activity increased after weaning when calves intake more hay (Rey *et al.*, unpublished, 2012c).

Over all observed phyla, 5 taxa relative abundances were affected by yeast addition: *Hydrogenophilus*, *Azomonas*, *Pseudomonas* and *Gammaproteobacteria unclassified* had higher abundances in the SC group than in the C group. They participate in the degradation of glucose. *Lachnospira* (pectinolytic bacteria) had a lower relative abundance in the SC group than in the C group. The stronger presence of rumen bacteria associated with glucose in yeast supplemented calves compared to control animals in our study and the higher hay intake and xylanase activity observed in this study (Rey *et al.*, unpublished) might suggest that the yeast improves adaptation of rumen bacteria to substrates present after weaning. Pinloche *et al.* (2008), observed in yeast supplemented in lactating cows fed a corn silage based diet, and using the t-RFLP technique, a decreased abundances of starch consuming bacteria (*Ruminobacter*, *Pseudobutyrvibrio*), an increased abundances of fibrolytic bacteria (*Fibrobacter*, *Ruminococcus* and *Eubacterium*) and lactic acid utilizing bacteria (*Megasphaera* and *Selenomonas*). In our study, *Ruminobacter* and *Megasphaera* were not observed, and *Ruminococcus* and *Selemonas* were not affected by yeast. These differences of yeast effect on the ruminal bacteria community between studies could depend of animal diet or to the techniques used to characterize the bacterial community. Actually, the effects of yeast addition are known to be more important when the rumen pH is low. In our study, the

ruminal pH was over 6.5 post-weaning, which could have prevented a positive effect of yeast on fibrolytic bacteria.

Before 90 days of age, the bacterial taxa *Lachnospira unclassified*, *BS.11 Unclassified*, *Eubacterium*, *Acetitomaculum* were observed with a lower relative abundance lower with the yeast supplementation than in controls. At the same period against the taxa *Prevotella*, *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*, *Lachnospiraceae uncultured*, *Ruminococcaceae unclassified* and *Acinetobacter* were not affected by yeast supplementation. All these bacteria taxa are acetogenic, cellulolytic and pectinolytic. These variations when the calf was supplemented with yeast, eat more hay than the controls was difficult to explain, because they affect bacteria with the same function. After 90 days of age, these taxa (*Prevotella*, *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*, *Lachnospiraceae unclassified*, *Lachnospiraceae uncultured*, *Ruminococcaceae Incertae_Sedis*, *Ruminococcaceae unclassified* and *Acinetobacter*) were measured with a higher relative abundance in calves supplemented with yeast. This observation is in agreement with the higher hay intake in these calves. These results suggested that the yeast supplementation in calves shaped the ruminal microbiota in favor of amylolytic, proteolytic, or pectinolytic or cellulolytic bacteria and adapted the taxonomic composition of rumen bacterial community to the substrates supplied by the diet in the post-weaning period.

Conclusion

During the pre-weaning period, yeast addition (*Saccharomyces cerevisiae*) resulted in an earlier appearance of the protozoa community and a greater archaeal density, but did not affect density and diversity of the bacteria community, except the abundance of minor taxa known to belong to acetogenic and glucose fermentative bacteria). During the post-weaning period, the protozoa community appeared in the control group only when calves were in contact with adult animals, as opposed to yeast supplemented calves whose ruminal protozoa increased to reach the density previously reported in adult animal. Yeast supplementation also increased archaeal density, lowered diversity and density of ruminal bacteria community and promoted proteolytic, amylolytic, pectinolytic and cellulolytic bacteria in the ruminal microbiota leading to a better adaptation of the microbiota to the dietary substrate.

Acknowledgements

We would like to thank the staff of the experimental station “Domaine de Borret Poucharramet” (UMR1289 TANDEM). We would like to thank all staff for technical assistance in sample preparation, particularly Beatrice Gabinaud and Nina Munster (UMR1289 TANDEM). We also thank Midi-Pyrénées region for the participation in the financial support of this experiment.

References

- Anderson, KL, Nagaraja TG & Morrill L (1987) Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J Dairy Sci* **70**: 1000-1005.
- Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyren P & Engstrand L (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *Microbial Diversity in the Gut*. Plos ONE **3**: e2836.
- Anonymous. 1988. Arrêté du 18 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. Pages 5608-5610 in Journal Officiel de la République Française. J. O, Paris.
- Arambel MJ & Kent BA (1990) Effect of a yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early to mid lactation dairy cows. *J Dairy Sci* **73**: 1560-1563.
- Belanche A, de la Fuente G, Pinloche E, Newbold CJ & Balcells J (2012) Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. *J Anim Sci* DOI:10.2527/jas.2011-4802.
- Bryant MP, Small N, Bouma C & Robinson I (1958) Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J Dairy Sci* **41**:1747-1767.
- Callaway ES & Martin SA (1997) Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J Dairy Sci* **80**: 2035-2044.
- Chagan I, Tokura M, Jouany JP & K. Ushida K (1999) Detection of methanogenic archaea associated with rumen ciliate protozoa. *J Gen Appl Microbiol* **45**: 305-308.
- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P (1995) Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Curr Microbiol* **31**: 201–205.
- Chaucheyras-Durand F & Fonty G (2001) Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod Nutr Dev* **41**: 57–68.
- Chaucheyras-Durand F & G. Fonty (2002) Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microb. Ecol Health Dis* **14**:30–36.
- Combes S, Michelland RJ, Monteils V, Cauquil L, Soulié V, Ngoc Uyen Tran, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2011) Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol Ecol* **77**: 680–689.
- Dann HM, Prockley JR, McCoy GC, Hutjens MF & Garrett JE (2000) Effects of yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J Dairy Sci* **83**: 123-127.
- Dawson KA (1989) Modification of rumen function and animal production using live microbial cultures as feed supplements. California Anim. Nutr. Conf. pp 25.
- Dehority BA (2003) Rumen microbiology. Nottingham University Press, UK, 372pp.
- Denman ST, Tomkins NW & McSweeney CS (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 313–322.
- Durand-Chaucheyras F, Fonty G & Bertin G (1997) L'utilisation de levures vivantes, additifs microbiens chez le ruminant: effets sur la microflore et les fermentations ruminales, effets zootechniques. Bull. G.T.V. 5B-576: 35–52.
- Fierer N, Jackson JA, Vilgalys R & Jackson RB (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4117-4120.

- Fonty G, Gouet P, Jouany J-P & Senaud J (1987) Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J Gen Microbiol* **133**:1835-1843.
- Hajime M, Mokoto O, Shoji S, Hisao I, & Makoto M (1992) Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *J Gen Appl Microbiol* **38**: 447-456.
- Jami E, & Mizrahi I (2012) Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS ONE* 7(3): e33306. doi:10.1371/journal.pone.0033306.
- Kumar U, Sareen VK & Singh S (1997) Effect of yeast culture supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J Sci Food Agric* **73**:231–236.
- Lee HJ, Jung JY, Oh YK, Lee S-S, Madsen EL, & Jeon CO (2012) Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups using barcoded pyrosequencing and H-NMR spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* doi:10.1128/AEM.00104-12
- Lesmeister KE, Heinrichs AJ & Gabler MT (2004) Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J Dairy Sci* **87**: 3439–3450.
- Li RW, Connor EE, Li C, Baldwin RL & Sparks ME (2011) Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ Microbiol* **14**: 129-139.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* **35**: e120doi:10.1093/nar/gkm541.
- Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R & Bayourthe C (2008) How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J Dairy Sci* **91**:3528–3535.
- McAllister TA & Cheng KJ (1996) Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim Feed Sci Technol* 62 : 29-36.
- Minato H, Otsuka M, Shirasaka S, Itabashi H & Mitsumori M (1992) Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *J Gen Appl Microbiol* **38**: 447-456.
- Moon YH, Ok JU, Lee SJ, Ha JK & Lee SS (2010) A comparative study on the rumen microbial populations, hydrolytic enzyme activities and dry matter degradability between different species of ruminant. *Anim Sci J* **81**: 642–647.
- Newbold CJ, Wallace RJ, Chen XB & McIntosh FM (1995) Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *J Anim Sci* **73**: 1811–1818.
- Newbold CJ, Wallace RJ & McIntosh FM (1996) Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br J Nutr* **76**: 249–261.
- Nocek JE, Holt MG & Oppy J (2011) Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci* **94**:4046–4056.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H & Wagner H (2010) Vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17.4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Pinloche E, McEwan N, Marden JP, Bayourthe C, Moncoulon R & Newbold CJ (2008) Effect of yeast on the bacterial diversity of the rumen. Gut Microbiome Symposium 2008. 6th congress INRA Rowett Research Institut. Clermont-Ferrand. p9.
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J & Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*. **35**: 7188–7196.

- Quigley JD, Wallis LB, Dowlen HH & Heitmann RN (1992) Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *J Dairy Sci* **75**:3531–3538.
- Rey M, Monteils V, Bayourthe C, Marden J-PM & Enjalbert F (unpublished 2012a) Effects of supplementation of live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* SC 47) on the establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves in pre- and post-weaning.
- Rey M, Enjalbert F, Combes S, Cauquil L, Bouchez O & Monteils V (Submitted, 2012b) Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning using high throughput 454 GS FLX pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Rey M, Enjalbert F, Combes S, Cauquil L, Bouchez O & Monteils V (unpublished, 2012c) The phylogenetic analysis of establishment of Archaea community in the rumen of dairy calves from birth to weaning using a high throughput 454 GS FLX pyrosequencing.
- Schloss PD (2009) A High-Throughput DNA Sequence Aligner for Microbial Ecology Studies. *PLoS ONE* **4**: e8230. doi:10.1371/journal.pone.0008230.
- Skillman LC, Evans PN, Naylor GE, Morvan B, Jarvis GN & Joblin KN (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**: 277–285.
- Swartz DL, Muller LD, Rogers GW & Varga GA (1994) Effect of yeast cultures on performance of lacting dairy cows: a field study. *J. Dairy Sci.* **77**: 3073-3080.
- Therneau TM & Atkinson B (2010) R port by Brian Ripley, rpart: Recursive Partitioning. R package version 3.1-48, <http://CRAN.R-project.org/package=rpart>.
- Stewart CS & Bryant MP (1988) The rumen bacteria. In : Hobson PN, (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. p527.
- Wagner DG, Quinonez J & Bush LJ (1990) The effect of cornor wheat-based diets and yeast culture on performance, ruminal pH, and volatile fatty acids in dairy calves. *Agri-Pract* **11**:7–12.
- Williams PEV & Newbold CJ (1990) Rumen probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: *Recent Advances in Animal Nutrition 1990* (Eds.: Haresign, W., and Cole, D.J.A.). Butterworths, London, 211-227.
- Williams PEV, Tait CAG, Innes GM & Newbold CJ (1991) Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J Anim Sci* **69**:3016–3026.
- Williams AG & Coleman GS (1997) The rumen protozoa. In : Hobson PN & Stewart CS *The rumen microbial ecosystem*. Second edition, Chapman et Hall, London, 73-139.
- Wu S, Baldwin 6th RL, Li W, Li C, Connor EE, & Li RW (2012) The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Metagenomics* doi:10.4303/mg/235571.
- Yokoyama MT & Johnson KA (1988) Microbiology of the rumen and intestine. In: *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*, D.C. Church Eds. pp.125-143.
- Zend 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. PhD Thesis, Université de Toulouse, France.

DISCUSSION GÉNÉRALE

La synthèse bibliographique présentée en début de manuscrit montre que l'implantation des microorganismes et l'apparition des produits de fermentation dans le rumen chez les jeunes ruminants (veaux et agneaux) débute dès les premières heures après la naissance. L'implantation des microorganismes chez l'agneau a été définie comme séquentielle et temporelle (Fonty et al., 1987), et est souvent basée sur la caractérisation de groupes fonctionnels, par exemple les bactéries cellulolytiques ou amylolytiques. D'autres études se sont intéressées à l'effet de facteurs de variation pouvant influencer l'implantation des microorganismes du rumen et leur activité chez le jeune ruminant, par exemple l'effet de l'alimentation au moment du sevrage et de l'apport de flores exogènes ou de levures. Ces études ont montré des effets sur les paramètres fermentaires (AGV, ammoniac) et/ou sur le microbiote ruminal (bactéries cellulolytiques et amylolytiques ou encore la communauté des archées) variables selon le facteur de variation appliqué chez le jeune ruminant (veau et agneau).

Notre travail avait un double objectif : le premier objectif était de caractériser la séquence taxonomique d'implantation des microorganismes du rumen (bactéries, archées et protozoaires) et la mise en place des paramètres fermentaires et des activités enzymatiques principales chez le veau en périodes pré- et post-sevrage. Le deuxième objectif était de définir quel était l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur la mise en place des paramètres définis auparavant en périodes pré- et post-sevrage chez le jeune veau de race laitière.

Dans les deux premières parties nous allons présenter la colonisation du rumen par le microbiote, la mise en place des fonctions ainsi que les relations entre les deux, chez les veaux en périodes pré- et post-sevrage. Dans la troisième partie, nous présenterons les effets de la supplémentation en levures vivantes sur le biotope et le microbiote ruminal. Enfin, dans la quatrième partie, nous présenterons les apports et les limites des techniques analytiques utilisées lors de nos travaux.

I. Implantation des microorganismes du rumen et acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau de la naissance au sevrage

L'expérimentation 1 (articles 1 à 3) a permis de mettre en évidence la mise en place des fonctions ruminales par l'étude des paramètres fermentaires et des activités enzymatiques dans le rumen, et l'implantation du microbiote ruminal chez le veau de race laitière de la

naissance (jour 1) au sevrage (jour 83). Le groupe témoin de l'expérimentation 2 en période pré-sevrage a permis de confirmer ou de discuter certains résultats observés lors de l'expérimentation 1 et peu décrits dans la littérature.

1. Entre 1 et 10 jours d'âge

Le jour de la naissance des veaux (jour 1), aucune extraction ou amplification d'ADN n'a pu être réalisée dans les échantillons de contenu ruminal prélevés. Ce résultat s'explique sans doute par une absence de microorganismes ou une quantité d'ADN trop faible pour être extraite ou détectée. Les paramètres physico-chimiques mesurés sur ces échantillons montraient un pH de 7,10 et un potentiel redox positif ($E_h = +224$ mV). De plus à la naissance, une absence d'AGV et d'activités xylanase et amylase dans le contenu ruminal a été observée. De même, à la naissance, nous n'avons observé aucune production *in vitro* de méthane par le contenu ruminal de veau, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'activité méthanogène, ce qui signifierait soit qu'il n'y a pas d'archées soit qu'elles ne sont pas actives. Seule une infime quantité d'ammoniac et de faibles activités protéolytique et uréolytique ont été mesurées. *In vitro*, la mesure des paramètres physico-chimiques sur du contenu ruminal de vaches laitières autoclavé et incubé avec un substrat, montre un pH neutre (7,10) et un E_h positif (+270 mV) quand il est dépourvu de toute activité microbienne, comme le confirme une concentration en AGV qui n'évolue pas dans le temps (Julien et al., 2010). Cette analogie entre nos observations sur le veau nouveau-né et ces caractéristiques de contenu ruminal autoclavé confirment qu'à la naissance, le microbiote ruminal est soit absent, soit non fonctionnel chez le veau, avec un environnement neutre et oxydatif contenant uniquement de la salive, du mucus, des cellules épithéliales desquamées, et quelques traces de substrats énergétiques utilisables (Jarrige et al., 1995).

Dès 2 jours d'âge (essai 1 articles 1, 2 et 3), sur nos veaux alimentés avec du colostrum, les communautés bactériennes et d'archées ont été détectées dans le contenu ruminal avec des densités respectives de $1,68 \times 10^{10}$ et $1,70 \times 10^5$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. Leurs densités augmentaient avec l'âge. Cette mise en place rapide du microbiote ruminal a été aussi observée chez le veau (Bryant et al., 1958) et l'agneau (Fonty et al., 1987). Dans notre étude, de 2 à 3 jours d'âge, la communauté bactérienne ruminale était composée majoritairement par les phyla : *Proteobacteria* (49% en abondance relative moyenne dans l'essai 1 et 24% dans l'essai 2), *Bacteroidetes* (29% dans

l'essai 1 et 54% dans l'essai 2), *Firmicutes* (15,9% dans l'essai 1 et 18% dans l'essai 2), *Actinobacteria* (5,5% dans l'essai 1 et 2% dans l'essai 2) et *Fusobacteria* (4,8% dans l'essai 1 et 0,7% dans l'essai 2). Les phyla *Fibrobacteres* et *Spirochaetes* n'étaient pas présents dans l'essai 1 à l'inverse de l'essai 2 pour lequel ils étaient représentés en faible proportion (0,2 et 0,3% respectivement). Ces phyla sont apparus à partir de 4 jours d'âge (essai 1 article 2), respectivement à 0,4 et 1% pour *Fibrobacteres* et *Spirochaetes*. Les différences d'abondance relative entre les 2 essais viennent corroborer l'effet d'une contamination différente du rumen au cours de la période colostrale, le colostrum maternel dans l'essai 2 pouvant avoir été contaminé par des bactéries hébergées par les mères, en particulier ces taxa.

Dès 4 jours d'âge (essai 1 article 2), la communauté bactérienne du rumen chez le veau était majoritairement composée par les genres *Bacteroides* (24%), *Prevotella* (13%), *Fusobacterium* (4%) et *Streptococcus* (4%). La densité bactérienne devenait stable dès 7 jours d'âge à $1,41 \times 10^{11}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais comme observé chez des animaux adultes (Fonty et al., 1995 ; Moon et al., 2010). A partir de 4 jours, la densité des archées était de $7,29 \times 10^3$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais, et la communauté des archées était majoritairement composée par *Methanobrevibacter* (83%), *Methanosphaera* (1,8%) et la famille *VadinCA11_gut_group* (7%) qui variaient fortement (essai 1 article 3) et atteignaient rapidement $7,65 \times 10^5$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais avant 10 jours d'âge. Cette implantation rapide des archées a été aussi observée dans d'autres études comme chez les agneaux avec une apparition de la communauté ruminale des archées dès le premier jour de vie à 10^4 méthanogènes g^{-1} de contenu ruminal (Fonty et al., 1987 ; Skillman et al., 2004). Comme dans notre étude, Skillman et al. (2004) ont observé que la communauté des archées du rumen est composée principalement par *Methanobrevibacter spp.*

Entre 2 et 4 jours d'âge dans notre étude (essai 1 article 1), il a été mis en évidence, l'apparition des activités xylanase et amylase dans le contenu ruminal à des niveaux faibles, ainsi que l'apparition d'AGV, principalement de l'acétate (résultats similaires lors de l'essai 2 article 4 avec la mesure de produits fermentaires dès 1 jour d'âge). Parallèlement, le E_h mesuré dans le contenu ruminal devenait fortement négatif (-164 mV) conduisant à un milieu ruminal fortement réducteur ce qui était directement relié à l'apparition d'un microbiote complexe capable de consommer l'oxygène du milieu. Les bactéries qui étaient présentes **dès 4 jours d'âge** possèderaient plusieurs activités enzymatiques et expliqueraient donc

l'augmentation **jusqu'à 10 jours d'âge** des activités xylanase, amylase, protéase et uréase mesurées *in vitro* (essai 1 article 1). Cette observation confirme les résultats observés dans d'autres études avec une augmentation des activités enzymatiques majeures dès la fin de la première semaine de vie des veaux (Kmet et al., 1986a ; Kmet et al., 1986b ; Sahoo et al., 2005). A cette période, aucune ingestion d'aliment solide n'était observée dans notre étude, et la seule source possible de substrats pouvait être une fraction du lait ingéré qui pourrait échapper à un passage direct dans l'omasum via la gouttière œsophagienne. Mais comme l'ont montré Wise et Anderson (1939) quand les animaux sont alimentés au seau, seule une petite quantité de lait arrive directement dans le rumen. Ainsi, la population bactérienne qui colonise de façon précoce le rumen a la capacité de dégrader les substrats présents et conduit à la formation de produits fermentaires comme l'ammoniac et les AGV dont les concentrations augmentaient dès 2 jours d'âge. Cette activité fermentaire engendrait une acidification du milieu ruminal et le maintien d'un E_h négatif. Les archées qui colonisent le rumen dès la naissance peuvent dès lors utiliser l'hydrogène produit par les bactéries du rumen au cours des fermentations pour produire du méthane (Wolin et al., 1997). Ceci est cohérent avec la détection de méthane, *in vitro* dès 5 jours d'âge (essai 1 article 3).

2. Entre 10 jours d'âge et le sevrage

Entre 10 et 15 jours d'âge (essai 1 articles 1 et 2), les veaux commençaient à ingérer de l'aliment concentré en granulé. Cette période correspondait à une forte évolution de l'écosystème ruminal. La composition bactérienne évoluait fortement avec des diminutions d'abondances relatives de la famille *Actinomycineae* et des genres *Bacteroides*, *Ruminococcaceae Incertae_Sedis*, *Oscillospira*, *Fusobacterium*, *Pelistega* et *Treponema* ainsi que des augmentations du genre *Prevotella*, du phylum *Proteobacteria* majoritairement composé par *Gammaproteobacteria unclassified* et de la famille *Coriobacterineae* qui deviennent majoritaires (41,8 ; 25,4 et 3,4%, respectivement). Les genres *Oribacterium*, *Syntrophococcus* et *Ruminococcaceae uncultured* augmentaient aussi, mais sans devenir majoritaires. La majorité des taxa qui composaient le phylum *Proteobacteria* avait des abondances relatives inférieures à 1%. Les bactéries qui évoluaient fortement à cette période, sont connues chez l'adulte pour comprendre des espèces qui possèdent un large panel d'activités enzymatiques (fibrolytiques, amylolytiques, protéolytiques...).

