



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

Asma Zened

► To cite this version:

Asma Zened. 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. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT; Institut national agronomique de Tunisie, 2011. Français. NNT : 2011INPT0083 . tel-02807509

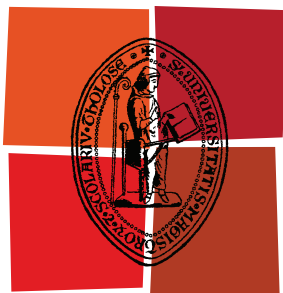
HAL Id: tel-02807509

<https://hal.inrae.fr/tel-02807509>

Submitted on 13 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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 :

Asma ZENED

le : mardi 15 novembre 2011

Titre :

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

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

UMR 1289 INRA-INP/ENSAT-ENV'TANDEM'

Directeur(s) de Thèse :

Francis ENJALBERT

Taha NAJAR

Rapporteurs :

Joël DORÉ

Michel DOREAU

Membre(s) du jury :

Philippe SCHMIDELY

Joël DORÉ

Michel DOREAU

Francis ENJALBERT

Taha NAJAR

REMERCIEMENTS

Voici la fin d'une magnifique expérience scientifique et humaine très riche, pour laquelle j'aimerai remercier toutes les personnes ayant contribué à l'aboutissement de ce projet.

Je remercie vivement Monsieur Joël DORÉ (Unité Ecologie Physiologie Système Digestif, INRA) et Monsieur Michel DOREAU (Unité de Recherche sur les Herbivores, INRA) pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à Monsieur Philippe SCHMIDELY (Sciences de la Vie et Santé, AgroParicTech) pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, Professeur Francis ENJALBERT, pour son encadrement et ses qualités scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de mieux structurer mes idées. Merci d'avoir assuré jusqu'au bout d'excellentes conditions matérielles qui m'ont permis de travailler dans un environnement favorable. Merci pour m'avoir fait confiance jusqu'à la fin de ma thèse et pour m'avoir dirigé sur ce sujet passionnant.

Merci à Monsieur Taha NAJAR, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance et laissé une grande liberté d'action tout au long de ce projet de recherche.

Je suis très reconnaissante envers le gouvernement tunisien et l'INRA qui m'ont attribué une bourse pour réaliser mes travaux.

Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Xavier FERNANDEZ, Directeur de l'UMR TANDEM, et Thierry GIDENNE, animateur de l'équipe NED, pour m'avoir accueillie dans leur équipe et pour m'avoir ouvert la porte de leur laboratoire.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon comité de pilotage pour le temps consacré et les discussions : Pascale MOSONI (Unité de microbiologie, INRA) et Frédéric GLASSER (Unité de Recherche sur les Herbivores, INRA).

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Annabelle TROEGELER-MEYNADIER (UMR TANDEM) qui m'a encadrée tout au long de ma thèse. Merci pour ses conseils, sa disponibilité et son aide. Merci pour ta patience, ta gentillesse et ton efficacité.

Je remercie sincèrement Sylvie COMBES pour l'investissement permanent dont elle a fait preuve dans ce projet. Complice et confidente auprès de qui j'ai trouvé une oreille attentive et toujours de bons conseils. Merci pour son soutien inconditionnel.

Un grand merci à Laurent CAUQUIL. Que dire à part que sans toi une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible. Merci de t'être investi à fond et de m'avoir consacré ton temps si précieux. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Je tiens à remercier Marie Claude NICOT qui m'a transmis son savoir-faire avec une grande générosité et qui a toujours été disponible pour répondre à mes questions.

Merci à Marie-Luce CHEMIT qui m'a appris une infinité de choses. Merci pour sa sympathie et son soutien.

Un grand merci à Yves FARIZON et à Jean-Philippe VERGNES pour leur aide et leur disponibilité. Que de bons moments en votre compagnie.

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à toute l'équipe du Domaine de Borret en particulier, Brigitte SANTA-CRUZ et Caroline DUFRESNE qui m'ont aidée lors des prélèvements, parfois très contraignants. Merci pour leur 'super' boulot et pour tous les efforts qu'elles ont fournis pour me faciliter la tâche.

Un grand merci à tout le personnel de l'UMR TANDEM, qui de près ou de loin a participé à ce travail. En particulier, Béatrice GABINAUD et Muriel SEGURA pour leur patience à m'enseigner les notions essentielles des analyses de laboratoire.

J'adresse également mes remerciements à Viviane BATAILLER pour son aide administrative au cours de ces 3 années.

Merci aux bioinformaticiens (Christine ROUSSEAU et Jérôme MARIETTE) qui m'ont aidée à analyser les données du pyroséquençage, un domaine qui ne relève pas de mes compétences.

Un énorme merci aux futurs thésards, particulièrement Muhammad KALEEM et Yapo Magloire YAPI, avec qui j'ai partagé de bons moments.

Un grand merci à Céline Domange pour sa gentillesse, son soutien, son aide et sa disponibilité. Merci également à Nathalie Priymenko pour sa sympathie.

Merci à tous mes collègues, thésards et stagiaires de l'UMR TANDEM, en particulier, Christine JULIEN, pour son aide et sa disponibilité. Merci à Lionel RAYMOND qui a participé aux analyses d'une partie de ce travail.

Merci à Madame Sabiha (INAT), pour son aide administrative et sa gentillesse.

Dédicaces

Je dédie cette thèse en premier lieu à ma grand-mère. J'aurais tant aimé qu'elle soit encore là pour assister à la fin de cette longue aventure. Je ne doute pas qu'elle aurait été fière de moi.

*A mon papa,
A ma maman,
A ma soeur,*

Merci pour votre soutien tous les jours malgré la distance qui nous sépare. Merci d'avoir toujours cru en moi. C'est à vous que je dédie cette thèse.

A Blaise,

Personne ne sait aussi bien que toi, m'écouter, me comprendre et me donner confiance. Merci d'être là ...si proche de moi et de m'avoir encouragée pour aller de l'avant.

A Celia, Dalia et Valentina,

Auprès de qui j'ai trouvé une oreille attentive et toujours de bons conseils quand j'étais dans une impasse. Merci pour notre belle complicité, merci d'être là quand j'avais besoin de vous, pour votre soutien et votre affection.

A tous mes amis,

Pour leur soutien inconditionnel dans les pires et les meilleurs moments.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THÈSE

PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITÉ DE LECTURE DE RANG A

- Article 1** - Starch plus sunflower oil addition in the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation associated with a decrease of the diversity of ruminal bacterial community (**en préparation, Journal of Dairy Science**). 107
- Article 2** - *In vitro* study of dietary factors affecting the biohydrogenation shift from trans-11 to trans-10 fatty acids in the rumen of dairy cows (**accepté, Animal**). 133
- Article 3** - Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the *in vitro* ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids (**accepté, Journal of Dairy Science**). 159
- Article 4** - Effects of pH and donor cow diet on ruminal linoleic acid Δ^{12} - and Δ^9 -isomerisation (**soumis, British Journal of Nutrition**). 187
- Article 5** - Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets (**en préparation, Environmental Microbiology**). 199
- Article 6** - Trans11 to trans10 shift of fatty acids ruminal biohydrogenation is associated with changes of rumen microbiota evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing (**en préparation, ISME Journal**). 233
- Article 7** - Effects of natural and synthetic vitamin E on ruminal and milk fatty acid profiles in cows receiving high starch high fat diets (**en préparation, Livestock Science**). 265

COMMUNICATIONS LORS DE CONGRÈS ET JOURNÉES D'ANIMATION

1. A. Zened, S. Combes, L. Cauquil, J. Mariette, C. Rousseau, C. Klopp, A. Troegeler, F. Enjalbert (2011). **The ruminal level of *trans*-10 fatty acids of dairy cows is linked to the composition of the bacterial community.** FEMS - 4th Congress of European Microbiologists, Genève, Suisse (*Poster*).
2. A. Zened, S. Combes, L. Cauquil, F. Enjalbert, A. Troegeler (2011). **Ruminal bacterial community change in response to diet-induced variation of ruminal *trans*-10 fatty acids.** FEMS - 4th Congress of European Microbiologists, Genève, Suisse (*Poster*).
3. L. Cauquil, J. Mariette, C. Rousseau, A. Zened, F. Enjalbert, A. Troegeler, C. Klopp, S. Combes (2011). **From high throughput 454 GS FLW data analysis process of 16S RNA gene sequences using barcoding to bacterial community exploration.** FEMS - 4th Congress of European Microbiologists, Genève, Suisse (*Poster*).
4. A. Zened, S. Combes, L. Cauquil, A. Troegeler, F. Enjalbert (2011). **La composition de la communauté bactérienne est liée au % d'acides gras *trans*-10 dans le rumen.** Journée d'animation transversale inter-départements PHASE et MICA de l'INRA (Séminaire : Nutrition et Ecosystème Microbien digestif), Tours, France (*Présentation orale*).
5. S. Combes, L. Cauquil, A. Zened, J. Mariette, C. Klopp, C. Rousseau, F. Enjalbert (2011). **How the composition of the rumen fluid microbiota relates to the physicochemical parameters of the lipid biohydrogenation process?** 3rd StatSeq workshop, Toulouse, France (*Poster*).
6. A. Zened, A. Troegeler-Meynadier, M.C. Nicot, F. Enjalbert (2010). **Le ratio entre acides gras *trans*-10 et *trans*-11 obtenu *in vitro* reflète les valeurs *in vivo* et dépend principalement de la flore de la vache donneuse.** Journée de l'école doctorale SEVAB, Toulouse, France (*Poster*).

7. A. Zened, A. Troegeler-Meynadier, M.C. Nicot, F. Enjalbert (2009). **The ruminal ratio of *trans*-10/*trans*-11 fatty acids obtained *in vitro* reflects *in vivo* values and strongly depends on the diet of the donor cow**. International Symposium on Ruminant Physiology, Clermont-Ferrand, France, pp.420 (*Poster*).

SOMMAIRE

Remerciements	3
Publications scientifiques et communications issues de la thèse	7
Sommaire	11
Liste des tableaux	17
Liste des figures	19
Liste des abréviations	21

INTRODUCTION GÉNÉRALE	23
------------------------------	----

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	29
------------------------------	----

Chapitre 1-Ecosystème microbien ruminal	31
--	----

I. Milieu ruminal : Paramètres physico-chimiques et produits de digestion des aliments	32
---	----

1. Conditions du milieu ruminal	32
a. Humidité	32
b. Température	33
c. Anaérobiose	33
d. pH	33
e. Potentiel d'oxydo-réduction	34
2. Digestion des aliments dans le rumen	34
a. Dégradation des glucides	34
b. Dégradation des protéines	35
c. Digestion des lipides	35
	32

II. Microbiote ruminal	36
	32

1. Bactéries ruminales : Capacités métaboliques des espèces majeures cultivées	36
--	----

2. Facteurs de variation du microbiote ruminal	40
a. Variabilité entre espèces hôtes et entre individus	40
b. Variabilité spatiale	41
c. Variabilité liée à l'alimentation	42
Chapitre 2-Méthodes d'étude de la communauté bactérienne du rumen	44
I. Choix du gène cible	44
II. Techniques microbiologiques	46
1. Hybridation moléculaire	49
2. Empreintes moléculaires	49
3. Séquençage	53
III. Interprétation des données : Appréhension de la diversité bactérienne	56
1. Notion d'espèce en microbiologie	56
2. Caractérisation de la communauté bactérienne	57
3. Bioinformatique au service de la taxonomie	58
Chapitre 3-Métabolisme ruminal des acides gras	60
I. Lipides et acides gras	60
1. Nomenclature et analyse des acides gras	60
2. Nature et source des lipides de la ration	61
II. Digestion ruminale des lipides et leur devenir dans l'organisme	62
1. Lipolyse	62
2. Biohydrogénation des acides gras insaturés	63
a. Biohydrogénation de l'acide linoléique	64

b. Biohydrogénation de l'acide α -linoléique	65
c. Bactéries impliquées dans la biohydrogénation	67
3. Absorption intestinale	69
4. Métabolisme mammaire	69
 III. Facteurs de variation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique	 70
	66
1. Facteurs de variation de l'efficacité globale de la biohydrogénation	71
a. Composition de la ration en fourrages et en concentrés	71
b. Effet d'une supplémentation lipidique	72
c. Autres facteurs de variation	73
2. Facteurs de variation du ratio t10 /t11	74
a. Effet du ratio fourrages / concentrés sans addition de matières grasses	74
b. Effet du ratio fourrages / concentrés avec addition de matières grasses	75
c. Autres facteurs de variation	79
 ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	 83
 Matériels et méthodes communs	 87
 I. Méthodes expérimentales : présentation des protocoles	 87
1. Première étape : Détermination des modalités de passage de la voie t11 à la voie t10 de la biohydrogénation ruminale des acides gras polyinsaturés <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	87
a. Essai <i>in vivo</i> (Articles 1, 5 et 6)	87
b. Essais <i>in vitro</i> (Articles 2, 3 et 4)	90
2. Deuxième étape : Maîtrise de la déviation de la voie t11 à la voie t10 de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique par addition de vitamine E <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> (Article 7)	94
a. Pré-essais <i>in vitro</i>	94

b. Essai <i>in vivo</i>	96
c. Essai <i>in vitro</i>	97
II. Méthodes analytiques : acides gras et communauté bactérienne	97
1. Dosage par chromatographie en phase gazeuse des acides gras dans les matières premières des rations des vaches et des substrats d'incubation, et dans les échantillons obtenus <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	98
a. Préparation des échantillons	98
b. Extraction-méthylation des acides gras	98
c. Analyse chromatographique	100
2. Analyse de la communauté bactérienne des contenus ruminiaux et des cultures <i>in vitro</i>	101
a. Extraction des ADN totaux	101
b. Électrophorèse capillaire du polymorphisme de conformation simple brin	101
c. Pyroséquençage 454 GS FLX : Analyse des séquences d'ANDr 16S	103
 Article 1 - Starch plus sunflower oil addition in the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation associated with an alteration of the diversity of ruminal bacterial community	107
 Annexe 1 – Effet de la ration des vaches sur l'évolution diurnale des valeurs de pH et de potentiel redox ruminal	129
 Article 2 - <i>In vitro</i> study of dietary factors affecting the biohydrogenation shift from trans-11 to trans-10 fatty acids in the rumen of dairy cows	133
 Article 3 - Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the <i>in vitro</i> ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids	159
 Article 4 - Effects of pH and donor cow diet on ruminal linoleic acid Δ^{12} - and Δ^9 -isomerisation	187

Article 5 - Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets	199
Annexe 2 – Effet du jour de prélèvement sur les populations bactériennes	231
Article 6 - Trans11 to trans10 shift of fatty acids ruminal biohydrogenation is linked to changes of rumen microbiota evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing	233
Annexe 3 – Evolution temporelle des populations bactériennes corrélées aux isomères <i>trans</i> -10 ou <i>trans</i> -11 à partir de la distribution de la ration enrichie en amidon et en huile	261
Annexe 4 - The ruminal level of <i>trans</i> -10 fatty acids of dairy cows is linked to the composition of bacterial community	263
Article 7 - Effects of natural and synthetic vitamin E on ruminal and milk fatty acid profiles in cows receiving high starch high fat diets	265
DISCUSSION GÉNÉRALE	291
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	301
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	307

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition du rumen de la vache	32
Tableau 2. Fonctions <i>in vitro</i> des bactéries cultivables isolées du rumen	38
Tableau 3. Les différentes divisions bactériennes présentes dans la phase liquide, solide et dans l'épithélium du rumen	41
Tableau 4. Comparaison des méthodes d'empreintes moléculaires pour l'étude des écosystèmes microbiens	48
Tableau 5. Pourcentage moyen des principaux acides gras trans dans les flux omasal ou duodenal	75
Tableau 6. Variation du ratio t10/ t11 dans l'omasum, le flux duodénal ou dans le lait	77
Tableau 7. Ingrédients et composition chimique des régimes administrés aux vaches	88
Tableau 8. Schéma expérimental de l'essai <i>in vivo</i> (carré latin 4×4)	89
Tableau 9. Ingrédients des substrats utilisés <i>in vitro</i> (Article 2)	90
Tableau 10. Ingrédients des substrats utilisés <i>in vitro</i> (Article 3)	92
Tableau 11. Volumes de réactifs utilisés pour la réalisation de la PCR	102
Tableau 12. Paramètres des réactions de la PCR	102
Tableau 13. Effet du jour de prélèvement (J), de l'addition d'amidon (A) et d'huile (H) dans la ration des vaches, et leurs interactions	232
Tableau 14. Observations de nos études <i>in vivo</i> et enzymatiques	295

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les différentes régions de la l'ARNr 16S	45
Figure 2. Full cycle rRNA approach	47
Figure 3. Principe de la CE-SSCP	50
Figure 4. Exemple d'un profil CE-SSCP	50
Figure 5. Technologie GS FLX 454	55
Figure 6. Biohydrogénation de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2)	65
Figure 7. Biohydrogénation de l'acide α -linoléique (c9,c12,c15-C18:3)	66
Figure 8. Les principaux effets de l'alimentation sur les trois étapes de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2)	71
Figure 9. Evolution du pourcentage de c9,c12-C18:2 (/ acides gras totaux), du pH et du ratio t10/t11 dans des contenus ruminiaux mis en culture soit avec un substrat riche en amidon et un tampon à pH 5,5 (A) soit avec un substrat riche en fibres et un tampon à pH 7,0 (F), en fonction de la durée d'incubation	95
Figure 10. Extraction-méthylation des acides gras	99
Figure 11. Pipeline développé pour le nettoyage et l'analyse des séquences	104
Figure 12. Effet de la ration (T : témoin, A : riche en amidon, H : riche en huile, AH : riche en amidon et en huile) sur l'évolution du pH ruminal	130
Figure 13. Effet de la ration (T : témoin, A : riche en amidon, H : riche en huile, AH : riche en amidon et en huile) sur l'évolution du potentiel redox (Eh) du contenu ruminal	131
Figure 14. Evolution des populations bactériennes corrélées aux t11 totaux au cours de l'adaptation à la ration enrichie en amidon et en huile	261
Figure 15. Evolution des populations bactériennes corrélées aux t10 totaux au cours de l'adaptation à la ration enrichie en amidon et en huile	262

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment-Lengh Polymorphism
AG	Acide gras
AGI	Acides gras insaturés
AGL	Acide gras libres
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AGS	Acides gras Saturés
AGV	Acides gras volatils
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARN/RNA	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BH	Biohydrogénation
c	cis
c9-C18:1	Acide oléique
c9,c12-C18:2	Acide linoléique
c9,c12,c15-C18:3	Acide α -linolénique
CE-SSCP	Capillary Electrohoresis- Single Strand Conformation Polymorphism
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
C2	Acide acétique/acétate
C3	Acide propionique/propionate
CLA	Acide linoléique conjugué
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
Eh	Potentiel redox
FISH	Fluorescent in Situ hybridization
LDL	Lipoprotéines à basse densité
HDL	Lipoprotéines à haute densité
HGT	Hydrogénotrophie
HPLC	High performance liquid chromatography
MG	Matière grasse
MS (I)	Matière sèche (ingérée)
OTU	Operational Taxonomic Unit

PCR	Polymerase Chain Reaction
SSH	Suppressive soustractive hybridization
t	trans
TB	Taux butyreux
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TTGE	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
t10	trans 10
t11	trans 11

Abréviations des noms des régimes et des substrats utilisés

T	Ration Témoin
H	Ration Huile
A	Ration Amidon
AH	Ration Amidon + Huile
C	Control diet (Ration Témoin)
HS	High starch diet (Ration Amidon)
O	Oil diet (Ration Huile)
HS + O	High Starch + Oil diet (Ration Amidon + Huile)
Cs	Control substrate
HSs	High Starch substrate
LAs	Linoleic Acid substrate
HS + LAs	High starch + Linoleic Acid substrates
LSLF	Low Starch Low Fat (Ration Témoin)
HSHF	High Starch High Fat (Ration Amidon + Huile)
LS	Low Starch (Ration Témoin)
LSO	Low Starch + Oil (Ration Huile)
HS	High starch (Ration Amidon)
HSO	High starch + Oil (Ration Amidon + Huile)
LSLA	Low Starch Linoleic Acid
HSLA	High Starch Linoleic Acid
LSLnA	Low Starch Linolenic Acid
HSLnA	High Starch Linolenic Acid

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

La matière grasse fait partie des composants majeurs du lait et constitue un des déterminants de sa qualité nutritionnelle, organoleptique, technologique et économique. Du fait de l'accroissement des maladies humaines liées à la consommation de matière grasse, un intérêt croissant est désormais porté aux qualités nutritionnelles des produits laitiers car ils représentent près d'un quart des apports lipidiques journaliers (CNIEL, 2009). D'autre part, la combinaison de plusieurs facteurs techniques, économiques ou nutritionnels a contraint la filière production laitière à réduire la production de matière grasse, et à modifier sa composition pour répondre aux questionnements de santé humaine.

Ainsi, les orientations scientifiques en jeu visent à réduire la proportion des acides gras saturés (AGS) ayant 12 à 16 carbones, tout comme celle de certains acides gras (AG) monoènes de configuration *trans*, ces deux groupes étant des facteurs de risque de maladies cardio-vasculaires (AFSSA, 2007). Inversement, l'augmentation de certains AG possédant potentiellement des effets bénéfiques pour la santé humaine est privilégiée (Williams., 2000). Parmi ces AG, les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA), dont les produits issus des ruminants sont des sources importantes dans l'alimentation humaine, ont attiré depuis une dizaine d'années l'attention des nutritionnistes et font actuellement l'objet de nombreuses recherches, en raison de leurs effets potentiels anticarcinogènes, immuno-modulateurs et anti-adipogènes (Bessa et al., 2000; Roche et al., 2001; Pariza et al., 2001). Cependant, tous les CLA ne sont pas équivalents. Par exemple, l'isomère c9,t11-CLA diminue le rapport cholestérol LDL / cholestérol HDL chez l'homme, au contraire de son isomère t10,c12-CLA (Tricon et al., 2004). Ce dernier pourrait entraîner des effets secondaires, principalement un diabète insulino-résistant (Clément et al., 2002) voire même être proathérogène ou procarcinogène chez l'animal de laboratoire. Enfin, les AG de la série oméga 3 sont aussi associés à des effets positifs pour la santé, plus particulièrement pour ce qui concerne la prévention des maladies cardiovasculaires (Bhatnagar et Durrington, 2003; Din et al., 2004).

La matière grasse est le composant le plus variable du lait, d'un point de vue quantitatif et qualitatif. Sa composition et sa production dépendent principalement de facteurs animaux (Palmquist et al., 1993) ou environnementaux, parmi lesquels l'alimentation constitue le levier le plus efficace et facile à mettre en œuvre (Palmquist et al., 1993; Chilliard et al., 2003; Ashes et al., 1997). Dans les exploitations laitières, le pourcentage de concentré et la supplémentation lipidique sont des facteurs techniquement maîtrisables et couramment utilisés pour augmenter la densité énergétique des rations destinées à des animaux en début de lactation et aux fortes productrices dont les besoins nutritionnels sont très élevés. Chez les vaches laitières, l'influence de ces facteurs sur la production et la composition du lait a été

bien étudiée et plusieurs revues exhaustives ont été publiées (Palmquist et al., 1993; Kennelly et al., 1996; Chilliard et Ferlay., 2004). Ces revues montrent que l'augmentation du pourcentage de concentrés au-delà de 50% de la matière sèche (MS) de la ration accroît la production laitière, mais elle est souvent accompagnée d'une chute du taux butyreux (TB) et d'une augmentation de la part des AG longs au détriment des AG à chaîne moyenne dans la matière grasse du lait. La supplémentation lipidique, elle, a peu d'effet sur la production laitière, mais elle provoque souvent des réductions du TB.

La diminution du TB observée lors de l'utilisation de rations riches en concentré et/ou en lipides est surtout une conséquence d'une synthèse réduite de matière grasse dans la mamelle. Les causes de cette réduction sont multiples et liées aux modifications de l'environnement ruminal provoquées par ce type de régime (Bauman et Griinari., 2000). Les AG longs polyinsaturés (AGPI) d'origine alimentaire, ainsi que des AG de configuration *trans* (intermédiaires du métabolisme ruminal des AGPI) peuvent être captés par la glande mammaire et diminuent la synthèse des AG à chaîne courte ou moyenne (Bauman et Griinari., 2000; Barber et al., 1997; Griinari et al., 1998). Par ailleurs, l'infusion post-ruminale de mélange d'isomères *trans* du C18:1 (Romo et al., 1996) ou de t10,c12-CLA (Baumgard et al., 2000) a confirmé que ces AG, principalement le t10,c12 -CLA, sont des puissants inhibiteurs de la synthèse de matière grasse par la mamelle.

Chez la vache, la combinaison d'apports lipidiques et de pourcentages élevés de concentrés dans la ration induit les plus fortes variations de teneur en matière grasse du lait en relation avec une modification importante du profil en AG. Les lipides apportés par les huiles représentent une forme d'apport pratique en recherche, et pour laquelle il existe beaucoup de données sur leurs effets sur la composition en AG du lait mais peu d'études se sont intéressées aux variations du métabolisme ruminal à l'origine des isomères t11 et t10. La production de ces isomères se fait selon deux voies distinctes au cours de la biohydrogénation des AGPI par les bactéries ruminales. En raison de leurs potentiels effets sur la santé humaine ainsi que sur la production laitière des vaches, il est d'intérêt de bien connaître les facteurs conduisant vers l'une ou l'autre voie, afin de limiter l'apport des AG t10 et augmenter celle des AG t11.

Cette thèse propose donc une étude des modes d'action des facteurs alimentaires connus pour induire une augmentation des AG t10 au détriment des AG t11 dans le lait sur la biohydrogénation ruminale des AGPI. En effet, cette déviation de la voie t11 à la voie t10

peut être la conséquence d'une modification du microbiote ruminal et/ou d'une modification de l'activité des bactéries. Ces différents niveaux d'action seront explorés *in vivo* et *in vitro*. Enfin, une seconde expérimentation étudiera la possibilité d'utiliser des additifs alimentaires pour éviter cette déviation.

La première partie de ce document est consacrée à l'étude bibliographique qui rappelle dans un premier temps le fonctionnement du rumen ensuite les techniques d'étude du microbiote et décrit enfin le métabolisme ruminal des acides gras et ses facteurs de variation. Dans une deuxième partie, après une présentation des objectifs et des moyens mis en œuvre pour y répondre, les résultats des différentes études seront présentés sous forme d'articles scientifiques, complétés d'annexes.

ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 - Écosystème microbien ruminal

L'appareil digestif du ruminant peut être considéré comme stérile à la naissance. La colonisation du tube digestif, en particulier du rumen, va se réaliser progressivement avec l'installation successive de différentes populations de micro-organismes dans un ordre bien défini (Fonty et al., 1987; Krause et al., 1999). En se développant, l'écosystème se complexifie jusqu'à atteindre un état d'équilibre dynamique. Il s'agit d'un état pour lequel l'écosystème est capable de s'autoréguler pour maintenir ses fonctions par ajustements incessants des populations microbiennes, un écosystème ne peut être stable (Lévêque, 2001).

Chez la vache adulte, le rumen pèse environ 100 kg (McDonald et al., 1981). Il se subdivise en plusieurs poches : ventrale, dorsale, caudo-ventrale et caudo-dorsale. La muqueuse du rumen est plissée et couverte de papilles aplaties plus ou moins denses. La densité et la taille de ces papilles sont liées à la stratification du digesta : les papilles les plus hautes et les plus nombreuses sont au contact de la phase liquide, et au niveau du sac dorsal les papilles sont peu nombreuses et petites. Le contenu du rumen n'est pas homogène, on distingue 3 phases : la phase liquide dans la partie ventrale qui contient les fines particules alimentaires et le liquide ruminal, la phase solide dans la partie intermédiaire essentiellement composée de grosses particules et de gaz et la phase gazeuse dans la partie dorsale du rumen (Welch., 1982).

Le microbiote ruminal constitue l'une des particularités de la digestion des ruminants. Sa composition varie en fonction des changements des conditions du milieu ruminal. La compréhension des mécanismes de variations de la population microbienne est indispensable pour optimiser les performances du ruminant. Une véritable symbiose existe entre le ruminant et son microbiote, les micro-organismes permettant la digestion de la cellulose, et l'apport de protéines d'origine microbienne.

I. Milieu ruminal : Paramètres physico-chimiques et produits de digestion des aliments

Le tableau 1 présente les paramètres physico-chimiques du contenu total ruminal d'une vache.

Tableau 1. *Composition du rumen de la vache*
D'après Clarke et Bauchop., (1977), Uden et Van Soest., (1982)

Quantités dans le rumen de la vache	
Eau	82-90%
Taille moyenne des particules (μm)	2290
Acides (mM)	
acétique	66
propionique	23
butyrique	20
lactique	<7
Ammoniaque (mM)	8-9

1. Conditions du milieu ruminal

Le développement et l'activité des micro-organismes du rumen sont directement dépendants des conditions physicochimiques du milieu.

a. Humidité

L'humidité est en moyenne de l'ordre de 85%; néanmoins cette valeur est variable en fonction des apports hydriques réalisés par les aliments, l'eau de boisson et la salive, qui vont constituer principalement la phase liquide du contenu ruminal. Celle-ci est caractérisée par une pression osmotique comparable à celle du sang et comprise entre 200 et 400 mosm/l chez l'animal sain. L'eau du rumen représente une masse importante en quantité et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme (Brugère, 1983).

b. Température

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

c. Anaérobiose

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

La teneur en dioxyde de carbone est toujours élevée (60% de la poche des gaz), celle en CH₄ est en moyenne de 27%, 7% en N₂, et 0,2% en H₂ (Tiret., 2001). La majeure partie est éliminée par éructation et une partie est incorporée dans divers métabolismes bactériens.

d. pH

La valeur du pH du rumen est comprise dans une large gamme, entre 5.5 et 7.3. En effet, un pH du rumen considéré normal ne correspond pas forcément à la neutralité (7.0) au sens physico-chimique du terme puisqu'au cours de la digestion, il apparaît des acides gras volatils (AGV) rendant le milieu acide. Le pH du rumen peut varier sans qu'il y ait de troubles, et la cause de variation la plus importante est constituée par les apports de substrats alimentaires induisant notamment d'importantes variations nyctémérales. De ce fait, le pH joue un rôle prépondérant dans la sélection des micro-organismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. Les éléments responsables des fluctuations de pH du rumen sont, pour les acides : les AGV et l'acide lactique produits lors des fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates, ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse ou de l'uréolyse. Le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates apportés

par la salive (un bovin adulte sécrète chaque jour environ 100 litres de salive), dont la sécrétion dépend en grande partie de l'alimentation (Brugère, 1983).

e. Potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel redox (Eh) d'un rumen sain et en fonctionnement est négatif et varie de – 150 mV à – 260 mV lorsqu'il est mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène (Marden et al., 2005). Les micro-organismes du rumen maintiennent le caractère très réducteur de ce milieu par leurs activités fermentaires (Baldwin et Emery., 1960). Les valeurs négatives du Eh enregistrées dans le rumen traduisent le caractère hautement réducteur de ce milieu appauvri en oxygène, bien que quelques auteurs (Czerkawski, 1969; Hillman et al., 1985) aient mis en évidence la présence d'air ou d'oxygène dans le rumen, qui pénètre lors de l'ingestion des aliments, lors de la mastication mérycique et avec l'eau de boisson.