A la même période, la concentration en AGV totaux augmentait et engendrait un pH ruminal plus faible (5,82). En revanche les activités enzymatiques (xylanase, amylase et

protéase) mesurées *in vitro* diminuaient comme la concentration en ammoniac dans le rumen. L'évolution différentielle entre les paramètres fermentaires et les activités enzymatiques peut s'expliquer : i) par un effet de dilution lié à une augmentation du volume de liquide ruminal et ii) par l'augmentation de l'arrivée de substrats dans le rumen avec l'alimentation solide pour l'augmentation des fermentations (augmentation des concentrations en AGV). La même évolution des paramètres fermentaires du rumen a été observée chez des veaux au même âge avec la diminution du pH ruminal (Anderson et al., 1987).

Entre 15 et 30 jours d'âge (essai 1 articles 1, 2 et 3), le profil bactérien différait totalement de celui qui était observé avant 15 jours d'âge. En effet, une majorité des genres bactériens du phylum *Proteobacteria*, connus pour dégrader les glucides, disparaissaient ainsi que les genres *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Granilucotella*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Oscillibacter* et *Subdoligranulum*, non observés ou très faiblement chez les ruminants sevrés (Zened, 2011 ; Li et al., 2011). Les bactéries présentes dans le rumen permettent, par leurs activités enzymatiques, de dégrader les aliments solides arrivant dans le rumen car la consommation de concentré augmente rapidement vers 1 mois d'âge, tout comme la consommation de foin. *Prevotella*, qui était alors le genre prédominant, possède un potentiel enzymatique diversifié en fonction des espèces, majoritairement amylolytique et protéolytique, permettant probablement de dégrader une grande partie du concentré ingéré. Certains genres bactériens, connus pour des espèces fortement impliquées dans la dégradation des fibres, n'évoluaient pas avec l'âge et étaient présents depuis 2 jours d'âge, comme *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Butyrivibrio*, *Xylanibacter*. A la même période, la communauté des archées était composée majoritairement par *Methanobrevibacter* (92%) comme chez les animaux adultes (Whitford et al., 2001 ; Janssen et al., 2008 ; Zhou et al., 2009). L'abondance relative de *Methanobrevibacter* restait stable avec l'âge chez les veaux alors que l'ingestion d'aliments solides augmentait. La densité en archées se stabilisait dès 15 jours d'âge à $5,05 \times 10^6$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais ce qui est plus faible que chez l'agneau pour lequel la densité en archées est comprise entre 10^8 et 10^9 méthanogènes g^{-1} de contenu ruminal à 3 semaines d'âge (Skillman et al., 2004). D'autres études ont montré que la communauté d'archées, chez certains ruminants adultes, est plus complexe avec le genre *Methanomicrobium* comme dominant et la présence des genres *Methanimicrococcus* ou *Methanosphaera*, alors que *Methanobrevibacter spp.* n'était pas observé (Tajima et al., 2001 ; Shin et al., 2004b). De plus, aucun protozoaire cilié n'a été observé dans le rumen de nos veaux, comme observé par Bryant et al. (1958) avant 13 semaines d'âge chez des veaux. Ce

résultat est sans doute à mettre en relation avec le confinement des animaux de notre étude dans des box individuels sans contact direct avec des animaux adultes. Quand les animaux sont proches d'animaux adultes, la présence de protozoaires est observée chez des veaux de 6 semaines (Minato et al. (1992). Les protozoaires ciliés sont connus pour être en symbiose avec les archées (Changan et al., 1999 ; Morgavi et al., 2006 ; Ohene-Adjei et al., 2007). Ohene-Adjei et al. (2007) ont observé un lien entre certains genres d'archées et l'inoculation de certains protozoaires : par exemple: 1) l'inoculation avec les protozoaires *Entodinium* favorise les archées *uncultured*, ou 2) l'inoculation avec des protozoaires *Holotricha* conduit à l'émergence de *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanobrevibacter ruminantium*, et *Methanobacterium bryantii*. Ohene-Adjei et al. (2007) ont observé que le genre *Methanobrevibacter*, qui était prédominant dans notre étude, ne varie pas avec les différents protozoaires testés. Les autres espèces d'archées décrites par Ohene-Adjei et al. (2007) avaient une faible abondance ou n'ont pas été observées dans notre étude. Des études récentes montrent que dans le rumen chez des animaux adultes, un autre genre appartenant aux archées est abondant : le cluster C (appelé RCC, Tymensen et al., 2012). Ce genre n'a jamais été retrouvé dans le rumen des veaux de notre étude. En conséquence, l'absence de protozoaires ciliés dans notre étude pourrait au moins en partie expliquer les différences (densité et composition) de la communauté des archées entre les jeunes veaux et des animaux adultes.

De 1 mois d'âge jusqu'au sevrage (essai 1 articles 1 et 2), la communauté bactérienne était largement représentée par *Prevotella* (42%) et *Gammaproteobacteria unclassified* (25%). En parallèle, la concentration en AGV se stabilisait, comme les activités enzymatiques mesurées *in vitro* (xylanase, amylase et protéase). La stabilité des activités enzymatiques dans le temps était probablement une conséquence d'une régulation par les communautés bactériennes en fonction des substrats disponibles (Tamate et al., 1962) ou d'une dilution des enzymes par l'augmentation du volume ruminal liée à l'ingestion de foin. Ceci serait possible dans notre étude, car les veaux ingéraient une quantité de foin supérieure à 100 g/j à partir de un mois d'âge. Les produits de fermentation mesurés sont la résultante d'un équilibre entre leurs productions par les bactéries du rumen et l'absorption à travers la paroi ruminale dont la surface d'échange est liée au nombre et à la taille des papilles composant l'épithélium ruminal. La surface d'échange varie en fonction de l'ingestion de concentré et des concentrations en produits de fermentation (Tamate et al., 1962). Une augmentation du pH ruminal était observée dans notre expérimentation à partir de 40 jours d'âge et jusqu'au sevrage. Ce phénomène était accompagné d'une ingestion croissante de

foin, entraînant probablement une production accrue de salive dont les substances tampon pourraient expliquer l'augmentation du pH.

3. Comparaison des données issues de l'essai 1 avec les données sur animaux témoins en période pré-sevrage dans l'essai 2

Le jour de la naissance des veaux (jour 1), les paramètres physico-chimiques mesurés dans le contenu ruminal montraient un pH de 7,10 et un potentiel redox positif (+ 224 mV) pour l'essai 1. Lors de l'expérimentation 2, les animaux témoins à la naissance présentent un pH de 7,01 et un potentiel redox de +196 mV. Ces résultats sont cohérents entre les 2 essais et confirment la neutralité du contenu ruminal chez les veaux à la naissance.

Dès 2 jours d'âge, lors de l'essai 1, les veaux étaient alimentés avec un pool de colostrum congelé et les communautés bactériennes et d'archées étaient détectées dans le contenu ruminal avec des densités respectives de $1,68 \times 10^{10}$ et $1,70 \times 10^5$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais, puis ces densités augmentaient avec l'âge. La même observation a été faite lors de l'essai 2 (article 5) mais les densités bactériennes ($1,8 \cdot 10^{11}$) et d'archées ($2,35 \cdot 10^9$) étaient plus élevées. Cette différence de quantité de micro-organismes dans le rumen peut s'expliquer par une plus grande contamination de celui-ci lors de l'essai 2. En effet, lors de l'essai 2, les veaux recevaient du colostrum frais de leur mère le jour de la naissance, à l'inverse de l'essai 1 où le colostrum avait été congelé. La congélation du colostrum et sa conservation entraînerait une disparition au moins partielle des micro-organismes présents et donc une teneur plus faible que celle du colostrum non congelé. Ainsi le colostrum maternel sans congélation, utilisé lors de l'essai 2, pourrait avoir conduit à une contamination plus importante du rumen.

Entre 2 jours d'âge et le sevrage, les résultats de l'essai 2 confirment les évolutions des paramètres du biotope et du microbiote ruminal observés lors de l'essai 1 avec la même stabilisation de ces paramètres à partir de 1 mois d'âge. De même lors de l'essai 2, aucun protozoaire cilié n'a été détecté dans les échantillons de contenu ruminal des veaux en période pré-sevrage, comme lors de l'essai 1.

Par contre des différences existent entre les 2 essais au niveau des valeurs des certains paramètres étudiées.

Au niveau du biotope :

- les activités enzymatiques (xylanases, amylases et protéases) ont été supérieures lors de l'essai 2 par rapport à l'essai 1 ;

- la concentration en ammoniac a diminué après 10 jours d'âge pour arriver au moment du sevrage à une valeur comprise entre 60 et 70 mg/L pour l'essai 2 alors qu'elle était de l'ordre de 50 mg/L pour l'essai 1

- la concentration en AGV totaux elle était plus faible entre 1 mois d'âge et le sevrage lors de l'essai 2 (environ 50 mM) que lors de l'essai 1 (environ 80 mM)

Au niveau du microbiote :

- la densité de la communauté des archées qui à 2 jours d'âge était de 10^9 , augmentait jusqu'à 20 jours d'âge pour se stabiliser à 10^{10} copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais lors de l'essai 2. Ces valeurs étaient largement supérieures à la densité mesurée sur la même période lors de l'essai 1 (10^5 à 10^6 copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais).

- la densité de la communauté bactérienne qui à 2 jours d'âge était de 10^{11} , augmentait jusqu'à 20 jours d'âge à 10^{13} , puis diminuait rapidement et se stabilisait à 10^{11} copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais lors de l'essai, c'est-à-dire beaucoup plus que sur la même période lors de l'essai 1 (10^{10} à 10^{11} copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais).

- la composition bactérienne des taxa majoritaires semblait aussi différente. En effet, dans l'essai 2, genre *Prevotella* était plus abondant que dans l'essai 1 dès 2 jours d'âge alors que *Bacteroides* l'était moins. Il semble aussi que la composition bactérienne du rumen se soit stabilisée plus rapidement lors de l'essai 2 (vers 18 jours) que lors de l'essai 1 (1 mois d'âge). Les différences observées entre les essais 1 et 2 n'étaient pas liées à l'ingestion d'aliments solides car les courbes d'ingestion étaient identiques. Par contre la contamination initiale par le colostrum frais à la naissance lors de l'essai 2 pourrait justifier les différences. Une autre différence entre les essais résidait dans la composition du concentré, plus riche en protéines et fibres mais moins riche en amidon dans l'essai 2 que dans l'essai 1, ce qui pourrait avoir contribué aux différences observées entre les 2 essais. La contamination du rumen les premiers jours de vie de l'animal dépend de son environnement extérieur et des liens qu'il peut avoir avec d'autres animaux (Fonty et al., 1987). Ensuite, la maturation du microbiote ruminal et du biotope dépend à la fois des aliments ingérés et de l'environnement extérieur, comme observé dans d'autres études (Fonty et al., 1987 ; Li et al., 2011).

La mise en place de l'écosystème ruminal chez le veau de race laitière avant le sevrage montre ainsi une stabilisation à partir de 1 mois d'âge et ce dans nos deux essais. De la naissance à 1 mois d'âge par contre il a été observé de forts changements à la fois du microbiote et du biotope, liés à la contamination au moment de la naissance, à l'environnement immédiat de l'animal et à l'aliment qu'il reçoit par la suite. Il semble que la mise en place du microbiote ruminal soit une succession écologique des espèces qui peuvent s'implanter et le coloniser et que ces populations représentent un sous ensemble de méta-communautés pouvant s'implanter comme le montrent Curtis et Sloan (2004). Ces communautés qui peuvent s'implanter peuvent différer d'un animal à un autre car l'implantation primaire du système digestif serait un échantillon aléatoire de la méta-communauté de l'environnement immédiat de l'animal. Cette mise en place variable entre individus a déjà été observée chez le lapereau jusqu'à 49 jours d'âge, période de stabilisation (Combes et al., 2011). Il semblerait donc que la mise en place à la naissance de l'écosystème digestif des jeunes mammifères connaisse une part de hasard et par la suite, tende à se rapprocher entre les individus suite à l'arrivée de l'aliment solide et la sélection des communautés au sein du système digestif.

Au vu de ces résultats, on peut donc conclure que, chez le veau, la colonisation du rumen se fait dès la naissance et évolue pendant les 15 premiers jours de la vie de l'animal. Entre 15 jours et le sevrage, avec l'ingestion d'aliments solides, la composition du microbiote ruminal évolue vers un écosystème proche de celui observé chez des ruminants adultes mais sans atteindre les mêmes densités et abondances relatives. La synthèse des résultats sur l'implantation du microbiote et la mise en place des fonctions fermentaires du rumen chez le veau de la naissance au sevrage est présentée dans la figure 19.

Alimentation		Âge des veau						
		Naissance	2 à 3 jours	4 à 10 jours	10 à 15 jours	15 jours à 1 mois	1 mois au sevrage	
Microbiote	Bactéries	Pas d'ADN extrait	Densité (10 ¹⁰)	Densité (10 ¹¹)				
			Composé par: Majoritairement <i>Proteobacteria</i> , <i>Bacteroidetes</i> et <i>Firmicutes</i> Minoritairement <i>Actinobacteria</i> <i>Fusobacteria</i> <i>Fibrobacter</i> <i>Spirochaetes</i>	Composé par: Majoritairement <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Fusobacterium</i> et <i>Streptococcus</i> Minoritairement <i>Ruminococcus</i> <i>Fibrobacter</i> <i>Butyrivibrio</i> <i>Xylanibacter</i>	Composé par: Majoritairement <i>Prevotella</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>unclassified</i> <i>Coriobacterineae</i> Minoritairement <i>Proteobacteria</i> <i>Ruminococcaceae</i> <i>unclassified</i> <i>Syntrophococcus</i>	Composé par: Majoritairement <i>Prevotella</i> Disparition De nombreux <i>Proteobacteria</i> Taxa qui n'évoluent pas <i>Ruminococcus</i> <i>Fibrobacter</i> <i>Butyrivibrio</i> <i>Xylanibacter</i>	Composé par: Majoritairement <i>Prevotella</i> <i>Gammaproteobacteria</i> <i>unclassified</i> Taxa qui n'évoluent pas <i>Ruminococcus</i> <i>Fibrobacter</i> <i>Butyrivibrio</i> <i>Xylanibacter</i>	
			Densité (10 ⁵)	Densité (10 ³ -> 10 ⁵) forte variabilité individuelle		Densité (10 ⁶)		
	Archées	Composé majoritairement par: <i>Methanobrevibacter</i>	Composé par: <i>Methanobrevibacter</i> (83%) <i>Methanosphaera</i> (2%, très variable) <i>VadinCA11_gut_group</i> (7%)		Composé majoritairement par: <i>Methanobrevibacter</i> (92%) et <i>Methanosphaera</i> et <i>VadinCA11_gut_group</i> (en moindre abondance)			
	Protozoaires ciliés	Aucun						
Biotope	AGV	Non détecté	Détection presque uniquement de l'acétate	Augmentation dont l'acétate (de 12 à 43 mM)			Stable	
	Ammoniac	Faible	Faible (60 g/L)	Augmentation à 180 g/L	Diminution à 58 g/L	Stable		
	Xylanase	Non détecté	Détection	Augmentation	Diminution	Stable		
	Amylase	Non détecté	Détection	Augmentation	Diminution	Stable		
	Protéase	Faible	Faible	Augmentation	Diminution	Stable		
	pH	7,10		Diminution à 5,82	Augmentation à 6,34			Stable
	E _h	+224 mV	-164 mV	Stable entre - 150 et - 200 mV				

Figure 19 : Synthèse des résultats sur l'implantation des microorganismes du rumen et l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau de la naissance au sevrage.

II. Maturation du microbiote du rumen et des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période post-sevrage jusqu'à 4 mois d'âge (sevrage à 2 mois)

L'expérimentation 2 (articles 4 et 5) en période post-sevrage (veaux du groupe témoin) a permis de mettre en évidence la colonisation du rumen par le microbiote ainsi que la mise en place des paramètres fermentaires et des activités enzymatiques chez le veau de race laitière en période post-sevrage et jusqu'à 4 mois d'âge (avec un sevrage à 2 mois).

1. De 60 à 90 jours

A cette période, les veaux n'ingéraient que du concentré en grande quantité, ainsi que du foin et aucun protozoaire cilié n'était observé dans le rumen. La densité bactérienne du rumen à 60 jours, était de $2,95 \times 10^{12}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. La densité bactérienne augmentait entre 60 et 80 jours d'âge pour atteindre $1,64 \times 10^{13}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais et diminuait ensuite jusqu'à 90 jours pour atteindre $6,44 \times 10^{12}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. A partir du sevrage la communauté bactérienne du rumen était composée par les phyla *Bacteroidetes* (53,71%), *Proteobacteria* (24,90%), *Firmicutes* (17%), *Actinobacteria* (3,09%), *Fibrobacteres* (1,03%) et *Spirochaetes* (0,27%). Le phylum *Fusobacteria* composé par *Fusobacterium* n'était plus observé. Entre 60 et 70 jours d'âge, *Gammaproteobacteria unclassified* (21,99%), *Ruminococcaceae uncultured* (1,73%) et *Coriobacterineae* (1,12%) étaient majoritaires. *Gammaproteobacteria unclassified* diminuait ensuite dès 70 jours pour atteindre 6,54% alors que *Ruminococcaceae uncultured* et *Coriobacterineae* augmentaient entre 70 et 80 jours d'âge (4,06% et 3,67%, respectivement). Les taxa *Prevotellaceae unclassified*, *Dialister* et *Syntrophococcus* étaient aussi majoritairement présents entre 60 et 80 jours (2,44%, 2,02% et 1,09% respectivement). Une grande partie de ces taxa étant *uncultured* ou *unclassified*, leurs identités et leurs fonctions sont donc inconnues.

Au moment du sevrage, la densité en archées dans le rumen était de $8,62 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. Cette densité diminuait pour atteindre $1,78 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais à 80 jours d'âge puis augmentait pour atteindre $2,18 \times 10^{11}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais à 90 jours d'âge. La densité ruminale en archées chez le veau dans notre étude était supérieure à celle observée chez des bouvillons nourris avec un régime à base de fourrage ($1,34 \times 10^9$ cellules ml^{-1}) par Denman et al. (2007) et à celle observée chez des vaches tarées alimentées

avec un régime riche en céréales (10^6 archées g^{-1} de contenu ruminal ; Hook et Steel, 2011). Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence des protozoaires ciliés chez les animaux adultes, qui affectent le nombre d'archées dans le rumen des adultes, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Les évolutions de densités des bactéries et des archées liées à l'âge après le sevrage sont en sens inverse : quand les bactéries augmentent, les archées diminuent et inversement. L'évolution des archées dans le rumen après le sevrage doit dépendre des substrats dont ils ont besoin pour se développer et qui proviennent de la dégradation des aliments par le métabolisme bactérien. Nos données ne permettent pas d'expliquer les évolutions inverses de ces deux communautés.

Parallèlement, les activités protéolytique et amylolytique, ainsi que la concentration en ammoniac ruminal, variaient peu. Ces observations étaient probablement liées à la stabilité après le sevrage des populations bactériennes protéolytique et amylolytique comme *Prevotella*, et *Streptococcus* et des bactéries protéolytique, peptidolytique et cellulolytique comme *Butyrivibrio* par exemple. De même, la valeur du E_h restait similaire en périodes pré- et post-sevrage, et variait entre -150 et -200 mV, valeurs similaires à celles observées chez des vaches taries (Julien et al., 2010b ; Monteils et al., 2011) et des vaches en lactation (Marden et al., 2008). Entre 60 et 90 jours, la proportion d'acétate augmentait alors que les proportions de propionate, butyrate et valérate diminuaient. Cette évolution est concordante avec l'augmentation de l'activité des xylanases qui a été observée sur cette période et qui était probablement liée à l'augmentation des bactéries cellulolytiques et hémicellulolytiques comme par exemple *Eubacterium* et *Ruminococcaceae uncultured*, surtout entre 70 et 80 jours. Une diminution temporaire du pH (de 6,9 à 6,5) entre 60 et 63 jours d'âge était observée, le pH avait une valeur élevée et du coup cette diminution de pH ne révèle pas d'anomalie du type acidose mais pourrait être le reflet de l'augmentation de l'ingestion de concentré et la légère diminution de l'ingestion de foin entre 60 et 63 jours. Après 63 jours, le pH ruminal augmentait rapidement. L'ingestion croissante de foin à cette période et la probable augmentation de production de salive associée expliquent probablement une stabilisation rapide du pH autour de 7.

2. De 90 à 120 jours

A partir de 90 jours, la densité bactérienne était stable, avec une valeur de $3,53 \times 10^{12}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais observée à 120 jours d'âge. La communauté bactérienne était composée majoritairement par *Prevotella* (55,33%) et

Lachnospiraceae unclassified (4,14%) dont l'abondance ne variait pas depuis le sevrage. A partir de 90 jours d'âge, les autres taxa bactériens majoritaires étaient : *BS.11 unclassified*, *Prevotellaceae unclassified*, *Prevotellaceae uncultured*, *Xylanibacter*, *RC9*, *Fibrobacteraceae uncultured*, *Ruminococcus*, *Ruminococcaceae uncultured* et *Gammaproteobacteria unclassified* avec des abondances relatives comprises entre 6,54 et 1,41%.

La présence d'une forte abondance des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* est concordante avec les observations de Stewart et al. (1997) et Kim et al. (2011) chez des ruminants adultes. Le genre *Prevotella* est prédominant chez des animaux sevrés (Pitta et al., 2010). Ce genre est identifié comme ayant un grand rôle (xylodestrinolytique, pectinolytique, protéolytique, peptolytique) dans le métabolisme ruminal (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007 ; Turnbaugh et al., 2008). Le phylum *Fibrobacteres* regroupe des espèces majoritairement cellulolytiques, et était faiblement représenté dans notre étude. Ce phylum est plus abondant dans la phase solide du rumen que dans la phase liquide chez des moutons alimentés au foin (Michalet-Doreau et al., 2001). L'utilisation de contenu ruminal filtré mais aussi l'heure de prélèvement dans notre étude pourrait expliquer cette abondance faible. Néanmoins ce phylum a également été observé en faible proportion chez des bouillons adultes en pâturage dans la phase ruminale totale (Pitta et al., 2010). Une comparaison de la composition bactérienne du rumen chez le veau après le sevrage dans notre étude avec des animaux adultes est présentée dans le tableau 9. Les principaux phyla observés chez le veau et l'adulte sont les mêmes. Ces phyla ainsi que les genres bactériens qui les composent diffèrent néanmoins par leurs abondances relatives. Une proximité taxonomique plus importante apparaît entre les valeurs observées dans notre étude et celles observées chez les taurillons de 12 mois alimentés avec du foin (Li et al., 2011). Elle pourrait être expliquée par des animaux aux stades physiologiques plus proches et aux types de rations utilisées également plus proches.