2. Digestion des aliments dans le rumen

La digestion résulte de l'activité des micro-organismes du rumen.

a. Dégradation des glucides

La dégradation des glucides par les micro-organismes du rumen est relativement simple malgré la grande diversité des substrats d'origine glucidique. Les glucides complexes sont d'abord hydrolysés en glucides simples (les oses), principalement du glucose, du fructose, du xylose et des acides uroniques. Durant l'hydrolyse, les micro-organismes s'attachent aux particules alimentaires et sécrètent des enzymes qui permettent de rompre les liaisons entre les oses simples qui composent les polymères complexes, libérant ainsi des unités de glucides simples ou oses (Jouany et al., 1995). Les oses sont ensuite fermentés par les micro-organismes du rumen et vite métabolisés afin de produire de l'ATP nécessaire au métabolisme microbien (Jouany, 1994). La fermentation est réalisée en deux étapes consécutives : la transformation des oses simples en acide pyruvique suivie d'une transformation de l'acide pyruvique en acides gras volatils (AGV) qui sont absorbés à travers l'épithélium ruminal et constituent la principale source d'énergie pour l'animal (Jouany et al., 1995). Chez les ruminants, la proportion des différents AGV produits dans le rumen varie en fonction du régime alimentaire de l'hôte. D'une manière générale, un aliment riche en cellulose conduit à

une production majoritaire d'acide acétique (C2) qui peut représenter en moyenne jusqu'à 70% des AGV produits, en pourcentage molaire, le propionate (C3) près de 20% et le butyrate environ 10% alors qu'une ration riche en amidon aboutit à une augmentation de la proportion de C3 qui peut atteindre 30% (Andersen et al., 1999).

b. Dégradation des protéines

Chez les ruminants, la protéolyse est due aux bactéries et aux protozoaires. Environ 30% à 50% des bactéries isolées du rumen sont capables de lyser les protéines solubles (Wallace et al., 1997). La particularité des protozoaires est qu'ils lysent essentiellement les protéines insolubles (Ushida et Jouany., 1985). La dégradation des protéines se fait en étapes successives : chaque réaction permet de réduire la taille du peptide utilisé. Les acides aminés sont alors soit désaminés par des espèces bactériennes spécifiques (Wallace et al., 1997), soit directement incorporés par les micro-organismes pour former leurs propres protéines. La désamination conduit à la formation de corps carbonés résiduels et d'ammoniaque. La désamination de certains acides aminés ramifiés comme la leucine, l'isoleucine et la valine conduit à la formation d'AG ramifiés : respectivement, l'acide isovalérique, l'acide 2-méthylbutyrique et l'acide isobutyrique. Ces acides aminés sont d'une importance capitale car ils servent de facteurs de croissance aux bactéries cellulolytiques (Bryant et Robinson., 1963). Les micro-organismes utilisent préférentiellement l'ammoniaque aux acides aminés libres comme source d'azote (Jouany et al., 1995).

c. Digestion des lipides

Les lipides sont en général apportés dans la ration sous forme estérifiée, soit sous forme de triglycérides dans les aliments concentrés, soit sous forme de glycolipides et de phospholipides dans les fourrages verts. Des formes spécifiques comme les savons d'AG ou des AG libres (AGL) sont présentes dans certains produits commerciaux. Les glycérides sont hydrolysés grâce aux bactéries lipolytiques. De cette hydrolyse résultent des AG qui vont alors subir des transformations très diverses par d'autres micro-organismes. Dans le rumen, les principales transformations des AG sont : l'isomérisation, l'hydrogénation et l'hydratation (Van de Vossenberd et Joblin., 2003). Environ 80% à 92% des acides linoléiques et linoléniques sont hydrogénés dans le rumen (Doreau et Ferlay, 1994). Après être sortis du rumen, les AG seront digérés grâce aux enzymes pancréatiques dans l'intestin grêle puis

absorbés. Le degré de saturation des AG a des conséquences directes sur la nutrition et la santé des consommateurs de produits issus de ruminants. En effet, il a été montré, chez l'Homme, que les AGS (acides laurique, myristique et palmitique) ont un rôle pro-carcinogène et pro-athérogène alors que les insaturés (acides oléique, polyinsaturés oméga 3) ont un rôle anti-carcinogène et anti-athérogène (Williams, 2000).

II. Microbiote ruminal

Le rumen de la vache abrite 10^{10} à 10^{11} bactéries, 10^7 à 10^9 Archaea, 10^8 à 10^9 protozoaires (ciliés et flagellés), 10^3 - 10^5 zoospores de champignons et 10^9 à 10^{10} particules virales par millilitre (Klieve et Swain, 1993). Les bactéries constituent la fraction majoritaire de la microflore digestive (50 % de la biomasse microbienne, Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Toutefois, cette densité bactérienne varie en fonction des individus au sein d'une même espèce hôte mais aussi en fonction de la technique d'estimation utilisée.

Dans ce travail, seules les bactéries seront abordées puisqu'elles représentent le pourcentage de biomasse le plus important au sein du microbiote ruminal, et qu'elles sont les agents les plus importants dans la digestion des aliments dans le rumen.

1. Bactéries ruminales : Capacités métaboliques des espèces majeures cultivées

La classification actuelle décompose le domaine des bactéries en un premier rang taxonomique appelé phylum. Dans les fermenteurs digestifs, 3 phyla majoritaires sont présents : les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria contre 20 phyla dans les sols (Dunbar et al., 2002). La faible diversité retrouvée dans les écosystèmes digestifs pourrait s'expliquer par les fortes contraintes du milieu (pH, potentiel redox, anaérobiose) et la spécialisation fonctionnelle de ces écosystèmes. L'analyse de banques de séquences d'ADNr 16S issues de contenus de rumen montre que les Firmicutes sont généralement majoritaires (50 à 80% de la communauté) suivis des Bacteroidetes (10 à 40% de la communauté). Les Proteobacteria sont également présentes (3 à 5 % de la communauté) mais elles ne sont jamais dominantes chez les individus sains (Seksik et al., 2003). Dans le rumen de la vache, il existe une différence dans la répartition de ces phyla en fonction du compartiment : on observe 49% (dans la phase liquide) à 69% (dans la phase solide) de Firmicutes, 39% (dans la phase liquide) à 29% (dans la phase solide) de Bacteroidetes (Tajima et al., 1999).

Les *Firmicutes* peuvent être impliqués dans plusieurs étapes de la digestion anaérobie de par leurs capacités métaboliques étendues. Tout d'abord, ces bactéries sont capables de dégrader la cellulose, les protéines ainsi que les composés azotés. Ces bactéries syntrophiques peuvent aussi dégrader les AGV comme le butyrate ou ses analogues. Cette dégradation produit du dihydrogène qui est ensuite assimilé par les méthanogènes hydrogénotrophes. Ce groupe constitue la population majeure impliquée dans la phase d'acidogénèse. Et enfin les *Firmicutes* font également partie des bactéries acétogènes non syntrophes qui produisent de l'acétate à partir du H₂ et du CO₂. Les *Bacteroidetes* sont connus en tant que bactéries protéolytiques (Zehnder, 1988). Ils interviennent dans la dégradation des protéines et sont capables de fermenter les acides aminés en acétate. Ariesyady et al., (2007) ont montré que les *Betaproteobacteria* sont les principaux consommateurs de propionate, butyrate et acétate.

Les capacités métaboliques *in vitro* de quelques espèces bactériennes (souvent cultivables) ont été étudiées mais ne permettent pas de réellement juger de leurs aptitudes *in vivo*. Le tableau 2 résume les espèces majoritairement présentes dans le rumen et celles ayant un rôle essentiel dans son fonctionnement. Les *Ruminococcus* font partie des espèces cellulolytiques les plus actives. *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* ont été observées chez les ruminants et les équidés (Lin et Stahl, 1995). Pour adhérer aux fibres végétales, ces bactéries forment une épaisse couche de polyholosides (Roger et al., 1990). Elles sont très sensibles au pH acide provoqué par une alimentation riche en amidon. Certaines souches de *Ruminococcus albus* produisent des métabolites secondaires qui inhibent *Ruminococcus flavefaciens* (Odenyo et al., 1994).

Fibrobacter succinogenes est une espèce cellulolytique majeure du rumen, elle représente 5 à 6% de la communauté procaryotique. Elle est capable de dégrader les celluloses les plus récalcitrantes mais elle est très sensible aux phénols des végétaux (Chesson et al., 1982). *Butyrivibrio fibrisolvens* est susceptible d'exercer une grande variété de fonctions (hydrolyses glucidique et protéique, fermentation) bien que son activité cellulolytique soit plus faible que celle des *Ruminococcus* et *Fibrobacter succinogenes* (Bryant et Burkey, 1953). Elle fait partie des espèces dominantes chez les ruminants et elle est une des principales espèces productrices d'acide butyrique. Les *Clostridium* ne sont jamais dominantes dans le rumen. Elles sont cellulolytiques, et certaines espèces dégradent les peptides.

Tableau 2. Fonctions in vitro des bactéries cultivables isolées du rumen (HGT: hydrogénotrophie)

D'après Fonty et Chaucheyras-Durand, (2007)

Division			Classe	Espèce	Hydrolyse							Substrat de fermentation							Produit de fermentation							HGT					
					Cellulose	Hémicellu.	Pectine	Amidon	Protéine	Peptide	Lipide	Cellobiose	Maltose	Saccharose	Glucose	Galactose	Fructose	Pentose	Ac. aminés	Lactate	Acétate	Propionate	butyrate	Isobutyrate	Ethanol	Succinate	Lactate	H2	CO2	Méthanog.	Acétog.
Firmicutes	Clostridia	<i>Ruminococcus albus</i>	+	+	+					+								+				+			+	+					
		<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+	+					+									+				+		+	+	+				
		<i>Ruminococcus bromii</i>				+													+				+		+	+			+		
		<i>Ruminococcus schinkii</i>																												+	
		<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+	+	+				+	+		+	+					+				+								
		<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+		+						+				
		<i>Clostridium aerotolerans</i>	+							+									+									+			
		<i>Clostridium longisporum</i>	+							+									+		+				+	+					
		<i>Clostridium aerotolerans</i>																	+								+				
		<i>Clostridium aminophilum</i>							+								+														
		<i>Clostridium sticklandii</i>							+								+														
		<i>Clostridium polysaccharolyticum</i>	+							+									+		+					+					
		<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	+							+									+					+	+						
		<i>Eubacterium ruminantium</i>		+		+				+	+		+	+	+	+			+		+				+	+			+		
		<i>Eubacterium limosum</i>			+								+	+	+	+		+	+	+	+									+	
		<i>Eubacterium oxydoreducens</i>																+		+										+	
		<i>Selenomonas ruminantium</i>	+			+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+		+	
		<i>Lachnospira multipara</i>								+		+	+		+				+						+	+	+				
		<i>Lachnobacterium bovis</i>								+	+	+	+		+				+						+	+	+				
		<i>Mitsuokella jalaludinii</i>					+																								
		<i>Mitsuokella multiacidus</i>					+																								
		<i>Anaerovibrio lipolytica</i>							+						+				+	+			+				+	+			
		<i>Megasphaera elsdenii</i>										+	+	+		+		+	+					+				+	+		
		<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>															+					+									
		<i>Peptostreptococcus productus</i>																	+		+									+	
		<i>Acidaminococcus fermentans</i>																+				+									
		<i>Allisonella histaminiformans</i>																+				+									
		<i>Veillonella alcalescens</i>																	+												
		<i>Veillonella parvula</i>																		+	+										
		<i>Acetitomaculum ruminis</i>																													+
		<i>Succiniclasticum ruminis</i>																			+										
		<i>Desulfotomaculum ruminis</i>																													+
		Bacilli	<i>Streptococcus bovis</i>	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+				+			+					
			<i>Syntrophococcus sucromutans</i>																					+		+				+	
Bacteroidetes	bacteroides	<i>Prevotella ruminicola</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+									
		<i>Prevotella bryantii</i>			+	+		+	+			+	+	+	+			+	+	+		+									
		<i>Prevotella brevis</i>						+	+			+	+	+	+			+	+	+		+									
		<i>Prevotella albensis</i>						+	+			+	+	+	+			+	+	+		+									
Proteobacteria	Aeromonadales	<i>Ruminobacter amylophilus</i>				+	+			+							+			+		+									
		<i>Succinomonas amylolytica</i>				+				+		+	+	+									+								
	Pasteurellales	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>				+				+		+	+	+				+					+								
		<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>								+		+	+	+	+			+													
		<i>Mannheimia succiniproducens</i>										+		+	+	+								+							
Campylobacteriales	<i>Wolinella succinogenes</i>																														
Desulfuobacteriales	<i>Desulfuovibrio desulfuricans</i>																						+								
Spirochaetes	Spirochaetes	<i>Treponema bryantii</i>			+													+				+									
		<i>Treponema saccharophilum</i>			+																										

Les *Eubacterium* ont été isolées chez diverses espèces de mammifères herbivores. Leurs potentialités métaboliques varient beaucoup d'une espèce à l'autre. Elles sont principalement fermentatives. Certaines espèces hydrogénotrophes sont capables d'acétogénèse réductrice.

Selenomonas ruminantium est une espèce majoritaire chez les ruminants recevant une ration riche en amidon. Ces bactéries fermentent et produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, de l'acide propionique et une faible quantité de dihydrogène (Scheifinger et al., 1975).

Megasphaera elsdenii fermente les oses simples et 97% du lactate présent dans le rumen (Counotte et al., 1981). Elle se retrouve chez les jeunes ruminants et chez les ruminants recevant une ration riche en amidon (Stewart et al., 1997). *Megasphaera elsdenii* produit également beaucoup d'AG ramifiés indispensables à la croissance de nombreuses espèces bactériennes dont les cellulolytiques.

Streptococcus bovis est une espèce amylolytique majoritaire chez les ruminants recevant une alimentation riche en céréales. La croissance de cette espèce est très rapide et son activité génère de grandes quantités d'acide lactique. Par conséquent, *S. bovis* est l'agent souvent responsable des phénomènes d'acidose lactique.

Lachnospira multipara est la principale espèce pectinolytique du rumen. On retrouve cette espèce chez les animaux recevant une alimentation riche en pectine.

Les fonctions métaboliques d'*Anaerovibrio lipolytica* sont l'hydrolyse des lipides et l'utilisation de l'acide lactique. Son importance est donc capitale dans le fonctionnement du fermenteur digestif.

Parmi les *Peptostreptococcus*, *Peptostreptococcus anaerobius* est une espèce capitale dans le fonctionnement du rumen puisqu'elle est la principale espèce productrice d'ammoniaque.

Les *Prevotella* sont des espèces dominantes quel que soit le régime alimentaire des ruminants. On les retrouve également chez de nombreux animaux non ruminants : Homme, lapin, porc. Elles remplissent de nombreuses fonctions métaboliques : de l'hydrolyse des glucides à la fermentation des oses simples, en passant par la protéolyse (Wallace et Brammall, 1985).

2. Facteurs de variation du microbiote ruminal

a. Variabilité entre espèces hôtes et entre individus

Des études basées sur la microscopie électronique ou les colorations de Gram montrent que les différentes espèces de ruminants ont des similitudes dans leurs microbiotes (Hobson et al., 1976). Les études moléculaires démontrent que certaines divisions bactériennes sont dans les mêmes proportions dans le rumen de différentes espèces de ruminants domestiques, tandis que pour d'autres divisions les proportions diffèrent. Par exemple, chez les ovins, la communauté bactérienne du rumen est composée de 42 à 73% de *Firmicutes*, 25 à 54% de *Bacteroidetes*, 0 à 19% de *Spirochaetes* et 0 à 3% de *Proteobacteria*. Chez les bovins, bien que les proportions de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* soient à peu près similaires, les *Proteobacteria* sont plus présentes que les *Spirochaetes*.

La variabilité de la communauté bactérienne a pu également être observée entre individus de la même espèce comme par exemple dans le rumen du mouton (Edwards et al., 2005) ou dans le côlon de l'Homme (Zoetendal et al., 1998). L'utilisation de la microscopie électronique démontre que le nombre de bactéries attachées à la paroi du rumen de la vache varie d'un animal à l'autre (McCowan et al., 1980). Dans le rumen du mouton, la variabilité entre individus est généralement plus importante que les autres effets testés comme un traitement antibiotique (Edwards et al., 2005) ou un changement alimentaire (Larue et al., 2005). Ainsi Larue et al. (2005) démontrent que les profils DGGE varient de 40% entre individus. En revanche, cette variabilité entre individus n'a pas été observée chez certaines espèces comme la dinde (Scupham, 2007). D'après Zoetendal et al. (1998) des différences inter-individuelles existent mais sont finalement de faible ampleur puisque la flore bactérienne dominante est stable d'un individu à l'autre. Etant donné que les communautés bactériennes des fermenteurs digestifs abritent plusieurs centaines d'espèces, il est probable que les espèces présentes et leurs abondances respectives diffèrent, au moins un peu, d'un individu à l'autre chez une même espèce de mammifère herbivore. Très peu d'informations sont disponibles par contre quant au rôle éventuel des facteurs génétiques de l'hôte sur la composition et la stabilité de la flore digestive. Chez le ruminant, une seule étude (Skillman et al., 2004) montre que chez les agneaux jumeaux, la composition de la flore méthanogène est similaire.

b. Variabilité spatiale

Dans le rumen, les micro-organismes ne sont pas distribués de façon homogène et uniforme : la répartition spatiale des communautés microbiennes entre la phase solide et la phase liquide du rumen est différente (Tableau 3). Des études réalisées sur la vache (Tajima et al., 1999; Cho et al., 2006) et le mouton (Larue et al., 2005) montrent que quel que soit le régime alimentaire, les communautés bactériennes de la phase solide contiennent plus de *Firmicutes* et de *Proteobacteria*. Une différence a été également notée entre les communautés microbiennes de la lumière du rumen (phase solide et liquide) et celles de la paroi ruminale, composée de 6 à 12 fois plus de *Firmicutes* et de 0.3 à 8 fois moins de *Bacteroidetes* que les communautés bactériennes lumineuses (Cho et al., 2006; Sadet et al., 2007).

Tableau 3. Les différentes divisions bactériennes présentes dans la phase liquide, solide et dans l'épithélium du rumen. D'après Michelland RJ,(2009).

Hôte	Régime alimentaire	Localisation dans le rumen	n	en % du nombre total de séquence				Référence
				<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Spirochaetes</i>	<i>Proteobacteria</i>	
vache tarie	65% foin / 35% concentré	phase liquide	53	11	79	0	8	(Whitford <i>et al.</i> , 1998)
bœuf	foin de luzerne	phase liquide	68	25	68	4	3	(Kocherginskaya <i>et al.</i> , 2001)
	20% foin / 80% concentré	phase liquide	67	15	58	0	27	
vache tarie	75% luzerne / 25% concentré	phase liquide	51	90	4	2	4	(Tajima <i>et al.</i> , 2000)
	Passage de 25 à 92% concentré	phase liquide	58	72	22	0	5	
	92% concentré	phase liquide	41	95	2	0	0	
vache tarie	80% luzerne-fléole / 20% de concentré	phase liquide	41	49	39	2	5	(Tajima <i>et al.</i> , 1999)
		phase solide	42	69	29	2	0	
mouton	foin d'herbe	phase solide	48	42	54	0	2	(Koike <i>et al.</i> , 2003b)
	80% luzerne / 20% concentré	phase solide	43	47	30	19	2	
mouton	foin d'herbe	phase liquide	98	57	40	0	3	(Larue <i>et al.</i> , 2005)
		phase solide	157	70	25	0	0	
	70% foin d'herbe / 30% maïs	phase liquide	120	54	41	0	1	
		phase solide	134	73	25	0	1	
vache tarie	75% enveloppe de riz / 25% concentré	phase liquide	40	30	68	0	3	(Cho <i>et al.</i> , 2006)
		phase solide	37	76	11	3	5	
		épithélium	36	6	94	0	0	
mouton	foin d'herbe	phase solide		57	36	0	3	(Yu <i>et al.</i> , 2006)

n : nombre total de séquence

c. Variabilité liée à l'alimentation

L'aliment (nature, forme de présentation, quantité ingérée, fréquence de distribution) est un facteur essentiel influençant l'équilibre des populations microbiennes du tube digestif. En effet, il conditionne la fourniture de nutriments et d'énergie pour la micropopulation, et au cours de sa biodégradation, il agit sur les paramètres physicochimiques du milieu (pH, potentiel redox, concentration des métabolites...) qui conditionnent l'équilibre des communautés microbiennes.

En général, des régimes riches en amidon et/ou glucides rapidement fermentescibles ont un effet marqué sur le microbiote ruminal où on note une augmentation des populations amylolytiques (*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*,...), saccharolytiques (Lactobacilles) et utilisatrices d'acide lactique (*Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*,...) avec une diminution de l'activité de la population cellulolytique (*Butyrivibrio* spp., *Ruminococcus*, *Fibrobacter*,...), ce qui conduit au phénomène d'acidose ruminale (Martin et al., 2002; Nocek, 1997). Ces dernières sont en effet, très sensibles aux pH acides induits par les fermentations rapides et intenses des aliments (Russel et Wilson, 1996).

Avec un niveau d'amidon élevé dans la ration, les bactéries amylolytiques se développent très rapidement. La structure du matériel végétal, notamment le degré de cristallinité de la cellulose, peut également influencer sur la prédominance d'une espèce bactérienne cellulolytique ou d'une autre : ainsi *Fibrobacter succinogenes* serait favorisée avec des régimes riches en cellulose cristalline (paille de céréales par exemple) par rapport au *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* qui semblent préférer la cellulose amorphe (Fonty et al., 1995).

Il est clair que la composition et l'activité de l'écosystème ruminal sont affectées au cours du passage d'un régime riche en fourrage à un régime riche en concentrés destiné à augmenter les capacités de production des vaches, en revanche, les perturbations dues à la mise au pâturage après la saison hivernale sont moins bien connues. Il a été montré par exemple, que les populations bactériennes cellulolytiques et leurs activités diminuaient significativement au début du changement de régime et qu'il fallait 3 à 4 semaines pour que celles-ci ré-augmentent (Zitnan et al., 1994). Quelques études mettant en jeu des méthodes d'écologie moléculaire (Weimer et al., 1999; Tajima et al., 2001) montrent que la rapidité et l'amplitude

de la réponse à un changement de régime alimentaire varient fortement d'un individu à l'autre.

Les bactéries ruminales étant responsables de l'efficacité de la digestion microbienne, un intérêt croissant est porté aux modifications de la communauté bactérienne induites par des facteurs alimentaires, parallèlement des modifications du milieu. En réponse à des perturbations, selon Ives et Carpenter (2007), l'écosystème peut :

- rester constant, on parle alors de résistance de l'écosystème.
- être affecté par la perturbation mais retrouver son état initial. On parle de résilience de l'écosystème.
- être affecté par la perturbation et ne pas retrouver son état initial. On parle alors de seuil de réversibilité pour étudier les limites de la capacité de réaction de l'écosystème.

Un écosystème est donc d'autant plus stable qu'il est diversifié en raison de la redondance fonctionnelle et de l'occupation maximale de toutes les niches écologiques. Cette théorie repose sur le fait que de nombreuses espèces de micro-organismes sont capables de réaliser les mêmes fonctions au sein de l'écosystème (Cardinale et al., 2002). Ainsi, la disparition d'une espèce microbienne n'affectera pas le fonctionnement de l'écosystème étant donné que d'autres espèces microbiennes peuvent remplir les mêmes fonctions. La compréhension de ces phénomènes au sein de l'écosystème ruminal permettrait de mieux appréhender son fonctionnement et donc une meilleure maîtrise de son efficacité. Aussi, l'étude du microbiote ruminal est indispensable.

Chapitre 2 - Méthodes d'étude de la communauté bactérienne du rumen

Pendant longtemps, l'écosystème ruminal était étudié à l'aide des méthodes de culture microbienne. Ces techniques présentent l'inconvénient de ne mettre en évidence que les populations cultivables qui ne représentent que 20 à 40% de la totalité des espèces présentes (Suau et al., 1999). Au cours des dernières années, des outils d'analyses moléculaires se sont développés. Dans ce travail bibliographique, ne seront abordées que les techniques de biologie moléculaire basées sur l'étude de l'ADN.

La collecte des échantillons lors de l'étude des contenus digestifs est souvent problématique car ils sont difficilement accessibles. De ce fait, l'étude des prélèvements de fèces a été longtemps une alternative. L'accès direct au contenu du rumen peut se faire par canulation. L'inconvénient majeur de la technique est qu'à chaque ouverture de la canule, du dioxygène entre dans l'écosystème et peut modifier son degré d'anaérobiose. De plus, le délai de récupération post opératoire est de plusieurs jours et la lourdeur de la méthode limite le nombre d'animaux étudiés. Dans ce travail, toutes les vaches étaient munies de canules ruminales.

I. Choix du gène cible

La connaissance des espèces composant un microbiote consiste à mettre en évidence le polymorphisme d'un gène entre les espèces microbiennes. Les gènes codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal (ou gène *ssu*) constituent un traceur de choix dans le domaine de l'écologie moléculaire. En effet, l'ARNr 16S (Figure 1) est une molécule ancestrale bien conservée dans sa globalité, présente en abondance dans toutes les cellules procaryotes. Il s'agit du marqueur neutre de diversité qui a suscité un intérêt pour différentes raisons :

- Sa présence universelle en plusieurs copies chez tous les procaryotes (Case et al., 2007).
- L'analyse comparée des séquences d'ARNr 16S isolées à partir de divers procaryotes a montré qu'il existait des séquences conservées mais également des régions très variables (Woese, 1987). Plus les séquences sont conservées, plus elles permettent de différencier les hauts niveaux (règles, embranchements). Au contraire, les régions

"hyper-variables" permettent de différencier les bactéries en groupes ayant des analogies avec la classification en genre, espèce et sous-espèce (Amann et al., 1995a).

- Il a évolué de façon constante dans le temps en l'absence de pression de sélection. De ce fait, il permet de classer les micro-organismes mais aussi de comprendre leurs évolutions (Zuckerandl et Pauling, 1965).

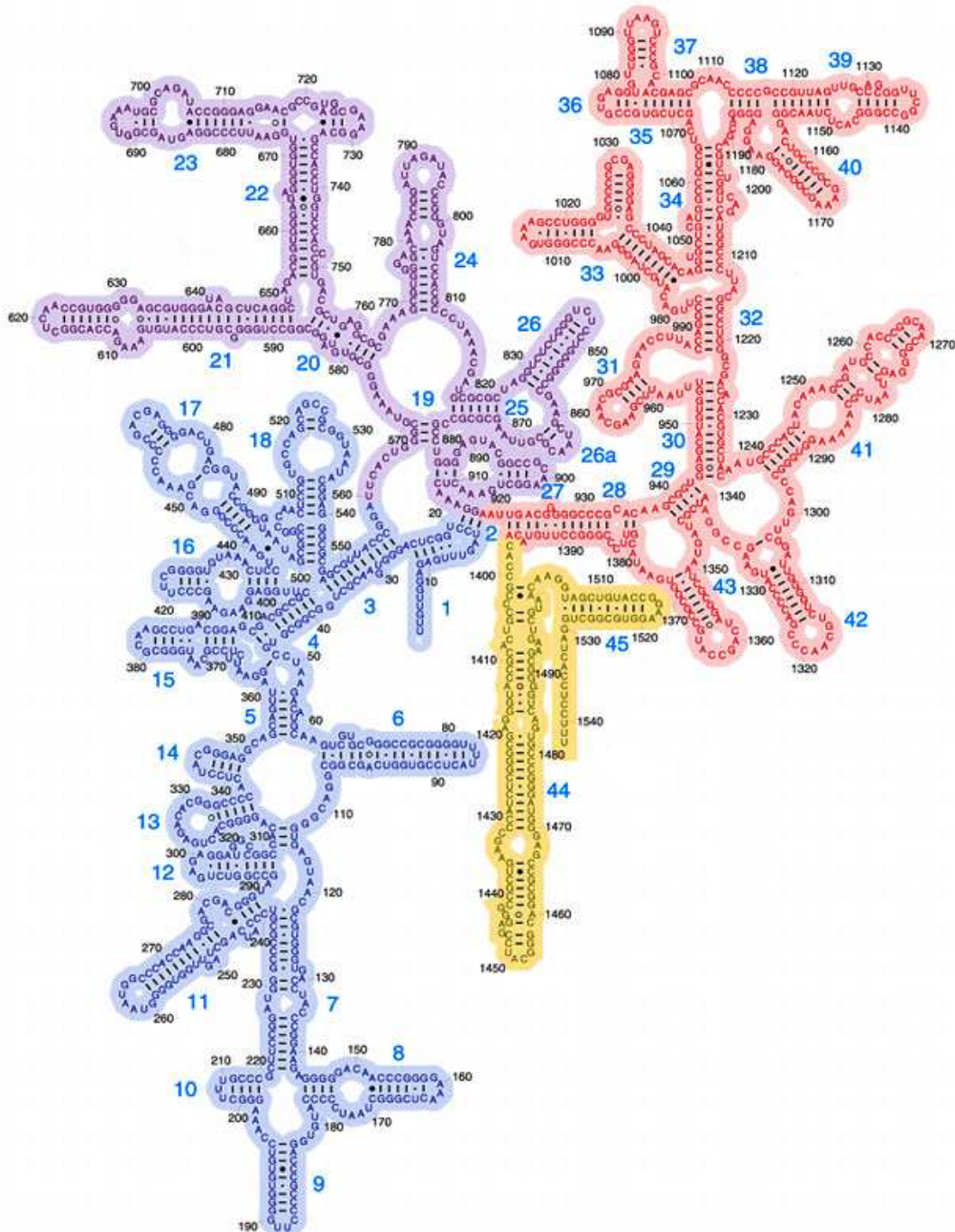


Figure 1. Les différentes régions de la l'ARNr 16S. D'après Woese C.R, (1987). L'ARN ribosomal 16S est le constituant ARN de la petite sous-unité ribosomique des procaryotes. Le gène codant les ARN ribosomique 16S est composé d'environ 1500 paires de bases. Il est présent chez tous les procaryotes.

Ce gène présente néanmoins quelques inconvénients comme l'hétérogénéité des séquences chez certaines espèces (Klappenbach et al., 2001) et le manque de variabilité pour discriminer les espèces proches (Qi et al., 2001). D'autres gènes ont alors été testés (Case et al., 2007; Qi et al., 2001) mais le manque d'information dans les bases de données rendent l'utilisation des gènes codants pour l'ARNr 16S plus intéressante et plus informative.

Les capacités fonctionnelles de l'écosystème peuvent par ailleurs être étudiées. On parle alors, d'approche fonctionnelle qui est peu utilisée dans l'étude des écosystèmes digestifs, car la plupart des fonctions métaboliques nécessitent de nombreux complexes enzymatiques qui sont codés par un grand nombre de gènes et qui, de plus, diffèrent selon les espèces microbiennes. Par exemple, la cellulolyse dans le rumen nécessite l'action synergique de trois enzymes : les endoglucanases, les exoglucanases et les β -glucosidases sachant que chacune est codée par un grand nombre de gènes (Forsberg et al., 1997). Cette approche a néanmoins été utilisée pour détecter ou quantifier les capacités méthanogènes d'un microbiote (Nunoura et al., 2008) ayant un complexe enzymatique codé par un nombre restreint de gènes.

Une autre approche d'étude existe, la métagénomique, qui consiste à séquencer en totalité tous les génomes microbiens présents dans un échantillon (Singh et al., 2008). Cette approche donne une information quasi complète de la composition de la communauté et de ses fonctions métaboliques. Des approches métagénomiques ont été réalisées chez le bovin (Beloqui et al., 2006; Ferrer et al., 2007) et ont permis de mettre en évidence de nouveaux gènes de micro-organismes impliqués dans la cellulolyse. Cependant, la majorité des études actuelles sont basées soit sur l'analyse de la communauté microbienne, soit sur l'analyse de potentielles fonctions métaboliques du microbiote.

II. Techniques microbiologiques

Les techniques de microbiologie classique conduisent à une vision partielle des communautés microbiennes d'un écosystème en favorisant la vision "cultivable" du monde microbien par opposition à la vision "totale" donnée par les outils moléculaires. En effet, Hungate (1966) a développé des techniques de cultures anaérobies afin d'étudier la microflore du tube digestif des termites et du rumen des mammifères ruminants. Il a énoncé le concept que les milieux de culture doivent simuler l'habitat microbien pour promouvoir la croissance des organismes : par exemple, en ajoutant du jus de rumen stérilisé comme supplément nutritif et en s'assurant que le milieu reproduit les caractéristiques physico-chimiques du rumen de la façon la plus

proche possible. Ces études ont conduit à l'isolement et à la caractérisation d'une grande variété de micro-organismes anaérobies inconnus auparavant. Cependant, les données actuelles fournies par les outils moléculaires permettent d'estimer que la fraction cultivable de la diversité microbienne est entre 0.001% et 15 % (Amann et al., 1995a). Un certain nombre de techniques ont été mises au point dans le but d'obtenir, de manière rapide, une image de la diversité microbienne d'un écosystème.

Parmi celles-ci, on peut distinguer celles basées sur d'hybridation de sondes nucléiques, d'autres, sur l'analyse de fragments d'ADN, appelées méthodes d'empreintes moléculaires ou une estimation à partir de séquençage aléatoire. Les séquences obtenues par clonage servent de base pour de nombreuses méthodes d'hybridation et d'empreintes moléculaires : on parle alors de "full cycle rRNA approach" comme décrit dans la figure 2.

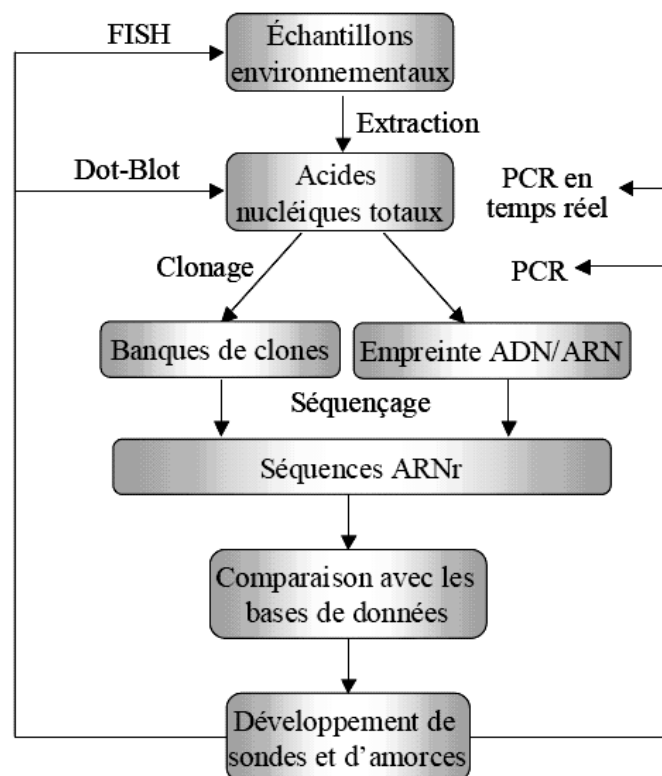


Figure 2. "Full cycle rRNA approach"

Tableau 4. Comparaison des méthodes d'empreintes moléculaires pour l'étude des écosystèmes microbiens

Technique	Migration	Détection du polymorphisme selon la	Principe	Identification des espèces
DGGE TGGE TTGE	Gel	Composition en acides nucléiques	Dénaturation différentielle du double brin d'ADN des amplicons selon leur composition en bases GC face à un agent dénaturant	Oui par séquençage
AFLP		Longueur de l'amplicon	Traitement des amplicons avec des enzymes de restriction engendrant des fragments de taille différente séparés par électrophorèse	Oui par Séquençage
T-RFLP	Capillaire	Longueur de l'amplicon		Oui possibilité d'identification grâce aux bases de données
ARISA		Longueur de l'amplicon	Utilisation d'un marqueur de diversité de longueur variable : l'ITS 16S/23S	Non
CE-SSCP		Longueur de l'amplicon + Composition en acides Nucléiques	Conformation tridimensionnelle différentielle des simples brins des amplicons.	Non

Voici un rapide descriptif non exhaustif des outils les plus utilisés :

1. Hybridation moléculaire

Cette technique consiste à hybrider des sondes oligonucléotidiques avec un extrait d'ARN obtenu à partir de l'échantillon à analyser. Chaque sonde est complémentaire d'une séquence d'ARN 16S cible. Le nombre croissant de séquences disponibles dans les bases de données a permis de dessiner de nombreuses sondes. Il existe différentes techniques d'utilisation de ces sondes : l'hybridation en "dot blot" (Amann et al., 1990; Harmsen et al., 2002), le FISH (Fluorescent *in situ* hybridization, DeLong et al., 1989; Rigottier-Gois et al., 2003), le SSH (suppressive soustractive, Galbraith et al., 2004) et les biopuces ou microarrays. Les biopuces sont utilisées dans l'étude de certains écosystèmes microbiens comme les milieux aquatiques (Yergeau et al., 2007) ou le sol (Brodie et al., 2006) mais peu utilisées en écologie microbienne du tube digestif. La technique d'hybridation est un bon outil de détection et de quantification de taxons microbiens mais nécessite d'avoir des informations liées aux séquences ciblées surtout si on se place au niveau de l'espèce, le travail devenant alors long.

2. Empreintes moléculaires

Plusieurs techniques permettent de réaliser rapidement, par électrophorèse de fragments d'ADNr préalablement amplifiés par PCR, une empreinte moléculaire des communautés microbiennes présentes dans un écosystème. Ces méthodes d'empreintes moléculaires ou fingerprints se basent sur la mise en évidence de la variabilité de longueur et/ou de composition des amplicons d'un marqueur de diversité (souvent le gène codant pour l'ARNr 16S). Le tableau 4 résume les différentes méthodes d'empreintes moléculaires.

La migration électrophorétique des empreintes moléculaires est soit réalisée sur des gels (DGGE, TGGE, TTGE, AFLP), soit réalisée dans des capillaires (appelés CE pour Capillary Electrophoresis) gérés par un séquenceur (T-RFLP, CE-SSCP, ARISA). Les techniques en gel sont capables de détecter les espèces bactériennes qui constituent plus de 1% de la communauté totale (Zoetendal et al., 1998). L'avantage des bandes de gel est qu'elles peuvent être récupérées afin de les séquencer et déterminer l'affiliation phylogénétique (Schmalenberger et Tebbe, 2003).

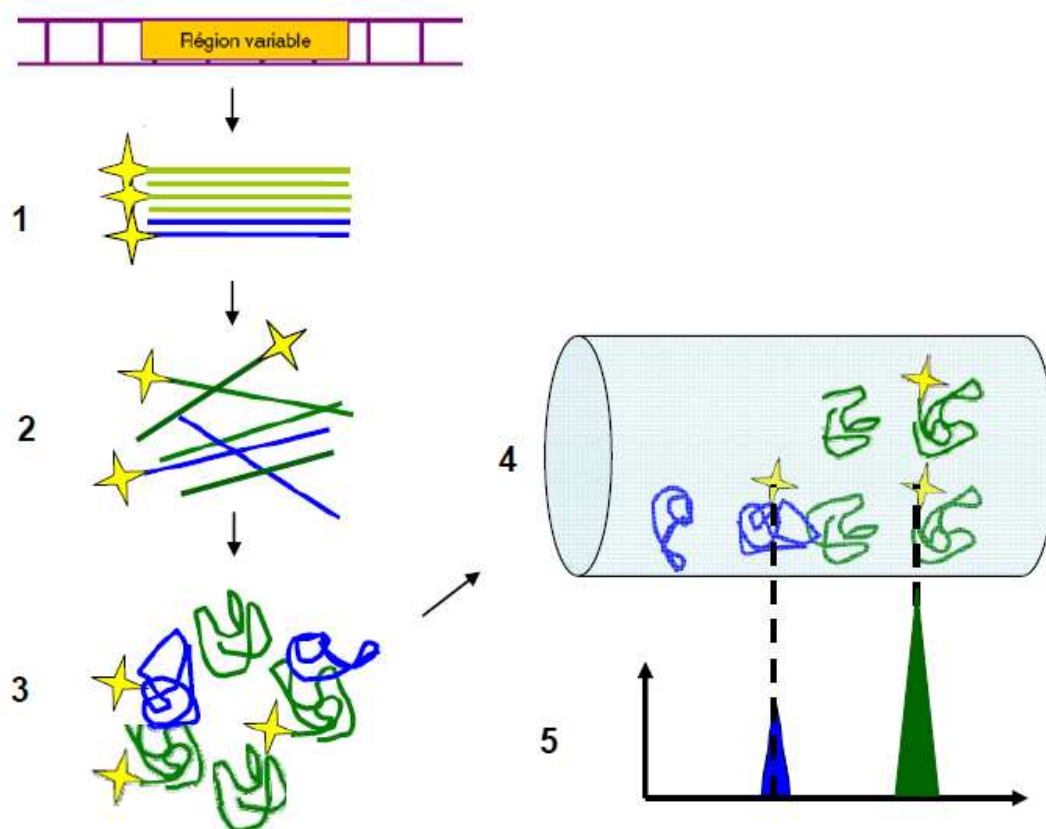


Figure 3. Principe de la CE-SSCP. Exemple avec trois séquences d'ADN. (1) Amplification de la région variable du gène d'intérêt avec des amorces marquées d'un fluorochrome (étoile jaune). (2) Dénaturation des amplicons. (3) Refroidissement rapide des amplicons et maintien de leurs conformations grâce à la formamide désionisée. (4) Migration en électrophorèse capillaire, les amplicons adoptent une forme différente selon leurs longueurs et leurs compositions en acides nucléiques. (5) Détection de la fluorescence par un laser. D'après Moletta M. (2005).

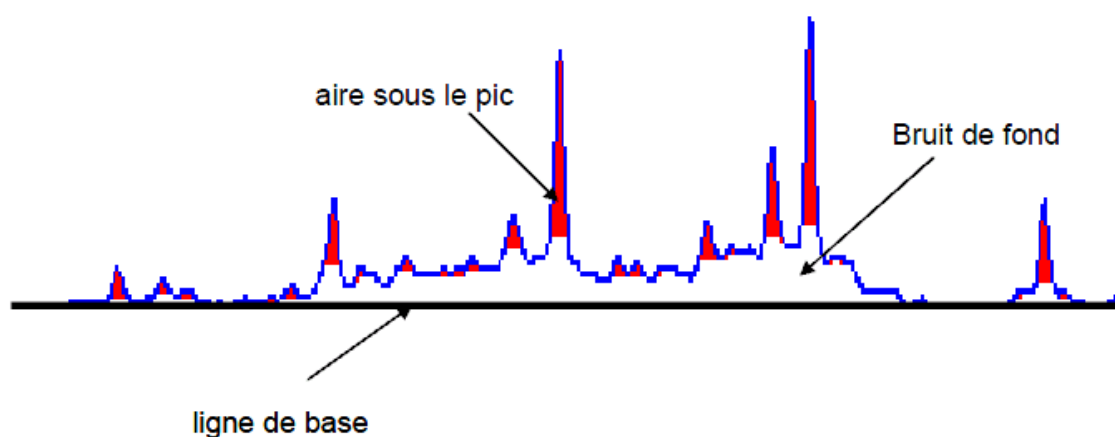


Figure 4. Exemple d'un profil CE-SSCP

Les techniques en capillaire sont plus précises, plus reproductibles et plus rapides que les techniques en gel (Hong et al., 2007). Les techniques de fingerprints permettent d'avoir rapidement une image représentative de l'ensemble de la communauté microbienne. Elles sont moins onéreuses et peuvent donc être utilisées pour comparer les communautés bactériennes de plusieurs échantillons, par contre elles ne permettent pas l'affiliation phylogénétique.

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser la technique CE-SSCP. De ce fait, seule cette technique sera développée en détail. En effet, la CE-SSCP a été utilisée dans l'étude d'écosystèmes divers et variés allant du tube digestif (Brinkmann et al., 2008) au sol (King et al., 2007) mais aussi la mer (Livi et al., 2006). La figure 3 résume le principe de la technique CE-SSCP. Une région variable d'un gène d'intérêt est amplifiée avec des amorces marquées d'un fluorochrome (étape 1). En effet, une des deux amorces utilisées en PCR est marquée par un fluorochrome ce qui aboutit au marquage d'un seul des deux brins des amplicons. Les amplicons sont dénaturés à 95 °C (étape 2). Ils sont ensuite rapidement refroidis à 0°C et leur conformation est maintenue stable grâce à de la formamide désionisée (étape 3). Les amplicons adoptent une conformation tridimensionnelle selon leurs longueurs et leurs compositions en acides nucléiques. Les amplicons migrent en électrophorèse capillaire (étape 4). Un laser détecte la fluorescence et l'information est acquise sous forme de pics (étape 5). La conformation adoptée dépend du nombre d'acides nucléiques dans le brin d'ADN, de sa composition en bases azotées et de l'ordre de succession de ces dernières.

Les simples brins d'ADN sont déposés dans un capillaire ayant un potentiel électrique à chaque extrémité, qui provoque la migration électrophorétique des brins d'ADN. A travers les mailles du gel, les petites molécules vont migrer plus loin que les grosses molécules. Un scanner va capter l'intensité de fluorescence émise par le fluorochrome et produit un signal traduit sous forme d'un pic de taille proportionnelle à l'intensité. Tous les pics enregistrés forment alors un chromatogramme. Les fluorochromes utilisés sont le 6-FAM et le ROX et servent respectivement, à marquer les brins d'amplicons et d'étalon interne. Grâce aux signaux qu'il émet à intervalles réguliers lors de la migration, l'étalon interne sert à aligner les profils entre eux. A la sortie du séquenceur, le résultat obtenu est un chromatogramme avec des pics représentant les espèces dominantes au sein de la communauté microbienne et un bruit de fond ou background qui est l'aire sous la courbe en enlevant l'aire sous les pics (Figure 4). Ce bruit de fond peut renseigner sur les espèces minoritaires (Fromin et al., 2002).

Chaque technique d’empreinte moléculaire possède une résolution maximale qui correspond à un nombre maximum de pics qui peuvent être identifiés. Cependant, les écosystèmes étudiés sont souvent complexes et possèdent un nombre d’espèces microbiennes supérieur au nombre maximum de pics ou de bandes identifiables, on observe alors, un phénomène de co-migration dès que le nombre d’espèces présentes dans la communauté excède 10 (Loisel et al., 2006). Les pics susceptibles de co-migrer possèdent une structure tridimensionnelle proche mais ne sont pas nécessairement proches d’un point de vue phylogénétique. De ce fait, l’approche CE-SSCP est sujette à un manque de résolution pour l’étude des communautés riches et ne donne qu’une image représentative des espèces dominantes du microbiote.

Des biais peuvent exister lors de l’extraction de l’ADN et l’amplification PCR. Dans ce travail, nous avons utilisés le QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, Angleterre) pour extraire et purifier l’ADN, reconnu être bien adapté pour l’extraction et la purification de l’ADN des contenus digestifs d’autant plus que (Yu et Morrison., 2004), démontrent une augmentation de la quantité et de la qualité de l’ADN extrait en utilisant le kit QIAamp® DNA Stool Mini kit avec une lyse mécanique (Beadbeater) au préalable. D’où le choix de cette procédure dans notre travail. Quant aux biais liés à la PCR, il est nécessaire que les amorces soient spécifiques à la zone amplifiée en ciblant au maximum les espèces d’intérêt au sein de la communauté et au minimum les espèces non sélectionnées.

Le choix de l’enzyme est tout aussi important, car il faut trouver un compromis entre son taux d’erreur et son rendement. En effet, une enzyme ayant un faible pourcentage d’erreur a un rendement moins élevé; par conséquent, il faut augmenter le nombre de cycles PCR pour avoir une bonne quantité d’amplicons. Sachant que, l’amplification de l’ADN extrait est réalisée au cours des 5 ou 6 premiers cycles et les cycles suivants ne font que ré-amplifier les brins déjà obtenus. Dans ce cas, si les amorces ont une forte complémentarité avec d’autres séquences d’ADN, elles seront alors amplifiées. Cependant, si la communauté microbienne étudiée est diverse, ce biais ne semble pas être très important (Suzuki et Giovannoni., 1996). D’ailleurs, une étude des communautés bactériennes de fèces humaines par la technique DGGE n’a pas montré de différence entre 20 et 35 cycles d’amplification PCR (Zoetendal et al., 1998).

La technique CE-SSCP est robuste, reproductible et offre l’avantage d’obtenir une image qualitative de l’ensemble de la communauté microbienne d’une manière rapide et peu

coûteuse. Par ailleurs, dans le but d'exploiter l'ensemble des informations contenues dans les profils CE-SSCP, notre équipe a développé un outil méthodologique (Michelland et al., 2009), un logiciel permettant de traiter les données fournies. C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'utiliser la technique CE-SSCP.

3. Séquençage

Différentes méthodes ont été utilisées pour déterminer le nombre d'espèces bactériennes présentes dans les écosystèmes digestifs : microscope, estimation à partir de séquençage aléatoire de banque de clones ou plus récemment détermination par séquençage à très-haut débit (pyroséquençage). Bien que la quantité estimée varie en fonction de la méthode utilisée, tous les travaux convergent vers un nombre qui varie entre 300 et 1000 espèces bactériennes en fonction des espèces animales et même des individus au sein d'une même espèce.

- Clonage et séquençage (méthode de Sanger)

Lors du clonage et du séquençage par la méthode de Sanger, le gène d'intérêt d'une communauté microbienne est amplifié par PCR. Ensuite, chaque amplicon est cloné dans le génome d'une cellule d'*Escherichia coli*. Les cellules sont par la suite, isolées individuellement et mises en culture. Chaque clone est alors séquencé suivant le protocole de Sanger (amplification PCR classique avec ajout d'une faible concentration de désoxynucléotides ou dNTP marqués avec des fluorochromes différents). Les amplicons obtenus sont de taille variable et sont généralement séparés par électrophorèse. La couleur de fluorescence des différentes bandes du gel permet d'attribuer un nucléotide (A, T, G ou C) à chaque paire de base. Cette technique a permis les progrès de la génomique jusqu'en 2006 mais ses applications sont limitées par le coût et le temps, ce qui diminue le nombre d'échantillons analysés.

- Nouvelles technologies de séquençage

Plusieurs technologies de séquençage à très haut débit sont apparues depuis quelques années (Roche/454 Genome Sequencer FLX; Illumina/Solexa Genetic Analyzer; Applied Biosystems SOLiD). Les différences entre ces technologies résident dans la technique utilisée, il en

résulte des différences dans la quantité, le type de données générées et la qualité des données (taux d'erreurs).

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser la technique 454 GS FLX. Il s'agit d'une technique de séquençage utilisant une mesure de luminescence (Figure 5), par le système luciférine/ luciférase, produite par le pyrophosphate libéré lors de l'incorporation de nucléotides triphosphates. Une amorce oligonucléotidique spécifique de la cible recherchée est utilisée pour ce séquençage. Celle-ci s'hybride avec le produit de PCR dénaturé. Les quatre désoxyribonucléotides triphosphates sont ajoutés successivement en présence d'enzymes. Si le nucléotide qui est présent dans le milieu réactionnel correspond à la séquence, il sera incorporé et libérera un pyrophosphate (PPi). Ce PPi est transformé en ATP par l'ATP sulfurylase. Une luciférase couple cet ATP à une luciférine ce qui produit une oxyluciférine en émettant un signal lumineux capté par le scanner du séquenceur. Les nucléotides en surplus dans le milieu réactionnel sont alors dégradés par une apyrase. Le processus se poursuit avec l'ajout d'un autre nucléotide (Ronaghi et al., 1998). Toutefois, la taille des séquences obtenues est faible (400 à 500 paires de bases) car à chaque ajout de nucléotide l'activité des enzymes utilisées diminue (Ronaghi, 2001). Le pyroséquençage est une technique de séquençage relativement récente qui présente trois avantages majeurs par rapport au séquençage de Sanger :

- sa rapidité. A titre d'exemple, la technologie 454 associée au séquenceur GS FLX (Life Sciences et Roche Diagnostics) séquence environ 5 millions de bases par heure contre 5000 pour la technologie Sanger actuelle.
- l'absence d'une étape de culture de clone. En écologie microbienne, c'est une avancée majeure qui permet de séquencer directement l'ADN présent dans l'échantillon et représente un gain de temps considérable.
- son faible coût, environ 10 fois moins cher par base nucléique que la technique Sanger.

Le pyroséquençage offre donc de nouvelles perspectives pour analyser les microbiotes digestifs, notamment pour des analyses métagénomiques ou pour comparer plusieurs écosystèmes.

III. Interprétation des données : Appréhension de la diversité bactérienne

La composition de la communauté représente les différentes espèces constituant cette communauté, tandis que la structure prend en compte à la fois la composition en espèces et l'abondance de chaque espèce. La diversité quant à elle, est un indicateur qui prend en compte le nombre d'espèces (richesse) et l'abondance relative de chaque espèce.

1. Notion d'espèce en microbiologie

La notion d'espèce est le concept clé et l'unité de base de la taxonomie. La notion d'espèce biologique a sensiblement évolué, depuis l'avènement de la théorie de l'évolution. Selon la définition la plus communément citée, les espèces sont des "groupes de populations naturelles, effectivement ou potentiellement interfécondes, qui sont génétiquement isolées d'autres groupes similaires"(Mayr et al., 1982). Cette définition se prête bien aux organismes eucaryotes, cependant, chez les procaryotes, le concept de reproduction (reproduction végétative et asexuée) est différent. A la différence des eucaryotes, les caractères morphologiques des procaryotes considérés seuls n'ont toujours qu'une faible signification dans la classification des bactéries car la grande majorité des micro-organismes ont des formes trop simples pour que l'on puisse les utiliser pour la taxonomie.

Le développement des techniques moléculaires a permis alors de donner une définition plus rigoureuse de l'espèce. Cette définition est fondée sur les propriétés de dénaturation et de renaturation du double brin de l'ADN génomique bactérien en fonction de la température de dénaturation (T_m) à laquelle l'ADN est présent à 50% sous forme simple brin et à 50% sous forme double brin. Elle permet de définir une espèce procaryotique comme constituée de souches qui présentent des valeurs d'hybridation ADN-ADN supérieures ou égales à 70% et une valeur ΔT_m (différence de température de dénaturation entre l'hybride ADN1-ADN1 et l'hybride ADN1-ADN2) inférieure ou égale à 5°C La généralisation de l'analyse de l'ADNr a incité les auteurs à corrélérer les pourcentages d'identité entre ARNr 16S et les pourcentages de réassociation ADN-ADN. Ainsi, les séquences d'ADNr ayant des pourcentages d'identités supérieures à 97% sont considérées comme étant des espèces très proches et sont regroupées en Operational Taxonomic Unit (OTU). Ce choix d'un seuil de 97% d'identité est discuté et certains auteurs préfèrent utiliser des seuils de 95, 96 ou 99% (Amann et al., 1995b; Godon et al., 1997).

2. Caractérisation de la communauté bactérienne

Différents outils ont été développés afin de comparer les communautés microbiennes. Il existe deux approches pour caractériser une communauté :

- soit l'étude de la diversité d'une communauté, qui consiste à observer la distribution du nombre total d'individus entre les différentes OTUs de la communauté en tenant compte de l'abondance de chaque OTU (selon un seuil choisi).
- soit s'intéresser à la composition en s'intéressant aux profils taxonomiques et leurs affiliations phylogénétiques.

Pour la première approche, MOTHUR est un outil qui permet de regrouper les séquences en OTUs en calculant des matrices de distance et en utilisant un algorithme de regroupement ("clustering algorithm"). Un OTU désigne un groupe de séquences d'acides nucléiques, alignées par position nucléotidique homologue, dont le pourcentage de similarité deux à deux est supérieur à 97%. L'OTU peut être affiliée à une espèce cultivée ou non. Lorsqu'un OTU est non affilié à une espèce connue, il est plus souvent appelé « phylotype ».

Les méthodes basées sur l'analyse des profils taxonomiques permettent d'identifier quels sont les micro-organismes présents. L'étape d'alignement des séquences est une étape déterminante en taxonomie. Elle consiste à mettre en regard les positions homologues des différentes séquences analysées et à comparer, pour chacune de ces positions, des nucléotides présents. Si on prend l'exemple de la molécule d'ARNr 16S, de structure en mosaïque, dans les régions très conservées, les nucléotides homologues sont facilement repérés, alors que dans les régions variables ou hyper-variables, la détection est plus compliquée, surtout si des phénomènes d'insertion ou de délétion sont survenus. L'utilisation des structures secondaires permet d'améliorer l'alignement obtenu, en particulier pour les régions hyper-variables, ainsi que pour les régions où des insertions ou des délétions ont eu lieu. Les régions hyper-variables sont utiles lors de l'étude de séquences appartenant à des genres, espèces ou souches d'une même espèce.

3. Bioinformatique au service de la taxonomie

De nombreux logiciels sont disponibles afin de réaliser des opérations sur les séquences d'ADN, de l'assemblage à l'analyse statistique (Schloss, 2008). L'utilisation de ces outils n'est pas toujours aisée. De plus, les étapes de mise en forme des fichiers d'entrée et de sortie de chaque outil sont des opérations délicates et chronophages. Au cours d'une analyse taxonomique, les séquences subissent de nombreuses manipulations réalisées sous environnement UNIX. Ceci nécessite l'apprentissage du fonctionnement de ce système d'exploitation ainsi qu'un certain nombre de commandes.

Dans le cadre de cette étude, plusieurs scripts ont été mis au point afin de rendre plus aisé le maniement d'un grand nombre de séquences. Par ailleurs, nous avons bénéficié pour cette étude d'un cluster de calcul disponible à la plateforme bioinformatique de Toulouse, ce qui a permis de réaliser rapidement des calculs complexes sur un grand nombre de séquences.

Plusieurs bases de données sont disponibles afin d'effectuer des comparaisons de séquences:

- **Base RDP** (Maidak et al., 1994) <http://rdp.cme.msu.edu/>: C'est une base de 1 921 179 séquences du gène de l'ARNr 16S couvrant essentiellement le domaine *Bacteria*, dans laquelle il n'y a pas de tri sur la longueur des séquences.
- **Base Greengenes** (DeSantis et al., 2006) <http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>: C'est une base de 1 021 768 séquences du gène de l'ARNr 16S de plus de 1250 bases, affiliées phylogénétiquement. Un alignement est également disponible. Cette base présente l'avantage de proposer des séquences du domaine Archaea.
- **Base SILVA** (Pruesse et al., 2007) <http://www.arb-silva.de/>: C'est une base de séquences des gènes des ARNr 16S et 23S. La base de l'ARNr 16S de plus de 900 bases contient actuellement 555 530 séquences.

Les inventaires moléculaires enrichissent de jour en jour la bibliographie scientifique, analysant la diversité microbienne des écosystèmes, du plus exotique aux plus communs (sol, mer, océan, lac et rivière). Ils ont permis d'enrichir nos connaissances sur la compréhension des écosystèmes microbiens, jusqu'alors limitées. Ils résultent de l'enrichissement croissant des bases de données par les séquences trouvées. Dans cette étude nous avons privilégié la base SILVA en raison de la qualité et de la longueur des séquences fournies ainsi que les différentes affiliations phylogénétiques disponibles.

Le développement des techniques de séquençage à haut débit est un moyen d'investigation rapide sur les bactéries ruminales, qui apparaissent très dépendantes de l'alimentation des animaux et des conditions du milieu. Ces méthodes peuvent nous aider considérablement à progresser dans la compréhension de l'écosystème ruminal et son fonctionnement notamment dans la digestion des lipides.

Chapitre 3 - Métabolisme ruminal des acides gras

I. Lipides et les acides gras

1. Nomenclature et analyse des acides gras

Les lipides sont des substances très hétérogènes, peu ou pas solubles dans l'eau, dont les rôles dans les systèmes biologiques sont très variés. Ils sont composés essentiellement d'acides gras (AG) qui sont des chaînes de carbones présentant à l'une des extrémités une fonction acide, le groupement carboxyle, et un groupement méthyle à l'autre extrémité ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$). La nomenclature des AG repose sur quatre critères :

- le **nombre d'atomes de carbone** (un AG ayant 18 atomes de carbone ou acide octadécanoïque est en général noté C18).
- le **nombre de doubles liaisons** ($\text{C}=\text{C}$). Les AG saturés (AGS) ne présentent aucune double liaison alors que les acides gras insaturés (AGI) comprennent au moins une double liaison avec une distinction entre les AG monoinsaturés (AGMI) ayant une double liaison et les AG polyinsaturés (AGPI) ayant plus d'une double liaison.
- la **position des doubles liaisons** ($\text{C}=\text{C}$), c'est-à-dire la position de l'atome de carbone qui porte la double liaison, déterminée à partir de l'extrémité CH_3 (dans ce cas le numéro des carbones est désigné par les lettres n- ou ω) ou l'extrémité COOH (où le numéro des carbones est indiqué par la lettre Δ , utilisée dans cette étude).
- la **configuration des doubles liaisons** ($\text{C}=\text{C}$), qui peuvent être : *cis* (c) lorsque les atomes d'hydrogène sont du même côté de la liaison formant ainsi un coude au niveau de la double liaison, ou *trans* (t) lorsqu'ils sont de part et d'autre de la double liaison. Cette différence de configuration stérique modifie leurs propriétés, en particuliers physiques : le point de fusion des AG *trans* est plus élevé que celui de leurs isomères *cis*, ce qui les rapproche des AG saturés.

Lorsque deux doubles liaisons sont séparées par une seule simple liaison carbone-carbone, elles sont dites conjuguées. Dans le cas contraire, elles sont qualifiées de non-conjuguées, ce qui est le cas de la majorité des AGPI.

Les lipides peuvent être associés à d'autres substances, comme les glucides, formant ainsi des glycolipides, ou à du phosphore, formant des phospholipides. Les AG peuvent être libres ou estérifiés avec du cholestérol ou avec des alcools, principalement du glycérol, formant alors des glycérides (mono, di ou triacylglycérols, selon le nombre d'AG).

Le grand nombre d'isomères possibles pour une même chaîne de carbone rend difficile la détermination de la composition précise en AG. De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour l'analyse des AG. La plus couramment employée est la chromatographie. Les techniques de chromatographie liquide (HPLC) et de chromatographie en phase gazeuse (CPG) permettent une excellente séparation des différents isomères. La CPG, à l'aide d'une colonne capillaire polaire de 100 m, met par exemple en évidence 10 pics attribués à 20 isomères d'acide linoléique dont des acides linoléiques à doubles liaisons conjuguées (CLA), l'HPLC permet quant à elle de séparer 16 pics (Sehat et al., 1998). La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse permet d'identifier et/ou de quantifier précisément les composés présents sous les pics, révélant parfois des coélutions d'AG.

2. Nature et source des lipides de la ration

Dans les rations de ruminants laitiers, les AG sont présents sous forme de phospholipides et de glycolipides (essentiellement des galactolipides) qui constituent la majorité des lipides des plantes fourragères, et aussi sous forme de triacylglycérols (couramment appelés triglycérides) issus des aliments concentrés (Harfoot et Hazlewood., 1988). Les lipides des céréales, des protéagineux et des oléagineux sont principalement constitués de triacylglycérols (98 %) et sont essentiellement des AG insaturés à 18 carbones. Les lipides des fourrages sont riches en acide alpha-linolénique (c9,c12,c15-C18:3), tandis que les aliments concentrés contiennent en général beaucoup d'acide linoléique (c9,c12-C18:2) et d'acide oléique (c9-C18:1) (Harfoot et Hazlewood., 1988), à l'exception des graines de lin riches en acide linolénique et de certaines matières premières dérivées de l'huile de palme, riches en acide palmitique (C16:0).

Les rations de ruminants laitiers contiennent usuellement peu de lipides, généralement moins de 3% de lipides de la MS. Cependant, des sources de lipides peuvent être ajoutées afin de couvrir les besoins énergétiques ou limiter le déficit des animaux durant certaines périodes du cycle biologique pour lesquelles, soit la disponibilité en fourrages est réduite, soit l'ingestion volontaire d'aliments est limitée. L'apport de lipides végétaux dans la ration des ruminants

laitiers vise aussi à moduler la teneur en matière grasse du lait et son profil en AG, afin d'obtenir un produit présentant les qualités technologiques désirées, mais aussi qui répond aux attentes diététiques des consommateurs de plus en plus soucieux de leur santé (Ashes et al., 1997; Chilliard et al., 2001; Lock et Bauman., 2004).

Dans les tissus animaux et végétaux, la majorité des AG présentent des chaînes paires, non ramifiées, à 16 ou 18 carbones. Certains AG sont insaturés et en général, les doubles liaisons sont en position *cis*. Cependant, dans les tissus ou dans le lait des ruminants, il y a des AG de configuration *trans* produits par les micro-organismes ruminiaux. Des AG à chaîne impaire ou ramifiée peuvent être trouvés, ils sont également issus du métabolisme bactérien.

II. Digestion ruminale des lipides et leur devenir dans l'organisme

Le métabolisme lipidique dans le rumen est caractérisé par l'existence de deux phénomènes d'une part une lipolyse des triacylglycérols alimentaires suivie d'une hydrogénation des acides gras, et d'autre part une synthèse lipidique réalisée par les micro-organismes du rumen. Des revues sur la lipolyse et la biohydrogénation ont été réalisées par plusieurs auteurs (Harfoot et Hazlewood., 1988; Doreau et Chilliard., 1997; Jenkins, 1993).

1. Lipolyse :

L'hydrolyse des esters lipidiques alimentaires est réalisée par la flore lipolytique ruminale. Cette étape permet la production d'acides gras libres d'une part (pour permettre leur BH) et du glycérol et du galactose, d'autre part, qui sont rapidement fermentés en AGV, principalement en propionate et en butyrate (Tamminga et Doreau, 1991).

La lipolyse est en général considérée comme une étape rapide, elle dure moins d'une heure (Dawson et al., 1974). Cependant, la cinétique précise de cette phase a été peu étudiée (Sauvant et Bas, 2001). Il a été montré, que plus de 90% des triacylglycérols contenus dans le régime disparaissent avant d'atteindre le duodénum (Bauchart et al., 1990). Bien que le taux d'hydrolyse soit généralement élevé (> 85%), un certain nombre des facteurs peuvent diminuer la lipolyse (Demeyer et Doreau, 1999), comme par exemple, un pourcentage élevé

de lipides dans la ration (Beam et al., 2000) ou un pH bas du rumen (Van Nevel et Demeyer, 1996).