Taxa bactériens du rumen	Abondances relatives moyennes (%)			
	Notre étude ¹	Li et al., 2011 ²	Callaway et al., 2010 ³	Zened, 2011 ⁴
Bacteroidetes	60	52,0	38,9	47,3
<i>Prevotella</i>	55,3	25,0	18,2	11,3
<i>Prevotellaceae unclassified</i>	3,8	NS	NS	3,5
<i>Xylanibacter</i>	1,3	NS	NS	1,0
Proteobacteria	24,9	Faible abondance	NS	Faible abondance
<i>Gammaproteobacteria unclassified</i>	7,0	NS	NS	2,9
<i>Succinivibrio</i>	1,1	NS	11,8	0,3
Firmicutes	17,0	43,0	28,4	48,3
<i>Lachnospiraceae unclassified</i>	4,1	NS	NS	11,9
<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	2,6	NS	NS	2,0
<i>Ruminococcus</i>	1,3	3,6	0,9	0,6
Actinobacteria	3,1	Faible abondance	NS	Faible abondance
<i>Coriobacterineae</i>	2,0	NS	NS	NS
<i>Bifidobacteriaceae</i>	1,5	NS	NS	3,9
Fibrobacteres	1,0	1,9	NS	0,3
Spirochaetes	0,3	2,3	0,9	0,2

NS : Non spécifiés

¹ veaux à 4 mois d'âge (essai 2 article 5)

² taurillons de 12 mois alimentés au foin

³ vaches et des bouvillons nourris avec une ration d'engraissement riche en concentrés

⁴ vaches tarées alimentées avec une ration riche en fourrage

Tableau 9 : Comparaison des taxa majoritairement représentés dans le rumen chez le veau après sevrage (notre étude) et chez des bovins adultes (Li et al., 2011 ; Callaway et al., 2010 ; Zened, 2011).

A partir de 90 jours, chez des veaux en box commun à proximité d'animaux adultes, la colonisation du rumen par des protozoaires ciliés a été observée dans notre étude avec majoritairement des petits entodiniomorphes ($<100\mu\text{m}$, 10^3 - 10^4 protozoaires ml^{-1} de contenu ruminal frais) comme rapporté par Bryant et al. (1958) chez des veaux au même âge. La présence à côté des jeunes animaux des mères ou d'animaux adultes engendre une colonisation plus précoce (à partir de 2 semaines de vie) chez l'agneau (Fonty et al 1987). Dès 120 jours, la communauté de protozoaires atteint 10^5 - 10^6 ml^{-1} de contenu ruminal frais comme observé chez le ruminant adulte (McAllister et Chang, 1996 ; Williams et Coleman, 1997). A cette période, la densité de la communauté d'archées dans le rumen se stabilisait et atteignait $7,93 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. La stabilisation de la communauté des archées peut être reliée à la stabilisation des protozoaires ciliés puisque ces deux communautés sont en symbiose (Changan et al., 1999 ; Morgavi et al., 2006 ; Ohene-Adjei et al., 2007).

A la même période, le pH et le E_h étaient stables tout comme les activités enzymatiques (protéase, amylolyase et xylanase) et les paramètres fermentaires (AGV et ammoniac). Cette stabilité des paramètres fermentaires et des activités enzymatiques est certainement à relier à la faible évolution de la composition de la communauté bactérienne également sur cette période.

L'apparition des protozoaires ciliés dans le rumen des veaux participe sans doute à l'augmentation légère de l'activité xylanolytique mesurée *in vitro* entre 90 et 120 jours d'âge car ils participent activement au métabolisme glucidique dans le rumen, dont la dégradation des hémicelluloses (Jouany et Ushida, 1998). La légère augmentation de la concentration en AGV totaux observée pourrait être le résultat de leur activité avec une proportion d'acétate qui restait élevée (60-70%) et une proportion de butyrate qui augmentait de 5 à 8%. L'augmentation du butyrate est cohérente avec les observations de Jouany et Senaud (1982), qui ont montré que la proportion de butyrate augmente en présence de protozoaires, quelle que soit la ration chez des moutons. Par contre les proportions d'acétate (entre 56 et 73%) et de propionate (entre 18 et 35%) varient en fonction à la fois de l'alimentation et de la présence des protozoaires (Jouany et Senaud, 1982).

Après le sevrage, des changements sont observés au niveau de certains paramètres fermentaires comme les AGV, sans doute en raison d'une nouvelle évolution du microbiote, plus spécifique et plus adapté à la dégradation d'aliments solides.

L'apparition à partir de 90 jours des protozoaires ciliés dans le rumen semble conditionnée par la présence d'animaux adultes à proximité. A 4 mois d'âge, l'écosystème ruminal tend à devenir proche de celui observé chez les animaux adultes en termes d'activité fermentaire, de produits de dégradation des aliments et de composition taxonomique du microbiote. Néanmoins les proportions des communautés bactériennes diffèrent encore de celles observées chez l'adulte. Le sevrage, même relativement précoce (60 jours), est un changement alimentaire mais n'est pas un stress à proprement parler car il n'affecte quasiment pas les paramètres fonctionnels du rumen, probablement parce que l'augmentation de consommation d'aliments solides est progressive. La synthèse des résultats sur l'implantation du microbiote et la mise en place des fonctions fermentaires du rumen chez le veau en période post-sevrage (sevrage à 60 jours d'âge) est présentée dans la figure 20.

Âge des veau		Sevrage (60 jours) → 70 jours → 90 jours → 120 jours			
Alimentation		Concentré + foin		Concentré + foin à volonté	
Microbiote	Bactéries	Densité (10¹²)		Densité (10¹³)	
		Phyla: Bacteroidetes (54%), Proteobacteria (25%), Firmicutes (17%), Actinobacteria (3%), Fibrobacteres(1%), Spirochaetes (0,3%)			
		Majoritaires: <i>Prevotella</i> (47%) <i>Gammaproteobacteria unclassified</i> (22%) <i>Ruminococcaceae uncultured</i> (2%) <i>Coriobacterineae</i> (1%)		Majoritaires: <i>Prevotella</i> (55%) <i>Gammaproteobacteria unclassified</i> (7%) <i>Ruminococcaceae uncultured</i> (4%) <i>Coriobacterineae</i> (4%) <i>Prevotellaceae unclassified</i> (2%) <i>Dialister</i> (2%) <i>Syntrophococcus</i> (1%)	
		Bactéries protéolytique, amylolytiques, cellulolytiques majoritairement		Bactéries protéolytique, amylolytiques, cellulolytiques majoritairement	
	Archées	Densité qui varie en moyenne autour de 10¹⁰		Densité stable à 10¹¹	
	Protozoaires ciliés	Aucun		Petits Entodiniomorphes (10⁵-10⁶)	
Biotope	AGV	Augmentation proportion d'acétate (de 55 à 65%) Diminution des proportions propionate (de 35 à 25%), butyrate (de 8 à 5%) et valérate (4 à 2%)		Stabilité	
	Ammoniac	Stabilité			
	Xylanase	Augmentation		Stabilité	
	Amylase	Stabilité			
	Protéase	Stabilité			
	pH	Légère diminution de 6,9 à 6,5	Augmentation et Stabilisation à 7		
E_h	Stabilisation autour de - 150 et - 200 mV				

Figure 20 : Synthèse des résultats sur l'implantation des microorganismes du rumen et l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période post-sevrage (sevrage à 60 jours).

III. Etude de l'influence de la supplémentation en levures vivantes sur le microbiote et les fonctions de digestion ruminale chez le veau de la naissance au sevrage (2 mois) et en période post-sevrage (jusqu'à 4 mois d'âge)

L'un des objectifs de l'expérimentation 2 (articles 4 et 5) était d'évaluer l'effet de l'addition de levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*) sur l'implantation du microbiote ruminal et la mise en place des fonctions de digestion chez le veau de race laitière en périodes pré- et post-sevrage.

1. Effet de la supplémentation en levures vivantes en période pré-sevrage

En période pré-sevrage, l'addition de levures augmentait l'ingestion de concentrés par les veaux sans modifier l'ingestion de foin, comme précédemment observé par Leismester et al. (2004).

La densité bactérienne du rumen, **à partir de 2 jours d'âge et jusqu'au sevrage**, évoluait avec l'âge comme décrit précédemment mais n'était pas affectée par l'addition de levures. Ce résultat confirme celui de Chaucheyras-Durand et Fonty (2001). La diversité bactérienne (indices ACE, Chao et Shannon) évoluait également avec l'âge sans être affectée par l'addition de levures. Par contre un effet des levures a été observé sur certains taxa qui composent les phyla précédemment décrits. Ainsi, l'addition de levures chez le jeune pré-ruminant augmentait les abondances relatives de *BS.11 unclassified*, *Enterococcus*, *Acetitomaculum*, *Faecalibacterium*, *Gallibacterium* et *Pseudomonas* (qui comprend majoritairement des bactéries acétogènes, ou qui dégradent le glucose, tableau 10). Inversement, les taxa bactériens *Lachnospira* et *Campylobacter* étaient plus faiblement observés lors de la supplémentation en levures (tableau 10). Ces genres bactériens sont principalement connus pour regrouper des espèces acétogènes et pectinolytiques (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Pour quelques taxa, il existerait une interaction entre l'âge des veaux et la supplémentation en levures (tableau 10). En effet, chez les veaux supplémentés en levures, certains taxa étaient plus abondants avant 7 ou 18 jours d'âge comme *Comamonaceae unclassified*, *Actinobacillus*, *Syntrophococcus* et *Comamonas*. Certaines de ces bactéries sont connues pour regrouper des espèces majoritairement acétogènes et qui fermentent le glucose. La levure influencerait, en période d'alimentation lactée, une communauté bactérienne capable de dégrader les substrats provenant du lait. En revanche, *Eubacterium* (bactéries connues pour regrouper des espèces cellulolytiques,

hémicellulolytiques et amylolytiques) était moins abondant dans le groupe levures que dans le groupe témoin avant 22 jours d'âge pour devenir similaire entre les groupes ensuite (tableau 10). Avant 22 jours d'âge, la quantité de foin ingéré par les veaux était infime, la diminution de bactéries cellulolytiques et l'augmentation de bactéries acétogènes et dégradant le glucose chez les veaux supplémentés en levures, suggèrerait une sélection des genres bactériens face aux substrats présents. Par contre l'addition de levures n'avait aucun effet sur les taxa majoritairement observés lors de la colonisation du rumen comme *Bacteroides* (genre bactérien connu pour regrouper des espèces cellulolytiques), *Prevotella* (genre bactérien connu pour regrouper des espèces cellulolytiques hémicellulolytiques, amylolytiques et protéolytiques) et *Streptococcus* (genre bactérien connu pour regrouper des espèces cellulolytiques pectinolytiques, amylolytiques et protéolytiques) par exemple.

Taxa bactériens	Age (en jours)						
	2	7	12	18	22	40	
<i>Prevotella</i>	6%	27%	47%				Taxa bactériens majoritaires non affectés par la supplémentation en levures
<i>Gammaproteobacteria unclassified</i>	22%	7%					
<i>Bacteroides</i>	6%	2%					
<i>Pasteurellaceae unclassified</i>	19%	1%					
<i>Prevotellaceae unclassified</i>	1%	6%	3%				
<i>Succinivibrio</i>	1%	7%	2%				
<i>Lachnospiraceae unclassified</i>	1%	4%	3%				
<i>Bacteroidales unclassified</i>	0,3%	3%	2%				
<i>Mannheimia</i>	10%	0,1%					
<i>Porphyromonas</i>	1%	3%	0,1%				
<i>Streptococcus</i>	7%	1%					
<i>Dialister</i>		1%					
<i>Ruminococcaceae uncultured</i>		1%					
<i>Pseudomonas</i>		4,5 vs. 1,9%					Taxa bactériens affectés par la supplémentation en levures (veau du groupe levures vs. veau du groupe témoin)
<i>Gallibacterium</i>		1,3 vs. 0,2%					
<i>Campylobacter</i>		0,1 vs. 0,2%					
<i>Faecalibacterium</i>		0,2 vs. 0,03%					
<i>Lachnospira</i>		0,04 vs. 0,1%					
<i>Acetitomaculum</i>		0,2 vs. 0,08%					
<i>Enterococcus</i>		0,4 vs. 0,07%					
<i>BS.11 unclassified</i>		0,8 vs. 0,1%					
<i>Eubacterium</i>		-	=				Taxa bactériens affectés par une interaction entre l'âge et la supplémentation en levure (en rouge : au sein du groupe levures + : plus abondant - : moins abondant) = : abondance identique entre les groupes
<i>Syntrophococcus</i>		+	=				
<i>Comamonas</i>		+	=				
<i>Comamonadeceae unclassified</i>	+	=					
<i>Actinobacillus</i>	+	=					

Tableau 10 : Synthèse des taxa bactériens majoritaires et des taxa bactériens affectés par la supplémentation en levures en fonction de l'âge des veaux en période pré-sevrage.

La densité des archées dans le rumen évoluait avec l'âge des veaux avant le sevrage et était stimulée par l'addition de levures. En effet la densité en archées était de $3,44 \times 10^{11}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais **dès 2 jours d'âge** avec apport de levures alors qu'elle était de $2,35 \times 10^9$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais sans apport de levures. Cette densité augmentait **jusqu'à 18 jours d'âge** pour se stabiliser à $7,60 \times 10^{12}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais avec un apport de levures et $5,49 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais sans apport de levures. Parallèlement, **dès 22 jours d'âge**, la présence de protozoaires ciliés (entre $1,22 \times 10^1$ et $6,22 \times 10^1$ protozoaires g^{-1} de contenu ruminal frais) était observée précocement chez les veaux recevant des levures alors que chez les veaux témoins aucun protozoaire n'était observé sur toute la période pré-sevrage. Ce résultat confirme l'observation de Chaucheyras-Durand et Fonty (2002) d'une colonisation précoce des protozoaires ciliés avec l'addition de levures chez des agneaux. La présence de protozoaires ciliés plus précocement avec la supplémentation en levures permet de supposer que l'environnement ruminal est plus favorable à leur implantation et pourrait aussi expliquer la forte densité d'archées observées chez ces mêmes animaux puisque ces 2 communautés sont connues pour être fortement associées (Changan et al., 1999).

Dans le rumen des veaux recevant des levures, il était mesuré une plus forte proportion d'acétate et de moindres proportions de propionate et de valérate ce qui serait concordant avec une meilleure efficacité des bactéries pectinolytiques, cellulolytiques ou acétogènes. Néanmoins la diminution du genre bactérien *Lachnospira* (bactérie qui regroupe des espèces connues pour être pectinolytiques, Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007) était sans doute compensée par les activités des autres types bactériens acétogènes et qui fermentent le glucose. Le pH, le E_h et la concentration en ammoniac du rumen n'étaient pas affectés par l'addition de levures, de même que les activités xylanasiq ue et amylasiq ue. Des études chez des animaux adultes ont aussi observé l'absence d'effet d'une supplémentation en levures sur le pH ruminal et sur la concentration en ammoniac (Fondevila et al., 1990 ; Varel et Kreikemeier, 1994). A l'inverse d'autres études chez des animaux adultes ont montré une augmentation du pH ruminal lors de supplémentation en levures (Fems et al., 1993 ; Newbold et al., 1996 ; Koul et al., 1998 ; Fonty et Durand-Chaucheyras, 2006) et une diminution de la concentration du rumen en ammoniac (Erasmus et al., 1992 ; Arcos-Garcia et al., 2000). Lorsque la ration est constituée principalement de fibres, les levures probiotiques semblent n'avoir aucun effet sur le pH (Plata et al., 1994). La diminution de la concentration en

ammoniac est attribuée à une utilisation plus importante par les micro-organismes du rumen pour la synthèse de protéines microbiennes et/ou à la diminution de l'activité protéolytique des bactéries. Dans notre étude, l'absence d'effet des levures sur ces paramètres (pH, E_h et la concentration en ammoniac) est à relier à l'absence de modification d'abondance des bactéries majoritaires. Un apport de levures a été montré comme stimulant la prolifération et l'activité des bactéries cellulolytiques entre 20 et 50 jours d'âge chez des agneaux (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2001). La plus faible ingestion de concentrés lors de l'addition de levures pourrait avoir entraîné la diminution de l'activité protéolytique. La régulation des activités enzymatiques des bactéries pourrait avoir lieu sans affecter la balance bactérienne puisque les bactéries majoritaires ont plusieurs fonctions enzymatiques et qu'elles peuvent donc réguler leurs potentiels enzymatiques en fonction des substrats présents. Ces changements sont fortement liés aux substrats fournis par le régime alimentaire de l'animal en période pré-sevrage.

En résumé, au cours de la période de pré-sevrage, une supplémentation en levures (*Saccharomyces cerevisiae*) engendre une ingestion moindre de concentrés chez le veau. Cette supplémentation conduit à une apparition plus précoce de la communauté des protozoaires, une plus grande densité en archées, mais n'a pas d'incidence sur la densité et la diversité de la communauté bactérienne, à l'exception de variations d'abondances de quelques taxa quantitativement mineurs dans le rumen. L'apport de levures entraîne une diminution de la protéolyse, une augmentation de la proportion d'acétate ruminal et une diminution de la proportion de propionate. La synthèse de l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur l'implantation du microbiote et la mise en place des fonctions fermentaires du rumen chez le veau en période pré-sevrage (sevrage à 60 jours) est présentée dans la figure 21.

Effet de la supplémentation en levures vivantes en période **pré-sevrage**

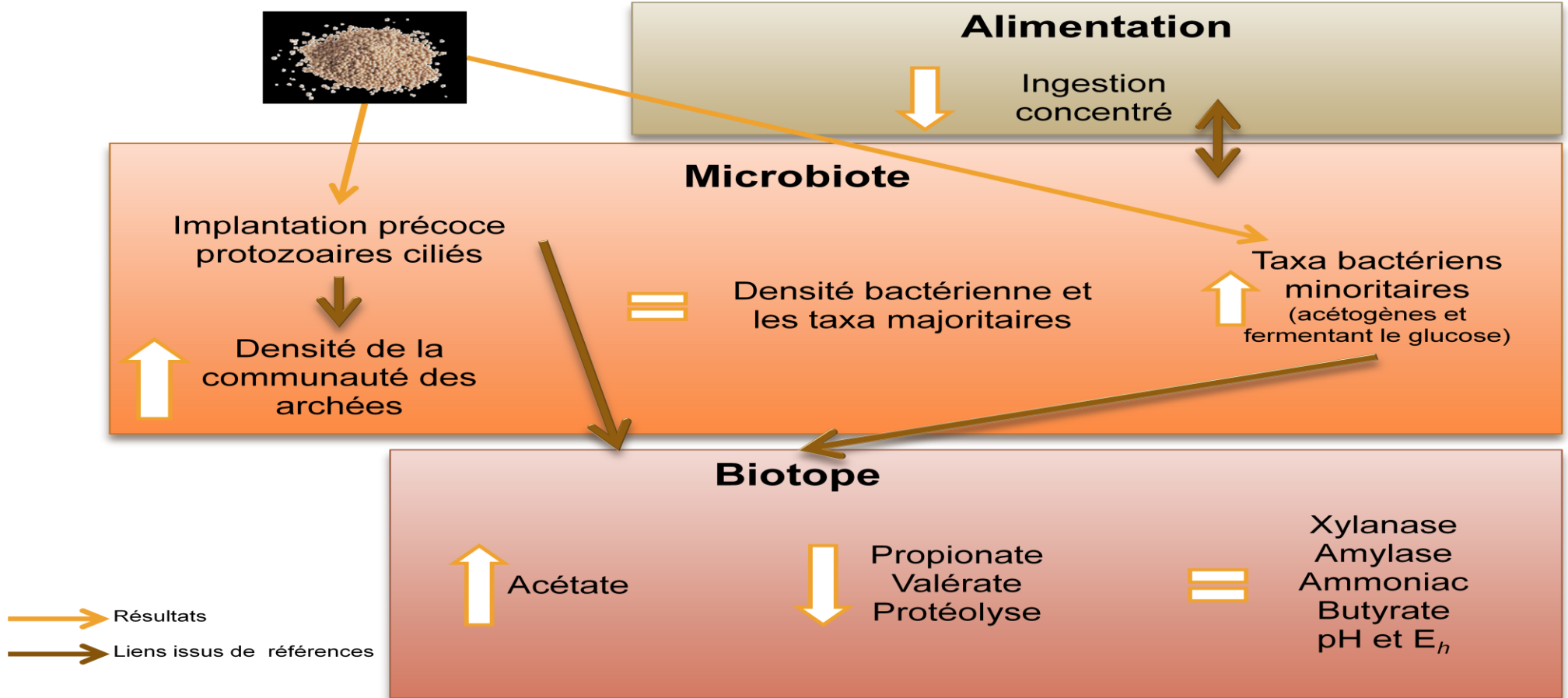


Figure 21 : Synthèse de l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur l'implantation des microorganismes du rumen et l'acquisition des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période pré-sevrage (sevrage à 60 jours).

2. Effet de la supplémentation en levures vivantes en période post-sevrage

Dans notre étude, il a été observé sur cette période une augmentation de l'ingestion de foin chez les veaux supplémentés en levures par rapport aux témoins. Après le sevrage, la densité bactérienne du rumen évoluait avec l'âge comme décrit précédemment, et était diminuée par la supplémentation en levures vivantes: respectivement $5,98 \times 10^{11}$ et $3,53 \times 10^{12}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais chez les veaux supplémentés en levures et chez les veaux témoins. Cette densité est supérieure à celle observé par Chaucheyras-Durand et Fonty, (2002) chez des agneaux sevrés. Au même moment la diversité bactérienne (indice de Shannon) était plus basse chez les animaux supplémentés en levures que chez les animaux témoins. Durant cette période, 3 taxa bactériens qui participent à la dégradation du glucose, avaient des abondances relatives augmentées avec l'addition de levures : *Hydrogenophilus*, *Azomonas* et *Pseudomonas* (tableau 11). De même, *Gammaproteobacteria unclassified* (taxon sans identité et ni fonctions connues) a été observé avec une abondance relative plus importante avec la supplémentation en levures que chez les témoins (tableau 11). En revanche l'apport de levures engendrait une plus faible abondance du genre *Lachnospira* (bactérie qui regroupe des espèces pectinolytiques, Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Pour treize autres taxa bactériens, il existait une interaction entre l'âge et l'addition de levures. Avant 90 jours d'âge, les taxa bactériens *Lachnospira unclassified*, *BS.11 unclassified*, *Eubacterium*, *Acetitomaculum* avaient une abondance relative plus faible avec la supplémentation en levures que chez les témoins. Par contre à la même période les taxa *Prevotella*, *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*, *Lachnospiraceae uncultured*, *Ruminococcaceae unclassified* et *Acinetobacter* n'étaient pas affectés par la supplémentation en levures. Ces taxa bactériens regroupent des espèces dont les potentiels acétogènes, cellulolytiques et pectinolytiques. Ces variations au moment où les veaux supplémentés en levures ingèrent plus de foin que les témoins sont difficiles à expliquer car elles concernent des bactéries aux fonctions identiques. Après 90 jours d'âge, ces mêmes taxa (*Prevotella*, *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*, *Lachnospiraceae unclassified*, *Lachnospiraceae uncultured*, *Ruminococcaceae Incertae_Sedis*, *Ruminococcaceae unclassified* et *Acinetobacter*) avaient une plus forte abondance relative chez les veaux supplémentés en levures. Cette observation est en accord avec l'ingestion plus importante de foin par ces mêmes veaux. L'apport de levures à des veaux sevrés semble renforcer la présence dans le rumen de bactéries cellulolytiques, pectinolytiques et liés à la dégradation du glucose par rapport aux animaux témoins, en cohérence avec l'ingestion d'une plus grande quantité de fibres.

Taxa bactériens	Age (en jours)					
	60	70	80	90	120	
<i>Prevotellaceae unclassified</i>	2,4%		4,5%			Taxa bactériens majoritaires non affectés par la supplémentation en levures
<i>Ruminococcaceae uncultured</i>	1,7%	4%	1,6%			
<i>Coriobacterineae</i>	1,1%	3,7%	0,8%			
<i>Dialister</i>	2%		0,6%			
<i>Bacteroidales unclassified</i>	0,7%		1,6%	2,5%		
<i>Xylanibacter</i>	0,9%		1,6%			
<i>Ruminococcus</i>	0,5%		1,9%			
<i>Succinivibrio</i>	1%	2%	0,7%			
<i>Lachnospira</i>	0,1 vs. 0,2%					
<i>Gammaproteobacteria unclassified</i>	13,8 vs. 7%					
<i>Pseudomonas</i>	1,7 vs. 0,6%					
<i>Hydrogenophilus</i>	0,2 vs. 0,08%					
<i>Azomonas</i>	0,2 vs. 0,1%					
<i>Prevotella</i>	=	+				Taxa bactériens affectés par une interaction entre l'âge et la supplémentation en levure (en rouge : au sein du groupe levures + : plus abondant - : moins abondant) = : abondance identique entre les groupes (en bleu : au sein du groupe témoin)
<i>Lachnospiraceae unclassified</i>	-	+				
<i>BS.11 unclassified</i>	-	=				
<i>Bifidobacteriaceae</i>	-	=				
<i>Fibrobacteriaceae uncultured</i>	Pic à 90 jours Augmente de 60 à 120 jours					
<i>Eubacterium</i>	-	=				
<i>Acetitomaculum</i>	-	+	=			
<i>Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio</i>	=	+				
<i>Syntrophococcus</i>	+	-	=			
<i>Lachnospiraceae uncultured</i>	=	+				
<i>Ruminococcaceae Incertae_Sedis</i>	=	+				
<i>Ruminococcaceae unclassified</i>	=	-	+			
<i>Acinetobacter</i>	=	+	=			

Tableau 11 : Synthèse des taxa bactériens majoritaires et des taxa bactériens affectés par la supplémentation en levures en fonction de l'âge des veaux en période post-sevrage.

Avec une supplémentation en levures, une diminution de l'abondance des bactéries consommatrices d'amidon (*Ruminobacter*, *Pseudobutyrvibrio*), une abondance accrue de bactéries fibrolytiques (*Fibrobacter*, *Ruminococcus* et *Eubacterium*) et des bactéries utilisatrices d'acide lactique (*Megasphaera* et *Selenomonas*) ont été observées par Pinloche et al. (2008) chez des vaches en lactation alimentées avec une ration à base d'ensilage de maïs et de concentré. Dans notre étude, *Ruminobacter* et *Megasphaera* n'ont pas été détectés, les genres *Fibrobacter*, *Ruminococcus* et *Selenomonas* n'ont pas été affectés par la supplémentation en levures alors qu'*Eubacterium* avait une abondance plus faible avec la supplémentation en levures. Les variations d'effet de la supplémentation en levures sur ces bactéries cellulolytiques pourraient s'expliquer par l'échantillonnage de contenu ruminal étudié (phase liquide ou solide ou contenu total). Le prélèvement de contenu ruminal dans notre étude a été réalisé à l'aide d'une sonde œsophagienne pour éviter une opération chirurgicale pour canuler les jeunes animaux, ce qui aurait pu les perturber. La sonde permet d'obtenir un échantillon représentant une phase plutôt liquide mais avec la présence d'une part de phase solide qui passe la sonde (part de fibre non négligeable). De plus, cette technique, associée à l'utilisation d'un tamis de maille 1,6 mm, permet d'obtenir à tous les âges, un échantillon de contenu ruminal homogène et représentatif car les animaux passent d'une alimentation liquide à une alimentation solide, ce qui entraîne des changements des équilibres entre phases du contenu ruminal avec l'âge. Cette technique de prélèvement est donc un compromis entre rapidité de la prise d'échantillons et homogénéité dans le temps des échantillons même si cela entraîne la perte d'une certaine partie des fibres de la phase solide du rumen. Dans l'étude de Pinloche et al. (2008) différentes fractions de contenu ruminal étaient testées et montraient que la diversité bactérienne est plus importante dans la phase solide que dans la phase liquide. La majorité des bactéries cellulolytiques est attachée aux fibres dans la phase solide. En effet, la phase solide du rumen de l'adulte contient environ 75% de la biomasse bactérienne totale et 25% se trouve dans la phase liquide (Forsberg et Lam, 1977). L'adhérence des bactéries de la phase solide est un préalable important à la fibrolyse par les bactéries (par leur enzymes polysaccharidases et glucosidases, Fonty et Forano, 1998). On pourrait donc penser que l'on ne peut pas se prononcer sur les bactéries cellulolytiques au vu de l'échantillonnage réalisé, mais dans notre étude, il était mesuré à partir de 90 jours une augmentation des abondances relatives de taxa bactériens cellulolytiques (différents de ceux observés par Pinloche et al., 2008) avec la supplémentation en levures comme décrit précédemment. Les différences d'abondances relatives des bactéries

composant le microbiote ruminal entre les jeunes ruminants et les adultes pourraient aussi jouer un rôle sur l'effet des levures sur les taxa bactériens majoritaires ou minoritaires.

En ce qui concerne les protozoaires ciliés du rumen, **entre 60 et 90 jours** leur densité variait pour se stabiliser ensuite **à partir de 90 jours** à 10^5 protozoaires g^{-1} de contenu ruminal frais chez les veaux supplémentés en levures. Par contre, à partir de 90 jours chez les veaux témoins, les protozoaires ciliés apparaissaient et leur densité était rapidement proche de celle des animaux recevant des levures, sans doute en raison du transfert des animaux dans des box communs voisins d'animaux adultes. En période post-sevrage, la densité des archées était affectée par une interaction entre l'âge et la supplémentation en levures : **entre 60 et 80 jours d'âge**, la densité en archées augmentait pour le groupe levures et diminuait pour le groupe témoin, puis **entre 80 et 90 jours d'âge**, la densité en archées diminuait pour le groupe levures et augmentait pour le groupe témoin pour ensuite se stabiliser à $5,24 \times 10^{11}$ et $7,93 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais chez les veaux recevant des levures et les témoins respectivement. La plus forte densité de la communauté des archées dans le rumen, chez les veaux sevrés supplémentés en levures était sans doute reliée directement à l'implantation précoce des protozoaires du fait de la forte symbiose entre ces 2 communautés (Belanche et al., 2012). De plus, quand la densité bactérienne diminue avec la supplémentation en levures, la densité des archées augmente. Il semblerait donc qu'un certain équilibre existe au sein de l'écosystème ruminal entre toutes les communautés de micro-organismes.

Après le sevrage, l'apport de levures a augmenté l'activité xylanase mesurée *in vitro*. Ces résultats suggèrent que les levures favoriseraient l'expression du potentiel enzymatique des bactéries présentes dans le rumen pour faire face aux substrats présents après le sevrage. L'apport de levures favoriserait donc la dégradation des fibres dans le rumen en favorisant l'activité des espèces microbiennes cellulolytiques, pectinolytiques et acétogènes. Il a été aussi observé que l'apport de levures engendrait un pH ruminal plus élevé ainsi que des pourcentages d'acétate et de valérate également plus élevés, ce qui corrobore l'hypothèse d'une meilleure efficacité cellulolytique des animaux recevant les levures comme décrit par des études *in vitro* (Callaway et Martin, 1997 ; Michalet-Doreau et al., 1997). En effet dans notre étude, la supplémentation en levures entraînait une présence précoce des protozoaires dont le potentiel cellulolytique est connu chez les ruminants adultes. De plus, la plus forte présence de taxa majoritaires comme *Lachnospiraceae unclassified* ou *Prevotella*, avec l'addition de levures, couplée à la forte présence de certains taxa non affectés par la

supplémentation par des levures (comme par exemple *Ruminococcus* et *Xylanibacter*) avec l'apport de levures pourrait expliquer l'augmentation de l'activité fibrolytique chez les veaux supplémentés en levures. Chaucheyras-Durand et Fonty (2002) ont observé une plus forte densité des bactéries cellulolytiques en présence de levures chez des agneaux. Pour expliquer le mode d'action des levures, une synthèse rédigée par Chaucheyras-Durand et Durand (2010) montre qu'*in vitro*, la levure consommerait l'oxygène qui rentre dans le rumen lors de l'ingestion par l'animal et ainsi favoriserait la croissance des bactéries anaérobies, consommerait des sucres présents dans le rumen et produirait des vitamines qui stimuleraient certaines bactéries comme les bactéries cellulolytiques et favoriseraient leur croissance. La consommation de l'oxygène par les levures conduit normalement à une diminution du potentiel redox comme observé par Marden et al. (2008) mais n'est pas concordante avec notre étude chez le veau car le potentiel redox est resté stable. Cette non variation de potentiel redox dans notre étude pourrait s'expliquer par un statut d'oxydo-réduction du rumen du veau différent de celui de l'adulte. En effet, le niveau des flux entrants et sortants au niveau du rumen chez les jeunes animaux n'est pas connu. On pourrait penser que ces modes d'action de la levure pourraient conduire aux variations observées au niveau du rumen chez les jeunes veaux de notre étude.

En résumé, au cours de la période post-sevrage, les veaux supplémentés en levures consomment plus de foin que les animaux témoins. L'apport de levures engendre une densité en archées plus importante ainsi qu'une réduction de la diversité et de la densité de la communauté bactérienne, qui est accompagnée d'une augmentation de l'abondance relative des bactéries cellulolytiques, pectinolytiques et acétogènes. Ces changements sont probablement à l'origine des augmentations de l'activité xylanasique et de la proportion d'acétate. Ces résultats suggèrent que la supplémentation en levures chez les veaux accélère dans le rumen le développement de certaines communautés du microbiote ruminal, modifiant les activités enzymatiques ainsi que les produits de fermentations. L'action des levures stabiliserait également la composition taxonomique des communautés bactériennes pour faire face aux substrats fournis par le régime alimentaire de l'animal en période post-sevrage. L'addition de *S. cerevisiae* améliorerait donc la digestion des fibres chez les veaux après le sevrage. La synthèse de l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur l'implantation du microbiote et la mise en place des fonctions fermentaires du rumen chez le veau en période post-sevrage (sevrage à 60 jours) est présentée dans la figure 22.

Effet de la supplémentation en levures vivantes en période **post-sevrage**

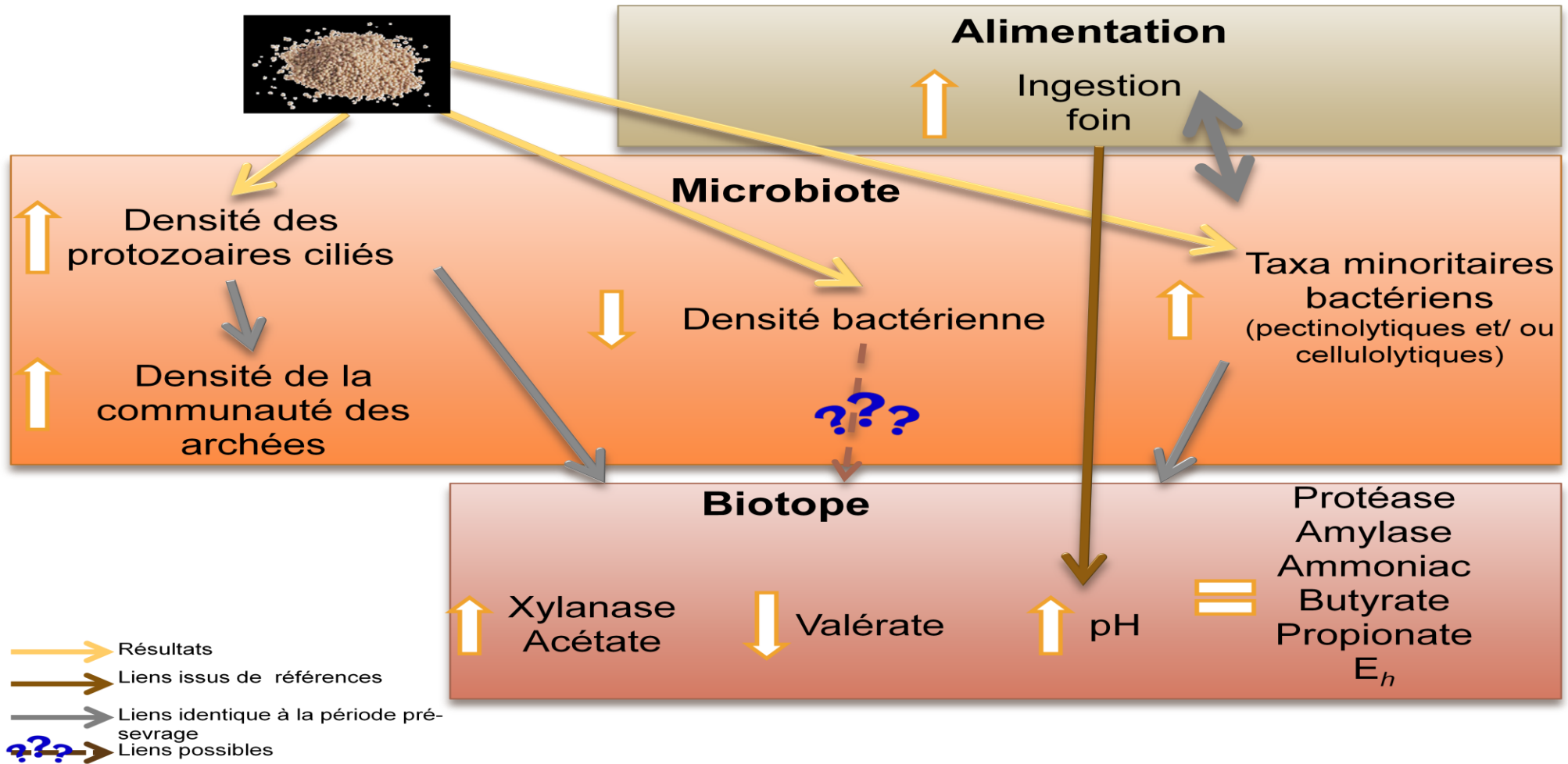


Figure 22 : Synthèse de l'effet de la supplémentation en levures vivantes sur la maturation des microorganismes du rumen et des fonctions de digestion ruminale chez le veau en période post-sevrage.

IV. Apports et limites des méthodes analytiques utilisées lors de nos travaux

1. Les apports liés aux techniques de biologies moléculaires utilisées

Lors des deux essais, la caractérisation du microbiote ruminal (composition bactérienne et en archées) a été réalisée par pyroséquençage haut débit 454 permettant une étude sans *a priori* et un regard global sur ces communautés grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques à chacune. Cette technique nous a permis de mettre en évidence qu'il se mettait en place de nombreuses populations sous dominantes dès 2 jours d'âge et que peu de taxa étaient majoritaires.

Nous avons mis en évidence que l'implantation du microbiote ruminal chez les jeunes veaux était :

- complexe et très variée
- séquentielle avec les différentes périodes d'âge qui ont été définies en chapitres I et II avec en parallèle la mise en place des fonctions fermentaires du rumen
- modifiable par une supplémentation en levures vivantes qui affecte les taxa bactériens minoritairement abondants, ce qui n'aurait pas été visible avec une technique d'analyse plus spécifique des populations fortement développées et connues chez les ruminants adultes.

Ces nouvelles données apportent des éléments importants car elles montrent que le rumen du veau contient un microbiote plus complexe que ce que l'on pensait lors des études plus anciennes et avec des techniques de cultures (Anderson et al., 1987 ; Fonty et al., 1987). La quantification de la densité des communautés bactériennes et d'archées par des analyses PCR quantitatives spécifiques des communautés totales vient confirmer les observations qui avaient été faites par des techniques de cultures.

2. Les limites observées lors de cette étude

D'un point de vue méthodologique, nous avons caractérisé une grande partie des communautés microbiennes du rumen par de nouvelles techniques de biologie moléculaire qui permettent de donner une vision complète et sans *a priori* sur la diversité et la composition des communautés colonisant le rumen.

Des inconvénients majeurs de ces techniques qui ont été observés sont :

- que seulement 60 % des séquences ont pu être affiliées au niveau du genre, ne permettant pas de leur attribuer de façon directe une fonction au sein du rumen, mais uniquement de les supposer au vu des différentes espèces connues au sein d'un genre donnée

- l'observation d'un grand nombre de taxa non cultivés ou non répertoriés dans les bases de données utilisées pour affilier les séquences d'ADN dont on ne connaît ni l'identité ni les fonctions. Cette même observation a aussi été faite dans d'autres études sur le microbiote ruminal par des approche de biologie moléculaire chez le ruminant (Shin et al., 2004b au niveau des archées ; Zened et al., 2012 au niveau des bactéries par exemple) et aussi chez le jeune ruminant (Li et al., 2011 au niveau des bactéries).

Les informations contenues dans ces bases de données dépendent des micro-organismes que l'on peut cultiver et identifier afin de les caractériser physiologiquement et métaboliquement. Malgré cet inconvénient, ces techniques permettent une approche globale de la caractérisation taxonomique d'un écosystème donné. Néanmoins, il faut continuer à utiliser les méthodes culturales en complément des techniques de biologie moléculaire afin d'enrichir les bases de données taxonomiques et diminuer la part de taxa non connus, surtout en ce qui concerne des taxa fortement représentés. L'utilisation de techniques de qPCR ciblée (par groupe fonctionnel ou par espèce) semble aussi intéressante pour caractériser un microbiote donné. D'autres nouvelles approches semblent intéressantes comme la métabolomique ou la protéomique pour arriver à appréhender les fonctions d'un microbiote (voies enzymatiques par exemple) directement sur les échantillons sans passer par une étude *in vitro*.

Des études récentes ont montré qu'un biais pouvait exister en fonction du type d'amorces utilisées pour étudier une communauté donnée comme le montrent Tymensen et al. (2012) au niveau de la communauté des archées étudiée via des approches moléculaires avec des amorces différentes. Ceci montre que le choix des amorces est très important pour analyser une communauté donnée et pourrait jouer un rôle dans les différences entre les données de la littérature et/ou nos données de composition taxonomique du microbiote ruminal par pyroséquençage, ou même de densité du microbiote mesurée par qPCR.

Par ailleurs, dans nos études, les prélèvements de contenu ruminal ont été réalisés à l'aide d'une sonde œsophagienne. Cette méthode permet un prélèvement dès le premier jour de vie et évite une cannulation chirurgicale qui engendrerait une perturbation des animaux. Elle peut cependant présenter des inconvénients, que nous avons essayé de limiter. Nous avons par

exemple limité la contamination des échantillons prélevés ou l'implantation de microorganismes liés à la sonde en désinfectant les sondes avant usage et en utilisant des sondes différentes pour chaque veau. D'autre part, l'utilisation répétée d'une sonde pourrait altérer la gouttière œsophagienne, ce qui pourrait induire une colonisation plus précoce avec une gouttière moins étanche. Dans notre étude le prélèvement était effectué 1 heure après la buvée de lait quand la gouttière est *a priori* encore ouverte. Malgré ces limites, cette méthode de prélèvement reste pour des conditions d'études dès la naissance le meilleur moyen à utiliser.