Différentes souches de bactéries produisent des lipases extracellulaires. Parmi ces bactéries, la plus connue est *Anaerovibrio lipolytica*, l'une des bactéries lipolytiques les plus actives (Prins et al., 1975), qui est capable d'hydrolyser les triacylglycérols mais pas les galactolipides et les phospholipides (Fonty et al., 1995). Le pH optimal d'*Anaerovibrio lipolytica* est 7.4 (Henderson, 1971), sa croissance diminue à pH 5.7 et est inhibée à pH 5.3 (Hobson, 1965). Les phospholipides sont hydrolysés par des souches de *Butyrivibrio* (Harfooft et Hazlewood, 1988) qui sont aussi capables d'hydrolyser les triacylglycérols. Dans la littérature, l'hydrolyse des galactolipides a peu été abordée et les études réalisées sont contradictoires (Dawson et al., 1977; Faruque et al., 1974). D'autre part, jusqu'à présent, aucune activité lipolytique n'a pu être attribuée aux champignons du rumen. De même, l'implication des protozoaires ciliés dans l'hydrolyse des lipides alimentaire n'a pas été prouvée de façon claire (Harfooft et Hazlewood, 1997).

2. Biohydrogénation des acides gras insaturés

La biohydrogénation (BH) des AGI est une réaction chimique mise en œuvre par les bactéries qui saturent les doubles liaisons C=C en une ou plusieurs étapes. Cette BH a pour produit terminal, un AGS, le C18:0 pour les AGI à 18 carbones. Cette réaction n'est jamais complète, elle varie en fonction des conditions du milieu. Une quantité plus ou moins importante d'intermédiaires échappe à une saturation complète et peuvent être absorbés dans l'intestin.

Les AGI en C18 (c9-C18:1, c9,c12-C18:2 et c9,c12,c15-C18:2) sont prépondérants dans l'alimentation des ruminants. Toutefois, comme le c9-C18:1 est transformé rapidement et principalement en C18:0 (seulement 3% sont isomérisés en t-C18:1, Ward et al., 1964), seules les BH de c9,c12-C18:2 et de c9,c12,c15-C18:2 seront présentées dans cette étude puisqu'elles sont prépondérantes dans la production d'AG *trans*, objets de ce travail.

a. Biohydrogénation de l'acide linoléique

La BH de c9,c12-C18:2 commence par une isomérisation, avec la formation d'une double liaison *trans* en position 11 donnant naissance au c9,t11-CLA, communément appelé acide ruménique (Kepler et al., 1966 ; Kramer et al., 1998) . Ce CLA peut soit sortir du rumen et être absorbé, soit subir l'hydrogénation de la double liaison *cis* en position 9 du c9,c12-C18:2 sous l'action d'une réductase microbienne et donner l'acide vaccénique (t11-C18:1) qui peut à son tour être absorbé ou transformé en acide stéarique (C18:0).

Il existe une autre voie de biohydrogénation de c9,c12-C18:2. Il peut être transformé en t10,c12-CLA qui ensuite subit une hydrogénation de la double liaison en position 12, conduisant à la formation de t10-C18:1. La biohydrogénation de c9,c12-C18:2 permet ainsi la synthèse des c9,t11-CLA et t10,c12-CLA (Figure 6).

Les deux premières réactions étant rapides, le CLA est éphémère en particulier le c9,t11-CLA qui disparaît plus vite que les autres isomères. La réaction finale est lente, de ce fait, le t11-C18:1 a tendance à s'accumuler.

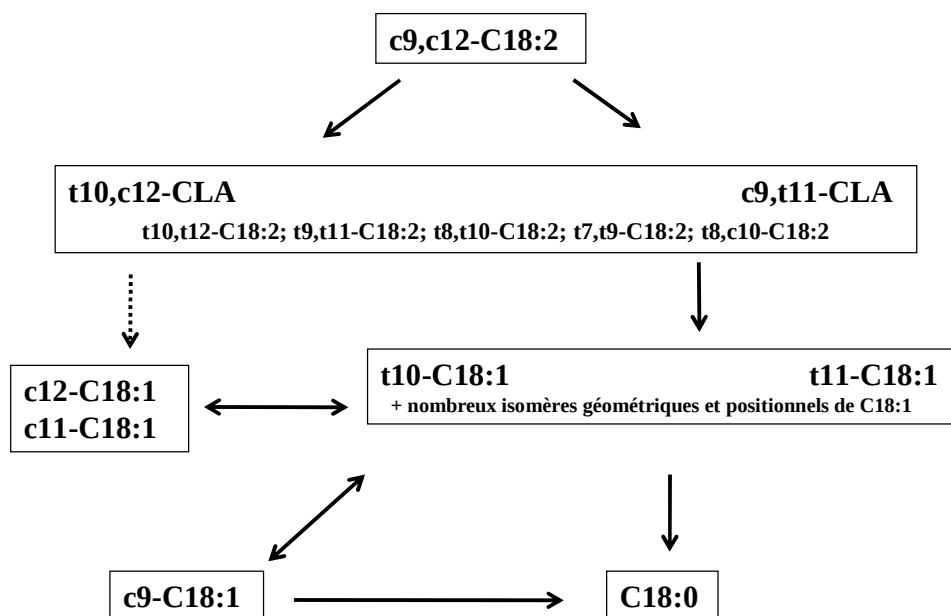


Figure 6. Biohydrogénation de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2) et de l'acide oléique (c9-C18:1). D'après Enjalbert et Troegeler-Meynadier (2009).

b. Biohydrogénation de l'acide α -linolénique

Il s'agit de l'AGI prédominant dans le régime des ruminants au pâturage. La voie généralement admise se décompose en 4 étapes. Une réaction initiale d'isomérisation (position c12) transforme le c9,c12,c15-C18:3 en un intermédiaire conjugué, le c9,t11,c15-C18:3, appelé acide linolénique conjugué (CLnA). Ce triène subit ensuite l'hydrogénation de la double liaison en position 9, produisant du t11,c15-C18:2.

Une hydrogénation supplémentaire avec éventuellement une isomérisation donne naissance à des t-C18:1 majoritairement du t11-C18:1, mais aussi du c15-C18:1 (Harfoot et Hazlewood., 1997). Une autre voie de BH a été proposée par (Destailats et al., 2005) où le c9,c12,c15-C18:3 est isomérisé en c9,t13,c15-C18:3 formant le t13,c15-C18:2, qui donne naissance au

t13-C18:1. Kramer et al. (2004) ont émis une hypothèse sur la production de t10,c12,c15-C18:3 à partir du c9,c12,c15-C18:3 donnant le t10,c12-C18:2 lors d'un état de dysfonctionnement (Figure 7). Bien que les CLA ne soient pas des intermédiaires majoritaires de la BH de c9,c12,c15-C18:3, Collomb et al. (2004) ont montré que du t11,c13-CLA était produit durant celle-ci. Cependant, il existe peu d'études et de données sur la BH du c9,c12,c15-C18:3.

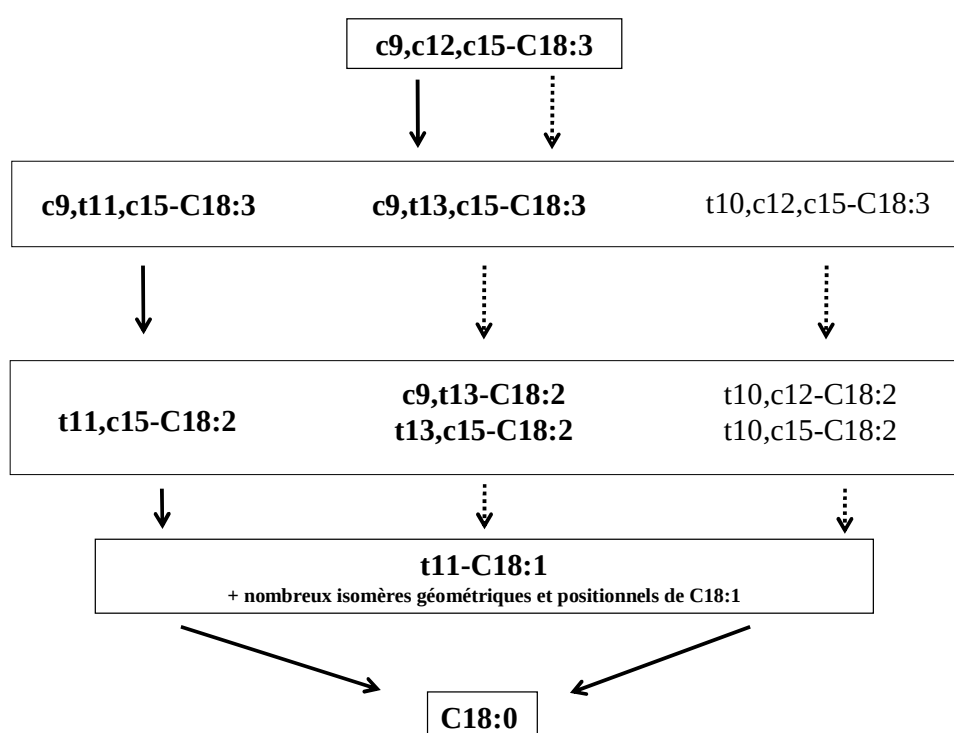


Figure 7. Biohydrogénation de l'acide α-linolénique (c9,c12,c15-C18:3), d'après Enjalbert et Troegeler-Meynadier (2009), Destailats et al. (2005) et Kramer et al. (2004).

c. Bactéries impliquées dans la BH

L'intensité de l'impact des lipides sur l'ingestion dépend de ses effets négatifs sur le métabolisme ruminal : un apport lipidique inférieur à 5% de la MS influence peu la digestion ruminale (Doreau et Chilliard, 1997), mais un apport supérieur a un effet délétère sur les bactéries fibrolytiques du rumen, diminuant la digestion des parois végétales Harfoot et Hazlewood, 1988; Jenkins, 1993; Veira et al., 2001). Ce seuil de 5% est indicatif car les effets des lipides sur le métabolisme ruminal et l'ingestion ne dépendent pas que de la quantité ajoutée, mais aussi de la nature des AG, de la quantité libérée et de la vitesse de libération, sachant qu'une libération plus lente a moins d'effet négatif sur les micro-organismes (Jenkins, 1993; Allen, 2000).

Concernant les bactéries impliquées dans la BH du c9,c12-C18:2 et du c9,c12,c15-C18:3, elles peuvent être classées en 2 groupes : A et B en fonction du substrat qu'elles utilisent (Kemp et Lander, 1984). Le groupe A comprend des bactéries capables d'hydrogéner le C18:2 et le c9,c12,c15-C18:3 en t11-C18:1. Les deux groupes A et B peuvent effectuer les premières étapes de la BH produisant les t-C18:1, mais seules les bactéries du groupe B effectuent la dernière étape. Des recherches ont néanmoins permis d'isoler une souche de *Butyrivibrio hungatei* capable de réaliser les trois réactions (van de Vossenberg et Joblin, 2003). Un nombre restreint de bactéries est responsable de l'hydrogénation finale, ce qui pourrait expliquer sa lenteur. L'étude des bactéries pouvant être impliquées dans la BH a abouti à l'identification de certaines souches bactériennes pouvant biohydrogéner les AGI. Kemp et al. (1975) a réalisé une étude avec plus de 200 souches de bactéries, parmi lesquelles seulement 30 avaient une activité de BH dont 5 (*Ruminococcus albus*, deux espèces du genre *Eubacterium* spp. et deux espèces du genre *Fusocillus* spp.) parmi les 30 montraient une capacité significativement importante.

Au cours des 10 dernières années, d'autres souches ont été isolées (*Megasphaera elsdenii* YJ-4 par Kim et al. (2002); *Butyrivibrio hungatei* Su6 par Van de Vossenberg et Joblin, (2003); *Butyrivibrio fibrisolvens* TH1 par Fukuda et al. (2005); *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-5 par Fukuda et al., (2006); *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-10 par Fukuda et al., (2007); *Clostridium proteoclasticum* B316 et P-18 par Maia et al., (2007) et *Propionibacterium acnes* par Wallace et al., (2007).

La bactérie la plus étudiée pour son implication dans le processus de biohydrogénation est *Butyrivibrio fibrisolvens* (Polan et al., 1964; Kepler et al., 1966). Il a été montré que cette bactérie est capable de biohydrogéner le C18:2 en t-C18:1, mais pas jusqu'au C18:0 (Polan et al., 1964). Par ailleurs, Polan et al. (1964), ont signalé une amélioration de l'activité de BH lorsque *Butyrivibrio fibrisolvens* était mise en incubation avec *Megaspahaera elsdenii* et la souche *Selenomonas* 233. Les isomères produits par *Butyrivibrio fibrisolvens* sont principalement le c9,t11-CLA et le t11-C18:1, elle en serait la principale productrice. D'autres espèces synthétisent également des isomères t11 : comme le t9,t11-CLA et le t11-C18:1 produits par *Selenomonas ruminantium* (Fujimoto et al., 1993). Kim et al., (2002) ont montré que *Megaspahaera elsdenii* est capable de produire l'isomère t10,c12-CLA. Cependant, Wallace et al. (2006) ont obtenu cet isomère avec la bactérie *Propionobacterium acnes* et pas avec *Megaspahaera elsdenii*. D'autre part, jusqu'à présent, seule *Butyrivibrio fibrisolvens* a été étudiée pour son rôle dans la BH de l'acide linoléique (Kepler et al., 1966).

Des études ultérieures, ont pu mettre en évidence quelques bactéries du groupe B dont deux bactéries du genre *Fusocillus*. Cette bactérie a les mêmes propriétés que *Butyrivibrio hungatei*. D'autre part, des analyses phylogénétiques basées sur l'ARNr 16S montrent que *Butyrivibrio hungatei* faisant partie de la classe des Clostridiales est situé sur un cluster qui est très proche de *Clostridium proteoclasticum* (appelé maintenant *Butyrivibrio proteoclasticus*) et de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Kopečný et al., 2003; Paillard et al., 2007; Moon et al., 2008). *In vitro*, *Butyrivibrio proteoclasticus* est une espèce capable de biohydrogéner les AGPI pour donner du C18:0, cependant, Huws et al., (2011) ont montré *in vivo* que la corrélation entre la concentration de C18:0 et l'abondance de *Butyrivibrio proteoclasticus* dans le rumen était très faible.

Ces bactéries ayant des substrats différents : utilisatrices d'acide lactique (*Selenomonas ruminantium*, *Megaspahaera elsdenii*, *Propionibacterium acnes*) et fibrolytiques (*Butyrivibrio*, *Ruminococcus*), vont varier avec l'alimentation des animaux en particulier le ratio fourrages /concentrés.

3. Absorption intestinale

Après le passage dans la caillette, le bol alimentaire arrive dans le duodénum qui est un milieu particulièrement acide (pH de 2.0 à 2.5). A ce niveau, la majorité des AG libres sont adsorbés aux particules solides et les phospholipides sont quant à eux distribués de façon équitable entre la phase aqueuse et la phase solide du duodénum (Bauchart, 1993). Les sels biliaires interviennent dans la séparation des AG libres et leur solubilisation dans les structures micellaires. En outre, les phospholipases pancréatiques assurent l'hydrolyse des phospholipides et les lipases pancréatiques celle des triacylglycérols d'origine microbienne ainsi que ceux provenant des huiles alimentaires protégées. Les acides gras issus de l'hydrolyse des triacylglycérols et des phospholipides sont eux aussi solubilisés dans la phase micellaire pour être absorbés (Bauchart, 1993). Une faible partie des acides gras (15 à 25 %) est absorbée directement dans la partie proximale du jéjunum alors que 55 à 65 % d'entre eux sont absorbés dans les parties moyenne et distale du jéjunum. Dans une méta-analyse de la littérature, Glasser et al. (2008) rapportent que les taux de digestibilité intestinale sont de 44,8% pour le c9,t11-CLA et de 82,4% pour le t11-C18:1. Doreau et Ferlay (1994), ont montré qu'il n'existe pas de relation entre la digestibilité intestinale des AG et la quantité de lipides ingérée. Néanmoins, Bauchart (1993) a noté que le coefficient d'absorption intestinale peut varier de 80 (pour les AGS) à 92 % (pour les AGPI) pour des régimes à faible teneur en matières grasses (2 à 3 % de la MS). Le transport des lipides dans le sang est assuré par les lipoprotéines jusqu'aux différents tissus.

4. Métabolisme mammaire

La mamelle prélève environ la moitié des AG du lait directement dans le sang artériel, mais seulement des AG comportant plus de 14 carbones. L'autre moitié est synthétisée par les cellules mammaires qui ne produisent que des AG à 16 carbones et moins. Le taux de transfert des isomères CLA vers la mamelle serait en moyenne de 25 %, mais seulement 10% pour le t10,c12-CLA (Chouinard et al., 1999a; 1999b). Néanmoins, la mamelle, comme la plupart des tissus de mammifères, possède une $\Delta 9$ -désaturase, capable de convertir une partie du C18:0 prélevé en c9-C18:1 et une partie t11-C18:1 qu'elle prélève dans le sang en c9,t11-CLA. Cette synthèse mammaire est à l'origine de la majorité du c9,t11-CLA du lait (Griinari et al., 2000). D'autre part, une alimentation riche en CLA entraîne une augmentation de la teneur en CLA dans le lait avec une diminution de la production et de la concentration en

matière grasse (Chouinard et al., 1999a). L'isomère CLA majoritairement responsable de cette inhibition est le t10,c12-CLA (Bauman et Griinari, 2000). Cette diminution de la matière grasse du lait est aussi associée à une augmentation de la teneur du lait en t10-C18:1 (Bauman et Griinari, 2000). Les isomères t10,c12-CLA et t10-C18:1 seraient favorisés par une isomérase bactérienne spécifiquement activée par les pH acides (Piperova et al., 2002), ce qui pourrait expliquer la chute de taux butyreux lors de l'administration de régimes riches en concentrés (Kalscheur et al., 1997). En outre, le t10,c12-CLA ne peut être produit qu'au niveau ruminal, car il n'existe pas de Δ 12-désaturation tissulaire capable d'ajouter une double liaison en position 12 sur le t10-C18:1 (Raes et Demeyer, 2004).

La nature des AG longs dans le lait, en particulier la quantité d'isomères t10 et t11, dépend donc de la BH ruminale. Nous nous limiterons à l'étude des facteurs de variation affectant la digestion ruminale des lipides. Parmi ces facteurs, l'élément le plus efficace et le plus facile à mettre en œuvre est l'alimentation.

III. Facteurs de variation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique

Le flux d'AG *trans* sortant dépend de l'efficacité de toutes les réactions de digestion des lipides se déroulant dans le rumen et dépendant de l'alimentation de l'animal. Ce flux augmente avec l'efficacité de la lipolyse et de l'isomérisation des AG alimentaires, et diminue lorsque l'efficacité de la dernière étape de BH augmente (Enjalbert et Troegeler-Meynadier, 2009). Par ailleurs, les facteurs alimentaires (présentés dans la figure 8) peuvent moduler le profil isomérique des AG *trans* formés.

1. Facteurs de variation de l'efficacité globale de la biohydrogénation

L'efficacité globale de la BH peut être évaluée *in vivo* ou *in vitro* par le calcul de la disparition des AGI (Fievez et al., 2007), et l'apparition des produits (Troegeler-Meynadier et al., 2006).

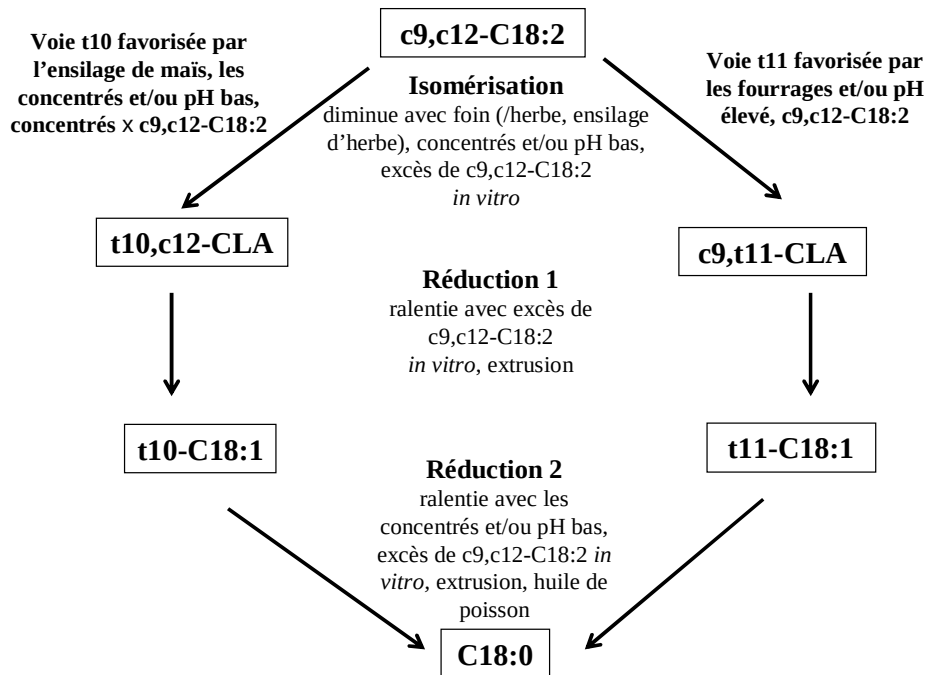


Figure 8. Les principaux effets de l'alimentation sur les trois étapes de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2). D'après Troegeler-Meynadier et al. (2006)

a. Composition de la ration en fourrages et en concentrés

- Nature du fourrage

Les teneurs des AG en CLA dans la matière grasse du lait sont élevées quand les vaches sont au pâturage (Dhiman et al., 1999; Palmquist 1998; Looor et al., 2003). Cependant, le stade physiologique de l'herbe pâturée peut être un facteur de variation de la teneur en AG. La teneur en CLA du lait diminue avec la maturation de l'herbe (Chouinard et al., 1998). Collomb et al. (2001) ont noté dans le lait de vaches au pâturage, une augmentation de la concentration en CLA et en t-C18:1 avec l'altitude où l'herbe serait plus riche en AGPI. Excepté l'ensilage d'herbe (Doreau et al., 2005), les fourrages conservés sont moins efficaces, en particulier les foin (Ribeiro et al., 2005) et l'ensilage de maïs (Chilliard et al., 2001). Ce résultat provient en partie du fait que le foin contient généralement des quantités plus faibles d'AG que l'herbe, mais aussi d'une moindre disparition des AGPI.

- **Ratio fourrages / concentrés**

Des études ont montré que lorsque la part de fourrages dans la ration augmente, la teneur en CLA et en t-C18:1 du lait augmente (Jahreis et al., 1997; Dhiman et al., 1999b; Ward et al., 2003). Par opposition, l'augmentation de la proportion de concentrés dans la ration diminue l'efficacité de la BH du c9,c12-C18:2 *in vivo* (Lor et al., 2004; Glasser et al., 2008; Enjalbert et Troegeler-Meynadier et al., 2009). Par exemple, Gerson et al. (1983) ont constaté que la diminution de la part de fibres (cellulose brute) dans la ration de 42,8 à 19,5% et l'augmentation du pourcentage d'amidon de 12,2 à 35,7 % entraînent une chute de la BH d'environ 50%.

Ce phénomène serait dû principalement à une acidification du milieu induite par l'amidon (Gerson et al., 1983). Sachant que le pH optimal de l'isomérase de *Butyrivibrio fibrisolvens* (principale bactérie étudiée et impliquée dans la BH) est proche de la neutralité, un pH acide inhiberait alors son activité et par conséquent la BH. Des études menées *in vitro* (Latham et al., 1972; Gerson et al., 1985) ont montré que la BH des AGPI était plus lente lorsque les vaches recevaient une alimentation riche en concentrés. Latham et al. (1972) ont constaté, parallèlement à ce phénomène, une augmentation du nombre de bactéries lactiques et productrices de propionate et une diminution du nombre de *Butyrivibrio* spp..

Ainsi, les fourrages peuvent agir en apportant des AGPI (essentiellement l'herbe), des fibres favorisant un pH ruminal proche de la neutralité et enfin en stimulant des bactéries fibrolytiques, dont *Butyrivibrio fibrisolvens*, qui représentent 25% des bactéries ruminales lorsque le régime est riche en fourrages mais seulement 2.3% lorsqu'il en est pauvre Lock et Garnsworthy, 2003).

b. Effet d'une supplémentation lipidique

L'addition d'AGPI dans la ration des vaches a également un fort impact sur le métabolisme ruminal puisque les AGPI ont une action plus négative que les AG saturés (Jenkins, 1993). L'addition d'huiles végétales dans la ration des ruminants laitiers est un moyen de modifier à court terme la production et la composition de la matière grasse du lait. Les effets de l'apport de lipides végétaux sur la production et la composition du lait de vache ont été très étudiés et de nombreuses revues ont été publiées (Bessa et al., 2000; Chilliard et al., 2001). L'addition

d'huile dans la ration augmente la concentration des AG dans le rumen, mais y diminue le pourcentage de c9,c12-C18:2, ceci est probablement dû à une efficacité élevée de la BH quand la matière grasse dans la ration augmente (Schmidely et al., 2008). Les principaux facteurs de variation de l'apport de lipides sont la quantité ajoutée, l'origine (nature des AGPI), le mode de présentation (huile ou graines) et les traitements technologiques appliqués. L'augmentation de la quantité de matières grasses en fortes concentrations dans le milieu ralentit la BH (Beam et al., 2000). *In vitro*, un excès de c9,c12-C18:2 inhibe sa propre BH (Kepler & Tove 1967) en entraînant une accumulation des intermédiaires et une saturation des différentes réactions de la BH (Troegeler-Meynadier et al., 2006).

D'autre part, la nature de la matière grasse agit différemment sur la BH, par exemple, l'adjonction d'huile de tournesol dans le régime des vaches augmente de manière plus importante la teneur en CLA dans le lait qu'une supplémentation en huile de soja, ou en huile de lin, plus riche en c9,c12,c15-C18:3 (Kelly et al., 1998; Dhiman et al., 2000; Chouinard et al., 2001). L'apport simultané en même quantité de c9,c12-C18:2 et de c9,c12,c15-C18:3 augmente les teneurs en t-C18:1 et en CLA dans le lait. D'autre part, les matières grasses sous forme de graines auraient un effet moins important sur la BH que les huiles. Cet effet s'expliquerait par une la nécessité d'une digestion préalable par les micro-organismes de la paroi végétale des graines d'où une libération progressive des AG dans le milieu qui prévient l'accumulation des intermédiaires de la BH (Chilliard et al., 2000). Toutefois, un traitement des graines par extrusion afin de fragiliser la paroi végétale peut rétablir la BH mais qui reste plus faible qu'avec les huiles. Chouinard et al. (2001) ont obtenu des teneurs en CLA élevées dans le lait lorsque les vaches recevaient des graines de soja chauffées.

c. Autres facteurs de variation

D'autres facteurs peuvent intervenir dans la possibilité d'accumulation des intermédiaires de la BH. Par exemple, le cuivre module la production de CLA en participant à la régulation de toutes les activités enzymatiques nécessaires à cette voie métabolique (Sol-Morales et al., 2000; Engle et al., 2000). Toutefois, l'influence du cuivre, probablement à cause de sa complexité, demeure floue. Il a été montré que d'autres substances peuvent affecter la BH, par exemple, l'addition de monensin à la ration peut augmenter la teneur en CLA dans le lait (Dhiman et al., 1996). Un autre facteur qui pourrait avoir un effet sur la BH est le temps de séjour des particules alimentaires. En effet, la vidange du rumen s'effectue plus rapidement

avec un régime riche en concentrés qu'avec un régime riche en fourrages, de ce fait, la BH pourrait être incomplète car elle n'a pas eu le temps de se terminer.

2. Facteurs de variation du ratio t10 / t11

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés en particulier, à l'équilibre des AG t10 et t11 mis en place lors de la BH. Cet équilibre est intimement lié à la composition de la ration en fourrages et concentrés et surtout à l'addition ou non de matière grasse insaturée.

a. Effet du ratio fourrages / concentrés sans addition de matières grasses

Lorsque les régimes sont à base de fourrages et ne contiennent pas de matière grasse ajoutée, ce sont les AG t11-C18:1 qui prédominent. Avec des régimes riches en fourrages, la proportion d'AG t10-C18:1 est faible (0.5% des AG totaux) dans le duodénum (Doreau et al., 2005) et l'augmentation de la proportion de concentrés fait augmenter cet AG (Pipero et al., 2002). Lors d'une augmentation du pourcentage de concentrés (de 40% à 75%) dans la ration, une modification du profil isomérique a été notée dans l'étude de Pipero et al. (2002) où il y a eu une augmentation des AG t10 dans le flux duodéal de 0,3 g/ jour avec la ration pauvre en concentrés à 29,1 g/jour lorsque la ration en était riche.

En effet, il a été montré (Bradford et Allen, 2004; Jurjan et al., 2004) que l'amidon rapidement dégradé aboutit à une formation plus importante d'AG t10-C18:1 que de l'amidon lentement dégradé. Cependant, l'augmentation des AG t10 a été aussi rapportée avec des rations à 50% de maïs grain, source d'amidon lentement dégradé (Pipero et al., 2002).

b. Effet du ratio fourrages / concentrés avec addition de matières grasses

Certaines revues (Chilliard et Ferlay, 2004; Chilliard et al., 2001) traitent des modifications du profil isomérique des AG t-C18:1 (principalement t10 et t11) et CLA (principalement c9,t11-CLA et t10,c12-CLA) dans le lait. Il a été montré que les proportions de ces isomères peuvent varier selon des changements alimentaires. Dans la majorité des études, ce sont les intermédiaires t11 qui sont les plus abondants dans le rumen (tableau 5), mais, dans certains cas, les AG t10 peuvent être majoritaires. Comme le montre ce tableau, la proportion d'AG t10 augmente lorsque le pourcentage de concentrés de la ration augmente, ou lors d'addition de matières grasses à la ration, et surtout lorsque ces matières grasses sont riches en c9,c12-C18:2. La combinaison d'une teneur élevée en concentrés et d'une addition de matières grasses conduit également à une augmentation des AG t10 dans un certain nombre d'essais.

Tableau 5. *Pourcentage moyen des principaux acides gras trans dans les flux omasal ou duodenal, rapports par Duckett et al. (2002), Piperova et al. (2002), Sackmann et al. (2003), Shingfied et al. (2003), Loo et al. (2004), Lundy et al. (2004), Lee et al. (2005), Loo et al. (2005c), Akraim et al. (2006) and Lee et al. (2006a). D'après Enjalbert et Troegeler-Meynadier, (2009).*

	Pas de matière grasse ajoutée	Principale matière grasse ajoutée			Pourcentage de	
		source de c9,c12-C18:2	source de c9,c12,c15-C18:3	Huile de poisson	≤50	>50
t6+t7+t8-C18:1	0,35	1,16	0,87	1,16	0,57	0,97
t9-C18:1	0,25	0,64	0,55	0,80	0,39	0,64
t10-C18:1	0,86	8,35	2,89	4,98	1,53	7,60
t11-C18:1	3,90	5,22	10,44	16,85	7,96	5,11
t12-C18:1	0,50	1,04	1,01	1,50	0,89	0,88
t13+t14-C18:1	1,16	2,41	3,76	2,49	1,76	2,76
t15-C18:1	0,71	0,94	1,82	1,09	1,02	1,19
c9,t11-C18:2	0,11	0,09	0,15	0,24	0,18	0,08
t9,t11C18:2	0,03	0,03		0,12	0,07	0,01
t10,c12-C18:2	0,06	0,11	0,02	0,06	0,07	0,07
c11,t13-C18:2	0,01	0,02	0,01	0,05	0,01	0,02
t11,t13-C18:2	0,04	0,02	0,16	0,06	0,06	0,05
t11,c15-C18:2	0,41	0,86	2,97	3,30	1,68	2,95
c9,t11,c15-C18:3			0,16		0,02	

Griinari et al., (1998) ont noté une augmentation marquée des isomères t10 lorsqu'il y a addition d'AGI à une ration pauvre en fibres (diminution du pourcentage de fibres de 50 à 20%). Cette interaction était associée également à la diminution du TB. De même, une augmentation des AG t10-C18:1 a été notée dans le duodénum lorsque des rations riches en concentrés supplémentées avec des AGI étaient administrées aux animaux, (Sackmann et al., 2003; Loor et al., 2005; Lundy et al., 2004). Certains auteurs ont noté une augmentation de la proportion d'AG t10 et une diminution de celle de t11 lors de l'addition de matière grasse insaturée (Shingfield et al., 2006; Roy et al., 2006; Loor et al., 2005).