La mesure des activités enzymatiques *in vitro* présente également des limites. En effet l'analyse est réalisée à partir de substrats purs mettant en évidence l'existence d'un potentiel maximum d'activité enzymatique alors que dans le rumen ces substrats ne sont pas purs et leur accessibilité est moindre. Ceci peut entraîner une différence entre des données obtenues *in vitro* et les valeurs réelles *in vivo*. Il existe aussi plusieurs façons d'exprimer les activités enzymatiques selon la méthode de Martin et al. (1995), ce qui peut changer les valeurs observées. Il est donc nécessaire de faire des choix par rapport à l'expression de ces données afin d'éviter un biais supplémentaire dans leur expression, ce qui nous a conduit à exprimer en matière sèche de contenu ruminal pour s'affranchir de la variabilité que l'on a observé sur le contenu ruminal frais (composition solide/liquide très variable) ou en rapportant ces mesures à la quantité de protéines, elle aussi très variable. Ce mode de mesure reste actuellement le plus rapide et le plus simple à utiliser pour caractériser un potentiel enzymatique. L'autre solution serait de faire de l'étude de la dégradation de substrats *in sacco* mais nécessiterait soit une cannulation si l'on désire réaliser cette mesure directement au niveau du rumen ou de réaliser la mesure *in vitro* sur du contenu ruminal prélevé et incubé, ce qui s'éloignerait des conditions réelles du rumen.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Nos objectifs de travail étaient d'apporter des connaissances sur la mise en place de l'écosystème ruminal chez le veau en termes de microbiote et de fonctions fermentaires. Pour cela ont été caractérisées la colonisation du rumen par les communautés bactériennes, d'archées et de protozoaires, ainsi que la mise en place des paramètres physicochimiques (pH/ E_h), des paramètres fermentaires (AGV et ammoniac) et des activités enzymatiques (fibrolytique, amylolytique, uréolytique et protéolytique) à partir de la naissance. Ce travail a porté sur les périodes pré- et post-sevrage ainsi que sur l'effet d'un apport de levures vivantes dans la ration à partir de la naissance. L'originalité de notre travail repose sur plusieurs éléments : i/ l'animal modèle choisi, le veau, pour lequel peu d'études ont été publiées à ce jour, ii/ un pas de temps très court entre les points de cinétique (tous les jours pendant les 10 premiers jours) et une étude sur le long terme (jusqu'à l'âge de 4 mois), iii/ une approche moléculaire par l'analyse de l'ADN 16S pour l'étude des communautés bactériennes et d'archées, qui permet d'une part d'éviter de cibler les espèces et donc d'avoir des *a priori*, et d'autre part d'avoir une approche exhaustive des communautés.

D'un point de vue cognitif, nos travaux ont montré que la mise en place de l'écosystème ruminal chez le veau de race laitière se déroule en 6 phases clés en période pré-sevrage et que sa maturation se déroule en 2 phases en période post-sevrage (jusqu'à 2 mois post-sevrage) dans nos conditions expérimentales proches des conditions pratiques en élevage laitier.

En période pré-sevrage :

- **à la naissance (jour 1 d'âge)**, le rumen est stérile (dépourvu de bactéries, archées et protozoaires) ou possède un microbiote non détectable (en dessous des seuils de détection). De plus le rumen est non fonctionnel (pas d'AGV, ni d'activités xylanase et amylase) et possède un biotope dont le pH est égal à 7,10 avec un E_h positif (+224 mV), signe d'un milieu non réducteur.

- **dès 2 jour d'âge et jusqu'à 3 jour d'âge**, on observe l'implantation d'un microbiote ruminal complexe et le milieu ruminal devient fortement réducteur ($E_h = -164$ mV). La communauté bactérienne est composée par les phyla *Proteobacteria* (49%), *Bacteroidetes* (29%), *Firmicutes* (15,9%), *Actinobacteria* (5,5%) et *Fusobacteria* (4,8%). Elle comprend de nombreux taxa dont l'abondance relative est inférieure à 5% comme *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, bien connus chez les ruminants adultes pour leurs activités cellulolytiques. Le phylum *Proteobacteria*, majoritaire, comprend majoritairement les genres *Enteric_Bacteria_Cluster*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Mannheimia*, *Pasteurella* et

Moraxella. La communauté des archées est majoritairement composée par les genres *Methanobrevibacter* (90%) et *Methanosphaera* (2%) et la famille *VadinCA11_gut_group* (7%). Aucun protozoaire cilié n'est observé à cette période. L'identification d'un microbiote complexe à 2 jours montre que la colonisation du rumen débute avant même l'ingestion d'aliments solides. A cette période, le contenu ruminal présente un spectre enzymatique large (xylanase et amylase) qui conduit à une production d'AGV avec principalement de l'acétate.

- **entre 4 et 10 jours d'âge**, le rumen rentre en phase de mise en place d'un écosystème fonctionnel. Ainsi dès 4 jours d'âge, la communauté bactérienne du rumen chez le veau est majoritairement composée par les genres *Bacteroides* (24%), *Prevotella* (13%), *Fusobacterium* (4%) et *Streptococcus* (4%), connus pour leur métabolisme complexe. A partir de 4 jours, les concentrations en AGV et en ammoniac du rumen augmentent, tout comme les activités protéasique, amylasique et xylanasique. La densité bactérienne dans le rumen devient stable dès 7 jours d'âge à $1,41 \times 10^{11}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais, comme observé chez des animaux adultes. Dès 10 jours d'âge, les veaux commencent à ingérer des aliments solides (concentré et foin). Les archées du genre *Methanosphaera* et de la famille *VadinCA11_gut_group* varient fortement, avec une densité de $7,65 \times 10^5$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais.

- **entre 12 et 15 jours d'âge**, l'écosystème ruminal passe par une phase de transition. Les produits fermentaires tout comme les activités enzymatiques diminuent jusqu'à des valeurs proches de celles observées chez des animaux adultes.

- **entre 15 jour et 1 mois d'âge**, l'écosystème ruminal rentre en phase de sélection et de nombreux taxa du phylum *Proteobacteria* disparaissent comme les genres *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Granilucateella*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Oscillibacter* et *Subdoligranulum* non observés ou très faiblement chez les ruminants adultes. La communauté bactérienne du rumen devient stable et est alors majoritairement composée de *Prevotella* (42%) et *Gammaproteobacteria unclassified* (24%). L'écosystème ruminal n'a pas atteint son climax puisque les abondances relatives ne sont pas encore stables dans le temps. La densité en archées est de $5,05 \times 10^6$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais.

- **juste avant le sevrage**, l'écosystème passe par une phase d'équilibre avec une stabilisation du microbiote (en composition et en densité) et du biotope.

En période post-sevrage :

- **Après le sevrage**, les veaux n'ingèrent que de l'aliment solide (concentré et foin) et l'écosystème ruminal passe par une nouvelle phase de sélection. La composition bactérienne n'évolue pas taxonomiquement excepté le phylum *Fusobacteria* composé par *Fusobacterium* qui disparaît, mais les abondances relatives des taxa changent. A partir de 90 jours, la densité bactérienne est stable à $4,57 \times 10^{12}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais. La communauté bactérienne est dominée par les phyla *Bacteroidetes* (53,71%), *Proteobacteria* (24,90%), *Firmicutes* (17%), *Actinobacteria* (3,09%), *Fibrobacteres* (1,03%) et *Spirochaetes* (0,27%). Au niveau genre, elle est composée majoritairement par *Prevotella* (55,33%) et *Lachnospiraceae unclassified* (4,14%) dont l'abondance ne varie pas à partir du sevrage. Les autres taxa bactériens majoritaires sont : *BS.11 unclassified*, *Prevotellaceae unclassified*, *Prevotellaceae uncultured*, *Xylanibacter*, *RC9*, *Fibrobacteraceae uncultured*, *Ruminococcus*, *Ruminococcaceae uncultured* et *Gammaproteobacteria unclassified* dont les abondances relatives varient entre 6,54 et 1,41%. A la même période, chez des veaux en box commun, à proximité d'animaux adultes, il est observé une colonisation par des protozoaires ciliés représentés majoritairement par les petits entodiniomorphes ($<100\mu m$, 10^3-10^4 protozoaires ml^{-1} de contenu ruminal frais). Le pH et le E_h sont stables tout comme les activités enzymatiques (protéase, amylase et xylanase) et les paramètres fermentaires (AGV et ammoniac).

- **A 2 mois post-sevrage**, l'écosystème ruminal arrive à un nouvel état d'équilibre du microbiote (archées et bactéries) et du biotope. La densité de la communauté de protozoaires atteint une valeur similaire à celle observée chez le ruminant adulte (10^5-10^6 protozoaires ml^{-1} de contenu ruminal frais). A cette période la densité de la communauté d'archées dans le rumen se stabilise à $7,93 \times 10^{10}$ copies du gène d'ARNr 16S g^{-1} de contenu ruminal frais, probablement en lien avec la stabilisation des protozoaires ciliés qui sont en symbiose avec les archées. A ce moment-là, l'écosystème ruminal des veaux est similaire à celui des ruminants adultes par l'identité taxonomique de son microbiote et par son biotope, mais diffère par les abondances relatives des taxa bactériens.

La comparaison de nos expérimentations (essai 1 et 2) a permis d'approcher les effets du type de colostrum (frais ou congelé) combiné à une durée de distribution de 1 ou 3 jours. La colonisation du rumen par les bactéries et les archées était plus importante lorsque du colostrum frais était ingéré pendant une journée qu'avec à une ingestion pendant 3 jours de

colostrum congelé. Cette colonisation plus précoce est associée à une acquisition plus rapide des fonctions ruminales.

Notre travail a aussi permis d'étudier l'effet de la supplémentation en levures vivantes *Saccharomyces cerevisiae* en périodes pré- et post-sevrage sur la colonisation du rumen et l'acquisition des fonctions ruminales. Chez le veau en **période pré-sevrage**, la supplémentation en levures diminue la consommation de concentrés sans affecter la croissance des veaux, n'a pas d'effet sur la diversité et la densité bactérienne, par contre elle entraîne de légères modifications d'abondances relatives au sein de la communauté. De plus l'apport de levures favorise une implantation précoce des protozoaires ciliés (dès 22 jours contre 90 jours sans levures) et une densité en archées plus élevée. Ces modifications de composition sont associées à une diminution de l'activité protéolytique et des proportions de propionate et de valérate ainsi qu'à une augmentation de la proportion d'acétate parmi les AGV. Pendant la **période post-sevrage**, l'addition de levures entraîne une augmentation de consommation de fourrages, une diminution du nombre de bactéries et inversement une augmentation des archées. Ces modifications sont associées à une plus forte activité xylanasiq, un pH ruminal plus élevé et une proportion d'acétate plus importante.

D'un point de vue pratique, en exploitation de bovins laitiers, l'élevage des génisses sur site pour un renouvellement interne du troupeau de vaches laitières est fréquent. Cet élevage représente un enjeu et un coût importants. Il est donc nécessaire de bien le maîtriser pour permettre la pérennité de la production. Le passage du stade pré-ruminant au stade ruminant nécessite la mise en place d'un écosystème ruminal fonctionnel. Trois points clés ont été démontrés au cours de ce travail : i) une mise en place rapide de l'écosystème ruminal dès 2 jours d'âge, composé par un microbiote complexe qui change avec l'ingestion des aliments solides et conditionne la mise en place du biotope ; un apport d'aliment solide le plus tôt possible pendant la phase de croissance de jeunes ruminants semble donc être à privilégier, ii) à 4 mois d'âge l'écosystème ruminal tend à devenir similaire à celui observé chez des ruminants adultes en terme de caractéristiques du biotope et par la composition du microbiote mais diffère par les densités bactériennes et en archées et les abondances relatives des taxa de la communauté bactérienne du rumen qui se met en place, et iii) la supplémentation en levures vivantes chez le jeune veau aurait des effets plus importants au niveau du biotope (surtout les fonctions fermentaires) que sur le microbiote ruminal, excepté pour l'implantation des protozoaires ciliés qui est plus précoce. Une autre point suggéré par ce travail concerne la

phase colostrale, qui semble être importante car elle conditionnerait les premières colonisations du rumen : un colostrum non congelé serait à privilégier.

Ces connaissances ouvrent la voie vers une amélioration de l'implantation du microbiote, voire vers une orientation, afin qu'il soit plus efficace dans l'utilisation des rations futures de l'animal. Pour compléter ce travail et approfondir la vision globale de l'implantation du microbiote, il est nécessaire de caractériser l'implantation des champignons anaérobies (en densité par qPCR et en composition taxonomique par qPCR ciblée ou pyroséquençage). Il serait aussi intéressant de connaître la mise en place anatomique du rumen par l'étude des papilles de la paroi ruminale et du volume ruminal dans différentes conditions d'élevage. Cette étude permettrait sans doute de comprendre les phénomènes d'absorption et de dilution qui se mettent en place au sein du rumen et expliquer certaines observations faites au niveau des paramètres fermentaires et des activités enzymatiques.

Il a été observé que la mise en place de l'écosystème ruminal pouvait être influencée ou améliorée par l'apport de probiotiques comme la levure vivante et que sa maturation dépendait de l'alimentation de l'animal. Pour étayer cela, il serait intéressant d'étudier l'effet d'autres facteurs de variations sur la mise en place de cet écosystème, par exemple des variations au niveau du plan d'alimentation comme : i) la fréquence d'alimentation (buvée de lait en 1 ou 2 repas par jour), ii) la nature de l'aliment liquide (lait maternel vs. aliment d'allaitement) et iii) la durée de distribution et la nature du colostrum. A plus long terme il serait aussi intéressant de préciser si les effets observés chez le jeune ruminant perdurent chez l'animal adulte. Pour des études à venir il faudrait améliorer ou coupler les techniques analytiques pour caractériser le microbiote, alimenter de plus en plus les bases de données taxonomiques pour identifier les séquences *unclassified* en couplant les techniques culturelles et moléculaires. Une étude plus approfondie des fonctions des micro-organismes du rumen par des approches globales de métabolomique et de protéomique serait intéressante pour connaître la mise en place des voies fonctionnelles du rumen (voies métaboliques et/ou protéiques). Ces techniques permettraient de davantage comprendre les fonctions des micro-organismes qui se mettent en place dans le rumen par l'étude de l'ARNm ou des protéines qui sont d'un intérêt fonctionnel dans l'écosystème ruminal chez le jeune veau sans avoir recours à des mesures *in vitro*. D'autre part, étudier le microbiote par qPCR avec des amorces spécifiques de fonctions ou de groupes d'espèces permettrait de donner une idée nouvelle et précise de la composition de l'écosystème. Cela pourrait permettre de faire le lien entre la

taxonomie et les fonctions des communautés qui composent l'écosystème ruminal, mais nécessite de développer ces amorces spécifiques. Ainsi, ces approches globales de l'écosystème ruminal permettraient de pouvoir mettre en relation directement la composition taxonomique du microbiote et son activité métabolique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Publications Scientifiques

- Adams D.C., M.L. Galyean, H.E. Kiesling, J.D. Wallace and M.D. Finkner. 1981. Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53 : 780-789.
- Agarwal N., D.N. Kamra, L.C. Chaudhary, I. Agarwal, A. Sahoo and N.N. Pathak. 2002. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. (*Letters*) *Appl. Microbiol.* 34 : 329-336.
- Ali Haimoud-Lekal D., P. Lescoat, C. Bayourthe and R. Moncoulon. 1999. Effets de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Aspergillus oryzae* sur les performances zootechniques de la vache laitière : étude bibliographique, p 157. In : 6ème Journée Rencontres Recherches Ruminants, 1-2 Décembre, Paris.
- An, D., X. Dong, and Z. Dong. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* 11 : 207-215.
- Andersen J.B., J. Sehested and K.L. Invartsen. 1999. Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica* 49 : 149-155.
- Anderson K., T. Nagaraja, J. Morrill, T. Avery, S. Galitzer and J. Boyer. 1987. Ruminant microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64 : 1215-1226.
- Andersson A.F., M. Lindberg, H. Jakobsson, F. Backhed, P. Nyren and L. Engstrand. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 3 : e2836. doi :10.1371/journal.pone.0002836.
- Andrade, P. V. D., S. Giger-Reverdin, and D. Sauvant. 2002. Relationship between two parameters (pH and redox potential) characterizing rumen status. Influence of diets. Page 332 in Proc. 9th Rencontres Recherches Ruminants, Paris, France. Institut de l'Elevage- INRA, Paris, France.
- Anonymous. 1988. Arrêté du 18 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. Pages 5608–5610 in *Journal Officiel de la République Française*. *Journal Officiel*, Paris, France.

- Arcos-Garcia J.L., F.A. Castrejon, G.D. Mendoza and E.P. Perez-Gavilan. 2000. Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livest. Prod. Sci.* 63 : 153-157.
- Bauchop T. and D.O. Mountfort. 1981. Cellulose Fermentation by a Rumen Anaerobic Fungus in Both the Absence and the Presence of Rumen Methanogens. *Appl. Env. Microbiol.* 42 : 1103-1110.
- Beauchemin K.A., W.Z. Yang, D.P. Morgavi, G.R. Ghorbani, W. Kautz and W.A.Z. Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81 : 1628–1640.
- Beecham T.J., J.V. Chambers and M.D. Cunningham. 1977. Influence of *Lactobacillus acidophilus* on performance of young dairy calves. *J. Dairy Sci.* 60 : 74. (Abstract)
- Beharka A. A., T. G. Nagaraja and J. L. Morrill. 1991. Performance and ruminal function development of young calves fed diets with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *J. Dairy Sci.* 74 : 4326–4336.
- Beharka A.A., T.G. Nagaraja, J.L. Morrill, G.A. Kennedy and R.D. Klemm. 1998. Effects of form of the diet on anatomical microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81 : 1946-1955.
- Belanche A., G. de la Fuente, E. Pinloche, C. J. Newbold and J. Balcells. 2012. Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. *J. Anim. Sci.* doi: 10.2527/jas.2011-4802.
- Bondi A.A. 1987. The nutritional requirements for production of body gain. In : *Animal nutrition*. John Wiley & Sons, Chichester, pp 370-412.
- Bonnemoy F., G. Fonty, V. Michel and P. Gouet. 1993. Effect of anaerobic fungi on the ruminal proteolysis in gnotobiotic lambs. *Reprod. Nutr. Develop.* 33 : 551-555.
- Brock F.M., C.W. Forsberg, J.G. Buchanan-Smith. 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Br. J Nutr.* 50 : 769-782.
- Brownlee A. 1956. The developpement of the rumen papillae in cattle fed on different diets. *British Vet. J.* 112 : 369-375.
- Bruce B.B., S.E. Gilliland, L.J. Bush and T.E. Staley. 1979. Influence of feeding cells of *Lactobacillus acidophilus* on the fecal flora of young dairy calves. *Oklahoma Anim. Sci. Res. Rep.* 207.
- Brugère H. 1983. Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV.* 3 : 5-22.

- Bryant M.P. and L.A. Burkey. 1953. Number and some predominate groups of bacteria in the rumens of cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* 36 : 218-224
- Bryant, M.P. and N. Small. 1960. Observations on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. *J. Dairy Sci.* 43 : 654-667.
- Bryant M.P., N. Small, C. Bouma and I.M. Robinson. 1958. Studies of the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.* 41 : 1747-1767.
- Cabrera E.J.I., M.G.D. Mendoza, I.E. Aranda, C. Garcia-Bojalil, G.R. Barcena and J.J.A. Ramos. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. *Anim. Feed Sci. Tech.* 83 : 49-55.
- Caldwell D.R. and Bryant M.P. 1966. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14 : 794-801.
- Callaway E.S. and S.A. Martin. 1997. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80 : 2035-2044.
- Callaway T.R., S.E. Dowd, T.S. Edrington, R.C. Anderson, N. Krueger, N. Bauer, P.J. Kononoff and D.J. Nisbet. 2010. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.* 88 : 3977-3983.
- Chagan I., M. Tokura, J.-P. Jouany, and K. Ushida. 1999. Detection of methanogenic archaea associated with rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45 : 305–308.
- Chaucheyras F., L. Millet, B. Michalet-Doreau, G. Fonty, G. Bertin and Ph. Gouet. 1997. Effect of an addition of LEVUCCELL[®] SC on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. Proceedings of a Symposium jointly organised by the Rowett Research Institute and INRA, Centre de Clermont-Theix 'Evolution of the rumen microbial ecosystem', Aberdeen, March 20-21 (RNDEE5, Suppl. 1-88, p 82).
- Chaucheyras-Durand F. and H. Durand. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* 1 (1) : 3-9.
- Chaucheyras-Durand F. and G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod. Nutr. Dev.*, 41 : 57-68.
- Chaucheyras-Durand F. and G. Fonty. 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microb. Ecol. Health Dis.* 14 : 30–36.

- Chaucheyras-Durand F., N.D. Walker and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 145 : 5-26.
- Chiquette J. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus oryzae* utilisés seuls ou combinés à la diète de bouvillons et de vaches laitières. *can. J. Anim. Sci.* 75 : 405-415.
- Coleman G.S., 1975. The interrelationship between rumen ciliate protozoa and bacteria. In : Mc Donald W., Warner A.C.I. (Eds.). *Digestion and metabolism in the ruminant.* The university of New England publ, Armidale, USA, pp. 149-164.
- Coleman G.S. 1983. Hydrolysis of fraction 1 leaf protein and casein by rumen entodiniomorphid protozoa. *J. Appl. Bacteriol.* 55 : 111-118.
- Combes S., R.J. Michelland, V. Monteils, L. Cauquil, V. Soulié, Ngoc Uyen Tran, T. Gidenne and L. Fortun-Lamothe. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol. Ecol.* 77 : 680–689.
- Cotta M.A. 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilisation of maltooligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 48-54.
- Cruywagen C.W., G.J. Brisson and H.H. Meissner. 1990. Casein curd-forming ability and abomasal retention of milk replacer components in young calves. *J. Dairy Sci.* 73 : 1578-1585.
- Curtis T.P. and W.T. Sloan. 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Current Opinion in Microbiology.* 7: 221–226.
- Cybulski W. and A. Andren. 1990. Immunohistochemical studies on the development of cells containing progastricsin (minor pepsinogen) in comparison to prochymosin and pepsinogen in Bovine abomasal mucosa. *Anat. Rec.* 227 : 458-463.
- Dann H.M., J.R. Prokley, G.C. McCoy, M.F. Hutjens and J.E. Garrett. 2000. Effects of yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83 : 123–127.
- Dawson K.A. and M.J. Allison. 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity. In : Hobson PN, (eds.). *The rumen microbial ecosystem.* Elsevier Science Publisher, New York, 445-459. p527.
- Dawson K.A. and K.E. Newman. 1988. Fermentations in rumen-stimulating continuous cultures receiving probiotic supplements. *J. Anim. Sci.* 67 : 500 (Abstr.).
- Dawson K.A. 1989. Modification of rumen function and animal production using live microbial cultures as feed supplements. *California Anim. Nutr. Conf.* pp 25.