Comme le montrent les tableaux 5 et 6, les sources de c9,c12,c15-C18:3 ne conduisent pas à une forte formation d'AG t10. Ainsi, comparée à l'huile de tournesol (riche en c9,c12-C18:2), l'addition d'huile de lin (riche en c9,c12,c15-C18:3) conduit à moins d'AG t10-C18:1 et moins de t10,c12-CLA dans le duodénum (Loor et al., 2005). Concernant l'effet de l'huile de poisson sur la BH, les résultats de certaines études restent contradictoires. Loor et al. (2005) ont montré que l'huile de poisson (2,5%) ou l'huile de tournesol (5%) augmentent le ratio t10 / t11, de même Kim et al., (2008) ont noté une augmentation de ce ratio avec une addition de 3% d'huile de poisson. Par contre, Shingfield et al., (2003) ont utilisé 1,6% d'huile de poisson et n'ont rapporté aucun effet.

Le tableau 6 résume les variations du ratio t10 / t11 observées dans différentes expérimentations en fonction du pourcentage et la nature des concentrés dans la ration ainsi que la nature et la quantité de matière grasse ajoutée. Ce tableau montre que le ratio t10 / t11 chez les vaches laitières n'est supérieur à 1 qu'avec des rations contenant plus de 50 à 60% de concentrés, et une concentration en c9,c12-C18-2 supérieure à 1% de la MS. Avec des rations contenant moins de 50% de concentrés, plus habituelles en élevage en France, cette déviation n'est observée que pour des teneurs en c9,c12-C18-2 supérieures à 2% de la MS.

Tableau 6. Variation du ratio t10/ t11 dans l'omasum, le flux duodénal ou dans le lait.

Type d'animaux	MSI (kg/j)	Concentrés dans la ration		Nature de la matière grasse ajoutée dans la ration	Quantité de c9,c12-C18:2 dans la ration	Quantité de c9,c12,c15-C18:3 dans la ration	t10 / t11	Dosage dans	Références
		Pourcentage	Nature						
Vaches laitières		50%	Maïs	Huile de maïs (4% de la MS)			0,2	Lait	Griinari et al. (1998)
		80%					1,2		
Taurillons (410 kg)	10,4	75%	Maïs	ϕ	162,4 g/j (1,6% de la MS)	21,0 g/j (0,2% de la MS)	0,7	Flux duodénal	Duckett et al. (2002)
	10,7	75%		Huile de maïs (5% de la MS)	254,1 g/j (2,4% de la MS)	34,5 g/j (0,3% de la MS)	0,5		
	10,6	75%		Huile de maïs (8% de la MS)	287,1 g/j (2,7% de la MS)	37,1 g/j (0,4% de la MS)	3,3		
Vaches laitières	20,6	25%	Maïs broyé	ϕ (5,7% de la MS)	379 g/j (1,8% de la MS)	83 g/j (0,4% de la MS)	0,3	Flux duodénal	Piperova et al. (2002)
							0,4	Lait	
	23,7	60%		ϕ (4,5% de la MS)	501,0 g/j (2,1% de la MS)	58 g/j (0,2% de la MS)	0,9	Flux duodénal	
							1,2	Lait	
Taurillons (300 kg)	5,9	64%	Maïs broyé	Huile de tournesol (4% de la MS)	115,3 g/j (2,0% de la MS)	25,2 g/j (0,4% de la MS)	1,3	Flux duodénal	Sackmann et al. (2003)
	6,2	76%			155,3 g/j (2,5% de la MS)	23,0 g/j (0,4% de la MS)	4,2		
	5,5	88%			169,3 g/j (3,1% de la MS)	15,6 g/j (0,3% de la MS)	11,3		
Vaches laitières	9,1	60%	Orge	Huile de poisson	91,7 g/j (1,0% de la MS)	112,0 g/j (1,1% de la MS)	1,1	Omasum	Shingfield et al. (2003)
Vaches laitières	20,2	35%	Blé broyé	ϕ	96,7 g/j (0,5% de la MS)	82,1 (1,7% de la MS)	0,1	Flux duodénal	Loor et al. (2004)
	20,2	35%		Huile de lin (3% de la MS)	180,9 g/j (0,9% de la MS)	444,9 g/j (2,2% de la MS)	0,1		
	20,2	65%		ϕ	142,2 g/j (0,7% de la MS)	54,7 g/j (0,3% de la MS)	0,8		
	20,2	65%		Huile de lin (3% de la MS)	238,7 g/j (1,2% de la MS)	442,2 g/j (2,2% de la MS)	0,4		

Vaches laitières	20,1	50%	Maïs concassé	Huile de soja (2,5% de la MS)	502,3 g/j (2,5% de la MS)	66 g/j (0,3% de la MS)	0,2	Omasum	Lundy et al. (2004)
Vaches laitières	17,2	65%	Blé + orge broyés	Huile de lin (5% de la MS)	239,7 g/j (1,4% de la MS)	479,5 g/j (2,8% de la MS)	0,3	Flux duodéal	Loor et al. (2005)
	19,3			Huile de tournesol	676,3 g/j (3,5% de la MS)	64,3 g/j (0,3% de la MS)	1,3		
Vaches laitières	21,9	40%	Blé	φ			0,3	Lait	Shingfield et al. (2006)
	17,4	40%		Huile de poisson + tournesol	> 2,7% de la MS		1,2		
Vaches laitières	17,7	70%	Maïs	φ	54 g/100g AG (1,2% de la MS)	2,8 g/100g AG (0,1% de la MS)	2,7	Lait	Roy et al. (2006)
	20,8	50%		φ	50,7 g/100g AG (0,9% de la MS)	6,4 g/100g AG (0,1% de la MS)	0,3		
	21,6	35%		φ	34,5 g/100g AG (0,4% de la MS)	23,5 g/100g AG (0,3% de la MS)	0,2		
	15,5	70%		Huile de tournesol (après 6 jours de	62,9 g/100g AG (4,2% de la MS)	1,0 g/100g AG (0,1% de la MS)	1,9		
	18,8	50%		Huile de tournesol (après 6 jours de	62,9 g/100g AG (4,21% de la MS)	1,0 g/100g AG (0,07% de la MS)	0,2		
	21,5	35%		Huile de lin (après 6 jours de supplémentation)	18,4 g/100g AG (1,00% de la MS)	49,0 g/100g AG (2,65% de la MS)	0,1		
	14,8	70%		Huile de tournesol (après 18 jours de	62,9 g/100g AG (4,2% de la MS)	1,0 g/100g AG (0,1% de la MS)	13,3		
	18,4	50%		Huile de tournesol (après 18 jours de	62,9 g/100g AG (4,2% de la MS)	1,0 g/100g AG (0,1% de la MS)	5,2		
	20,2	35%		Huile de lin (après 18 jours de	18,4 g/100g AG (1,0% de la MS)	1,0 g/100g AG (0,1% de la MS)	0,1		
Vaches laitières	18,7	50%	Maïs	Graines de lin extrudées + huile de lin	360 g/j (1,9% de la MS)	348g/j (1,9% de la MS)	1,4	Lait	Pottier et al. (2006)

In vitro, l'huile chauffée diminue la proportion d'isomères t11 et augmente celle des AG t10 (Privé et al., 2010). De même, Vazquez-Anon et al. (2008), ont noté une diminution du pourcentage d'AG t11 dans le lait lorsque les vaches recevaient de l'huile de soja chauffée, mais sans effet sur les AG t10.

L'évolution du ratio t10 / t11 est probablement liée à une adaptation de la microflore du rumen, comme suggéré par Roy et al., (2006). Cette adaptation expliquerait en effet que le ratio t10 / t11 évolue au cours du temps lors de supplémentation en matière grasse. Dans certaines études, les isomères t11 (t11-C18:1 et c9,t11-CLA) ont atteint une concentration maximale dans le lait 4 à 7 jours après le début de la supplémentation en matières grasses alors que le t10-C18:1 atteint un plateau à partir du 10^{ème} jour (Bauman et al., 2000; Roy et al., 2006; Shingfield et al., 2006). De même, Choi et al., (2005) ont constaté une production de t10,c12-CLA *in vitro* à pH bas plus élevée lorsque le contenu ruminal provenait de vaches ayant reçu une ration riche en amidon supplémenté avec du c9,c12-C18:2, suggérant que les bactéries ruminales productrices de t10,c12-CLA sont acido-résistantes par rapport à celles produisant le c9,t11-CLA.

L'utilisation d'ensilage de maïs supplémenté avec de l'huile aboutit à une plus forte synthèse d'AG t10 que de l'herbe ou du foin (Kay et al., 2005; Roy et al., 2006). Cet effet pourrait être dû en partie à un pourcentage d'amidon élevé mais aussi au c9,c12-C18:2 qu'on retrouve en quantité supérieure dans l'ensilage de maïs que dans l'herbe ou dans le foin, qui sont plutôt riches en c9,c12,c15-C18:3.

c. Autres facteurs de variation

Certains additifs peuvent affecter le profil isomérique des AG intermédiaires de la biohydrogénation. Les ionophores par exemple, augmentent la production des AG t-C18:1, avec ou sans addition de c9,c12-C18:2 à la ration (Fellner et al. 1997). Jenkins et al., (2003) ont montré que ces AG sont constitués essentiellement d'AG t10. D'autre part, Pottier et al., (2006) ont montré que la vitamine E permet d'empêcher l'augmentation du ratio t10 / t11, mais ne peut pas agir lorsque le ratio est déjà élevé. Sachant qu'avec un régime à base d'herbe, la déviation de la voie t11 à la voie t10 de la BH du c9,c12-C18:2 n'a jamais été rencontrée, la vitamine E, très abondante dans l'herbe, pourrait alors prévenir cette déviation

(Kay et al., 2005). Ces auteurs ont montré que la supplémentation du régime avec de la vitamine E tendait à diminuer la proportion des t10-C18:1 dans le lait, mais de façon très limitée alors que (Pottier et al., 2006) obtenaient une diminution significative de la proportion de t10-C18 :1 dans le lait lorsque de la vitamine E était ajoutée avant le shift t10, mais pas lorsque de la vitamine E était ajoutée après. L'addition de bicarbonate dans la ration favorise la formation des isomères t11 (Piperova et al., 2002), en empêchant un fort abaissement du pH ruminal.

La BH ruminale est une voie mise en place par les bactéries pour lutter contre les effets toxiques des AGPI présents dans les aliments ingérés. Parmi les AGPI, le c9,c12-C18:2 et le c9,c12,c15-C18:3 sont les plus abondants dans la ration des ruminants. Leur BH se fait en trois et quatre étapes respectivement, et est à l'origine de la production d'intermédiaires, principalement des AG *trans* (CLA, CLnA et t-C18:1), pouvant être retrouvés en quantité plus ou moins importante dans les produits issus de ruminants, lait ou viande. Or ces AG *trans* pourraient avoir des propriétés biologiques, en particulier les isomères t11 auraient des effets bénéfiques pour la santé des consommateurs, alors que les isomères t10 sont responsables d'une forte diminution du taux butyreux observée régulièrement chez les vaches laitières recevant des rations riches en amidon et / ou en matière grasse.

Pour le c9,c12-C18:2, deux voies de BH sont admises : la voie t11, effectuée principalement par *Butyrivibrio fibrisolvens* conduisant à la formation du c9,t11-CLA et t11-C18:1 et la voie t10. D'après la bibliographie, les deux bactéries connues pour être capables de produire le t10,c12-CLA (et donc le t10-C18:1) sont *Megasphaera elsdenii* et *Propionibacterium acnes*. Cependant, pour la production d'AG t10 comme pour celle de t11, une ou plusieurs autres bactéries pourraient être impliquées. Pour le c9,c12,c15-C18:3, la voie t11 existe également mais la voie t10 n'a pas été démontrée.

Dans des conditions physiologiques normales, la voie t11 est fortement majoritaire avec un ratio t10 / t11 qui est très inférieur à 1, par contre avec des rations à base d'ensilage de maïs, riches en concentrés et surtout si elles comprennent des suppléments lipidiques riches en AGPI (lin, soja), il peut se produire une déviation de la voie t11 à la voie t10 (dans ce cas le ratio t10 / t11 devient supérieur à 1) associée une baisse très importante du taux butyreux du lait, représentant une contrainte majeure régulièrement constatée en élevage. Les effets du régime alimentaire des vaches conduisant à une forte teneur en isomères t10 dans le lait ont largement été abordés dans la littérature mais peu d'études se sont intéressées aux particularités du métabolisme ruminal des AGPI conduisant à ces isomères t10 et t11. D'autre part, les études réalisées sur les bactéries ruminales qui semblent être impliquées dans la BH, ont été réalisées en cultures *in vitro* et n'ont pas été vérifiées *in vivo*, excepté dans la récente étude de Huws et al. (2011). Afin de mieux maîtriser cette déviation t11 vers t10 de la BH des AGPI, une meilleure connaissance des modalités de son apparition au cours du métabolisme ruminal apparaît indispensable.

Ce travail se propose donc d'enrichir les connaissances sur le sujet par une étude approfondie au niveau du microbiote ruminal et de ses activités de BH en liaison avec l'équilibre t10 / t11.

ETUDE
EXPERIMENTALE

Les acides gras *trans*, présents majoritairement dans les produits issus de ruminants, ont des propriétés biologiques mais qui seraient différentes en fonction des isomères. Parmi ces acides gras, le t10,c12-CLA a des effets négatifs sur la production de matière grasse dans le lait et pourrait affecter négativement la santé humaine, alors que le c9,t11-CLA et le t11-C18:1 seraient plutôt bénéfiques. Ces acides gras sont produits au cours de la BH ruminale des AGPI, produisant en conditions normales majoritairement des isomères t11. Une déviation de la voie t11 vers la voie t10 peut se produire dans le rumen de vaches recevant des régimes riches en concentrés, surtout lorsqu'ils sont supplémentés avec une source de matière grasse insaturée (graines de lin ou de soja en général). Notre travail a donc pour objectif d'expliquer les modalités de cette déviation, afin de mieux la maîtriser en élevage.

Au niveau du métabolisme ruminal deux niveaux sont à explorer : la communauté bactérienne (en particulier les populations de bactéries réalisant la BH, non encore clairement identifiées) et l'activité microbienne (synthèse des enzymes, activité de ces enzymes). A cet effet nous avons tout d'abord mis en place un essai *in vivo* sur 4 vaches tarées recevant 4 rations différentes combinant deux niveaux d'amidon et deux niveaux d'huile de tournesol. Des prélèvements de contenus ruminiaux ont permis d'étudier les effets des rations sur la composition en acides gras, en particulier le ratio t10 / t11, et sur la communauté bactérienne du rumen. D'autre part, les vaches ont servi en parallèle de donneuses de contenu ruminal pour des approches *in vitro* (étude des activités microbiennes et enzymatiques) qui nous ont permis : 1) d'individualiser les potentiels effets directs des substrats d'incubation (teneur en amidon, teneur en c9,c12-C18:2) sur la BH, et en particulier sur le ratio t10/t11, 2) d'explorer les effets de la nature de l'acide gras (c9,c12-C18:2 vs. c9,c12,c15-C18:3) sur le ratio t10 / t11, et 3) de dissocier les potentiels effets du pH sur les activités enzymatiques de la Δ^9 et la Δ^{12} isomérisation. En effet, l'addition d'amidon dans la ration peut agir sur la BH de deux manières, par un effet substrat ou par un abaissement du pH ruminal.

Enfin, une dernière expérimentation a été mise en place avec pour objectif de rechercher un moyen de corriger cette déviation de la voie t11 vers la voie t10. Dans la littérature, la vitamine E de synthèse a souvent été utilisée mais avec plus ou moins d'efficacité. Un essai *in vivo* a donc été réalisé pour tester l'effet de la vitamine E naturelle (dont l'activité biologique est plus élevée que celle de synthèse) sur le ratio t10/t11 sur des vaches en lactation présentant une déviation sévère. En parallèle, mais *in vitro*, une comparaison entre les effets

de la vitamine E naturelle (RRR- α -tocophérol) et la vitamine E de synthèse (dl- α -tocophérol) sur la BH ruminale a été réalisée.

Dans un premier temps, les matériels et méthodes communs des différentes expériences seront présentés avec une description des deux expérimentations menées et des principales analyses utilisées dans ce travail. Ensuite, la présentation de nos différentes études se fera sous la forme d'articles, acceptés, soumis ou en préparation.

MATÉRIELS ET MÉTHODES COMMUNS

Dans cette partie seront abordées les modalités générales des méthodes expérimentales et les deux protocoles réalisés seront décrits, ainsi que les principales méthodes analytiques utilisées. Les éventuels calculs et les analyses statistiques effectuées à partir des données seront détaillés dans chaque article.

I. Méthodes expérimentales : présentation des protocoles

1. Première étape : détermination des modalités de passage de la voie t11 à la voie t10 de la biohydrogénation ruminale des acides gras polyinsaturés *in vivo* et *in vitro*

Ce premier protocole expérimental a été mis en place durant l'année 2008-2009. Il s'agissait d'un essai *in vivo* explorant l'effet de l'enrichissement en amidon et/ou en huile de tournesol d'une ration à base d'ensilage de maïs sur l'équilibre t10/t11 des intermédiaires de la BH des AGPI. Les objectifs de cette première expérimentation étaient de préciser si le passage de la voie t11 à la voie t10 est dû à un pourcentage d'amidon élevé dans la ration, à l'addition d'huile de tournesol, ou à une synergie de ces deux facteurs. D'autre part, la question était de savoir si ce shift était associé à des modifications de la communauté bactérienne. Enfin des essais *in vitro* ont été conduits en parallèle afin de séparer les effets liés à la communauté microbienne de la vache de ceux liés aux substrats (substrats fermentaires, substrats de la BH) et au pH.

a. Essai *in vivo* (Articles 1, 5, 6)

L'essai a été réalisé sur quatre vaches Holstein taries munies d'une canule ruminale. Quatre rations à base d'ensilage de maïs ont été testées. La ration témoin (T) comprenait 22% d'amidon, la ration A était enrichie en amidon (35% amidon), la ration H était enrichie en huile de tournesol (5%) et la ration AH était enrichie en amidon (33%) et en huile (5%). La composition des régimes est présentée dans le tableau 7.

Tableau 7. Ingrédients et composition chimique des régimes administrés aux vaches

	Régime T	Régime A	Régime H	Régime AH
Correspondances des noms des régimes dans les articles				
Article 1	C	HS	O	HS+O
Article 2	Control	High starch	Sunflower oil	High starch + oil
Article 3	Low starch	High starch	Low starch + oil	High starch +oil
Article 4	LSLF	-	-	HSHF
Articles 5 et 6	LS	HS	LSO	HSO
Ingrédients (% MS)				
Ensilage de maïs	68,7	37,7	63,2	32,3
Foin de luzerne	14,3	0,00	14,3	0,00
Blé tendre + Orge	0,00	48,5	0,00	48,5
Tourteau de soja 48	15,5	12,4	16,2	13,1
Huile de tournesol	0,00	0,00	4,82	4,72
Vitamines et minéraux ¹	1,50	1,47	1,50	1,47
Composition (% de MS)				
Protéines brutes	14,6	14,2	14,6	14,2
NDF	39,7	30,9	37,3	28,6
Amidon	21,5	34,8	19,8	33,1
Extrait éthéré	2,90	2,69	7,57	7,26
Composition en acides gras (mg/g de MS)				
C18:0	0,46	0,31	2,30	2,12
c9-C18:1	2,87	2,41	13,5	12,8
c9,c12-C18:2	8,61	8,63	34,1	33,6
c9,c12,c15-C18:3	1,28	1,40	1,24	1,35

¹ P: 40g, Ca: 260g, Mg: 50g, Na: 20g, Zn: 5g, Mn: 4g, Cu: 1g, I: 40 mg, Co: 20 mg, Se: 20mg, vitamine A: 450 000 IU, vitamine D3: 100 000 IU et vitamine E: 1 500 IU.

Les quatre régimes ont été étudiés selon un protocole en carré latin 4×4 (Tableau 8). La durée de chaque période expérimentale était de 4 semaines avec deux semaines d'adaptation au régime témoin (T), sous-période dite de "wash-out" suivies de deux semaines de régime expérimental (T, A, H ou AH), sous-période dite expérimentale.

Tableau 8. Schéma expérimental de l'essai in vivo (carré latin 4x4)

	Vache 1	Vache 2	Vache 3	Vache 4
Période 1	AH	A	H	T
Période 2	H	AH	T	A
Période 3	A	T	AH	H
Période 4	T	H	A	AH

Un prélèvement de contenu ruminal de chaque vache a été réalisé à J-1 (denier jour où toutes les vaches recevaient la ration T) et pendant les deux semaines pendant lesquelles le régime expérimental était distribué, tous les 2 jours de J2 à J14, puis à J15 (retour au régime T pour toutes les vaches). Un litre de contenu ruminal de chaque vache a été prélevé 5 heures après le repas du matin, puis filtré sur un tamis de maille 1,6 mm. Ces prélèvements ont servi pour :

- la mesure des paramètres physicochimiques (**Article 1 page 107**): pH ruminal, détermination des acides gras longs, détermination des acides gras volatils (AGV) et l'acide lactique. Pour les AGV et l'acide lactique, 5 ml de contenu ruminal a été prélevé dans un tube contenant 0,5 ml de HgCl₂ à 2% avant d'être congelés.
- l'analyse de la communauté bactérienne (**Articles 5 et 6 respectivement pages 199 et 233**). Pour cette analyse, 2 ml d'échantillon a été prélevé dans un tube eppendorf stérile sans DNase ni RNase. Deux annexes ont été développées : la première traite l'effet du jour de prélèvement sur la population bactérienne (**Annexe 2 page 231**) et la deuxième l'évolution temporelle de la communauté bactérienne avec le régime AH (**Annexe 3 page 261**).

En outre, à J3 et J13, des mesures de cinétique du pH et du potentiel redox (Eh) ont été réalisées toutes les heures de une heure avant le repas du matin jusqu'à 8 heures après, avec à chaque horaire, un prélèvement de contenu ruminal (filtré à 250µm) pour étudier l'évolution des teneurs en acides gras. Les résultats de cette étude sont développés dans l'**annexe 1 page 129**.

b. Essais *in vitro* (Articles 2, 3, 4)

➤ Effets de la ration des vaches donneuses et du substrat d'incubation sur la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique (Article 2 page 133)

L'objectif de cette étude *in vitro* était de dissocier les effets d'adaptation de l'écosystème ruminal des vaches donneuses aux rations, d'un éventuel effet substrat *sensu stricto* (addition de c9,c12-C18:2 et / ou d'amidon) dans les cultures, sur l'activité des bactéries, en particulier leur capacité à biohydrogéner. Par ailleurs, cette expérimentation nous a permis de vérifier si le contenu ruminal d'une vache subissant la déviation de la voie t11 à la voie t10 pouvait maintenir cette déviation lors de culture batch *in vitro*. A J14 de chaque sous-période expérimentale de l'essai *in vivo*, un litre de contenu de rumen a été prélevé avant le repas du matin sur chaque vache et filtré sur un tamis 1,6 mm. Au laboratoire (après 30 minutes de transport dans des conditions d'anaérobiose et à 39°C), le pH a été mesuré et 100 ml de chaque contenu ruminal ont été congelés pour servir de témoin de l'état initial.

Le contenu ruminal de chacune des 4 vaches a été mis à incuber avec 4 substrats, semblables aux rations utilisées *in vivo* (sauf que l'ensilage de maïs a été remplacé par des feuilles et des tiges de maïs broyées, et l'huile de tournesol par du c9,c12-C18:2 pur à 99 %) : soit 16 combinaisons . Le tableau 9 présente les ingrédients des substrats utilisés *in vitro*.

Tableau 9. *Ingrédients des substrats utilisés in vitro (Article 2)*

	Substrat T	Substrat A	Substrat H	Substrat AH
Noms des substrats dans l'article 2	Cs	HSs	LAs	HS+LAs
Matières premières (g/erlenmeyer)				
Feuilles + tiges de maïs	1,25	0,69	1,16	0,59
Maïs grain	0,84	0,46	0,77	0,39
Foin de luzerne	0,43	0,00	0,44	0,00
Blé tendre	0,00	1,48	0,00	1,49
Tourteau de soja 48	0,48	0,38	0,50	0,40
Acide linoléique	0,00	0,00	0,09	0,09

Ces substrats ont été mis dans des erlenmeyers avec 60 ml de chaque contenu ruminal et 60 ml de tampon bicarbonate. Le tampon bicarbonate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$: 19,5 g/l ; NaHCO_3 : 9,24 g/l) était préparé la veille des incubations et contenait les minéraux nécessaires à la croissance bactérienne (NaCl : 0,705 g/l ; KCl : 0,675 g/l ; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,108 g/l et $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,180 g/l). Avant la mise en incubation, il était chauffé à 39°C, température physiologique du rumen, et bullé avec du CO_2 afin d'assurer son pouvoir tampon et l'anaérobiose. Puis son pH a été ajusté à 6 avec de l'acide chlorhydrique 6N.

Les cultures ainsi préparées étaient placées dans un bain-marie rotatif à 39°C (Aquatron, Infors AG, Allemagne) et afin d'assurer l'anaérobiose indispensable au bon développement des bactéries ruminales, les erlenmeyers étaient remplis avec du CO_2 et fermés à l'aide de bouchons équipés d'un système de tubulures plongeant directement dans l'eau du bain-marie, ce qui permettait l'évacuation des gaz de fermentation sans laisser entrer d'air et surtout d'oxygène.

Les cultures ont ensuite été mises à incuber pendant 5 heures, à 39°C, agitées à une vitesse de 130 tours/min, dans des conditions d'anaérobiose et d'obscurité.

Après 5 heures, les fermentations ont été arrêtées en plaçant les erlenmeyers dans de la glace pilée. Les pH ont été mesurés et les contenus des erlenmeyers ont été congelés à -20°C jusqu'à analyse des acides gras longs.

- Effet de la nature de l'acide gras polyinsaturé, substrat de la biohydrogénation, sur la déviation de la voie t11 à la voie t10 (Article 3 page 159)

L'objectif de cette étude était de savoir si dans des conditions identiques, la BH de c9,c12,c15-C18:3 subissait la même déviation de la voie t11 à la voie t10 que la BH de c9,c12-C18:2. En effet, au cours de la BH du 9,c12,c15-C18:3, une isomérisation par la voie t10 a été proposée (Kramer et al., 2004) mais n'a jamais été démontrée. Des incubations *in vitro* semblables à celles décrites précédemment (Article 2) ont été réalisées : 4 contenus ruminiaux (prélevés à J15 avant le repas du matin) × 4 substrats (composés uniquement des substrats H et AH. L'apport d'acides gras était réalisé soit par l'addition de c9,c12-C18:2 pur soit par l'addition de c9,c12,c15:C18:3 pur (Tableau 10). Par ailleurs avant de congeler le contenu des erlenmeyers, des prélèvements ont été réalisés pour l'analyse des communautés bactériennes.

Tableau 10. *Ingrédients des substrats utilisés in vitro (Article 3)*

	Substrat H	Substrat AH	Substrat H	Substrat AH
Noms des substrats dans l'article 3	LSLA	HSLA	LSLnA	HSLnA
Matières premières (g/erlenmeyer)				
Feuilles + tiges de maïs	1,16	0,59	1,16	0,59
Maïs grain	0,77	0,39	0,77	0,39
Foin de luzerne	0,44	0,00	0,44	0,00
Blé tendre	0,00	1,49	0,00	1,49
Tourteau de soja 48	0,50	0,40	0,50	0,40
Acide linoléique	0,09	0,09	0,00	0,00
Acide α -linoléique	0,00	0,00	0,09	0,09

➤ Effets du pH sur l'efficacité de la $\Delta 9$ et de la $\Delta 12$ isomérisation (Article 4 page 187)

L'objectif de cette étude était d'individualiser les effets du pH sur les activités enzymatiques des deux voies d'isomérisation de c9,c12-C18:2, à l'origine des isomères t10 et t11. Pour cet essai, les contenus ruminiaux de deux vaches du protocole *in vivo* détaillé ci-dessus ont été utilisés : une recevant la ration témoin (T) ne devant pas induire de shift t11 vers t10, et l'autre recevant la ration enrichie en amidon et en huile de tournesol (AH), avec laquelle un shift était attendu. Au laboratoire, dans un erlenmeyer de 500ml, 200ml de jus filtré ont été ajoutés à 200mg de chloramphénicol (1 mg/ml), capable d'inhiber la synthèse des protéines chez les bactéries (en agissant sur l'activité du ribosome bactérien), puis le tout a été soigneusement mélangé sous agitation pendant 5 minutes. Le mélange obtenu a été laissé pendant 5 heures à l'étuve à 39°C afin d'inhiber totalement les activités bactériennes. La solution enzymatique ainsi préparée a été transférée dans des tubes à essais contenant 0,5 mg de c9,c12-C18:2 (pur à 99%) à raison de 1ml plus 1 ml de tampon bicarbonate, pH=7, ou de tampon pH=5,5 obtenu en additionnant de l'acide chlorhydrique 6N au tampon bicarbonate. Afin de maîtriser avec précision la quantité d'acides gras introduite dans le milieu, une solution à 1 mg/ml de c9,c12-C18:2 dans de l'hexane avait été préalablement préparée, le volume désiré de cette solution était introduit dans chaque tube puis l'hexane était évaporé sous azote à 50°C. Chacune des 4 combinaisons possibles (2 solutions enzymatiques, issues des vaches recevant les rations T et AH, $\times$ 2 pH, 7,0 et 5,5) a été mise à incuber 1h à 39°C dans un bain-marie pourvu d'un système d'agitation magnétique après avoir rempli les tubes de CO₂. Pour chacune des combinaisons, un tube non incubé était congelé immédiatement à -20°C pour témoigner de l'état initial. Quatre répétitions pour chaque combinaison incubées et non incubées ont été réalisées. Les incubations ont été arrêtées en plaçant les tubes dans de la glace pilée, puis leurs contenus ont été congelés immédiatement à -20°C jusqu'à analyse des acides gras longs.

2. Deuxième étape : Maîtrise la déviation de la voie t11 à la voie t10 de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique par addition de vitamine E *in vivo* et *in vitro* (Article 7 page 265)

Cet essai, réalisé durant l'année 2009-2010, avait pour objectif principal la recherche d'un produit efficace notamment parmi les antioxydants, et en particulier de la vitamine E, sur l'équilibre t10/t11 puisqu'en situation de shift cette dernière permettrait de restaurer au moins en partie la voie t11 (Kay et al., 2005). Mais préalablement deux pré-essais ont dû être réalisés.

a. Pré-essais *in vitro*

PREMIER PRÉ-ESSAI : Mise en œuvre de cultures batch *in vitro* de longues durées :

Un pré-essai *in vitro* a été réalisé avec une durée d'incubation de 100h dans l'objectif de vérifier la viabilité et l'activité des cultures batch de contenu ruminal sur de longues durées d'incubation et de suivre l'évolution du ratio t10 / t11 au cours de ces incubations. En effet des *in vitro* de courtes durées ne permettent pas d'observer d'éventuels effets des facteurs sur le microbiote. Le contenu ruminal a été prélevé sur une seule vache recevant 40% de concentrés (sur la base de la MS), une ration à base d'ensilage de maïs. Deux milieux d'incubation ont été utilisés : un riche en amidon (A, 60% blé) tamponné à pH 5,5 et l'autre riche en fibres (F, 70% de foin) tamponné à pH 7,0. Les milieux étaient alimentés toutes les 24h avec ces mêmes substrats plus du tampon.

La figure 9 montre l'évolution des principaux paramètres : le pourcentage de c9,c12-C18:2 (/acides gras totaux) évaluant la capacité de BH des milieux, le pH et le ratio t10/t11. Les résultats montrent une nette différence entre les deux régimes : un pourcentage c9,c12-C18:2 (moindre disparition) et un ratio t10/t11 plus élevé et un pH plus bas dans les milieux A que dans les milieux F. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie. Toutefois, au-delà de 52h d'incubation le pourcentage de c9,c12-C18:2 n'étant pas biohydrogéné augmente de manière très importante surtout pour les cultures avec le milieu A, ce qui peut souligner une altération des capacités de BH. Au-delà, de 52h d'incubation le pH s'abaisse fortement et le ratio t10 / t11 est supérieur à 1 pour les deux milieux. Dans les conditions testées, les cultures

batch *in vitro* de longue durée peuvent donc permettre une étude qualitative des facteurs de variation mais elles doivent être limitées à 52h.