- Dawson K.A. 2000. Some milestones in our understanding of yeast culture supplementation in ruminants and their implications in animal production systems. In : *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the 16th Annual Symposium.* (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds) Nottingham University. Press, Nottingham, UK. p. 473-486.
- Demeyer D. and V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement : la méthanogénèse. *Ann. Zootech.* 49 : 95–112.
- Denman S.E., N.W. Tomkins and C.S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62 : 313–322.
- Dehority B.A. and C. G. Orpin. 1988. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In : Hobson P.N., (eds.). *The rumen microbial ecosystem.* Elsevier Science Publisher. 151-178.
- De Puytorac P.J. Grain, and J.P. Mignot. 1987. *Précis de protistologie.* Société Nouvelle des Editions Boubee, Paris.
- Doreau M. and J P. Jouany. 1998. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81 : 3214–3221.
- Durand-Chaucheyras F., G. Fonty, G. Bertin. 1997. L'utilisation de levures vivantes, additif microbiens chez le ruminant : Effets sur la microflore et les fermentations ruminales, effets zootechniques. *Bulletin des G.T.V. no.5B.* 576 : 35-52.
- Eadie J.M. and S.O. Mann. 1970. Development of the rumen microbial population : high starch diets and instability. In : AT Philipson (eds). *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant,* 335-347.
- Edwards I.E., J.H. Mutsvangwa, J.H. Topps and G.F.M. Paterson. 1990. The effects of supplemental yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation and growth performance of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55 : 35-40.
- Edwards J.E., N.R. McEwan, N. McKain, N. Walker and R.J. Wallace. 2005. Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiology.* 151 : 717-725.
- Edwards J.E., N.R. McEwan, A.J. Travis and R.J. Wallace. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology.* 86 : 263-281.
- El Hassan S.M., C.J. Newbold and R.J. Wallace. 1993. The effect of yeast in the rumen and the requirement for viable yeast cells. *Anim. Prod.* 54 : 504 (Abstract).

- Elyse P. 2002. La PCR en temps réel : principes et applications. *Biology and Biotechnology* : 2-11.
- Erasmus L.J., P.M. Botha and A. Kistner. 1992. Effect of a yeast culture supplement on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75 : 3056-3065.
- Erasmus L.J., P.H. Robinson, A. Ahmadi, R. Hinders and J.E. Garrett. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 122 : 219-239.
- Eun, J.S., and K.A. Beauchemin. 2005. Effects of a proteolytic feed enzyme on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.* 88 : 2140–2153.
- Fernando S.C., H.T. Purvis, F.Z. Najar, L.O. Sukharnikov, C.R. Krehbiel, T.G. Nagaraja, B.A. Roe and U. DeSilva. 2010. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (22) : 7482-7490.
- Fiems L.O., B.G. Cottyn, L. Dussert and J.M. Vanacker. 1993. Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. *Reprod Nutr Dev.* 33 : 43-49.
- Fierer N., J.A. Jackson, R. Vilgalys and R.B. Jackson. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl Environ. Microbiol.* 71 : 4117-4120.
- Fondevila M., C.J. Newbold, P.M. Hotten, and E.R. Årskov. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw. *Ani. Sci.* 51 : 422-425.
- Fonty G., P. Gouet, J.P. Jouany and J. Senaud. 1987. Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *J. General Microbiol.* 133 : 1835-1846.
- Fonty G., J.P. Jouany, M. Chavarot, F. Bonnemoy and P. Gouet. 1991. Development of the rumen digestive functions in lambs placed in a sterile isolator a few days after birth. *Reprod. Nutr. Dev.* 31 : 521-528.
- Fonty G., J.-P. Jouany, E. Forano, and Ph. Gouet. 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. Pages 299–347 in *Nutrition des ruminants domestiques*. R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, and M. Journet, (eds.). INRA Editions, Paris, France.
- Fonty G. and F. Chaucheyras-Durand. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia, Bratislava*, 61/6 : 74-750.

- Fonty G. and F. Chaucheyras-Durand. 2007. Les écosystèmes digestifs, ed. E.T. Doc. : Lavoisier. (pp. 168 to 170 and 311).
- Fonty G. and E. Forano. 1999. Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. Cahiers Agricultures 8 : 21-35.
- Forano E., V. Broussolle and R. Durand. 1996. Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. Annales de Zootechnie 45 : Suppl. 1.
- Forsberg C.W. & K. Lam. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. Applied and Environ. Microbiol. 33 : 528-537.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. A review. J. Appl. Bacteriol. 66 : 365-378.
- Galip N. 2006. Effect of supplemental yeast culture on ruminal protozoa and blood parameters in rams. Revue Méd. Vét. 157 : 519-524.
- Gantner S., A.F. Andersson, L. Alonso-Sáez, S. Bertilsson. 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples, J. Microbiol. Meth. 84 : 12-18.
- Giger-Reverdin S., N. Bezault, D. Sauvant and G. Bertin. 1996. Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants : interaction with dietary nitrogen level. Anim. Feed. Sci. Tech. 63 : 149-162.
- Goad D.W., C.L. Goad and T.G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. J. Anim. Sci. 76 : 234-241
- Gomez-Alarcon R.A., C. Dudas and J.T. Huber. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. J. Dairy Sci. 73 : 703-710.
- Gouet Ph., J. Grain, H.C. Dubourguier and G. Albagnac. 1986. Interactions entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. Reprod. Nutr. Dévelop. 26 : 147-149.
- Grenet E., A. Breton, P. Barry and G. Fonty. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonisation as affected by diet composition. Anim. Feed Sci. Technol. 26 : 55-70.
- Guilhermet R., C. M. Mathieu, and R. Toullec. 1975. Transit des aliments liquides au niveau de la gouttière oesophagienne chez le veau préruminant et ruminant. Ann. Zoot. 24 : 69-79.

- Guilloteau P., T. Corring, P. Garnot, P. Martin, R. Toullec and G. Durand. 1983. Effects of age and weaning on enzyme activities of abomasum and pancreas of the lamb. *J. Dairy Sci.* 66 : 2373-2385.
- Guilloteau P., T. Corring, R. Toullec and R. Guilhermet. 1985. Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. II. Effects of weaning and feeding a liquid supplement to ruminant animals. *Reprod. Nutr. Develop.* 25 : 481- 493.
- Guilloteau P., T. Corring, R. Toullec and J. Robelin. 1984. Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. I. Effect of age in the preruminant. *Reprod. Nutr. Develop.* 24 : 315-325.
- Guilloteau P., R. Zabielski, J.W. Blum. 2009. Gastrointestinal tract and digestion in the young ruminant : Ontogenesis, adaptations, consequences and manipulations. *J. Physiol. Pharmacol.* 60 : 37-46.
- Hancock D.L., A.C. Brake, A.L. Montgomery, J.R. Dominey, C.A. Mattingly and M.J. Cecava. 1994. Influence of yeast addition and Compudose implantation on feedlot performance and carcass characteristics of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl 1) : 300.
- Harrison, H. N., R. G. Warner, E. G. Sander, and J. K. Loosli. 1960. Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk. *J. Dairy Sci.* 43 : 1301–1312.
- Harrison G.A., R.W. Hemken, K.A. Dawson, R.J. Haromon and K.B. Barker. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71 : 2967-2975.
- Hill K.J., D.E. Noakes and R.A. Lowe. 1970. Gastric digestive physiology of the calf and piglet. In : *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant* (A.T. Phillipson,, eds.). Oriel Press, New Castle, pp. 166-179.
- Hino T. and J.B. Russel. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH / NAD on deamination of amino acids by intact rumen micro-organisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50 : 1368-1374.
- Huber J.T., N.L. Jacobson and R.S. Allen. 1961. Digestive enzyme activities in the young calf. *J. Dairy Sci.* 44 : 1494-1501.
- Janssen P.H. and M. Kirs. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 : 3619. DOI : 10.1128/AEM.02812-07.

- Jaquette R.D., R.J. Dennis, J.A. Coalson, D.R. Ware, E.T. Manfredi and P.L. Read. 1988. Effect of feeding viable *Lactobacillus acidophilus* (BT1386) on the performance of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 71 : 219. (Abstract)
- Jarrige R. 1978. Digestion. In : INRA publications (Ed.), Alimentation des ruminants. Route de Saint-Cyr 78000 Versailles, pp. 23-45.
- Jarvis G.N., C. Strompl, D. M. Burgess, L. C. Skillman, E. R. B. Moore, K. N. Joblin. 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. Current Microbiol. 40 : 327–332.
- Jayne-Williams D.J. 1979. The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves. The Journal of Applied Bacteriology 47 : 271-284.
- Jouany J.P. 1988. Effect of diet on populations of rumen protozoa in relation to fibre digestion. In : Nolan J.V., Leng R.A., Demeyer D.I. The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, NSW, 59-74.
- Joany J.P., B. Lassalas and G. Bertin 1994. In vitro study of the dose effect of *Saccharomyces cerevisiae* on rumen digestion of a mixed diet. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 3.
- Jouany J.P. 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. INRA Prod. Anim. 7 : 207-225.
- Jouany J.P. and K. Ushida. 1998. The role of protozoa in feed digestion. Asian-Aus. J. anim. sci. 12 : 113-128.
- Julien, C., J.P. Marden, C. Bonnefont, R. Moncoulon, E. Auclair, V. Monteils and C. Bayourthe. 2010a. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. Animal. DOI : 10.1017/S1751731110000972.
- Julien, C., J.P. Marden, R. Moncoulon, and C. Bayourthe. 2010b. Redox potential measurement : A new way to explore ruminal metabolism. J. Dairy Sci. 93 (E-Suppl. 1) : 578. (Abstr.)
- Julien, C., J.P. Marden, R. Moncoulon and C. Bayourthe. 2010c. La mesure du potentiel rédox : une nouvelle voie d'exploration du métabolisme ruminal. 3^{ième} édition de la journée recherche ENSAT.
[http://www.ensat.fr/modules/resources/download/commons/ensat-contributeurs/documents%20a%20telecharger/JREChristineJulien.pdf?site=ensat.](http://www.ensat.fr/modules/resources/download/commons/ensat-contributeurs/documents%20a%20telecharger/JREChristineJulien.pdf?site=ensat)
- Karnati S.K., Z. Yu, J.T. Sylvester, B.A. Dehority, M. Morrison, and J.L. Firkins. 2003. Technical note : Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. J. Ani. Sci. 81: 812-815.

- Kehoe S.I. and A.J. Heinrichs. 2006. Gastrointestinal development in dairy calves. Alltech Inc. <http://en.engormix.com/MA-dairy-cattle/articles/gastrointestinal-development-dairy-calves-t196/p0.htm>.
- Kim M., M. Morrison and Z. Yu. 2011 Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol Ecol* 76 : 49–63.
- Kimsé M., V. Monteils, C. Bayourthe, and T. Gidenne. 2009. A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit caecum : Relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Sci.* 17 : 63–70.
- Kittelmann S, G.E. Naylor, J.P. Koolaard and P.H. Janssen. 2012. A Proposed Taxonomy of Anaerobic Fungi (Class Neocallimastigomycetes) Suitable for Large-Scale Sequence-Based Community Structure Analysis. *PLoS ONE* 7 (5) : e36866. doi:10.1371/journal.pone.0036866
- Kmet V., K. Boda, P. Javorsky, and R. Gibalova. 1986a. Dynamic of enzymatic activity development in the adherent rumen microflora. *Arch. Anim. Nutr.* 36 : 621-628.
- Kmet V., K. Boda, P. Javorsky, and R. Nemcova. 1986b. The enzymatic activity of rumen microflora in calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 56 : 73-77.
- Krom M.D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia. A study of the Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst (Lond.)* 105 : 305–316.
- Kumar U., V.K. Sareen and S. Singh. 1992. A note on the effect of supplementation of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of buffaloes on milk yield and composition. *Anim. Prod.* 55 : 440-442.
- Kumar U., V.K. Sareen and S. Singh. 1997. Effect of yeast culture supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves fed a high roughage diet. *J. Sci. Food Agric.* 73 : 231–236.
- Kung L. Jr., A. Hession, R.S. Tung and K. Maciorowski. 1991. Effect of *Propionibacterium shermanii* on ruminal fermentations. *Proc. 21st Biennial Conf. on Rumen Function.* Chicago, IL, 31. (Abstract)
- Koul V., U. Kumar, V.K. Sareen and S. Singh. 1998. Mode of action of yeast culture (YEA-SACC 1026) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. *J. Sci. Food Agric.* 77 : 413–417.
- Latham M.J., M.E. Sharpe and J.D. Sutton. 1971. The Microbial Flora of the Rumen of Cows Fed Hay and High Cereal Rations and its Relationship to the Rumen Fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, 34 : 425–434.

- Latham M.J., J.E. Storry and M.E. Sharpe. 1972. Effect of Low-Roughage Diets on the Microflora and Lipid Metabolism in the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 24:871-877.
- Larue R, Z. Yu, V.A. Parisi, A.R. Egan, M. Morrison. 2005. Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ Microbiol.* 7 : 530-43.
- Leedle J.A. and R.B. Hespell. 1980. Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Applied and Environ. Microbiol.* 39 : 709-719.
- Lesmeister K.E. and A.J. Heinrichs. 2004. Effects of Corn Processing on Growth Characteristics, Rumen Development, and Rumen Parameters in Neonatal Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 87 : 3439–3450.
- Lesmeister K.E., A.J. Heinrichs and M.T. Gabler. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87 : 3439–3450.
- Lever M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) : Effect of bismuth on the reaction. *Anal. Biochem.* 81 : 21–27.
- Li R.W., E.E. Connor, C. Li, R.L. Baldwin and M.E. Sparks. 2011. Characterization of the rumen microbiota of pre-ruminant calves using metagenomic tools. *Environ. Microbiol.* 14 : 129-139.
- Liu Z., C. Lozupone, M. Hamady, F.D Bushman and R. Knight. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic. Acids Res.* 35 : e120doi :10.1093/nar/gkm541.
- Liu Y., W.B. Whitman. 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *archaea*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125 : 171-189.
- Long S.S. and R.M. Swenson. 1977. Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *The Journal of pediatrics* 91 : 298-301.
- Longenbach, J. I., and A. Heinrichs. J. 1998. A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73 : 85-97.

- Lwin K.O., M. Hayakawa, T. Ban-Tokuda and H. Matsui. 2011. Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. *Curr Microbiol.* 62 : 1147–1151.
- Mackie RI, Sghir A and H.R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 69 : 1035-1045.
- Mackie R.I. and B.A. White. 1990. Symposium : Rumen microbial ecology and nutrition. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism : potential impact on nutrient output. *J. dairy Sci.* 73 : 2971-2995.
- Marden, J.P., Bayourthe, C., Enjalbert, F. and R. Moncoulon. 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88 : 277–281.
- Marden J.P., C. Julien, V. Monteils, E. Auclair, R. Moncoulon and C. Bayourthe. 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.* 91 : 3528–3535.
- Martin C., and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms : Effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67 : 407–413.
- Martin C., L. Millet, G. Fonty and B. Michalet-Doreau. 2001. Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 : 413-424.
- Martin S.A. and M.N. Streeter. 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73 : 2141-2145.
- McAllister TA and K.J. Cheng. 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 62 : 29-36.
- McCowan R.P., K.J. Cheng and J.W. Costerton. 1980. Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. *Applied and Environ. Microbiol.* 39 : 233-241.
- Medini D., D. Serruto, J. Parkhill, D.A. Relman, C. Donati, R. Moxon, S. Falkow and R. Rappuoli. 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 : 419-430.
- Michalet-Doreau B., D. Morand and C. Martin. 1997. Effect of the microbial additive LEVUCCELL[®] SC on microbial activity in the rumen microflora during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diet. Proceedings of a Symposium jointly organised by the Rowett Research Institute and INRA, Centre de Clermont-Theix

- 'Evolution of the rumen microbial ecosystem', Aberdeen, March 20-21 (RNDEE5, Suppl. 1-88, p 81).
- Michalet-Doreau B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet and G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 : 187-194.
- Minato H., M. Otsuka, S. Shirasaka, H. Itabashi and M. Mitsumori. 1992. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38 : 447-456.
- Mir Z. and P.S. Mir. 1994. Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high forage or high grain and on feed digestibility and in situ degradability. *J. Anim. Sci.* 72 : 537-545.
- Miranda R.L.A., M.G.D. Mendoza, J.R. Barcena-Gama, M.S. Gonzales, R. Ferrara, C.M.E Ortega and P.M.A. Cobos. 1996. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 63 : 289-296.
- Moharrery A. and T.K. Das. 2001. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Reprod. Nutr. Dev.* 41 :513–529.
- Monteils V., M. Rey, L. Cauquil, A. Troegeler-Meynadier, M. Silberberg, and S. Combes. 2011. Random changes in the heifer rumen in bacterial community structure, physico-chemical and fermentation parameters, and *in vitro* fiber degradation. *Livest. Sci.* 141 : 104–112.
- Moloney A.P. and M.J. Drennan.1994. The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. *Anim. Feed Sci. Tech.* 50 : 55-73.
- Moon, Y.H., J.U. Ok, S.J. Lee, J.K. Ha and S.S. Lee. 2010. A comparative study on the rumen microbial populations, hydrolytic enzyme activities and dry matter degradability between different species of ruminant. *Ani. Sci. J.* 81 : 642–647.
- Morgavi D.P, J.P. Jouany, C. Martin and M.J. Ranilla. 2006. Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. *International Congress Series* 1293 : 127– 130.
- Mosoni P., F. Chaucheyras-Durand, C. Bera-Maillet and E. Forano. 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* 103 : 2676–2685.

- Nelson J.H., R.G. Jensen and R.E. Pitas. 1960. Pregastric esterase and other oral lipases-a review. *J. Dairy Sci.* 60 : 327-362.
- Nelson, K. E., S. H. Zinder, I. Hance, P. Burr, D. Odongo, D. Wasawo, A. Odenyo, and R. Bishop. 2003. Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract : insights into an unexplored niche. *Environ. Microbiol.* 5 : 1212-1220.
- Nugent J.H.A., J.L. Mangan. 1981. Characteristics of the rumen proteolysis of fraction 1 (18S) protein from lucerne (*Medicago sativa* L). *Br. J Nutr.* 46 : 39-58.
- Ohene-Adjei S., R.M. Teather, M. Ivan and R.J. Forster. 2007. Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 : 4609–4618.
- Orpin C.G. 1977. On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomyces *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *J. General Microbiol.* 101 : 181-189.
- Orpin C.G. 1981. Fungi in ruminant degradation. *Agricultural Science Seminar : Degradation of plant cell wall material.*
- Orpin C.G. and K.N. Joblin. 1997. pp. 140–195. In : Hobson P.N. and Stewart C.S. (eds) *The Rumen Microbial Ecosystem*, Chapman & Hall, London.
- Ørskov, E. R., D. Benzie, and R. N. B. Kay. 1970. The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. *Brit. J. Nutr.* 24 : 785-795.
- Pei C-X, S-Y Mao, Y-F Cheng and W-Y. Zhu. 2010. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *animal*, 4, pp 2029. doi : 10.1017/S1751731109990681.
- Pelmont J. 2005. Hydrogène - Acétate –Méthane. In : *Biodégradations et métabolismes*, collection Grenoble Sciences, 197-244.
- Pettipher G.L. and M.J. Latham. 1979. Production of enzymes degrading plant cell walls and fermentation of cellobiose by *Ruminococcus flavefaciens* in batch and continuous culture. *J. General Microbiol.* 110 : 29-38.
- Pinloche E., N. McEwan, J.-P. Marden, C. Bayourthe, R. Moncoulon and C.J. Newbold. 2008. Effect of yeast on the bacterial diversity of the rumen. *Gut Microbiome Symposium 2008. 6th congress INRA Rowett Research Institut. Clermont-Ferrand.* p9.
- Pinos-Rodriguez J.M., P.H. Robinson., M.E. Ortega, S.L. Berry, G. Mendoza and R. Barcena. 2008. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with

- Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces boulardii*. *Ani. Feed Sci. and Technol.* 140 : 223-232.
- Pioneer Hi-bred International. 1988. Summary of the overall effect of Probios brand microbial products on the performance and health of incoming feedlot cattle. Pioneer Hi-bred International. Johnston, IA.
- Pitas R.E. and R.G. Jensen. 1970. Action of pregastric esterase on synthetic triglycerides containing butyric acid. *J. Dairy Sci.* 53 : 1083-1085.
- Pitta D.W., E. Pinchak, D.E. Dowd, J. Osterstock, V. Gontcharova, E. Youn, K. Dorton, I. Yoon, B.R. Min, J.D. Fulford, T.A. Wickersham And D.P. Malinowski. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.* 59 : 511–522.
- Piva G., S. Belladonna, G. Fusconi and F. Sicbaldi. 1993. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. *J. Dairy Sci.* 76 : 2717-2722.
- Plata P.F., G.D. Mendoza, R.G. Barcena and S.M. Gonzales. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fibre digestion in steers fed oat straw diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 49 : 203-210.
- Playne M.J. 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 36 : 638–644.
- Pruesse E., C. Quast, K. Knittel, B.M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies and F.O. Glöckner. 2007. SILVA : a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic. Acids Res.* 35 : 7188–7196.
- Quigley J.D., L.B. Wallis, H.H. Dowlen and R. N. Heitmann. 1992. Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 75 : 3531–3538.
- Raskin, L., Poulsen, L.K., Noguera, D.R., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1994. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 1241– 1248.
- Robinson P.H. and J.E. Garrett. 1999. Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaptation of cows to postpartum diets and on lactational performance. *J. Anim. Sci.* 77 : 988–999.
- Roque J.L. 1991. Anomalies de la digestion microbienne ruminale. Aspects pathologiques. Thèse Med. Vet., Toulouse. p99.