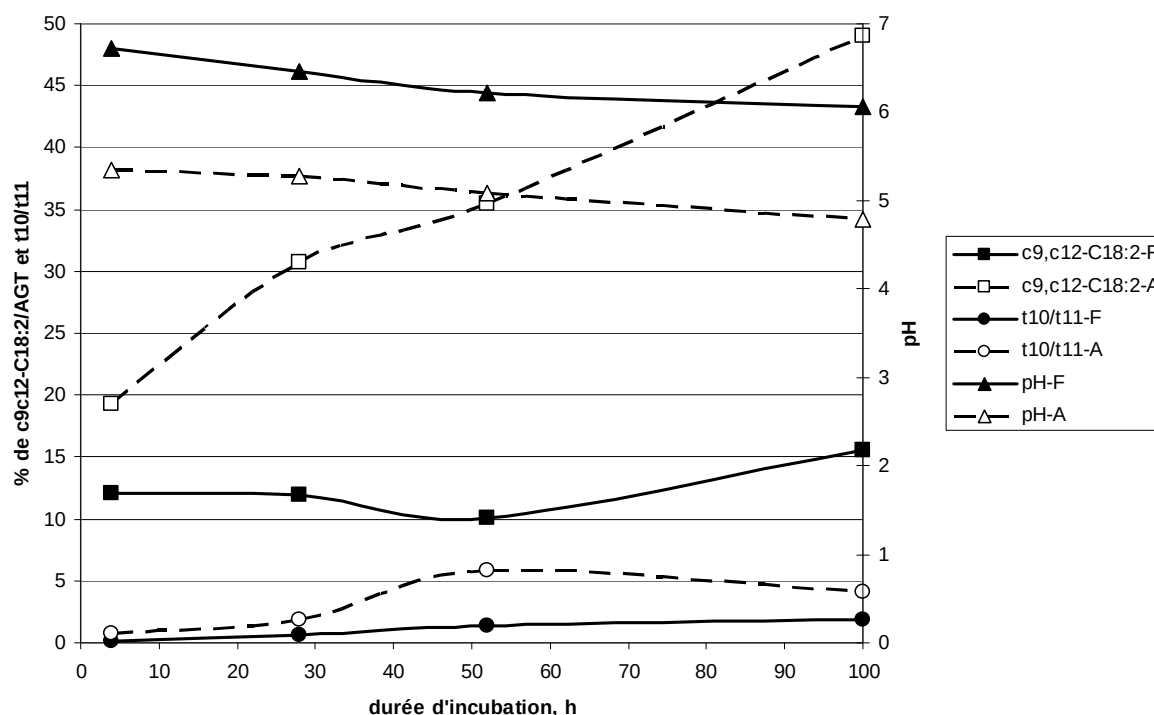


Figure 9. Evolution du pourcentage de c9,c12-C18:2 (/ acides gras totaux), du pH et du ratio t10/t11 dans des contenus ruminiaux mis en culture soit avec un substrat riche en amidon et un tampon à pH 5,5 (A) soit avec un substrat riche en fibres et un tampon à pH 7,0 (F), en fonction de la durée d'incubation

DEUXIÈME PRE-ESSAI : Sélection d'une substance antioxydante potentiellement active sur la déviation de la voie t11 vers la voie t10

La littérature indique que des vaches recevant de l'herbe ou de l'ensilage d'herbe ne produisent pratiquement jamais de t10, ce qui pourrait être dû au fait que l'herbe est riche en antioxydants notamment en α -tocophérol (Kay et al., 2005). Certaines études montrent que la vitamine E de synthèse peut être utilisée avec plus ou moins d'efficacité pour prévenir un ratio t10 / t11 élevé dans le lait. Des pré-essais *in vitro* ont donc été réalisés pour vérifier les effets de différents antioxydants (Super Oxyde Dismutase, β -carotènes, vitamines E naturelle

et de synthèse) sur le ratio t10 / t11 et les comparer aux effets de l'herbe. Des incubations de 5 et 24 heures ont réalisées avec le contenu ruminal d'une vache présentant un ratio t10 / t11 égal à 6. Après 5 heures d'incubation, ni les antioxydants ni l'herbe n'ont permis d'abaisser le ratio t10 / t11 en comparaison à un témoin. Par contre au bout de 24h d'incubation, les cultures avec de l'herbe présentaient un ratio t10/t11 très abaissé (3,4) et celles avec la vitamine E naturelle également mais dans une moindre mesure (7.6) par rapport au témoin qui présentaient un ration de 9,4. Les résultats ont montré que parmi les antioxydants, l'action de la vitamine E naturelle était la plus efficace quant à la diminution de ce ratio, la vitamine E de synthèse était restée sans effet.

b. Essai *in vivo* : Effets de la vitamine E naturelle sur la déviation de la voie t11 vers la voie t10 de biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique

Pour l'expérience *in vivo*, six vaches de race Holstein en milieu de lactation, munies de canules ruminales, ont été utilisées dans un cross-over (2×2). Chaque période a duré quatre semaines et était divisée en deux sous-périodes. Les deux premières semaines représentaient le wash-out, durant lesquelles les vaches recevaient 20 kg de MS en deux repas par jour, d'une ration à base d'ensilage de maïs et riche en amidon (A, 43% de concentrés dont 22% de blé). Puis pendant les deux semaines suivantes, les vaches recevaient le régime expérimental, correspondant à la ration A supplémentée en huile de tournesol (AH, 45% de concentrés dont 21% de blé et 3% d'huile), et au 8^{ème} jour de la distribution de la ration AH, trois vaches sur les six recevaient 15 g de vitamine E naturelle (37% de RRR- α - tocophérol) par repas, pesée dans des seringues de 20 ml et préalablement mélangée à l'huile de tournesol avant son administration aux vaches. En effet, dans notre essai *in vivo*, c'est à partir du 8^{ème} jour d'addition de l'huile de tournesol dans la ration des vaches, que le ratio t10/t11 avait très nettement augmenté. Durant les deux semaines de distribution de la ration AH, des prélèvements de contenu ruminal et de lait ont été réalisés tous les deux jours, afin d'établir leur composition en acides gras. Le contenu ruminal était prélevé 5 heures après le repas du matin puis congelé à -20°C. Le lait était un mélange de la traite du matin et de celle du soir, conservé également à -20°C. Dans le contenu ruminal, des paramètres fermentaires ont également été mesurés : pH, teneurs en ammoniac et acides gras volatils. La production laitière a été enregistrée et les taux protéique et butyreux ont été mesurés.

c. Essai *in vitro* : Comparaison des effets de la vitamine E naturelle et de la vitamine E de synthèse sur la déviation de la voie t11 vers la voie t10 de biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique

Pour l'expérience *in vitro*, seulement deux des vaches en lactation ont servi de donneuses de contenu ruminal après la phase d'adaptation de 2 semaines à la ration A décrite ci-dessus. Les incubations *in vitro* se sont déroulées exactement comme celles mises au point précédemment. La durée totale des incubations était de 52 heures, le premier jour, 40 ml de jus de rumen de chaque vache étaient mis à incuber avec 40 ml de tampon bicarbonate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$: 19,5 g/l ; NaHCO_3 : 9,24 g/l ; NaCl : 0,705 g/l ; KCl : 0,675 g/l ; $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$: 0,108 g/l et $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$: 0,180 g/l), chauffé à 39°C et saturé en CO_2 , puis ajusté à pH 6 à l'aide d'acide chlorhydrique 6N, dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 1,2 g de substrats à base d'ensilage de maïs à 63% de concentrés dont 44% de blé et 5% de c9,c12-C18:2 pur. Trois traitements ont été appliqués : 1) témoin, dans lequel aucune vitamine E n'a été ajoutée, 2) 0,03g de vitamine E naturelle (37% de RRR- α -tocophérol), et 3) 0,024g de vitamine de synthèse (50% d'acétate de dl-c-tocophérol). Trois séries d'incubation ont été réalisées pour obtenir 6 répétitions par traitement. A 24 et 48 heures d'incubation, 30 ml de tampon, 1,2 g du même substrat avec c9,c12-C18:2 et le cas échéant, la vitamine E ont été ajoutés. Tout d'abord, les substrats et la vitamine E étaient introduits directement et rapidement dans l'erlenmeyer à l'aide d'un entonnoir puis le tampon était ajouté dans les erlenmeyers (ouverture momentanée de la culture). Avant de le refermer, l'erlenmeyer a été rempli avec du CO_2 . Après 52 heures d'incubation, les fermentations ont été arrêtées en plaçant les erlenmeyers dans de la glace pilée et le pH a été mesuré, puis leurs contenus étaient congelés à -20°C, pour analyse ultérieure de leurs compositions en acides gras.

II. Méthodes analytiques : acides gras, communauté bactérienne

Dans cette partie ne seront détaillées que les méthodes analytiques spécifiques à ce travail : dosage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et les analyses de biologie moléculaire employées pour l'évaluation de la communauté bactérienne des échantillons obtenus *in vivo* et *in vitro*. Les autres analyses chimiques réalisées seront spécifiées au moment de la présentation de chaque étude.

1. Dosage par chromatographie gazeuse des acides gras dans les matières premières des rations des vaches et des substrats d'incubation, et dans les échantillons obtenus *in vivo* et *in vitro*

a. Préparation des échantillons

Pour l'analyse de la composition en AG, tous les échantillons (contenus ruminiaux, laits, cultures *in vitro*) ont été lyophilisés (Virtis Freezemobile 25, Virtis, USA), pesés. Les échantillons de contenus ruminiaux ont été broyés dans un broyeur à billes (Dangoumau, Prolabo, France) afin de les homogénéiser.

Les matières premières étaient préalablement broyées à 0,5 mm.

b. Extraction-méthylation des acides gras

Une extraction-méthylation en une seule étape des AG a été effectuée sur les échantillons lyophilisés et les matières premières broyées afin de réaliser un dosage par CPG. Cette opération (Figure 10) a été réalisée selon la méthode de Park et Goins (1994), en remplaçant la solution de trifluorure de bore à 14% dans du méthanol par une solution de méthanol-acétylchlorure (10:1), et après addition de 0,8 mg d'un étalon interne (C19:0). Cette méthode repose sur une double méthylation : en milieu basique pour les triglycérides et en milieu acide pour les AG libres, les phospholipides et les esters de cholestérol. Par ailleurs, cette méthode permet de minimiser l'isomérisation des CLA, inévitable lors de l'extraction-méthylation.

- ① Peser dans un tube en verre pyrex de 20 ml :
- 100 mg pour les contenus et les cultures ruminales, pour les matières premières pauvres en MG
 - 50 mg pour les laits lyophilisés
 - 20 mg pour les huiles
- ② Ajouter 200 µl de dichlorométhane, 200 µl d'étalon interne (C19:0 à 4 mg/ml dans du dichlorométhane) et 2 ml de soude méthanolique à 2 % préparée extemporanément, puis bien fermer le tube avec un bouchon téflon, avant de mélanger soigneusement son contenu au vortex (MS2 minishaker IKA, PAYS) 1min à 1400 tours/min.
- Chauffer le tube pendant 10 min à 90°C dans un bain thermostaté, puis refroidir rapidement à température ambiante.
- ③ Ajouter 3 ml de solution d'acétylchlorure méthanolique à 5% préparée extemporanément et agiter au vortex 1min à 1400 tours/min.
- Chauffer le tube pendant 10 min à 80°C dans un bain thermostaté, puis refroidir rapidement à température ambiante.
- ④ Ajouter 5 ml d'eau ultra-pure et 1,6 ml d'hexane, puis bien mélanger pendant 5 min au culbuteur (Rotator Drive STR4, Stuart Scientific, OSI, France) et centrifuger 10 min à 4000g (3K15 SigmaLaboratory centrifuges, Osterode am Harz, Allemagne).
- ⑤ Récupérer la phase supérieure hexanoïque (2ml) renfermant les méthyl esters et la répartir dans deux flacons de 2 ml à sertir. Cet extrait est ensuite analysé en CG.

Figure 10. *Extraction-méthylation des acides gras*

c. Analyse chromatographique

L'identification et la quantification des AG méthylés et contenus dans les 2ml d'hexane après extraction, ont été réalisées par CPG (Agilent 6890N, Network GC System, USA), équipé d'un auto-injecteur (7693, Network GC System, USA), d'une colonne capillaire en silice de 100 m (0,25 mm ID, 0,20 μ m d'épaisseur de film, CPSil88, Chrompack-Varian, Netherlands) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Afin d'isoler un maximum d'isomères, deux passages ont été nécessaires :

- méthode 1 :

Conditions de passage

Température de l'injecteur : 255°C
Température du détecteur FID : 260°C
Split ratio : 1/50
Volume injecté : 1 μ l
Gaz porteur : H₂, débit constant (1ml/mm)

Programme de températures

Température initiale (°C)	Durée (mn)	Rampe (°C/mn)	Température finale (°C)
60	2	8	150
150	12	2	175
175	20	5	225
225	10	5	240
240	10	0	240

- méthode 2 :

Conditions de passage

Température de l'injecteur : 255°C
Température du détecteur FID : 260°C
Split ratio : 1/75
Volume injecté : 0,5 μ l
Gaz porteur : H₂, débit constant (1ml/mm)

Programme de températures

Température initiale (°C)	Durée (mn)	Rampe (°C/mn)	Température finale (°C)
60	3	8	190
190	13	5	225
225	10	10	230
230	1	0	230
60	3	8	190

Les chromatogrammes obtenus étaient traités à l'aide du logiciel d'exploitation Peak simple (Peak Simple Chromatography Data System, version 3.56, SRI Inc., USA). Les pics des chromatogrammes ont été identifiés et quantifiés à partir de standards commerciaux, excepté les t-C18:1 autres que t9- et t11-C18:1 et les c-C18:1 autres que c9-C18:1 qui ont été identifiés par ordre d'élution. Les données brutes obtenues sont exprimées en mg d'AG / ml de solution hexanoïque injectée et corrigées par l'étalon interne.

2. Analyse de la communauté bactérienne des contenus ruminiaux et des cultures *in vitro*

a. Extraction des ADN totaux

L'extraction de l'ADN total a été réalisée à l'aide du kit QIAamp® DNA Stool Mini après une étape de lyse mécanique par beadbeating (FastPrep). Il s'agissait dans un premier temps de procéder à la lyse des cellules par choc thermique (95°C) et chimique, puis d'éliminer les impuretés et enfin de précipiter et purifier l'ADN total. L'ADN ainsi extrait (50 µl à partir d'environ 200 mg d'échantillon) était conservé à -20°C.

b. Électrophorèse capillaire du polymorphisme de conformation simple brin

Les fragments d'ADN amplifiés correspondaient à la région variable V3 (environ 200 paires de bases) de l'ADNr 16S. Les amorces universelles bactériennes qui ont été utilisées sont la W49 et la W104* (Sigma Proligo, France). L'amorce W104*, marquée par un fluorochrome (6-Fam) à son extrémité 5', assure la détection ultérieure d'un des deux brins d'ADN présents dans l'échantillon lors de l'analyse SSCP. L'enzyme utilisée pour la réaction de la PCR était la polymérase Isis DNA Polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France).

Les volumes des réactifs de PCR et d'ADN utilisés sont mentionnés dans le tableau 11. Le tableau 12 indique le programme de température utilisé lors de l'amplification.

Tableau 11. *Volumes de réactifs utilisés pour la réalisation de la PCR*

	Volume par tube (µl)
H2O (milliQ)	38
Tampon Pfu Ultra 10X	5
BSA (10 mg/ml)	2,5
dNTP (40 mM)	1
W49 (10 µM)	1
W104* (10 µM)	1
Isis polymerase	0,5
ADN (dilué au 1/200)	1

Tableau 12. *Paramètres des réactions de la PCR*

Etapes	Programme	
	Température	Durée
Dénaturation	94°C	2 min
Hybridation	61°C	15 s
Elongation	72°C	15 s
Elongation finale	72°C	7 min

Pour la préparation des amplicons, 1 µl de produit PCR a été mélangé à 9 µl d'un mélange de formamide désionisé (Genescan, Applied Biosystems) qui est un agent dénaturant et du standard interne (Rox 400HD, Genescan-Applied Biosystems) permettant ainsi de comparer les profils entre eux. Après une étape de dénaturation de l'ADN, les molécules ont été séparées par électrophorèse sur un séquenceur (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystem, USA) et détectées grâce à leur marqueur fluorescent.

L'électrophorèse a fourni un chromatogramme contenant un signal de l'échantillon et le signal du standard interne. La représentation de la communauté bactérienne s'étalait sur 1200 scans. Une co-migration des produits de PCR se produit lors de l'électrophorèse capillaire, par conséquent, un seul pic ne peut pas être considéré comme une espèce bactérienne mais à un assemblage d'OTU. Les profils CE-SSCP ont été alignés et normalisés en utilisant le programme StatFingerprints développé au sein de notre équipe par Michelland et al. (2009).

c. Pyroséquençage 454 GS FLX : analyse des séquences d'ADNr 16S

Après extraction de l'ADN total, une PCR a été réalisée en ciblant deux régions variables (V3 et V4 faisant 440 paires de bases) de l'ADNr 16S. Le choix de ces régions a été réalisé en tenant compte de la taille maximum compatible avec le séquenceur (environ 450 bases). La PCR est un peu particulière puisque des étiquettes ou « MID » (séquences de 10 nucléotides) ont été collées au bout de chaque amorce. Sachant que tous les échantillons ont été mélangés dans un seul tube pour être séquencés, ces MID nous ont permis de reconnaître nos échantillons par la suite. Concrètement, pour les 50 échantillons, 50 PCR ont été réalisées en utilisant 50 couples d'amorces. Ces échantillons ont été ensuite séquencés par pyroséquençage GS FLX 454 (LC 480, Roche, France) à la plateforme génomique « genotoul » de l'INRA de Toulouse.

Les séquences brutes issues du séquenceur sont d'abord triées par échantillon (chaque séquence est identifiée par une étiquette). L'analyse des données est réalisée suivant un pipeline (développé au sein de notre équipe en collaboration avec la plateforme bioinformatique de Toulouse et une bioinformaticienne de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse). Ce pipeline se résume en quelques étapes (Figure 11) réalisées sur un cluster de calcul de la plateforme bioinformatique de Toulouse.

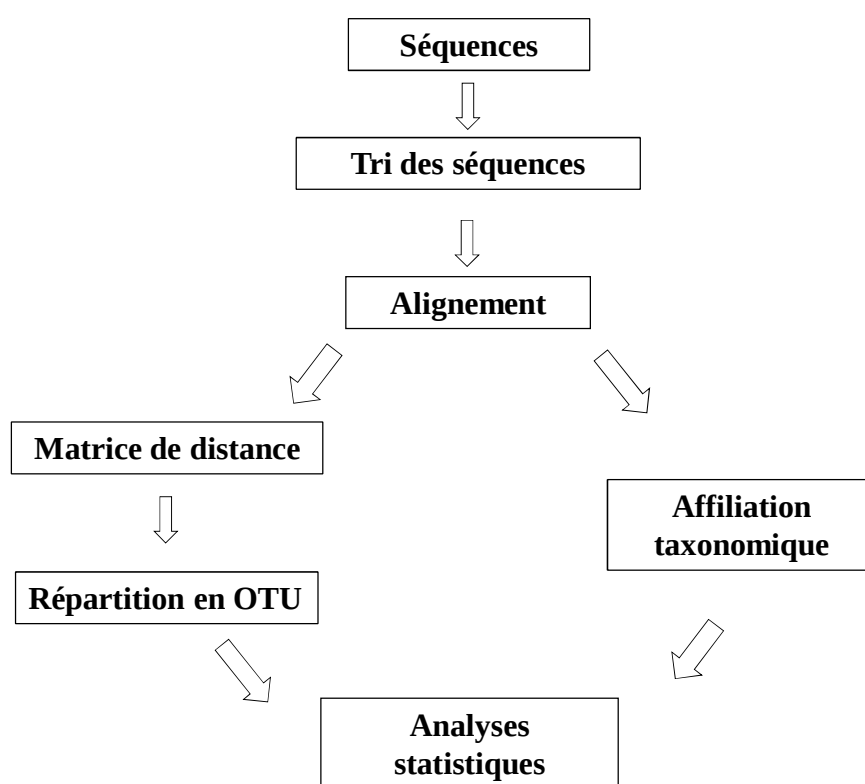


Figure 11. Pipeline développé pour le nettoyage et l'analyse des séquences

L'étape de nettoyage des séquences consiste à supprimer toutes les séquences qui :

- ont une base non identifiée (N)
- sont trop courtes (< 150 bases)
- ont des homopolymères¹ > 10
- contiennent des amorces qui ont plus de 2 mésappariements

Après nettoyage, 7300 séquences en moyenne ont été obtenues par échantillon. Les séquences supprimées représentent environ 19% des séquences initiales.

Les séquences nettoyées sont ainsi prêtes à être analysées. La première étape consiste à l'alignement des séquences qui se fait sur la base de données SILVA en faisant appel au logiciel MOTHUR.

Après l'alignement, deux approches peuvent être considérées :

- Soit un regroupement en OTU après le calcul de matrices de distance entre chaque paire de séquences avec un seuil fixé (0,05, 0,03 ou 0,01). Dans ce cas, deux séquences ayant une distance inférieure au seuil fixé seront considérées comme similaires. Ce seuil reste un choix de discrimination. Pour un seuil de 0,03, les séquences sont considérées comme faisant partie de la même espèce. Pour le seuil 0,05, les séquences sont considérées comme appartenant au même genre et le seuil 0,10 discrimine au niveau de la famille. A partir de ces OTU, des indices de diversité peuvent être calculés.
- Soit une affiliation taxonomique des séquences sur la base SILVA 102. Cette analyse des profils taxonomique a permis d'obtenir 360 taxons différents dans les 50 échantillons. L'identification de ces taxons peut aller jusqu'à l'espèce mais c'est très rare. Dans cette analyse, environ 98 % des séquences ont été affiliées à des phylums, 83 % à des familles et 53 % à des genres. Cette affiliation a été réalisée selon un Bootstrap² = 60%.

Dans notre étude, nous avons fait le choix d'adopter l'affiliation taxonomique des séquences car cette approche semble plus adaptée pour répondre aux objectifs de la partie microbiologique de ce travail c'est-à-dire, l'identification des bactéries impliquées dans la biohydrogénation ruminale du c9,c12-C18:2.

¹ homopolymère = segment d'ADN composé d'une base répétée (ex: AAAAAA)

² Un bootstrap de 60% signifie un indice de confiance de 60% à l'affiliation au groupe considéré

ARTICLE 1

L'addition d'amidon et d'huile de tournesol à la ration de vaches laitières taries provoque une déviation de la voie *trans*-11 vers la voie *trans*-10 associée à une modification de diversité de la communauté bactérienne du rumen (*en préparation*)

Afin de mieux comprendre les modalités amenant à une déviation de la biohydrogénation (BH) ruminale de la voie t11 à la voie t10, une expérimentation *in vivo* a été réalisée en utilisant 4 vaches Holstein taries recevant 4 rations différentes (en deux repas identiques par jour) durant 4 périodes expérimentales. La ration témoin (T) comprenait 22% d'amidon, la ration A était plus riche en amidon (35%), la ration H était enrichie en huile de tournesol (5%) et la ration AH était enrichie en amidon (33%) et en huile de tournesol (5%). Chaque période expérimentale était composée de deux sous-périodes : les deux premières semaines, dites de "wash-out", toutes les vaches recevaient la ration T afin de ne pas introduire de biais liés à la ration expérimentale donnée lors de la période précédente, et les deux dernières semaines, les vaches recevaient l'une des 4 rations expérimentales (T, A, H ou AH). Les prélèvements de contenu ruminal de toutes les vaches ont été réalisés 5 heures après le repas du matin.

Dans le contenu ruminal des vaches recevant la ration H, la proportion des isomères t11 a été très nettement augmentée sans modification du pH ruminal ni de la diversité de la communauté bactérienne comparé à la ration T. Par opposition, la ration A a induit une diminution du pH ruminal et une diminution de la diversité de la communauté bactérienne mais n'a eu aucun effet sur les voies de BH. L'addition conjointe d'amidon et d'huile de tournesol (ration AH) a seule conduit au shift, par augmentation de la proportion d'acides gras t10 au détriment de celle des t11 dans le contenu ruminal. Néanmoins ni le pH, ni la diversité de la communauté bactérienne du rumen n'étaient différents de ceux obtenus avec la ration A. Ainsi, la déviation de la voie t11 vers la voie t10 de la BH ruminale apparaît lorsque l'écosystème n'est plus capable de saturer de manière efficace les acides gras par la voie t11. Les acides gras insaturés étant toxiques pour le microbiote ruminal, il est alors obligé de mettre en place une deuxième voie de BH : la voie t10, qui nécessite quelques jours avant d'atteindre son niveau optimal.

**Starch plus sunflower oil addition in the diet of dry dairy cows
results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation
associated with an alteration of the diversity of ruminal bacterial
community**

A. Zened,*† F. Enjalbert,*† M.C. Nicot,*†L.Cauquil,*†and A. Troegeler-Meynadier,*†¹

* INRA, UMR1289, Tandem, F-31326 Castanet-Tolosan, France

† Université de Toulouse, INP, ENSAT, ENVT, UMR1289 Tandem, F-31076 Toulouse, France

¹Corresponding author: Annabelle Troegeler-Meynadier

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: a.troegeler@envt.fr

Abstract

Among *trans* fatty acids, exhibiting different health properties, t10,c12-CLA has negative effects on cows' milk fat production and can affect human health. In high yielding dairy cows, a shift from the t11 to the t10 pathway of biohydrogenation (BH) can occur in the rumen of cows receiving high concentrate diets, especially when the diet is supplemented with unsaturated fat sources. In order to study this shift, four rumen fistulated non-lactating Holstein cows were assigned to a 4×4 Latin square design with 4 different diets during 4 periods. Cows received 12 kg of dry matter per day of four diets based on corn silage during four successive periods: a control diet (22% starch, <3% fat), a high starch diet supplemented with wheat plus barley (35% starch, <3% crude fat), a sunflower oil diet, supplemented with 5% of sunflower oil (20% starch, 7.6% crude fat) and a high starch plus sunflower oil diet (33% starch, 7.3% crude fat). Fatty acids were analyzed and the ruminal community was studied by capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism.

Five hours post feeding, proportions of t11 BH isomers greatly increased in the rumen content with the addition of sunflower oil, without a change in ruminal pH compared to the control diet. Addition of starch to the control diet had no effect on BH pathways but decreased ruminal pH and decreased the diversity of the ruminal bacterial community. The association between high starch level and sunflower oil addition to the diet of cows increased t10 FA at the expense of t11 FA proportions in the rumen content, revealing a t11 to t10 shift. Interestingly, with the latter diet, ruminal pH and the diversity of bacterial community did not change compared to the single addition of starch. Shift occurred when the t11 BH capacity in the rumen was exceeded and had to be performed by another pathway, the t10 pathway, because of the absolute need of ruminal bacteria to eliminate unsaturated fatty acids, and this requires some days before being optimal. This t11 to t10 shift occurred progressively and could result from an adaptation of the microbiota to eliminate linoleic acid when adverse conditions affect t11 BH capacity.

Introduction

Because of their potential effects on human health, *trans* fatty acids (FA) deserve interest. Ruminal biohydrogenation (BH) of dietary polyunsaturated FA results in the production of peculiar FA, including conjugated linoleic acids (CLA), that result from isomerization of c9,c12-C18:2 and usually have at least one *trans* double bond, and t-C18:1 that mostly result from CLA reduction (Enjalbert and Troegeler-Meynadier, 2009). Some of these intermediates escape a complete ruminal BH to C18:0 and can, directly or after tissue desaturation of t11-

C18:1 to c9,t11-CLA, be found in meat and milk products. In most cases, t11 isomers represent the major part of these BH intermediates, but a shift toward a t10 isomerization can result in milk fat containing high amounts of t10 isomers. Part of the effects of CLA in human health is isomer-specific and some studies showed adverse effects of t10,c12-CLA (Bhattacharya et al., 2006; Ip et al., 2007). Similarly, total *trans* FA, including monoenoic, can alter cardiovascular risk markers, but the specificity of individual isomers remains debated between similar effects of all *trans* FA (Brouwer et al., 2010) and less deleterious effects of natural *trans* FA, mainly t11-C18:1 of milk origin, compared to industrial *trans* FA (Tardy et al., 2011). Moreover, the t10,c12-CLA decreases the mammary synthesis of de novo FA and induces milk fat depression in dairy cows (Baumgard et al., 2000). Due to these negative effects, understanding the conditions of the t10 shift is of interest.

Wide variability in the ratio of t10/t11 isomers has been observed in milk fat (Shingfield et al., 2006). Dietary factors shifting from t11 to t10 BH pathway have been identified, i.e. a high proportion of concentrate (Piperova et al., 2002), the addition to the diet of unsaturated fat (Roy et al., 2006) or both (Griinari et al., 1998; Loores et al., 2004). Griinari et al. (1998) evidenced a significant interaction between concentrate level and the type of dietary fat (saturated vs. unsaturated), but Loores et al. (2004) did not evidence an interaction between concentrate level and oil addition. Moreover, Roy et al. (2006) demonstrated strong time-dependent changes of the ratio between t10 and t11 isomers during the two first weeks of oil supplementation, suggesting that the adaptation of the ruminal microflora could be a modulator of the t11 to t10 shift. Weimer et al. (2010) indeed observed that cows exhibiting a milk fat depression, a consequence of the t10 shift, had a different microbial community than cows having a normal milk fat content.

The objectives of this study were to identify dietary conditions that result in the BH shift from t11 to t10 isomers, separating via a factorial design the effects of dietary starch level from that of oil supplementation and investigating their possible interaction. Experimental measurements were carried out over two weeks and included the study of the bacterial community.

Material and methods

Experimental design

Four dry ruminally fistulated Holstein cows were assigned to a 4×4 Latin square design with 4 different diets based on corn silage and soybean meal during 4 periods : control diet (C

diet), high starch diet (HS diet), oil diet (O diet) and high starch plus oil diet (HS+O diet). The C diet was a low-starch and low fat diet containing alfalfa hay (21.5% starch, 2.9% fat and 39.7% NDF, on a DM basis). In the HS diet, the starch content was increased to 34.8% using a mixture of wheat and barley and removing alfalfa hay (2.7% fat and 30.9% NDF, on a DM basis). In the O diet, 4.8% of the corn silage of the C diet was replaced with 4.8% of sunflower oil rich in c9,c12-C18:2 (19.8% starch, 7.6% fat and 37.3% NDF, on a DM basis). The HS+O diet was enriched with both a mixture of wheat and barley and sunflower oil (33.1% starch, 7.3% fat and 28.6% NDF, on a DM basis). The ingredients and chemical composition of the diets are shown in Table 1.

Table 1 Ingredients and chemical composition of donor cow diets.

Diets ¹	C	O	HS	HS+O
Ingredients (% of DM)				
Corn silage	68.7	63.2	37.7	32.3
Alfalfa hay	14.3	14.3	0.0	0.0
Wheat + barley	0.0	0.0	48.5	48.5
Soybean meal	15.5	16.2	12.4	13.1
Sunflower oil	0.0	4.8	0.0	4.7
Minerals-vitamins ²	1.5	1.5	1.5	1.5
Composition (% of DM)				
Crude protein	14.6	14.6	14.2	14.2
NDF	39.7	37.3	30.9	28.6
Starch	21.5	19.8	34.8	33.1
Crude fat	2.9	7.6	2.7	7.3
Fatty acid composition (% of DM)				
c9-C18:1	0.3	1.4	0.2	1.3
c9,c12-C18:2	0.9	3.4	0.9	3.4
c9,c12,c15-C18:3	0.1	0.1	0.1	0.1

¹C = control diet; HS = high starch diet; O = sunflower oil diet; HS+O = high starch plus sunflower oil diet.

²Contained (per kg of premix, DM basis) P: 40g, Ca: 260g, Mg: 50g, Na: 20g, Zn: 5g, Mn: 4g, Cu: 1g, I: 40 mg, Co: 20 mg, Se: 20mg, vitamin A: 450 000 IU, vitamin D3: 100 000 IU and vitamin E: 1 500 IU.