- Rossi F., P.S. Cocconcelli and F. Masoero. 1995. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Ann. Zootech.* 44 : 403-409.
- Roth B.A., N.M. Keil., L. Gygax and E. Hillmann. 2009. Influence of weaning method on health status and rumen development in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 92 : 645-656.
- Russell J.B. and D.B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 604-610.
- Sadet S. 2008. Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen: effet du régime alimentaire. Thèse de Doctorat en Nutrition et Sciences des Aliments de l'Université Blaise Pascal.
- Sahoo A., D N. Kamra and N.N. Pathak. 2005. Pre- and postweaning attributes in faunated and ciliate-free calves fed calf starter with or without fish meal. *J. Dairy Sci.* 88 : 2027–2036.
- Sakata T. and H. Tamate. 1979. Rumen Epithelium Cell Proliferation Accelerated by Propionate and Acetate. *J. Dairy Sci.* 62 : 49-52.
- Schloss P.D. 2009. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS ONE* 4 : e8230. doi : 10.1371/journal.pone.0008230.
- Shin E.C., K.M. Cho, W.J. Lim, S.Y. Hong, C.L. An, E.J. Kim, Y.K. Kim, B.R. Choi, J.M. An, J.M. Kang, H. Kim and H.D. Yun. 2004a. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *J. Applied Microbiol.* 97 : 378-383.
- Shin E.C, B.R. Choi, W.J. Lim, S.Y. Hong, C.L. An, K.M. Cho, Y.K. Kim, J.M. An, J.M. Kang, S.S. Lee, H.Kim and H.D. Yun. 2004b. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe.* 10 : 313–319.
- Sievert S.J. and R.D. Shaver. 1993. Carbohydrate and *Aspergillus oryzae* effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76 : 245-254.
- Simpson J.M., B. Martineau, W.E. Jones, J.M. Ballam and R.I. Mackie. 2002. Characterization of Fecal Bacterial Populations in Canines: Effects of Age, Breed and Dietary Fiber. *Microbial Ecology.* 44(2):186-197.
- Singh N., O.P. Nangia, S.L. Garg, J.P. Puri and J.S. Punia. 1988. Establishment of rumen protozoa and bacteria under different management practices in buffalo calves. *Ind. J. Anim. Sci.* 58 : 1315-1326.

- Skillman L.C., P.N. Evans, G.E. Naylor, B. Morvan, G.N. Jarvis and K.N. Joblin. 2004. 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* 10 : 277–285.
- Schloss P.D. 2009. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS ONE* 4 : e8230. doi :10.1371/journal.pone.0008230.
- Stanton T.B. 1984. Glucose metabolism of *Treponema bryantii*, an anaerobic rumen spirochete. *Canadian J. Microbiol.* 30 : 526-531.
- Stern M.D., A. Bach and M.M. Thrunel. 2007. Use of Live Yeast Products to Stabilize Rumen pH. Bucknell Conference 2007.
- Stevenson D.M. and P.J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 : 165-174.
- Stewart C.S. and M.P Bryant. 1988. The rumen bacteria. In : Hobson PN, (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. p527.
- Stewart C., H. Flint and M.P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. *The Rumen Microbial Ecosystem* pp. 10–72. Blackie Academic and Professional, London.
- Stobo I.J.F., J.H.B. Roy and H.J. Gaston. 1966. Rumen development in the calf. I. The effect of diets containing different proportions of concentrates to hay on rumen development. *Br. J. Nutr.* 20 : 171-188.
- Suárez, B.J. 2006. Rumen Development in Veal (Preruminant) Calves. Ph.D. Thesis, Wageningen Institute of animal Science, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands. ISBN : 90-8504-536-3. pp 14.
- Suarez, B. J., C.G. Van Reenen, G. Beldman, J. van Delen, J. Dijkstra and W. J. J. Gerrits. 2006. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets : I. Animal performance and rumen fermentation characteristics. *J. Dairy Sci.* 89 : 4365–4375.
- Sudhakar T.R.S., R.N. Sinha and B. Ranganathan. 1983. Influence of milk and milk substitutes on the types of bacteria in the rumen of buffalo calves. *Indian vet. J.* 60 : 193-198.
- Sultan S., P.K. Gupta, S.S. Kundu, S. Hari and G.N. Lodhi. 2006. Relative digestion, metabolism and microbial activity in sheep and goat on grass-concentrate diet. *Range Management and Agroforestry* 27 (1).
- Sweeney B.C., J. Rushen, D.M. Weary and A.M. de Passillé. 2010. Duration of weaning, starter intake, and weight gain of dairy calves fed large amounts of milk. *J. Dairy Sci.* 93 : 148-152.

- Swinney-Floyd D, B.A. Gardner, T. Rehberger and T. Parrot. 1999. Effects of inoculation with either Propionibacterium strain P-63 alone or combined with *Lactobacillus acidophilus* strain :LZ 53545 on performance of feedlot cattle. J. Anim. Sci. 77 : 77. (Abstract)
- Tajima K., R.I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67 : 2766-2774.
- Tajima K., S. Arai , K. Ogata , T. Nagamine , H. Matsui , M. Nakamura , R.I. Aminov and Y. Benno. 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. Anaerobe 6 : 273-284.
- Tamate H., A. D. McGilliard, N. L. Jacobson and R. Getty. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. J. Dairy Sci. 45 :408-420.
- Thivend P., G. Fonty, J.P. Jouany, M. Durand and Ph. Gouet. 1985. Le fermenteur rumen. Reprod. Nutr. Dévelop. 25 : 729-753.
- Tiret L. 2001. Physiologie de la digestion. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. p69.
- Turnbaugh P.J., R.E. Ley, M.A. Howald, V. Magrini, E.R. Mardis and J.I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444 : 1027–1031.
- Tymensen L.D., K. Beauchemin, and T. McAllister. 2012. Structures of free-living and protozoa-associated methanogen communities in the bovine rumen differ according to comparative analysis of 16S rRNA and mcrA genes Microbiology mic.0.057984-0; published ahead of print April 26, 2012, doi :10.1099/mic.0.057984-0.
- Ushida K., J.P. Jouany. 1994. Fibre digesting capacities of 5 genera of rumen ciliates. Proc. Nut. Physiol. 3 : 168.
- Ushida K., J.P. Jouany and P. Thivend. 1986. Role of rumen protozoa in nitrogen digestion in sheep given two isonitrogenous diets. Br. J. Nutr. 56 : 407-419.
- Vandevoorde L., H. Christianens, and W. Verstraete. 1991. In vitro appraisal of the probiotic value of intestinal lactobacilli. World. J. Microbiol. In addition, Biotechnol. 7 :587
- Varel V.H. and B.A. Dehority. 1989. Cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. Appl. Env. Microbiol. 55 : 148-153.
- Varel V.H. and K.K. Kreikemeier. 1994. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on in situ fiber degradation, ruminal fermentation, and microbial

- protein synthesis in nonlactating cows fed alfalfa or bromegrass Hay. *J. Anim. Sci.* 72 : 1814-1822.
- Vazquez-Anon M., A.J. Heinrichs, J.M. Aldrich and G.A. Varga. 1993. Postweaning Age Effects on Rumen Fermentation End-Products and Digesta Kinetics in Calves Weaned at 5 Weeks of Age. *J. Dairy Sci.* 76 (9) : 2742-2748.
- Waghorn G. C. and C.S.W. Reid. 1977. Rumen motility in sheep and cattle as affected by feeds and feeding. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.*, 37 : 176-181.
- Wallace R.J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition : progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72 : 2992-3003.
- Wallace R.J. and M.A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compound. In : Hobson P.N., (eds.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publishing, New York, 217-249. (p. 527).
- Wallace R.J. and K.N. Joblin. 1985. Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiol Lett.* 29 : 19-25.
- Wallace R.J. and C.J. Newbold. 1993. Rumen fermentation and its application : the development of yeast cultures as feed additives. In : Alltech Technical Publications. *Biotechnology in the Feed Industry*. Nicholasville, Kentucky, U.S.A. Edited by LYONS T. P. p 173-192.
- Wallace R.J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition : progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72 : 2992-3003.
- Wallace R.J., R Nodera and M.A. Cotta. 1997. pp. 283–328. In : HOBSON, P.N. & STEWART, C.S. (eds) *The Rumen Microbial Ecosystem*, Chapman & Hall, London.
- Wang Y. and P.-Y. Qian. 2009. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies, *PLoS ONE* 4 e7401. doi : 10.1371/journal.pone.0007401.
- Ware D. R., P.L. Read and E.T. Manfredi. 1988. Lactation performance of two large dairy herds fed *Lactobacillus acidophilus* strain BT 1386. *J. Dairy Sci.* 71 : 219. (Abstract)
- Weidmeier R.D.M., J. Arambel and J.L. Walters. 1987. Effect the yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70 : 2063-2068.
- Whitford M.F., R.M. Teather and R.J. Forster. 2001. *BMC Microbiol.* 1 : 5. doi : 10.1186/1471–2180–1–5.
- Williams P.E.V. and C.J. Newbold. 1990. Rumen Probiosis : The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In : *Recent*

- Advances in Animal Nutrition, p. 211-227, [D.J.A Cole and W. Haresign]. Butterworths, London, UK.
- Williams P.E.V., C.A.G. Tait, G.M. Innes and C.J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69 : 3016-3026.
- Williams A.G., and G.S. Coleman. 1997. The rumen protozoa. In : Hobson P.N., Stewart C.S. The rumen microbial ecosystem. Second edition, Chapman et Hall, London, 73-139.
- Wise, G. H., and G.W. Anderson. 1939. Factors affecting the passage of liquids into the rumen of the dairy calf. I. Method of administering liquids : drinking from open pail versus sucking through a rubber nipple. *J. Dairy Sci.* 22 : 697-705.
- Wolin M.J., C.S. Stewart and T.L. Miller. 1997. pp. 467–491. In : Hobson, P.N. and Stewart C.S. (eds) *The Rumen Microbial Ecosystem*, Chapman & Hall, London.
- Wozny M.A., M.P. Bryant, L.V. Holdeman and W.E.C. Moore. 1977. Urease assay and urease producing species of anaerobes in the bovine rumen and human feces. *Appl. Environ. Microb.* 33 : 1097-1104.
- Wright A.D.G., X. Ma and N. E. Obispo. 2008. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microb. Ecol.* 56 : 390–394.
- 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. PhD Thesis, Université de Toulouse, France.
- Zened A., S. Combes, L. Cauquil, J.Mariette, C. Klopp, O. Bouchez, A. Troegeler-Meynadier and F. Enjalbert. 2012. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* doi : 10.1111/1574-6941.12011.
- Zhou M., E. Hernandez-Sanabria and L.L. Guan. 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 : 6524–6533.
- Zitnan R., J. Voigt, U. Schonhusen, J. Wegner, M. Kokardova, H. Hagemeister, M. Levkut, S. Kuhla and A. Sommer. 1998. Influence of dietary concentrate to forage ratio on the development of rumen mucosa in calves. *Arch. Anim. Nutr.* 51 : 279-291.
- Zoetendal E.G., A.D.L. Akkermans and W.M. De Vos. 1998. Temperature Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from Human Fecal Samples Reveals Stable

and Host-Specific Communities of Active Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 3854-3859.

Zoedental E.G., C.T Collier, S. Koike, R.I. Mackie and H.R. Gaskins. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota : a review. J. Nutr. 134 : 465-472.

Sites internet

N° 1 : Figure 3 : métabolisme et devenir des protéines dans le système digestif du ruminant : <http://babcock.wisc.edu/node/144> (15/05/2012).

N°2 : Figure 5 : Développement des différents compartiments du tractus digestif du ruminant polygastrique de la naissance à sa maturité : <http://calfcare.ca/calf-feeding/the-calf%E2%80%99s-digestive-system/> (13/01/2012)

N°3 : Figure 10 : Pyroséquençage 454 étapes 2 à 3 et 5 (Site internet de Quigen).

http://www.google.fr/imgres?q=454+pyros%C3%A9quen%C3%A7age+et+lucif%C3%A9ras&um=1&hl=fr&biw=1280&bih=895&tbn=isch&tbnid=JLhw_moicTVOUM:&imgrefurl=http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx%3Fid%3D7454&docid=DD2hIAAPkHI8YM&imgurl=http://www.pyrosequencing.com/graphics/19673.gif&w=266&h=205&ei=JpYOU Mv9Bqac0AXdz4HACA&zoom=1&iact=hc&vpx=1028&vpy=318&dur=1224&hovh=164&hovw=212&tx=66&ty=67&sig=107528729346020319543&page=2&tbnh=164&tbnw=212&start=20&ndsp=25&ved=1t:429,r:9,s:20,i:163 (13/01/2012).

N°4 : Figure 14 : Image en microscopie électronique de *Saccharomyces cerevisiae* (a) et sur milieu gélosé (b)

<http://www.google.fr/imgres?q=levure+saccharomyces+cerevisiae&um=1&hl=fr&sa=N&biw=1280&bih=895&tbn=isch&tbnid=s5LULtJrfwLL1M:&imgrefurl=http://atchimiebiologie.free.fr/pain/pain.html&docid=RO0hrXqgO8clJM&imgurl=http://atchimiebiologie.free.fr/pain/saccharomyces.jpg&w=200&h=200&ei=77UOUI-GJoGn0QWEmIDADw&zoom=1&iact=hc&vpx=432&vpy=540&dur=503&hovh=160&hovw=160&tx=138&ty=70&sig=107528729346020319543&page=1&tbnh=160&tbnw=156&start=0&ndsp=20&ved=1t:429,r:11,s:0,i:107> (13/01/2012)

ANNEXE

REY M., ENJALBERT F., CAUQUIL L., COMBES S. and MONTEILS V. (2011). Evolution of bacterial diversity in the rumen in dairy calves from birth to weaning using a high throughput 454 GS FLX pyrosequencing. In *Advances in Animal Biosciences Volume 2 Part 2. Proceedings of the 8th International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH8)*. September 2011, p. 252. Aberystwyth UK. (oral communication)

Title: Use Times Roman 12 point bold. Only capitalise first letter of first word. Maximum two lines. No full stop at the end of title)

Evolution of bacterial diversity in the rumen in dairy calves from birth to weaning using a high throughput 454 GS FLX pyrosequencing

Summary: Your summary text must use Times Roman 10 point font and **MUST NOT** be longer than this box

Introduction The rumen in adult cow is an important site of fermentations, carried out by a microbial ecosystem that predominantly consists of bacteria. At birth, the calf rumen is sterile and milk is digested in the abomasum and the intestine. The rumen becomes functional later, with solid food intake. In lambs, Fonty et al. 1987 showed that the colonization of the rumen by bacteria begins during the first days of life and is sequential and Bryant et al. 1958 showed the same pattern from the first week of age in the calves. A lack of information persists on the establishment of the bacterial population during the very first days of life of calves, and most previous studies have focused on cultivable bacteria. The aim of this study was to define, using molecular microbiology, the early implantation of the ruminal bacterial population and its evolution until weaning.

Materials and Methods The experiment was carried out on 6 male Prim 'Holstein calves from birth (day 1) to 3 months of age (day 83), before weaning. The calves were separated from their mother at delivery and reared in individual pens. Body weight (BW) of the calves averaged 39.4 ± 1.7 kg and 120.5 ± 16.8 kg at birth and 83 days of age, respectively. A standard feeding program for unweaned calves, using a milk replacer, hay and a pelleted concentrate, was applied. The rumen samples were taken through a stomach tube every day until the 10th day after birth, then every 3 to 5 days to 83 days of age. Characterization of bacteria was achieved using V3 V4 hypervariable regions of the 16S RNA gene by pyrosequencing (454) on 132 samples. After cleaning and alignment, taxonomic assignment were performed using the open-source software Mothur V.1.12.3 (www.mothur.org) and a bacteria database based Silva 96 (1194263 reads). Number of and relative abundance of taxa according to phylum, class and order were analysed using a repeated-measures analysis of variance with a model that included the effects of age, calf and their interaction as fixed effects.

Results The compilation of all samples (e.g. 6 calves and 22 sampling days) showed 430 different taxa. The number of taxa evolved with age ($P < 0.001$). Between 2 and 12 days after birth, the number of taxa increased from 185 to 229 (Figure 1). Between 15 and 43 days of age, the number of taxa decreased from 205 to 144 taxa. After one month of age, the number of taxa was stabilized at an average value of 155 taxa. On the 132 samples, there were 10 different phyla, the major being: Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria (10, 15, 39 and 31%, respectively). Regarding classes, there were 17 different classes, the major being Actinobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Clostridia, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria (11, 10, 9, 27, 9 and 15%, respectively). The importance of some classes changed between 2 and 83 days: Bacilli (from 16 to 8%) and Gammaproteobacteria decreased from 16 to 8% and from 25 to 12%, respectively, whereas Clostridia increased from 17 to 31%. Forty one orders were identified, the major being Actinobacteriales, Bacteroidales, Lactobacillales, Clostridiales, Burkholderiales, Enterobacteriales, Pasteurales and Pseudomonadales (7, 11, 7, 28, 5, 3, 4 and 4%, respectively). Three orders were observed to change between 2 and 83 days: Lactobacillales and Enterobacteriales decreased from 13 to 5% and from 9 to 1%, respectively and Clostridiales increased from 16 to 31% (Figure 2) and showed a strong evolution during the first week.

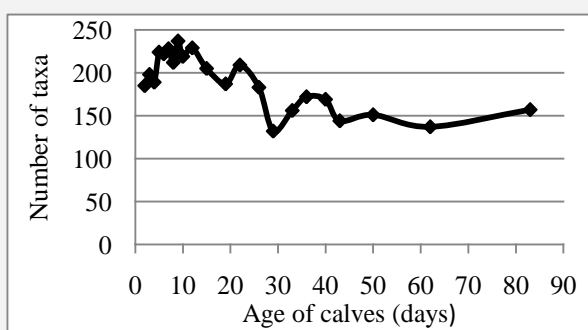


Figure 1. Evolution in the number of taxa according to the age of calves from birth to 83 days

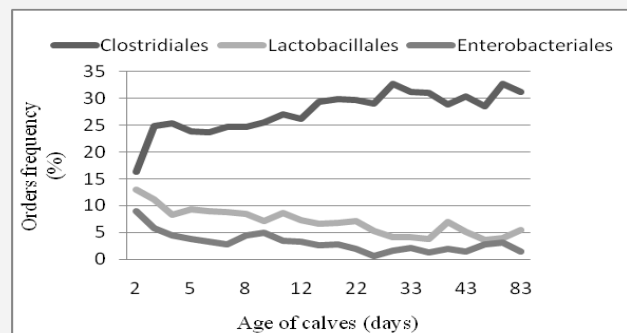


Figure 2. Evolution of 3 dominant orders frequency to the age of calves

Conclusions The use of 454 pyrosequencing showed an evolution of taxonomic diversity with the age of calves. This could be explained by successive steps of bacterial establishment in the rumen of calves from birth to weaning. The first one, between 2 and 30 to 40 days after birth would correspond to the establishment of pioneer species originating from the external environment. During the 2nd step the diversity reached stability, which could relate to an equilibrium between the microbiota and solid food arriving in the rumen.

References

Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J.-P. and Senaud, J. 1987. *Journal of General Microbiology* 133:1835-1843.
Bryant, M. P., Small, N., Bouma, C. and Robinson, I. 1958. *Journal of Dairy Science* 41:1747-1767.

REY M., ENJALBERT F., CAUQUIL L., BOUCHEZ O, S COMBES S. and MONTEILS V. Establishment of archaea in the rumen of dairy calves from birth to weaning using 454 GS FLX pyrosequencing. IIXth INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology. (2012). Clermont-Ferrand, France (Poster).

Establishment of archaea in the rumen of dairy calves from birth to weaning using 454 GS FLX pyrosequencing.

M Rey^{a,b,c}, F Enjalbert^{c,a,b}, L Cauquil^{a,b,c}, O Bouchez^e, S Combes^{a,b,c} and V Monteils^{d,a,b,c}. ^a INRA, UMR 1289 TANDEM, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France, ^b Université de Toulouse, INPT-ENSAT, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France, ^c Université de Toulouse, INPT-ENVT, UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France, ^d Present address: UMR 1213 Herbivores, VetAgro Sup Campus agronomique, F-63370 Lempdes, France, ^eINRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénées F-31326 Castanet-Tolosan, France.

Cow rumen is a complex microbial ecosystem where archaea represent 10^7 to 10^9 cells.ml⁻¹ of ruminal content. At birth, calf rumen is sterile; thereafter, it becomes functional when solid foods intake begins¹. This study aimed at describing the establishment of archaea in the rumen of calf. Six Holstein calves were separated from their mothers at birth (day 1), housed in individual boxes until weaning (day 83) and received a milk replacer, hay and pelleted concentrates. Ruminal samples were taken daily with a stomach tube until the 10th day after birth and then every 3 days. The number of total archaea was determined with a TaqMan qPCR technology². The archaea were characterized using the hypervariable regions (V3, V4 and V5) of the 16S rRNA genes by 454 GS FLX pyrosequencing. The software Mothur V.1.12.3 (www.mothur.org) and the database Silva 96 for archaea were used for alignment of sequences and taxonomical assignment (674,361 sequences observed in 92 samples). From 2 days after birth, archaea were detected in all calves at an average abundance of 8.85×10^4 16S rRNA gene copy number.ml⁻¹. Between 3 and 10 days of age, the archaea were detected sporadically in 4 calves (1.47×10^4 to 9.54×10^5 16S rRNA gene copy number.ml⁻¹). From 12 days of age, archaea reached their maximum abundance in all calves at 4.84×10^6 16S rRNA gene copy number.ml⁻¹ on average. Pyrosequencing revealed 34 taxa, only 15 having a relative abundance over 0.01%. The most abundant were the genera *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera* (83% and 7% relative abundances, respectively), and the family *VadinCA11_gut_group* (*Thermoplasmatales* order) at 9%. The relative abundances of the other taxa ranged between 1 and 0.01%. The archaea population was detected early after birth and was established definitively at 12 days that is before solid food intake begins.