Cows were housed in individual stalls and received 12.5 kg of DM daily, in two equal meals at 09:00 and 17:00 and were allowed *ad libitum* access to water. Each four-week period consisted of two weeks washout with the C diet followed by two weeks (further referred as experimental subperiods) with either C, HS, O or HS+O diet. In order to avoid carry-over effects, treatment orders were different among cows: (HS+O, O, HS and C for cow 1; O, C, HS+O, and HS for cow 2; C, HS, O and HS+O for cow 3; HS, HS+O, C, O for cow 4).

One liter of rumen fluid was collected from each cow 5 h post feeding every 2 days from day 0 (last day of the washout weeks) to day 14 and strained through a metal sieve (1.6mm mesh). The pH was measured and samples were stored at -20°C for later analysis. Each 1L-sample was divided into 4 aliquots: 2×5mL were transferred to 10mL vials with 0.5mL of 2% HgCl₂ for volatile fatty acids (VFA) and lactate assays; 2mL were stored in sterile Eppendorf tube for bacterial community analysis. Finally, 100mL were kept for FA determination. Moreover, on day 13, redox potential (*Eh*) was recorded continuously according to the method described by Julien et al. (2010). Only *Eh* values corresponding to 5h after morning meal were used for statistical analysis.

Chemical analysis

Concentrations of volatile fatty acids (VFA) were determined by Playne's (1985) method using automated gas separation, modified as follow: the ruminal samples were first centrifuged at 4000 x g for 20 minutes to separate the liquid phase. For protein removal, 1 mL of supernatant was mixed with 200 µL of 25 % metaphosphoric acid and further centrifuged at 20 000 x g for 15 minutes. One mL of supernatant was added to 200 µL (1% v/v) of 4-methylvaleric acid as internal standard and 1 µL of the mixture was then injected into a gas chromatograph (Hewlett Packard, Model 5890 Series II equipped with FID detector, Avondale, PA).

For lactic acid assay, total lactate (D-L lactate) was determined using a commercial kit (Boehringer Mannheim/ R-Biopharm, Cat.No.11 112 821 035, France).

Ruminal fluids were analyzed for FA contents and profiles. The FA were extracted and methylated using the procedure of Park and Goins (1994), except that the solution of 14% boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanolacetylchloride (10:1 v/v). Nonadecanoic acid (Sigma Co., St. Louis, MO) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg. Fatty acid methyl esters were quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, equipped with a model 7683 auto injector, Network GC System, Palo Alto, CA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm ID, 0.20 µm film thickness; CPSil88, Varian,

Middelburg, the Netherlands), according to the two temperature programs detailed in Zened et al. (2011). Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St. Louis, MO) except C18:1 FA other than *trans*-9-C18:1, *trans*-11-C18:1 and *cis*-9-C18:1 which were identified by order of elution.

Bacterial community analysis

Total DNA was extracted and purified with QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd., West Sussex, UK) from approximately 0.2 g of sample with a previous bead-beating step in a FastPrep instrument. Extraction of DNA, PCR reactions, and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP) procedures were based on the procedure described by Privé et al. (2010). The temperature program of PCR reaction was different and consisted of 2 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 15 s at 61°C, and 15 s at 72°C and a final extension of 7 min at 72°C. The CE-SSCP data was computed with StatFingerprints software (Michelland et al., 2009), and CE-SSCP profiles were aligned using pairwise alignment of their internal standard with the same reference internal standard.

Calculations and statistical analysis

Sums of CLA and t-C18:1 were obtained by adding proportions of all isomers measured; sums of t10 and t11 isomers were obtained by adding t10 and t11 isomers originating from c9,c12-C18:2 BH:

$$\text{Sum of CLA} = \text{t10,c12-CLA} + \text{c9,c11-CLA} + \text{c9,t11-CLA} + \text{t9,t11-CLA} + \text{t9,t13-CLA}$$

$$\begin{aligned} \text{Sum of t-C18:1} = & \text{t4-C18:1} + \text{t5-C18:1} + \text{t6+t7+t8-C18:1} + \text{t9-C18:1} + \text{t10-C18:1} + \text{t11-C18:1} \\ & + \text{t12-C18:1} + \text{t13+t14-C18:1} + \text{t15-C18:1} + \text{t16-C18:1} \end{aligned}$$

$$\text{Sum of t10 isomers} = \text{t10,c12-CLA} + \text{t10-C18:1}$$

$$\text{Sum of t11 isomers} = \text{c9,t11-CLA} + \text{t9,t11-CLA} + \text{t11-C18:1}$$

Simpson's diversity index (D') was calculated as follows (Rosenzweig, 1995):

$$D' = -\log \sum \alpha_i^2,$$

where α_i corresponds to the area of the i th peak.

Data statistical analyses were performed using the GLM procedure of SYSTAT (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, IL, USA) and reported as mean values and their standard errors. Initial (day 0) t10 and t11 percentages, acetate:propionate ratio, ruminal pH and D' were analyzed including cow, period and following experimental diet. Effects and data on day 12 (and day 13 for *Eh*) were analyzed including effects of period, cow, oil addition, starch addition and theirs interactions. Evolution of t10 and t11 percentages, acetate:propionate ratio, ruminal pH and D' from day 2 to day 14 were analyzed as repeated measures including the same effects than on day 12.

Results

On day 0, t10 and t11 percentages, acetate:propionate ratio, ruminal pH and bacterial diversity (D') in rumen fluid were not different between cows, or between following experimental diets (Figure 1). There was a significant decrease of the initial percentages of t10 (from 1.17 % to 0.56 % of total FA; $P<0.01$) and t11 (from 5.74 % to 3.44 %; $P<0.01$) from period 2 to period 4, but the initial t10/t11 ratio did not depend on the periods (0.17 on average, individual values ranging from 0.13 to 0.27). A significant period effect was noticed for D' , which was lower ($D'=7.0$) at the end of the washout of the second period compared to 8.0 on average for the 3 other periods. Initial pH values did not differ according to the period, and were around 6.3. The initial acetate:propionate ratio was higher during periods 1 and 2 than during periods 3 and 4 (4.1 vs. 3.5 on average, respectively).

During the experimental subperiods, an interaction between oil and starch additions and the sampling day (Figures 1A and 1B) significantly and linearly affected t10 ($P=0.01$) and linearly and quadratically affected t11 ($P<0.01$) percentages. For t10 isomers (Figure 1A), the values were strongly increased with HS+O diet from day 4, a maximum of 15.5% (/ total FA) was reached on day 8, and then values remained stable. With the other diets, t10 percentages (/ total FA) were $\leq 2\%$ all over the experimental subperiod.

For t11 isomers (Figure 1B), the highest values were obtained with O diet with a maximum of 22.5% (/ total FA) reached on days 10 and 12. On day 2, HS+O diet also induced higher t11 percentages (12.4 %) than C or HS diets (4.5 % on average), but this percentage rapidly decreased to 3.4 % on day 6 and remained stable around 2.7 % up to day 14, *i.e.* below values obtained with C or HS diets (4.7 % on average from day 6 to day 14).

An interaction between starch addition and sampling day significantly ($P=0.05$) and quadratically affected ruminal pH measured 5 hours after meal (Figure 1C): diets without starch induced a constant pH around 6.3 whereas diets with starch led to some variations between sampling days, in particular the lowest values were observed for HS+O diet on days 8 and 10. Acetate:propionate ratio was also significantly and quadratically affected by an interaction between starch addition and sampling day ($P=0.01$). The lowest ratio was obtained with HS+O diet, it decreased gradually from 3.2 on day 2 to 1.3 on day 14 (Figure 1D). With the other diets, acetate:propionate ratio values were stable all over the experimental period: 3.6 on average. Bacterial diversity (D') was affected only by starch addition ($P<0.01$), but no interaction with sampling day was observed.

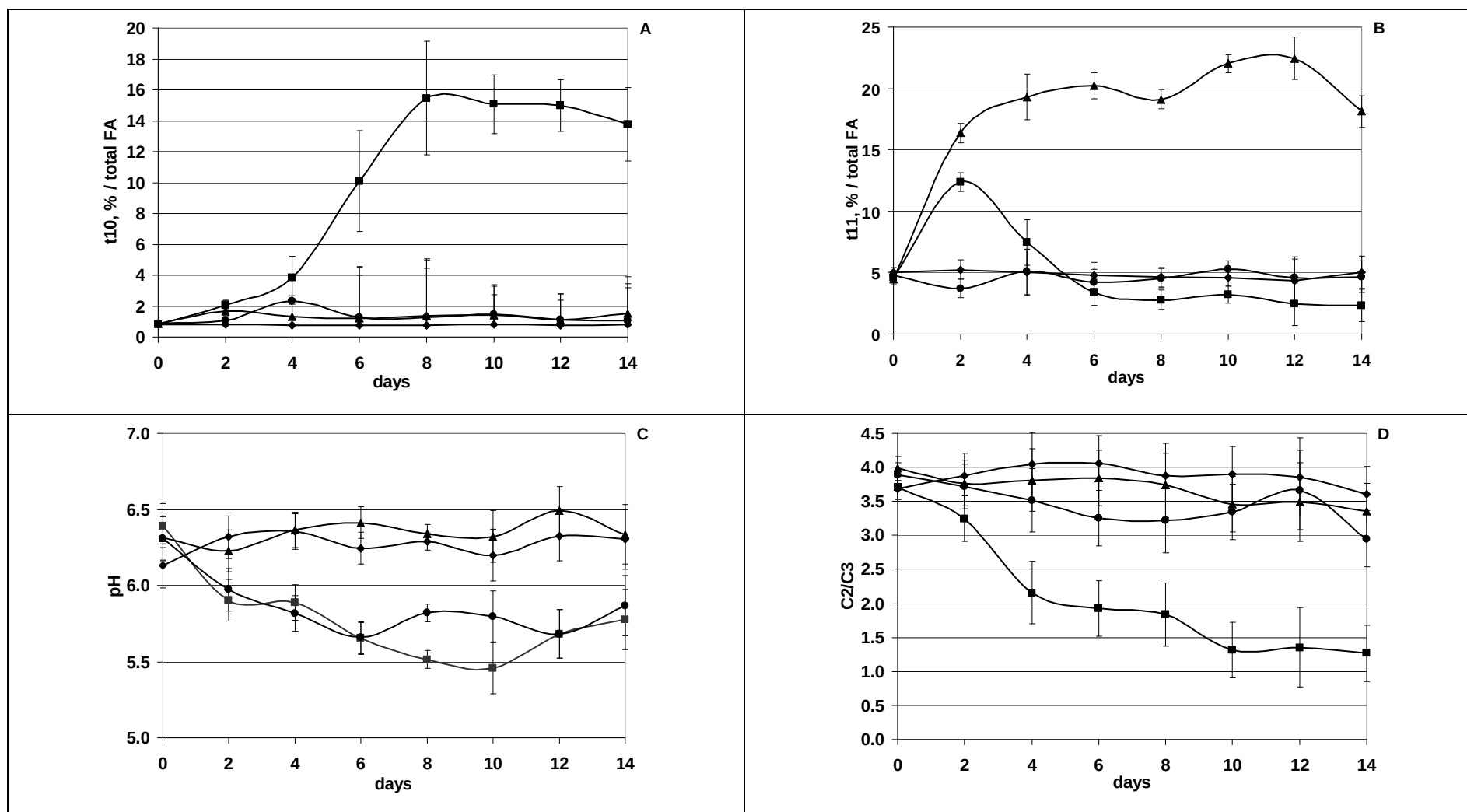


Figure 1 Evolution of t10 (A) and t11 (B) ruminal percentages (/ total fatty acids), pH (C) and acetate:propionate ratio (D) from day 0 to day 14 after beginning the distribution of the experimental: control diet (C diet; ♦), high starch diet (HS diet; ●), sunflower oil diet (O diet; ▲) or high starch plus oil diet (HS+O diet; ■)

On day 12, the ruminal pH was decreased from 6.4 to 5.7 when starch was added to the diet (Table 2). However, *Eh* and lactate concentration were not modified by the diet of cows (Table 2). Total VFA concentrations were significantly higher in the rumen of cows receiving HS and HS+O diets than in that of C and O diets fed cows: 133 vs. 98 mM on average, respectively (Table 2). Starch addition significantly decreased molar proportion of acetate, especially with HS+O diet. The lowest propionate proportion (17.4%) was obtained with C diet and the highest one (37.2%) with HS+O diet, but the effects of starch and oil additions were not statistically significant ($P=0.09$ and $P=0.10$, respectively). The acetate:propionate ratio tended to be altered by starch and oil addition, leading to the lowest values for HS+O diet.

Diets HS and HS+O led to a lower D' than C and O diets (6.6 versus 7.5 on average, respectively; Table 2).

Table 2 Effects of starch and oil addition in the diet, and their interaction, on fermentative parameters and Simpson diversity index (D') in the rumen of dry dairy cows sampled 5h after meal on day 12, except redox potential (*Eh*) recorded on day 13.

Diets ¹	C	O	HS	HS+O	SEM	P		
						Sad ²	Oad	S×Oad
pH	6.3	6.5	5.7	5.7	0.16	<0.01	0.63	0.63
<i>Eh</i>	-168.0	-164.8	-174.8	-171.3	10.66	0.77	0.88	0.99
Lactate (mM)	0.2	0.3	0.4	0.3	0.07	0.38	0.68	0.32
Total VFA ³ (mM)	96.4	100.7	134.4	131.1	7.31	<0.01	0.94	0.62
Acetate (% ⁴)	65.6	65.3	59.6	47.5	2.54	0.02	0.13	0.15
Propionate (% ⁴)	17.4	19.3	19.9	37.2	4.96	0.09	0.10	0.17
Butyrate (% ⁴)	12.1	11.1	15.1	10.0	2.15	0.67	0.21	0.39
A:P ratio ³	3.85	3.49	3.67	1.35	0.58	0.09	0.06	0.14
D'	7.6	7.5	6.5	6.8	0.43	0.05	0.98	0.85

¹C = control diet; HS = high starch diet; O = sunflower oil diet; HS+O = high starch plus sunflower oil diet.

²Sad = effect of starch addition; Oad = effect of oil addition; S×Oad = effect of interaction between oil and starch additions.

³VFA = volatile fatty acids ; A:P ratio = acetate:propionate ratio.

⁴Expressed as molar proportion of total volatile fatty acids.

On day 12, total FA content in rumen fluid 5h after meal was the highest with HS+O diet followed by O diet, C and HS diets (Table 3). Regarding ruminal FA profile, except C13:0 and C13:0*anteiso* whose percentages were very low, percentages of odd and branched-chain FA, c9,c12-C18:2 and c9,c12,c15-C18:3 were significantly decreased and t-C18:1 were significantly increased by oil addition (Table 3). Starch addition had less influence, it significantly increased C15:0*anteiso* and C16:1 percentages. Due to an interaction between starch and oil additions, the percentage of C16:0 was significantly higher with HS diet than with the other diets.

Starch and/or oil addition to the diet of cows greatly modified t-C18:1 and CLA isomeric profile, especially t10 and t11 isomers (Table 4). All t-C18:1 isomers, except t5- and t6+t7+t8 and t10-C18:1, were negatively affected by oil addition. Starch addition provoked a significant decrease of t13+t14-C18:1 and an increase of t10-C18:1. Interaction between starch and oil additions led to the highest proportion of t10-C18:1 with HS+O diet and the highest proportion of t11-C18:1 with O diet. For CLA isomers, a similar interaction was noticed leading to the highest values of t10,c12-CLA with HS+O (53.1% of CLA versus an average of 8.6% with the three other diets) and the highest c9,t11-CLA with O diet (79.8% of CLA versus 25.3%; Table 4). An interaction between starch and oil addition affected c9,c11-CLA which was only detected in rumen fluid from O diet fed cows. Oil addition significantly decreased ($P=0.02$, Table 4) t11,t13-CLA and t9,t11-CLA.

Table 3 Effects of starch and oil addition to the diet, and their interaction, on total fatty acid content (total FA, mg/g of dry matter) fatty acids profile (% of total fatty acids) in the rumen of dry dairy cows sampled 5h after meal on day 12.

Diets ¹	C	O	HS	HS+O	SEM	P		
						Sad ²	Oad	S×Oad
Total FA content	47.27	81.02	46.43	101.92	3.72	0.04	<0.01	0.03
C12:0	0.32	0.11	0.37	0.45	0.08	0.05	0.47	0.12
C13:0	0.07	0.03	0.09	0.10	0.03	0.18	0.68	0.52
C13:0 <i>anteiso</i>	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.55	0.24	0.75
C13:0 <i>iso</i>	0.12	0.04	0.10	0.06	0.01	0.95	<0.01	0.31
C14:0	0.65	0.33	1.25	1.32	0.39	0.09	0.76	0.65
C15:0	0.94	0.38	0.81	0.43	0.06	0.63	<0.01	0.31
C15:0 <i>anteiso</i>	1.04	0.38	1.54	0.77	0.10	<0.01	<0.01	0.61
C15:0 <i>iso</i>	0.56	0.22	0.52	0.14	0.03	0.06	<0.01	0.54
C16:0	15.07	10.31	18.00	10.57	0.45	0.01	<0.01	0.03
C16:1	0.05	0.04	0.10	0.18	0.04	0.04	0.37	0.23
C17:0	0.53	0.24	0.43	0.28	0.04	0.43	<0.01	0.11
C17:0 <i>anteiso</i>	0.45	0.21	0.84	0.15	0.14	0.28	0.01	0.14
C17:0 <i>iso</i>	0.21	0.09	0.21	0.06	0.01	0.31	<0.01	0.35
C18:0	39.70	35.18	37.87	48.84	4.51	0.24	0.50	0.14
c9-C18:1	2.95	5.31	3.53	2.33	0.37	0.02	0.16	<0.01
c11-C18:1	0.49	0.49	1.10	1.23	0.36	0.10	0.85	0.85
c12-C18:1	0.58	0.38	0.55	0.34	0.13	0.82	0.17	0.96
c15-C18:1	0.06	0.04	0.06	0.05	0.03	0.79	0.69	0.81
t-C18:1 ³	8.78	27.99	8.85	21.80	2.74	0.31	<0.01	0.30
c9,c12-C18:2	6.64	4.20	9.44	3.50	0.52	0.20	<0.01	0.05
CLA ³	0.38	2.84	0.25	0.15	0.76	0.11	0.17	0.14
t11,c15-C18:2	0.15	0.23	0.08	0.13	0.06	0.25	0.37	0.86
c9,c12,c15-C18:3	0.86	0.49	0.66	0.22	0.10	0.06	<0.01	0.73
Sum of t10 ³	0.73	1.12	1.12	14.99	1.66	<0.01	<0.01	<0.01
Sum of t11 ³	4.35	22.45	4.57	2.43	1.74	<0.01	<0.01	<0.01

¹C = control diet; HS = high starch diet; O = sunflower oil diet; HS+O = high starch plus sunflower oil diet.

²Sad = effect of starch addition; Oad = effect of oil addition; S×Oad = effect of interaction between oil and starch addition.

³CLA = t10,c12-CLA + c9,c11-CLA + c9,t11-CLA + t9,t11-CLA + t9,t13-CLA ; t-C18:1 = t4-C18:1 + t5-C18:1 + t6+t7+t8-C18:1 + t9-C18:1 + t10-C18:1 + t11-C18:1 + t12-C18:1 + t13+t14-C18:1 + t15-C18:1 + t16-C18:1; Sum of t10 = t10,c12-CLA + t10-C18:1 ; Sum of t11 = c9,t11-CLA + t9,t11-CLA + t11-C18:1.

Table 4 Effects of starch and oil addition in the diet, and their interaction, on isomeric profile of t-C18:1 and CLA isomers (expressed as % of total t-C18:1 and total CLA, respectively) in the rumen of dry dairy cows sampled 5h after meal on day 12.

Diets ¹	C	O	HS	HS+O	SEM		P	
						Sad ²	Oad	S×Oad
t-C18:1 isomers								
t4-C18:1	1.15	0.89	1.05	0.33	0.21	0.17	0.06	0.31
t5-C18:1	0.39	0.51	0.53	0.26	0.09	0.59	0.43	0.07
t6+t7+t8-C18:1	5.29	4.00	5.39	3.73	0.98	0.93	0.18	0.86
t9-C18:1	3.29	2.06	2.82	2.06	0.34	0.50	0.02	0.50
t10-C18:1	8.39	3.87	11.87	66.51	2.60	<0.01	<0.01	<0.01
t11-C18:1	44.96	70.13	49.60	11.07	1.76	<0.01	<0.01	<0.01
t12-C18:1	9.02	5.54	7.91	5.03	0.53	0.18	<0.01	0.59
t13+t14-C18:1	15.09	9.32	10.93	5.96	1.06	0.01	<0.01	0.72
t15-C18:1	5.74	1.90	4.61	2.49	0.41	0.53	<0.01	0.08
t16-C18:1	6.67	1.78	5.30	2.55	0.57	0.62	<0.01	0.11
CLA isomers								
t10,c12-CLA	5.30	2.76	17.77	53.13	1.41	<0.01	<0.01	<0.01
c9,c11-CLA	0.00	1.10	0.00	0.00	0.19	0.03	0.03	0.03
c9,t11-CLA	39.15	79.85	29.77	7.00	7.76	<0.01	0.29	<0.01
t9,t11-CLA	49.86	15.03	44.98	37.95	6.95	0.24	0.02	0.09
t11,t13-CLA	5.69	1.26	7.48	1.92	1.64	0.48	0.02	0.74

¹C = control diet; HS = high starch diet; O = sunflower oil diet; HS+O = high starch plus sunflower oil diet.

²Sad = effect of starch addition; Oad = effect of oil addition; S×Oad = effect of interaction between oil and starch additions.

Discussion

Before receiving the experimental diet (day 0), all cows presented a t10:t11 ratio under 0.3, including cows which exhibited a high t10:t11 ratio during the preceding experimental period, which demonstrates that our two weeks washout was sufficient for studying dietary factors leading to a t10 shift.

When cows did not receive sunflower oil in the diet (C and HS diets), t11-C18:1 was the main t-C18:1 isomer at day 12 (47% of total t-C18:1 on average) and t9,t11-CLA was the main CLA (47% of CLA on average). These diets had low levels of c9,c11-C18:2, whose BH was almost complete as showed by the low proportions of c9,c12-C18:1, t-C18:1 and CLA. Oil addition to the diets increased ruminal FA concentration, but decreased the percentage of c9,c12-C18:2, which probably is due to an extent of unsaturated FA BH that remains high when dietary FA increase (Schmidely et al., 2008). Moreover, c9,c12-C18:2 from added oil was more easily accessible to biohydrogenating bacteria than c9,c12-C18:2 of other dietary components, whose fat is inside vegetal cells. In our experiment, oil addition increased by 2.8 folds the percentages of t-C18:1 isomers. Such an accumulation of t-18:1 is known to be due to a saturation of the last BH reaction, which is a reduction of t-C18:1 to C18:0 (Troegeler-Meynadier et al., 2006).

The shift from t11 to t10 BH pathway was only observed when both starch and oil were added to the diet (HS+O diet). At day 12 with this diet, t10 were the major isomers, t10-C18:1 and t10,12-CLA representing 67% of total t-C18:1 and 53% of total CLA, respectively, but t11-C18:1 and c9,t11-CLA represented only 11 and 7% of total C18:1 and total CLA, respectively. The t9,t11-C18:2 isomer represented a high proportion of CLA, possibly due to its synthesis by *Selenomonas ruminantium* (Fujimoto et al., 1993), which can grow at low pH and is resistant to unsaturated FA (Maia et al., 2007). This shift appeared progressively, the t11 isomers decreasing until day 6 and the t10 isomers increasing until day 8 (Figure1). This progressive change is consistent with the results of Shingfield et al. (2006) and Roy et al. (2006). Contrary to our results and those of Shingfield et al. (2006), Roy et al. (2006) observed a peak of t11 isomers 4 to 6 days after the beginning of oil supplementation, which probably relates to their progressive incorporation of oil to the diets, the maximal incorporation being reached on day 4.

In our experiment, the synergistic effects of starch and oil dietary supplementation induced shifts of ruminal microbiota. Piperova et al. (2002) evidenced a t10 shift of BH due to starch addition without dietary fat supplementation in lactating dairy cows. Lack of t10 shift in our experimentation when adding starch but not oil could be due to a much lower DM intake in

our dry cows than in lactating dairy cows, resulting in lower disturbances of ruminal digestion when adding concentrates. Indeed in our experiment, starch addition alone decreased diversity, which is indicative of a selection of bacteria, but this selection, could have been insufficient to strongly change the BH pathway. The best known t11 FA producing bacteria, *Butyrivibrio fibrisolvens* is known to be very sensitive to a high starch diet (Klieve et al., 2003) and the optimal pH of its c9,c12-C18:2 isomerase is between 7.0 and 7.2 (Kepler and Tove., 1967). In our experiment, the HS diet only carried a low amount of c9,c12-C18:2, so that, in spite of adverse conditions, this bacterium could have been able to carry out BH.

The BH process is necessary to protect bacteria against the toxic effects of unsaturated FA (Maia et al., 2007). In spite of this toxic effect, in our O diet, the t11 biohydrogenating process remained very efficient, leading to high percentages of c9,t11-C18:2 and t11-C18:1. This diet contained around 20% starch and had 14% of alfalfa hay (on DM basis), which represented good conditions for the fibrolytic bacteria, and could have resulted in this high BH capacity. In the experiment of Roy et al. (2006), a similar diet (15% hay, 33% corn silage and concentrates) led to a t10 shift when supplemented with 5% sunflower oil. The difference with our results is probably due to their lactating cows eating more than 18 kg of DM daily compared to 12 kg in the present study.

The HS+O diet also resulted in a low acetate:propionate ratio, with a 2 fold higher propionate proportion than the other diets but did not change rumen pH which showed a similar pattern between HS and HS+O diets. Consistent with our results, Weimer et al. (2010) showed that cows that had a decreased milk fat content when receiving a high starch diet had a similar ruminal pH than cows that did not exhibit a milk fat depression, but a much lower acetate:propionate ratio. Computing our data from day 2 to day 14, a relationship between t10 proportions and acetate: propionate ratio could be evidenced ($10 \text{ proportion} = 11.2 * (\text{acetate: propionate ratio})^{-1.8}$, $r^2 = 0.68$). The role played by rumen pH on the rumen BH pathway has mainly been studied indirectly in vivo: adding sodium bicarbonate to the diet of dairy cows decreased the proportion of t10 isomers in the duodenal flow (Piperova et al., 2002) and the milk (Piperova et al., 2002; Troegeler-Meynadier et al., 2007). In vitro, Maia et al. (2009) showed that the amount of t10 isomers produced in continuous cultures was similar at pH 6.0 and at pH 7.0. In our experiment with the HS+O diet, the rumen pH was 5.7 five hours after the morning meal, which corresponds to the pH nadir (Garrett et al., 1999). This suggests that the average daily ruminal pH was probably over 6.0, preventing any pH related improvement of t10 isomers production compared to the low starch diets.

The HS+O diet had the same negative effect on bacterial diversity than HS diet, while oil addition alone diet had no effect on it. Milk fat depression, which is due to the t10 shift in lactating dairy cows, has already been shown to be associated with changes of bacterial community (Weimer et al., 2010). Both this specific bacterial community and the particular fermentation pattern resulting in a very high proportion of propionate, suggest that the combination of starch and oil additions resulted in a specific equilibrium between microorganisms. Such a new equilibrium could result from a selection due to the negative effects of starch on bacteria, particularly fibrolytic one, which are t11 FA producing bacteria. So an adaptation driven by the absolute need for the microbiota to eliminate unsaturated FA (Maia et al., 2007) supplied by oils, led to a promotion of the activity of t10 producers. Literature data indicate that *Megasphaera elsdenii* (Kim et al., 2002) and *Propionibacterium acnes* (Wallace et al., 2007) could be ruminal producers of t10 FA. Both these species are lactate utilizing bacteria. They can grow at low pH (Therion et al., 1982) and *Megasphaera elsdenii* is resistant to unsaturated FA (Maia et al., 2007). In our experiment, the rumen concentrations of lactate were very low and remained unaffected by the diets, which is not in favour of a shift of bacterial community driven by high lactate availability. However, a high production followed by an extensive transformation by lactate-utilizing bacteria could have masked the effects of diets, which precludes a definitive conclusion on this hypothesis. Interestingly, the increase of t10 isomers over time was slower than the decrease of t11 isomers. There was a rapid decrease of t11 FA from day 2 as opposed to an increase of t10 from day 4, so that the sum of t FA was lower on day 4 than on days 2 and 6 (14.5, 11.3 and 13.5% of total FA, respectively). This could be due to a decreased capacity of the microbiota to isomerize the supplemental c9,c12-C18:2 because of a negative effect of both starch and oil addition, on bacteria that biohydrogenate via the t11 pathway, followed by an adaptation of the microbiota to hydrogenate via another pathway, *i.e.* the t10 BH, to avoid toxic effects of unsaturated FA by maintaining a low ruminal concentration of c9,c12-C18:2. This adaptation could be due to an increased number or activity of bacteria able to biohydrogenate in conditions that are adverse to *B. fibrisolvens*.

Conclusion

The addition of starch to a control diet based on corn silage decreased ruminal pH and the diversity of the ruminal bacterial community but had no effect on BH pathways. When sunflower oil was added to the control diet, the ruminal pH did not change, as well as the

diversity of bacterial population, and the proportion of t11 BH intermediates in the rumen content greatly increased. The association of increasing starch level and sunflower oil addition in the diet of cows did not change ruminal pH and bacterial community diversity compared to the single addition of starch, but resulted in a drastic change of the isomeric profile of FA, t10 FA increasing at the expense of t11 FA. Temporal changes of the equilibrium between t10 and t11 intermediates strongly suggest that the increase of BH via the t10 pathway was a consequence of a decrease of the t11 BH capacity in the rumen, when diet resulted in adverse conditions for t11 producing bacteria. The bacterial modifications associated with this t10 shift should be investigated with deep sequencing methods

References

- Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Saebø A, Bauman DE 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology* 278, 179–184.
- Bhattacharyaa A, Banua J, Rahmana M, Causeyb J, Fernandes G 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 789–810.
- Brouwer IA, Wanders AJ, Katan MB 2010. Effect of animal and industrial *trans* fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans - A quantitative review. *PLoS One* 5, e9434.
- Enjalbert F, Troegeler-Meynadier A 2009. Biosynthesis of *trans* fatty acids in ruminants. In *Trans fatty acids in human nutrition* (eds Destailats F, Sébédio JL, Dionisi F and Chardigny JM), pp. 1–31. The Oily Press, Bridgwater, UK.
- Fujimoto K, Kimoto H, Shishikura M, Endo Y, Ogimoto K 1993. Biohydrogenation of linoleic acid by anaerobic bacteria isolated from rumen. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57, 1026–1027.
- Garrett EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR 1999. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 82, 1170–1108.
- Griinari JM, Dwyer DA, McGuire MA, Bauman DE, Palmquist DL, Nurmela KVV 1998. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81, 1251–1261.
- Ip MM, McGee SO, Masso-Welch PA, Ip C, Meng X, Ou L, Shoemaker SF 2007. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis* 28, 1269–1276.
- Julien C, Marden JP, Bonnefont C, Moncoulon R, Auclair E, Monteils V, Bayourthe C 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal* 4, 1641–1646.
- Kepler CR, Tove SB 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of a linoleate delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry* 242, 5686–5692.
- Kim YJ, Liu RH, Rychlik JL, Russell JB 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology* 92, 976–982.

- Klieve AV, Hennessy D, Ouwerkerk D, Forster RJ, Mackie RI and Attwood GT 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology* 95, 621–630.
- Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y, and Doreau M 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 2472–2485.
- Maia MR, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* 91, 303–314.
- Maia MR, Bessa RJ, Wallace RJ (2009). Is the *trans*-10 shift that sometimes occurs in the ruminal biohydrogenation of linoleic acid caused by low pH or starch? A Rusitec study. In *Ruminant Physiology*, XIth International Symposium, Clermont-Ferrand (France), September 6–9, pp 276–277. Chilliard Y, Glasser F, Faulconnier Y, Bocquier F, Veissier I, Doreau M, editors. The Netherlands, Academic Publishers, Wageningen.
- Michelland R, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprints profiles. *Molecular Ecology Resource* 9, 1359–1363.
- Park PW, Goins RE 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* 59, 1262–1266.
- Pipero LS, Sampugna L, Teter BB, Kalscheur KF, Yurawecz MP, Ku Y, Morehouse KM, Erdman RA 2002. Duodenal and milk *trans* octadecanoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 132, 1235–1241.
- Playne MJ 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic acid and succinic acid in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, 638–644.
- Privé F, Combes S, Cauquil L, Farizon Y, Enjalbert F, Troegeler-Meynadier A 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid in vitro. *Journal of Dairy Science* 93, 711–722.
- Rosenzweig ML 1995. *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Roy A, Ferlay A, Shingfield KJ, Chilliard Y 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with

particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science* 82, 479–492.