1. Rey, M., *et al.* (2012) Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. *J. Dairy Sci.* 95, 1500-1512.
2. Combes, S., *et al.* (2011) Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol Ecol.* 77, 680-689.

Establishment of archaea in the rumen of dairy calves from birth to weaning using 454 GS FLX pyrosequencing.

M. Rey^{a,b,c}, F. Enjalbert^{b,a}, S. Combes^{a,b}, L. Cauquil^{a,b}, O. Bouchez^c and V. Monteils^{b,a,d,e}.

^a INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; ^b Université de Toulouse INPT ENSAT, INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; ^c INRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénée, F-31326 Castanet-Tolosan, France; Present address: ^d Clermont Université, VetAgro Sup, UMR Herbivores, BP 10448, F-63000, Clermont-Ferrand, France; ^e INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champagnelle, France

OBJECTIF: Describe the temporal sequence of establishment of the archaea population in the rumen in calves from birth (day 1) until weaning (day 83), using tools of molecular microbiology.

MATERIELS et METHODES

Six Holstein calves from birth (day 1) to weaning were housed in individual boxes and received a milk replacer, hay and starter concentrates. A stomach tube was used for the ruminal sampling until the 10th day after birth and then every 3 days. To characterize the archaea population, a TaqMan qPCR and 454 pyrosequencing were used. Mothur software V.1.12.3 and Silva 96 database for archaea were used for alignment of sequences and taxonomical assignment.

RESULTATS

- 674,361 sequences observed in 92 samples.
- From 2 days, archaea were detected in all calves at 8.85×10^4 16S rRNA gene copy number.ml⁻¹.
- Between 3 and 10 days of age, the archaea were detected sporadically in 4 calves (1.47×10^4 to 9.54×10^5 16S rRNA gene copy number.ml⁻¹).
- From 12 days of age, archaea reached their maximum abundance in all calves at 4.84×10^6 16S rRNA gene copy number.ml⁻¹.
- Pyrosequencing revealed 34 taxa, only 15 having a relative abundance over 0.01%. The most abundant were the genera *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera* (83% and 7% relative abundances, respectively), and the family *VadinCA11_gut_group* (*Thermoplasmatales* order) at 9% (figure 1). The other taxa represent < 1% and were composed by more Unclassified.
- From day 9 and day 30 the solid food was intake.

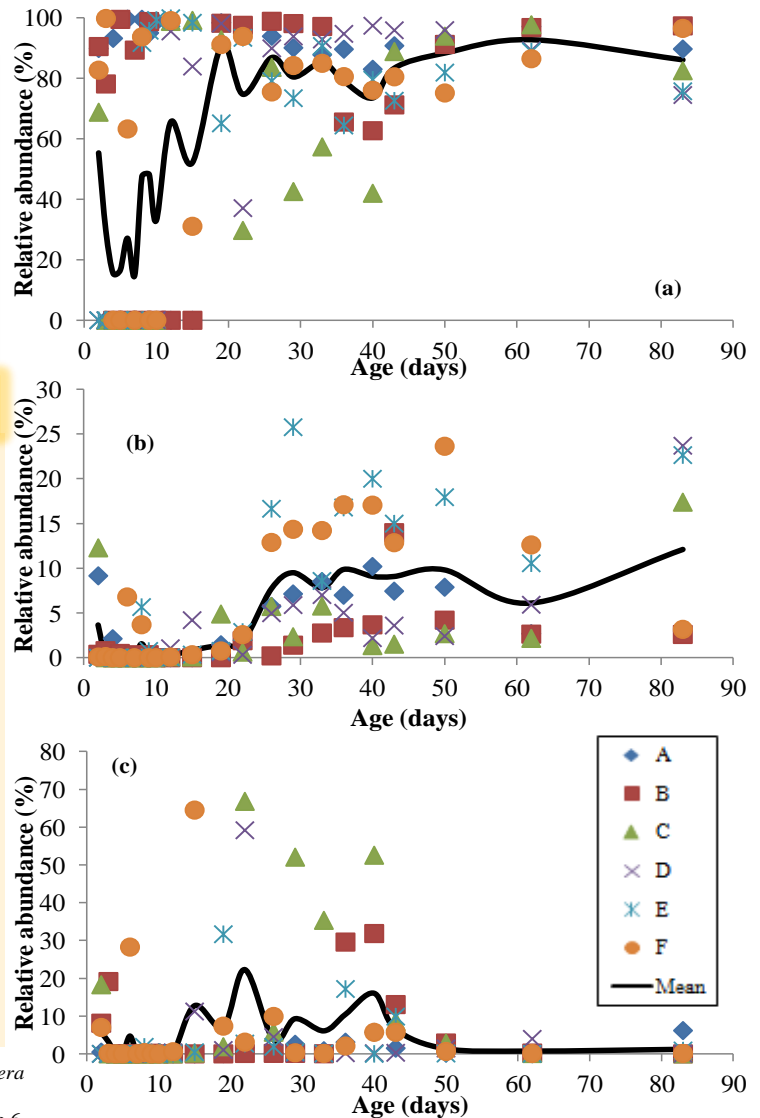


Figure 1: Evolution of ruminal *Methanobrevibacter* (a) and *Methanosphaera* (b) genus and *VadinCA11_gut_group* family (c) relative abundance (%) in calves between 2 and 83 days after birth. (A, B, C, D, E and F represent the 6 calves).

DISCUSSION et CONCLUSION

In calves from birth to weaning, the ruminal archaea population was :

- detected early after birth from 2 days.
- established definitively at 12 days that is before solid food intake begins.

-composed predominantly by *Methanobrevibacter* and *Methanosphaera* genera and *VadinCA11_gut_group* family with a greater relative abundance variability between calves before weaning.

Evolution des paramètres physico-chimiques et fermentaires dans le rumen du veau de la naissance au sevrage



Rey Mickael, Enjalbert Francis et Monteils Valérie



Université de Toulouse, UMR 1289, INRA INP-ENSAT ENV TANDEM, ENSAT, avenue Agrobiopole, Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France
mrey@ensat.fr



INTRODUCTION

Contrairement au rumen de l'adulte (important site de fermentation), le rumen du veau à la naissance est stérile. L'objectif de cette étude était une meilleure compréhension de la mise en place de l'activité fermentaire dans le rumen chez le veau à partir de sa naissance. Les paramètres physico-chimiques (pH et potentiel redox = Eh) et fermentaires (acides gras volatils = AGV) ont été mesurés dans le contenu ruminal du veau. Le pH et le Eh renseignent sur les conditions du milieu. Les AGV sont les produits terminaux des fermentations réalisées par les microorganismes.

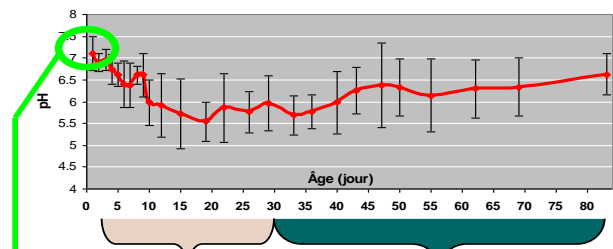
MATERIEL et METHODES

L'essai a porté sur 6 veaux mâles de race Prim' Holstein de la naissance au sevrage (3 mois d'âge). Les trois premiers jours, ils ont été alimentés avec du colostrum. Ensuite, ils ont reçu du lait en poudre en quantité contrôlée, du concentré 1^{er} âge en granulés, du foin et de l'eau à volonté.

Les prélèvements de contenu ruminal ont été effectués par sonde œsophagienne 1h après le repas quotidiennement jusqu'au 10^{ème} jour, puis tous les 3 à 5 jours jusqu'à la fin de l'essai.

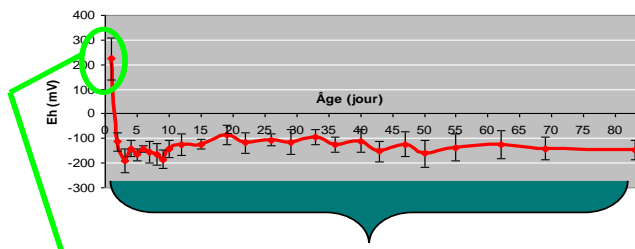
RESULTATS

Figure 1 : Evolution du pH en fonction de l'âge des veaux



- 1^{er} jour**
 - pH neutre
 - Pas de fermentation
- Du 2^{ème} jour à 1 mois d'âge**
 - Le pH s'acidifie
 - Les fermentations débutent et augmentent
- Entre 1 et 3 mois**
 - Le pH augmente.
 - Les AGV totaux se stabilisent

Figure 3 : Evolution du potentiel redox en fonction de l'âge des veaux

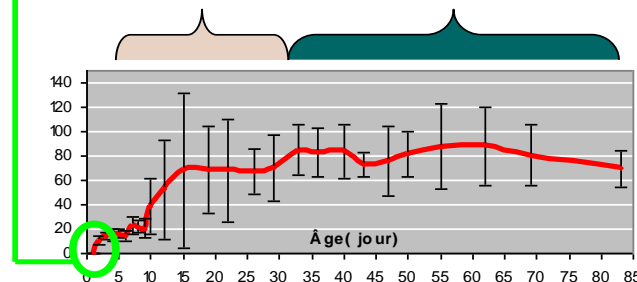


- 1^{er} jour**
 - Eh positif
- Du 2^{ème} jour au 3^{ème} mois**
 - Le Eh est fortement négatif dès le 2^{ème} jour
 - Les jours suivants il est compris entre -100 et -200 mV

Discussion

- Les fermentations ont débuté dès le 2^{ème} jour (Fig. 2).
- La production d'AGV (Fig. 2) est à relier avec la diminution du pH (Fig. 1), et peut être expliquée par la consommation de concentrés, dont la fermentation est connue chez l'adulte pour conduire à un pH ruminal inférieur à 6.
- Le Eh négatif dès le 2^{ème} jour (Fig. 3) met en évidence le caractère réducteur du milieu et traduit la mise en place d'une activité microbienne conduisant à l'anaérobiose.
- Les variations de Eh observées (Fig. 3) peuvent refléter un milieu perturbé et être reliées à l'implantation successive de différents microorganismes.

Figure 2: Evolution des acides gras volatils totaux (mM) en fonction de l'âge des veaux



Pour conclure, nous avons confirmé que le rumen est un milieu non réducteur, neutre et dépourvu de fermentation à la naissance du veau. Dès le 2^{ème} jour, les fermentations se mettent en place et le milieu devient réducteur et anaérobie. De plus, il a été observé une grande variabilité inter-individuelle pour tous les paramètres de l'étude.

Etude par pyroséquençage haut débit (454) de l'implantation des bactéries au niveau du rumen du veau laitier, de sa naissance au sevrage



Rey M., Enjalbert F., Cauquil L., Combes S. et Monteils V.



Université de Toulouse, UMR 1289, INRA INP-ENSAT ENVT TANDEM, ENSAT, avenue Agrobiopole,



Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

mrey@ensat.fr



OBJECTIF

Décrire la séquence temporelle d'implantation de la population bactérienne au niveau du rumen chez le veau, de la naissance jusqu'au sevrage, via des outils de microbiologie moléculaire.

MATERIELS et METHODES

6 veaux Prim' Holstein de la naissance (j1) au sevrage (j83). Prélèvement de contenu ruminal par sonde gastrique, tous les jours entre j1 et j10 ensuite tous les 3 à 5 jours. Caractérisation des bactéries via les régions hypervariables V3-V4 de l'ARNr 16S via 454 GS FLX Pyroséquençeur. Nettoyage, alignement des séquences et affectation taxonomique est réalisé via le logiciel Mothur V.1.12.3 et la base de données Silva 96 (1 194 263 séquences et 430 taxons différents observés sur les 132 échantillons).

RESULTATS

- ☐ Sur les 132 échantillons, 10 phylums différents dont 4 majoritaires : Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes et Proteobacter (respectivement 10, 15, 39 et 31%).
- ☐ 8 genres bactériens sont majoritaires.
- Figure 1a: les genres bactériens présentés apparaissent entre j2 et j10 puis disparaissent.
- Figure 1b: -les genres bactériens présentés apparaissent à j3 pour *Butyrivibrio* et *Ruminococcus* et à j12 pour *Lachnospira*.
- Entre j12 et 1 mois, nous observons une stabilisation pour *Ruminococcus* et une augmentation pour *Butyrivibrio* et *Lachnospira*.
- Après 1 mois, une stabilisation est observée.

Figures 1. Evolution de la distribution bactérienne dans le rumen en fonction de l'âge des veaux : Affiliation taxonomique par genre.

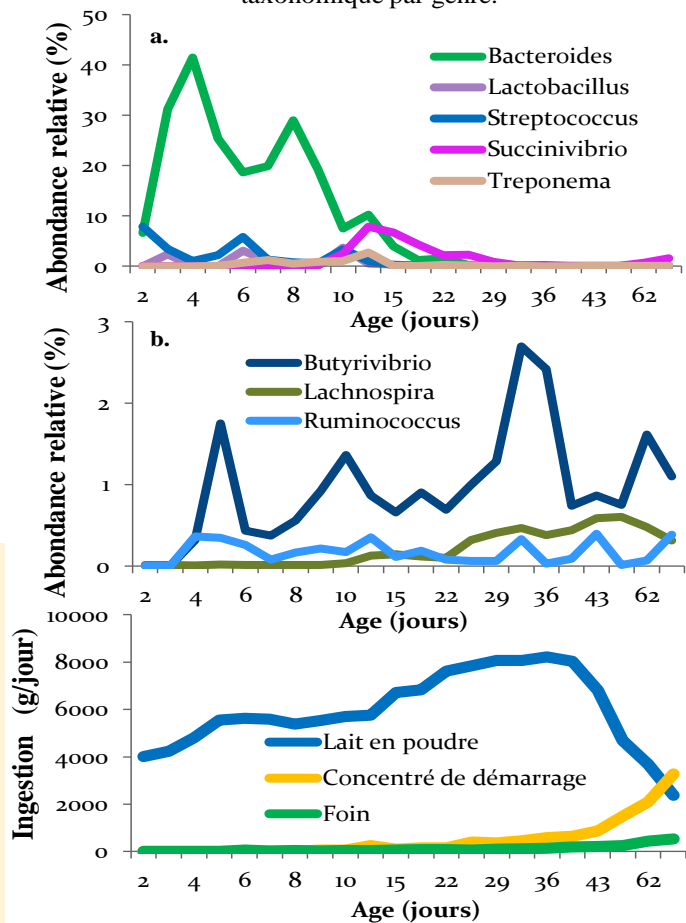


Figure 2. Evolution de l'ingestion de lait en poudre, aliment concentré de démarrage et foin (g de MS/ jour) avec l'âge.

DISCUSSION et CONCLUSION

Implantation des bactéries selon 3 phases :

- 1- j2 à j10: Alimentation lactée uniquement : apparition de nombreux genres bactériens.
- 2- j12 à j30 : Evolution de la populations bactérienne ruminale avec l'arrivée de l'aliment solide (stabilisation, diminution et/ou disparition au niveau des genres) = phase de sélection.
- 3- j30 à j83: Stabilisation de la population bactérienne avec la forte consommation d'aliment solide.

ABSTRACT

The newborn calf has a little and non-functional rumen. During the first months of life, digestive functions establish, in relationship with the colonization by a microbiota mainly composed of bacteria, archaea and protozoa. This study had two objectives: i) characterize and understand the sequence of establishment of ruminal microbiota in calves by molecular biology and counting techniques and describe the appearance of fermentation parameters (VFA and ammonia) and enzyme activities during the pre- and post-weaning periods, ii) define the effect of yeast supplementation on the establishment of the ruminal ecosystem in pre- and post-weaning periods. **On the one hand**, our work confirmed that at birth, calf rumen is devoid of micro-organisms, AGV, xylanase and amylase activities, with a pH close to neutrality and a strongly positive E_h . From 2 to 15 days of age, the rumen is colonized by a complex microbiota dominated by bacteria (*Proteobacteria* and *Bacteroidetes* phyla) and also containing archaea (with mainly the *Methanobrevibacter* genus), and E_h becomes strongly negative. These communities result in the production of fermentation products due to their enzymatic activities. Between 15 days and weaning, with the ingestion of solid food, the composition of rumen microbiota changes to become closer to that of adult ruminants without reaching maturity in terms of densities and relative abundances. At this time, the phylum *Bacteroidetes* is predominant with the *Prevotella* genus. After weaning, slight differences occur on some fermentative parameters such as VFA, probably related to a change in the microbiota that becomes less diversified and more adapted to the degradation of solid food. From 90 days, the establishment of ciliated protozoa in the calf rumen seems conditioned by the proximity with adult animals. From 4 months of age, considering fermentation, enzymatic and taxonomic composition of the microbiota, the ruminal ecosystem tends to be similar to that observed in adult animals. **On the other hand**, our work showed that during the pre-weaning period, the supplementation with live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) results in a lower concentrate intake, an earlier establishment of ciliated protozoa and a higher archaeal community density, but poorly affects the density and diversity of the bacterial community, with the exception of changes in abundances of some minor taxa. Yeast supplementation reduces proteolysis, increases the proportion of acetate and decreases that of propionate. During the post-weaning period, yeast supplemented calves consumed more hay, had a higher archaeal density, but a lower diversity and density of the bacterial community with an increased relative abundance of fiber, protein, starch, pectine degrading bacteria compared to control according to the substrates present in the rumen. These changes are probably related to increases of the xylanolytic activity and the proportion of acetate. Taken together, results obtained in this thesis have improved knowledge and understanding of the establishment of the ruminal ecosystem in the dairy calf in pre- and post-weaning periods, and carried some possibilities to orientate or improve the ruminal establishment for better control of calves rearing.

Keywords: Establishment, microbiota, 454 pyrosequencing, rumen, calves, VFA, ammonia, xylanase, amylase, protease.

RÉSUMÉ

Le veau nouveau-né possède un rumen peu développé et non fonctionnel. Au cours des premiers mois, les fonctions digestives s'établissent, avec l'implantation du microbiote composé majoritairement de bactéries, archées et protozoaires. Les objectifs de ce travail étaient doubles : i) caractériser et comprendre la séquence d'implantation taxonomique des microorganismes du rumen chez le veau par des techniques de biologie moléculaire et de dénombrement, ainsi que la séquence de mise en place des paramètres fermentaires (AGV et ammoniac) et des activités principales enzymatiques chez le veau en périodes pré- et post-sevrage, ii) étudier l'effet de l'addition de levures vivantes sur la mise en place de cet écosystème ruminal en périodes pré- et post-sevrage.

D'une part, nos travaux ont permis de confirmer qu'à la naissance, le rumen chez le veau, est dépourvu de micro-organismes, d'AGV, d'activité xylanase et amylase, avec un pH proche de la neutralité et un E_h fortement positif. La colonisation du rumen se fait dès la naissance, pendant les 15 premiers jours de la vie de l'animal par un microbiote complexe prédominé par les bactéries (phyla *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*) et comprenant aussi des archées (majoritairement *Methanobrevibacter*). En même temps, le E_h devient fortement négatif. Ces communautés entraînent la production de produits fermentaires grâce à leurs activités enzymatiques. Entre 15 jours et le sevrage, avec l'ingestion d'aliments solides, la composition du microbiote du rumen évolue pour se rapprocher de celle de ruminants adultes, sans atteindre pour autant la maturité en termes de densités et abondances relatives. A cette période, le phylum *Bacteroidetes* est majoritaire, avec le genre *Prevotella*. Après le sevrage de légers changements apparaissent sur certains paramètres fermentaires comme les AGV sans doute en raison d'une évolution du microbiote qui devient moins diversifié et plus adapté à la dégradation d'aliments solides. L'apparition, à partir de 90 jours, des protozoaires ciliés dans le rumen semble conditionnée par la présence d'animaux adultes à proximité. A 4 mois d'âge, l'écosystème ruminal tend à devenir proche de celui observé chez les animaux adultes en matière de paramètres fermentaires, activités enzymatiques et composition taxonomique du microbiote.

D'autre part, nos travaux ont permis de conclure que, avant sevrage, une supplémentation en levures vivantes (*Saccharomyces cerevisiae*) diminue l'ingestion de concentrés, conduit à une apparition plus précoce de la communauté des protozoaires et une plus grande densité d'archées, mais a peu d'effets sur la densité et la diversité de la communauté bactérienne, à l'exception de variations d'abondances de quelques taxa mineurs. L'apport de levures entraîne une diminution de la protéolyse, une augmentation de la proportion d'acétate ruminal et une diminution de la proportion de propionate. Au cours de la période post-sevrage, les veaux supplémentés en levures consomment plus de foin et la densité en archées est plus importante alors qu'une réduction de la diversité et de la densité de la communauté bactérienne est observée, mais accompagnée d'une augmentation de l'abondance relative des bactéries dégradant l'amidon, les pectines, les protéines et majoritairement les parois cellulaires en fonction des substrats présents dans le rumen. Ces changements sont probablement à relier aux augmentations de l'activité xylanase et de la proportion d'acétate. L'ensemble des résultats acquis dans ce travail de thèse a permis d'apporter un certain nombre de connaissances et une meilleure compréhension de la mise en place de l'écosystème ruminal chez le veau de race laitière en périodes pré- et post-sevrage, ainsi que quelques pistes pour orienter ou améliorer cette implantation pour une meilleure maîtrise de l'élevage des veaux d'élevage.

Mots clés : Implantation, microbiote, pyroséquençage 454, rumen, veaux, AGV, ammoniac, xylanase, amylase, protéase.