Schmidely P, Glasser F, Doreau M, Sauvant D 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors. 1. Total fatty acids. *Animal* 2, 677–690.

Shingfield KJ, Reynolds CK, Hervás G, Griinari JM, Grandison AS, Beever DE 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 714–732.

Tardy AL, Morio B, Chardigny JM 2011. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. *Nutrition Research Reviews* In press.

Therion JJ, Kistner A, Kornelius JH 1982. Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactolytic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 44, 428–434.

Troegeler-Meynadier A, Bret-Bennis L, Enjalbert F 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development* 46, 713–724.

Troegeler-Meynadier A, Nicot MC, Enjalbert F 2007. Effects of fat source and dietary sodium bicarbonate plus straw on the conjugated linoleic acid content of milk of dairy cows. *Archives of Animal Nutrition* 61, 406–415.

Wallace RJ, McKain N, Shingfield KJ, Devillard E 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research* 48, 2247–2254.

Weimer PJ, Stevenson DM, Mertens DR 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *Journal of Dairy Science* 93, 265–278

Zened A, Troegeler-Meynadier A, Nicot MC, Combes S, Cauquil L, Farizon Y, Enjalbert F 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Journal of Dairy Science* (accepted for publication).

ANNEXE 1

Effet de la ration des vaches sur l'évolution diurnale des valeurs de pH et de potentiel redox ruminal

Dans le cadre de l'expérimentation décrite précédemment des mesures de pH et de potentiel redox (Eh) ont été réalisées à J3 et J13, c'est-à-dire 3 et 13 jours après la mise en place des rations expérimentales. Le plan expérimental était un carré latin : 4 vaches taries $\times$ 4 rations $\times$ 4 périodes. Les 4 rations expérimentales étaient à base d'ensilage de maïs : une ration témoin (T ; $F/C^3 = 83/17$), une ration riche en amidon (A ; $F/C = 38/62$), une ration riche en huile (H ; $F/C = 78/22$) et une ration riche en amidon et en huile (AH ; $F/C = 32/68$).

L'enregistrement des valeurs Eh et pH a été réalisé sur chaque vache pendant 9h : de 1h avant le repas du matin à 8h après, selon la méthode *ex vivo* de Julien et al. (2010). Les données recueillies ont été analysées en temps répétés (heures de prélèvement) à l'aide d'un modèle linéaire général (SYSTAT) en incluant les effets liés à la période, au jour d'enregistrement (J3 et J13), à la vache et à la ration.

La ration a influé significativement ($P < 0,01$) sur le pH ruminal : la ration AH était la plus acidogène avec une moyenne de 6,0 ; la ration A entraînait un pH moyen de 6,2, et les rations T et H un pH moyen de 6,4 et 6,5, respectivement. Par ailleurs, il existait une interaction significative ($P = 0,03$) entre la ration de la vache et l'heure d'enregistrement par rapport au repas. Les rations T et H ont provoqué une diminution de pH postprandial, pour des valeurs minimales entre 4 et 6h après repas, mais celles-ci sont restées au dessus de 6,2 (Figure 12). Les rations A et AH ont entraîné une diminution postprandiale plus importante. Pour la ration AH, le pH est passé en dessous de 6,0 dès 3h après le repas pour atteindre un minimum de 5,6 à 6h; 8h post-repas le pH était encore inférieur à 6,0. Le pH induit par la ration A a suivi la même évolution mais les valeurs étaient plus élevées : valeur minimale de 5,9 à 6h, et 8h après le repas le pH était remonté à 6,0.

Contrairement au pH, le Eh moyen n'a pas été modifié ($P = 0,73$) par la ration (Figure 13).

³ F/C = ratio %fourrages / %concentrés dans la ration en MS

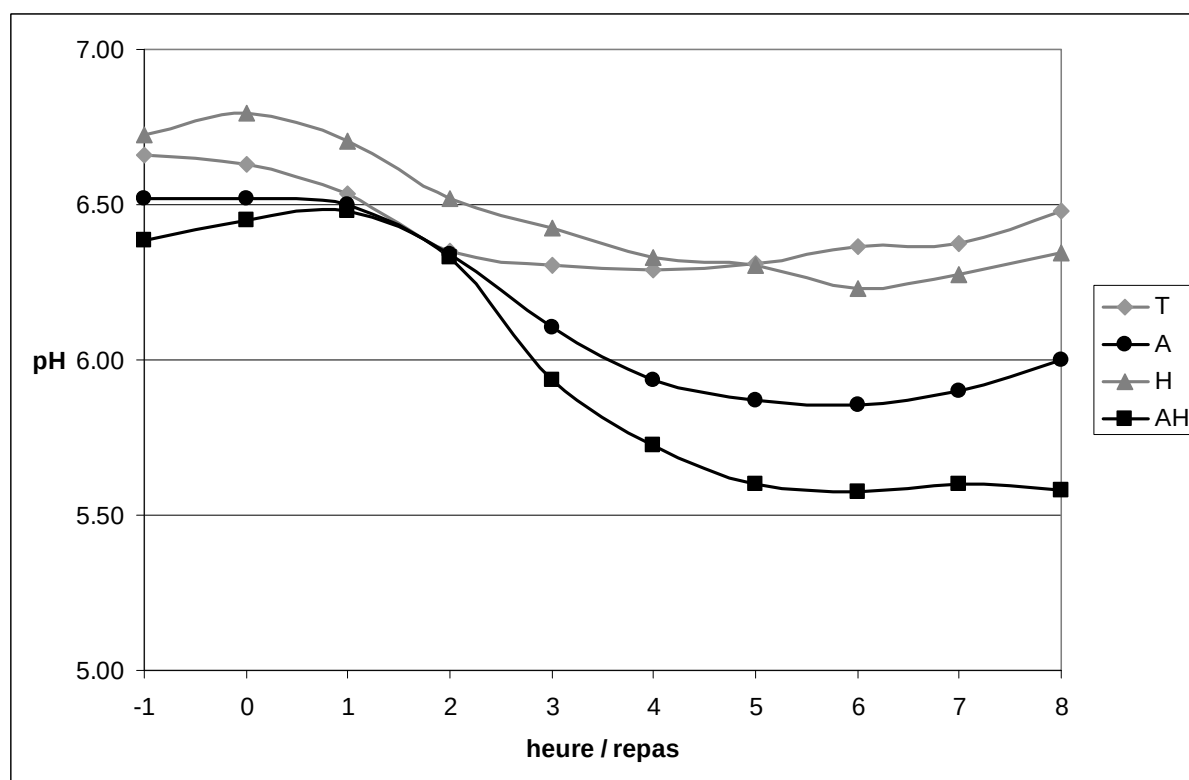


Figure 12. Effet de la ration (T : témoin, A : riche en amidon, H : riche en huile, AH : riche en amidon et en huile) sur l'évolution du pH ruminal.

Les évolutions du pH et du Eh enregistrées étaient similaires à celles obtenues par Marden et al. (2008), utilisant une ration à base d'ensilage de maïs riche en concentrés (F/C = 57/43).

Les vaches recevant les rations AH et A présentaient une acidose subaiguë selon les critères de Sauvant et al. (1999), c'est-à-dire un pH ruminal moyen au cours de la journée inférieur à 6,25. Cependant, certains auteurs préconisent de prendre en compte la durée pendant laquelle le pH ruminal est en dessous d'une valeur seuil. En particulier, Krause et al. (2002) en faisant une étude sur 24 heures, proposent de mesurer le temps pendant lequel le pH ruminal se trouve en dessous de 5,8. Si l'on retient ce critère, seule la ration AH était acidogène.

Il est à noter que 8h après repas les pH ne sont pas revenus à leur valeur initiale. En effet d'après Oetzel (2000) 8h sont insuffisantes pour que le pH ruminal revienne à sa valeur initiale, par contre l'intervalle de 16h entre le repas du soir (17h00) et le repas du matin (9h00) le permet.

Si les valeurs de pH obtenues au cours de la journée avec la ration AH acidogène étaient voisines de celles obtenues par Marden et al. (2008) avec leur ration acidogène (pH < 6,0 dès 3h pour un minimum de 5,6 à 5h, et un pH < 5,8 à 8h après le repas), les valeurs *Eh* obtenues dans cette étude étaient bien différentes : -115mV en moyenne sur la journée pour Marden et al. (2008) contre -186mV avec la ration AH. Mais ces auteurs ont utilisés des vaches laitières en début de lactation. Par ailleurs, aucune de nos rations n'a eu d'effet sur le *Eh*, avec une moyenne globale sur la journée de -183mV toutes rations confondues. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Julien et al. (2010), qui n'ont noté aucun effet du ratio F/C sur le *Eh* ruminal. Leurs rations étaient à base de foin et donc les valeurs *Eh* étaient inférieures à celles obtenues dans cette étude : -210mV en moyenne.

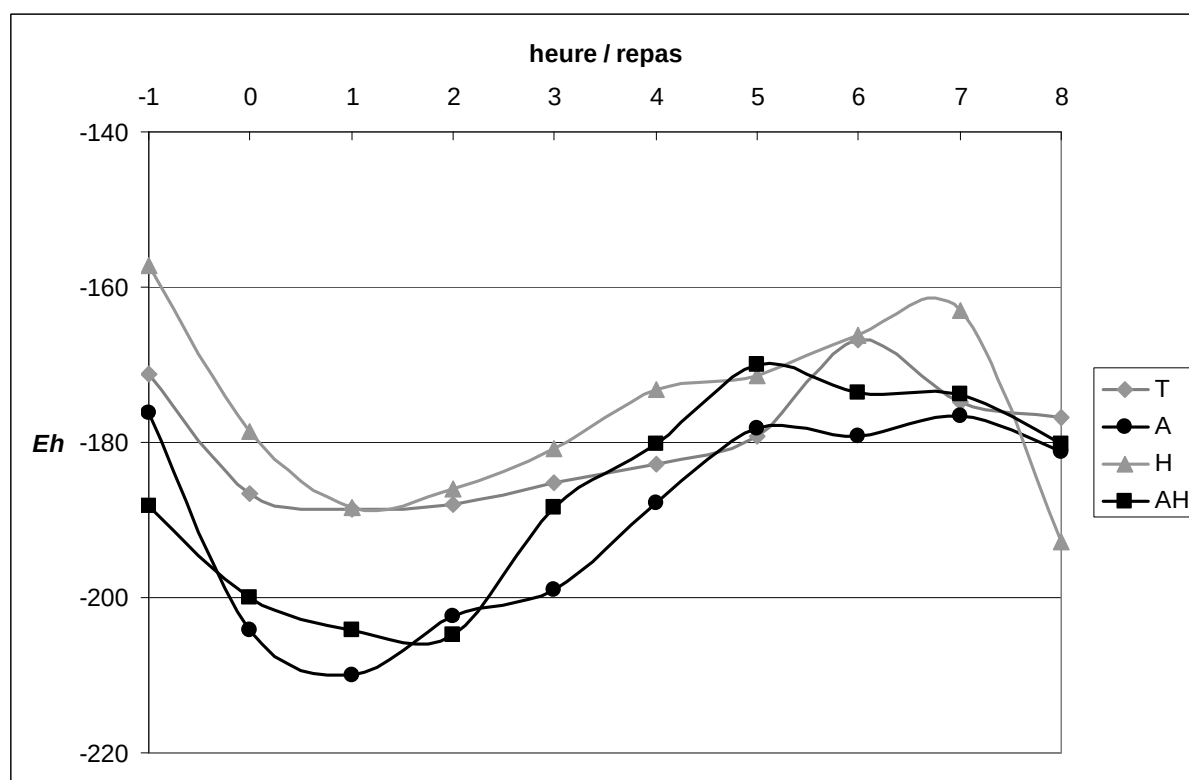


Figure 13. Effet de la ration (T : témoin, A : riche en amidon, H : riche en huile, AH : riche en amidon et en huile) sur l'évolution du potentiel redox (*Eh*) du contenu ruminal.

Conclusion :

L'addition d'huile et d'amidon (blé + orge) à une ration à base d'ensilage de maïs a provoqué une acidose ruminal subaiguë chez les vaches tarées, mais ni l'addition d'huile ni l'addition d'amidon n'a modifié le *Eh* ruminal. L'abaissement du pH ruminal induit par cette ration est peut-être à l'origine d'une modification de l'activité et/ou de la croissance des

bactéries. En effet, les bactéries ruminales ont des pH optimaux de croissance variables d'une espèce à l'autre, et la croissance de certaines d'entre elles est inhibée par des valeurs pH extrêmes (Russell et Dombrowski, 1980), ceux-ci pouvant entraîner une sélection des microorganismes résistants.

Ainsi, si nous reprenons l'objet de cette étude, à savoir les origines du shift de la voie t11 vers la voie t10 induit par la ration riche en huile et en amidon, une hypothèse d'explication pourrait être liée au pH ruminal. Celui-ci pourrait agir soit sur les populations bactériennes soit sur leurs enzymes. Les effets du pH sur les réactions enzymatiques sont développés dans l'étude enzymatique présentée plus tard, et s'ils expliquent au moins en partie la diminution des AG t11, ils ne peuvent pas expliquer l'augmentation des t10.

La diminution des isomères t11 pourrait être due à une inhibition de la croissance des bactéries le produisant, en particulier *Butyrivibrio fibrisolvens* dont la croissance est impossible à des $\text{pH} \leq 5,7$ (Russell et Dombrowski, 1980). Dans notre étude, seule la ration enrichie en huile et amidon a permis d'atteindre de telles valeurs de pH.

ARTICLE 2

Étude *in vitro* des facteurs alimentaires provoquant la déviation de la voie *trans*-11 vers la voie *trans*-10 de la biohydrogénation ruminale chez la vache laitière (accepté, « *Animal* »)

Cette étude, menée *in vitro*, visait à distinguer les effets de l'alimentation des vaches donneuses des effets propres liés aux substrats fermentaires, sur la déviation de la voie t11 vers la voie t10 de la biohydrogénation (BH) ruminale. Les vaches de l'essai *in vivo* précédent, ont été utilisées comme donneuses de contenu ruminal. Pour rappel, elles recevaient une ration témoin à 22% d'amidon et moins de 3% de matières grasses (MG), une ration enrichie en amidon (35% d'amidon, MG<3%), une ration additionnée de 5% d'huile de tournesol (20% d'amidon, 7.6% de MG) ou une ration enrichie en amidon et en huile de tournesol (33% d'amidon, 7.3% de MG). Le contenu ruminal de chaque vache a été incubé pendant cinq heures avec quatre substrats ayant une composition chimique similaire à celle des régimes distribués *in vivo*, en remplaçant l'huile de tournesol par de l'acide linoléique pur (LA) et l'ensilage de maïs plante entière par un mélange broyé de feuilles et de tiges séchées de plantes de maïs. Ces incubations ont été réalisées à chaque période expérimentale de l'essai *in vivo*.

L'efficacité de l'isomérisation du c9,c12-C18:2 en CLA a été la plus élevée lorsque le contenu ruminal provenait d'une vache recevant de l'huile de tournesol et lorsqu'il était incubé avec du LA. La proportion d'isomères t10 était faible en l'absence de LA dans les incubations, donc aucun shift n'y a été observé. La déviation de la voie t11 à t10 n'a eu lieu que dans les cultures avec les contenus ruminiaux des vaches recevant les rations riches en amidon incubés avec du LA. D'autre part, cette déviation était encore plus marquée lorsque le contenu ruminal provenait d'une vache ayant reçu de l'amidon plus de l'huile. Ces résultats montrent qu'une forte accumulation d'acides gras t10 au détriment des t11 est le résultat d'une microflore adaptée ainsi que de l'addition de LA comme substrat d'incubation.

***In vitro* study of dietary factors affecting the biohydrogenation
shift from trans-11 to trans-10 fatty acids in the rumen of dairy
cows**

A. Zened^{1,2}, F. Enjalbert^{1,2}, M.C. Nicot^{1,2}, A. Troegeler-Meynadier^{1,2,a}

Animal 2011. doi:10.1017/S1751731111001777.

¹ INRA, UMR1289, Tandem, F-31326 Castanet-Tolosan, France

² Université de Toulouse, INP, ENSAT, ENVT, UMR1289 Tandem, F-31076 Toulouse, France

^a Present address: INRA, UMR1289, Tandem, F-31326 Castanet-Tolosan, France

Corresponding author: Annabelle Troegeler-Meynadier. Email address: a.troegeler@envt.fr

Running head: trans-10 shift in ruminal biohydrogenation *in vitro*

Abstract: Based on the isomer specific effects of trans fatty acids on human health and the detrimental effect of t10,c12-conjugated linoleic acid (CLA) on cows' milk fat production, there is a need to identify factors that affect the shift from trans-11 to trans-10 pathway during ruminal biohydrogenation of fatty acids. The present experiment was conducted in vitro and aimed at separating the effects of the diet of the donor cows from those of the fermentative substrate, which is necessary to prevent this shift. Four dry Holstein dairy cows were used in a 4x4 Latin square design. They received 12 kg of dry matter per day of four diets based on maize silage during four successive periods: the control diet (22% starch, <3% fat), the high starch diet, supplemented with wheat plus barley (35% starch, <3% crude fat), the sunflower oil diet, supplemented with 5% of sunflower oil (20% starch, 7.6% crude fat) and the high starch plus oil diet (33% starch, 7.3% crude fat). Ruminal fluid of each donor cow was incubated for 5 hours with four substrates having similar chemical composition to the diets, replacing sunflower oil by pure linoleic acid (LA). The efficiency of isomerisation of LA to CLA was highest when rumen fluids from cows receiving dietary oil were incubated with added LA. The shift from trans-11 to trans-10 isomers was induced in vitro by high starch diets and addition of LA. Oil supplementation to the diet of the donor cows increased this shift. Conversely, the trans-10 isomer balance was always low when no LA was added to incubation cultures. These results showed that a large accumulation of trans-10 FA was only observed with an adapted microflora as well as an addition of non-esterified LA to the incubation substrate.

Keywords: Rumen biohydrogenation, linoleic acid, conjugated linoleic acids, trans fatty acids, trans-10 shift.

Implications: The isomeric profile of intermediates of polyunsaturated fatty acid ruminal biohydrogenation is a major concern for the nutritional quality of milk fat for human health. An *in vitro* study was used to separate the effects of rumen microbiota adaptation from the effects of substrate on biohydrogenation. It showed the importance of both factors to control the trans-10 shift. Combining high starch and high oil in the diet of donor cows plus an addition of linoleic acid in the substrate clearly switched the biohydrogenation pathway from trans-11 to trans-10. This knowledge will help further investigations on this shift, including studies on the microbiota.

Introduction

Conjugated linoleic acids (CLA) have a number of biological effects on animal models including anti-obesitic, anti-carcinogenic, antiatherogenic, anti-diabetagenic, immunomodulatory, apoptotic and osteosynthetic effects, and deserve interest since some of these properties have been evidenced in human subjects (Bhattacharya *et al.*, 2006; Benjamin and Spener, 2009). Part of the effects of CLA are isomer-specific and some studies showed adverse effects of t10c12-CLA (Bhattacharya *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2007). Similarly, total trans fatty acids (FA), including monoenoic, can alter cardiovascular risk markers, but the specificity of individual isomers remains an area of controversy where some suggest a similar effect of all trans FA (Brouwer *et al.*, 2010), whereas others assume natural trans FA, mainly of milk origin, are less deleterious as compared with industrial trans FA (Tardy *et al.*, 2011). Moreover, t10,c12-CLA decreases the mammary synthesis of *de novo* FA and induces milk fat depression in dairy cows (Shingfield and Griinari, 2007). In human foodstuffs, part of trans FA supply is from ruminant products, because they are formed during biohydrogenation (BH) of dietary unsaturated FA in the rumen (Enjalbert and Troegeler-Meynadier, 2009).

Wide variability in the ratio of trans-10/trans-11 isomers has been observed in milk fat (Shingfield *et al.*, 2006). In most cases, trans-11 FA are the major isomers and the proportion of trans-10 isomers is very low (<1% of total FA), so any significant increase of trans-10 isomers to the detriment of trans-11 isomers can be considered as a shift. Dietary factors shifting from trans-11 to trans-10 BH pathway have been identified, i.e. the proportion of concentrate (Griinari *et al.*, 1998), the addition of oil (Roy *et al.*, 2006) or both (Lor *et al.*, 2004). Moreover, Roy *et al.* (2006) demonstrated strong time-dependent changes of the trans-10 to trans-11 isomers ratio when dairy cows received supplemental oil, suggesting that the adaptation of the ruminal microflora could be a modulator of the trans-10 shift. Nevertheless, the mechanism of action of these factors remains unknown.

The objectives of this study were to identify factors that affect the shift from trans-11 to trans-10 isomers, separating the effects of modifications of the microflora due to the diet adaptation of cows from the effects of the fermentative substrates. A short term (5h) batch *in vitro* system was used, factorially combining rumen fluids from cows adapted to four dietary combinations of starch and sunflower oil contents with four combinations of starch and LA levels in the incubation substrate.

Material and methods

In vitro incubations

Four rumen-fistulated non-lactating Holstein cows were assigned to a 4×4 Latin square design with 4 different diets during 4 periods. The control diet was a low-starch (21.5% on a DM basis) diet based on maize silage and soybean meal. In the high starch diet, the starch content was increased to 34.8% using a mixture of ground wheat and barley. In the oil diet, 5% of the control diet was replaced with 5% of sunflower oil, and the high starch plus oil diet was enriched with both wheat plus barley and sunflower oil. The composition of the diets is shown in Table 1. Each four-week period consisted of two weeks with the control diet followed by two weeks with either control, high starch, oil or high starch plus oil diet.

Table 1 *Ingredients and chemical composition of donor cow diets*

	Control diet	High starch diet	Sunflower oil	High starch
Ingredients (% of DM)				
Maize silage	68.7	37.7	63.2	32.3
Alfalfa hay	14.3	0.00	14.3	0.00
Wheat barley mix	0.00	48.5	0.00	48.5
Soybean meal	15.5	12.4	16.2	13.1
Sunflower oil	0.00	0.00	4.82	4.72
Minerals and vitamins ^a	1.50	1.47	1.50	1.47
Composition (% of DM)				
Crude protein	14.6	14.2	14.6	14.2
NDF	39.7	30.9	37.3	28.6
Starch	21.5	34.8	19.8	33.1
Crude fat	2.90	2.69	7.57	7.26
Fatty acid composition (mg/g of DM)				
18:0	0.46	0.31	2.30	2.12
c9-18:1	2.87	2.41	13.5	12.8
c9,c12-18:2	8.61	8.63	34.1	33.6
c9,c12,c15-18:3	1.28	1.40	1.24	1.35

DM = dry matter

^aContained (per kg of premix, DM basis) P: 40g, Ca: 260g, Mg: 50g, Na: 20g, Zn: 5g, Mn: 4g, Cu: 1g, I: 40 mg, Co: 20 mg, Se: 20mg, vitamin A: 450 000 IU, vitamin D3: 100 000 IU and vitamin E: 1 500 IU.

On day 27 of each period, one litre of rumen fluid was collected from each cow before the morning meal, and strained through a metal sieve (1.6mm mesh). The rumen fluids were transported quickly (30 minutes) to the laboratory in anaerobic conditions at 39°C. In the laboratory, the pH of the rumen fluids was measured and 100 ml of each was frozen. Four incubation substrates were used (2.7 g of DM per flask). They corresponded to the four diets, replacing maize silage with a mix of maize grain and maize leaves and stems, and sunflower oil by 99% pure LA (LA; Sigma Co., St. Louis, MO). The composition of substrates is given in Table 2. Each ruminal fluid was incubated with the four substrates.

Table 2 *Ingredients and chemical composition of the substrates of in vitro incubations*

	Control substrate	High starch	Linoleic acid	High starch plus
Ingredients (% of DM)				
Maize leaves & stems	42.9	23.9	40.2	20.7
Maize grain	27.4	15.1	25.3	13.0
Alfalfa hay	14.2	0.00	14.7	0.00
Wheat	0.00	48.6	0.00	49.6
Soybean meal	15.6	12.4	16.4	13.3
Linoleic acid	0.00	0.00	3.37	3.41
Composition (% of DM)				
Crude protein	16.5	15.6	16.5	15.6
NDF	39.4	28.4	37.8	26.5
Starch	19.1	40.3	17.7	39.5
Crude fat	2.28	2.37	5.57	5.70
Fatty acids (mg/g of DM)				
18:0	0.39	0.28	0.38	0.27
c9-18:1	2.34	2.13	2.23	2.03
c9,c12-18:2	6.44	7.47	39.6	41.1
c9,c12,c15-18:3	0.52	0.99	0.52	0.99

DM = dry matter

Sixty ml of each rumen fluid and 60 ml of a bicarbonate buffer solution (19.5 g/l of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9.24 g/l of NaHCO_3 , 0.705 g/l of NaCl , 0.675 g/l of KCl , 0.108 g/l of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.180 g/l of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were placed into four 250-ml flasks containing the four different substrates. The buffer solution was pre-warmed to 39°C and saturated continuously with CO_2 . Its pH was lowered to 6 with hydrochloric acid (6N) before being added to the 60 ml of rumen fluids. Next the flasks were filled with CO_2 , closed with a rubber cap with a plastic tube leading into the water to vent fermentation gas without allowing the ingress of oxygen. This procedure might have changed the initial pH slightly, but pH was not checked again as incubation flasks were closed. Incubations were carried out at 39°C in a water-bath rotary shaker (Aquatron; Infors AG, 4103 Bottmingen, Germany). Flasks were stirred at 130 rpm and kept safe from the light during incubation.

After 5 hours, fermentations were stopped by placing the flasks into ice and the pH was measured. The contents of the flasks were immediately frozen at -20°C. Samples of initial ruminal fluids and contents of incubated flasks were freeze-dried (Virtis Freezemobile 25, Virtis, Gardiner, NY), weighed, ground and homogenised in a ball mill (Dangoumau, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France), and then stored at -20°C until analysis.

Chemical analysis

Chemical composition of feed was determined according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1998) procedures; NDF and ADF were determined according to the procedure of Van Soest *et al.* (1991).

The FA of rumen fluids, substrates and residues of incubation were extracted and methylated using the procedure of Park and Goins (1994), except that the solution of 14% of boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanolacetylchloride (10:1 v/v). Nonadecanoic acid (Sigma Co., St. Louis, MO) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg.

Fatty acid methyl esters were quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, equipped with a model 7683 auto injector, Network GC System, Palo Alto, CA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm ID, 0.20 µm film thickness; CPSil88, Varian, Middelburg, the Netherlands).

For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 260°C and the injector at 255°C; the split ratio was 1:50. Hydrogen was used as the carrier gas with a constant flow of 1ml/min. The samples were injected in 1 µl of hexane. The initial

temperature of the oven was 60°C, which was held for 2 min; it was then increased by 8°C/min to 150°C, held at 150°C for 12 min, increased by 2°C/min to 175°C, held at 175°C for 20 min, increased by 5°C/min to 225°C, held at 225°C for 10 min and finally increased by 10°C/min to 240°C and maintained at 240°C for 10 min. This temperature programme did not allow the separation of, c9,c12,c15-18:3 from 20:1 or of the t13,t14-18:1 from c9-18:1. Therefore, a second analysis was used to separate these coeluted FA. For this analysis, temperature of injection and detection were the same as in the first analysis. The split ratio was 1:75 and hydrogen was the carrier gas with a constant pressure of 150 kPa. The samples were injected in 1 µl of hexane. The initial oven temperature was 60°C, which was held for 3 min; it was then increased by 8°C/min to 190°C, held at 190°C for 13 min, increased by 5°C/min to 225°C, held at 225°C for 10 min, increased by 10°C/min to a final temperature of 230°C, and maintained there for 10 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St. Louis, MO) except 18:1 other than t9-18:1, t11-18:1 and c9-18:1, which were identified by order of elution. The FA concentrations were expressed in mg per kg of DM.

Calculations

The balances of each FA were calculated as final (incubated flask) - initial (rumen fluid + substrate) percentages relative to total FA. Negative values represented FA disappearance and positive values FA accumulation.

The average rates (mg/L/h) and the efficiencies of LA isomerisation (v1 and E1, respectively), CLA reduction (v2 and E2, respectively), and trans-18:1 reduction (v3 and E3, respectively) for our 5 hours incubations were calculated as previously described by Troegeler-Meynadier *et al.* (2006):

$$v1 = ([LA]b - [LA]e)/5 \text{ and}$$

$$E1 = ([LA]b - [LA]e)/[LA]b,$$

where 5 is the incubation time and [LA]b and [LA]e represent the concentrations of LA at the beginning and end of the 5-h incubation respectively. E1 also represents the BH extent of LA.

$$v2 = ([LA]b - [LA]e + [CLA]b - [CLA]e)/5 \text{ and}$$

$$E2 = ([LA]b - [LA]e + [CLA]b - [CLA]e)/([LA]b - [LA]e + [CLA]b),$$

where [CLA]b and [CLA]e represent the concentration of total CLA isomers measured at the beginning and end of the 5-h incubation respectively.

$$v3 = ([LA]b - [LA]e + [CLA]b - [CLA]e + [trans-18:1]b - [trans-18:1]e)/5 \text{ and}$$

$$E3 = ([LA]b - [LA]e + [CLA]b - [CLA]e + [trans-18:1]b - [trans-18:1]e)/([LA]b - [LA]e + [CLA]b - [CLA]e + [trans-18:1]b),$$

where [trans-18:1]b and [trans-18:1]e represent the concentration of total trans-18:1 isomers measured at the beginning and end of the 5-h incubation period respectively.

Statistical analysis

Data were analysed using the General Linear Model of SYSTAT (version 9, SPSS Inc., Chicago, IL) and were reported as mean values with standard errors of the mean.

The pH, the total FA concentrations and the proportions of C18 FA in the rumen fluids were analysed by ANOVA according to the following model:

$Y = \mu + C + P + Sd + Ld + Sd \times Ld + \epsilon$, where μ is the mean, C, P, Sd and Ld are the effects of cow, period, high starch versus low starch diets and diets with sunflower oil versus diets without added oil, respectively and ϵ the residual error.

Fatty acid accumulation or disappearance, final pH, rates and efficiencies of BH reactions *in vitro* were analysed by ANOVA according to the following model:

$Y = \mu + C + P + Sd + Ld + Ss + Ls + Sd \times Ld + Sd \times Ss + Sd \times Ls + Ld \times Ss + Ld \times Ls + Ss \times Ls + \epsilon$, where Ss and Ls are the effects of high starch versus low starch *in vitro* substrates and *in vitro* substrates with LA versus substrates without LA, respectively.

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

Results

Fatty acid profiles of ruminal fluids from donor cows

The FA composition of ruminal fluids was strongly affected by dietary starch level and oil supplementation. The ruminal fluids from cows receiving the high starch diets supplemented with oil contained numerically more trans-10 than trans-11 BH intermediates (Table 3). However, the effects of diet on t10,c12-CLA were not significant, and effects of dietary starch, dietary oil and their interaction only tended to be significant on t10-18:1 percentage ($P=0.078$, $P=0.058$ and $P=0.083$, respectively).

Effect of linoleic acid addition to the in vitro substrate

Adding LA to the *in vitro* substrate caused an increase of rates and efficiencies throughout the BH chain (Table 4). The isomerisation was more efficient when LA was supplemented in the non-esterified form (48%, Table 4) as compared to the disappearance of LA present in the cultures without LA addition (35%). Due to a higher amount of LA in the incubation flasks, this efficiency increase was associated with a tremendous increase in the amount of LA disappearing per time unit (v1, 13.9 versus 89.8 mg/L/h) and of LA disappearance relative to total FA (17% versus 4%; Figure 1). In the same way, v2 was higher in the flasks with LA addition than in the flasks without LA, but E2 was 92% without LA addition and 96% with LA addition (Table 4). For the final step leading to the formation of 18:0, v3 and E3 were also higher in cultures with LA compared to media without LA addition (64 versus 15 mg/L/h and 0.49 versus 0.27, respectively; Table 4).

Regarding the different isomers (Figure 2), all the CLA balances were higher when pure LA was added to cultures, with a marked effect on t10,c12-CLA whose accumulation was increased 25-fold. In the same way, addition of pure LA to incubation substrates led to a higher accumulation of all the trans-18:1 isomers (Figure 3).

Effect of starch addition to the in vitro substrate

The final pH was significantly lowered ($P<0.001$) by the addition of starch to the substrate (Table 4). The addition of starch to the *in vitro* cultures had no effect on v1 and slightly decreased E1 from 44 to 39% (Table 4). Starch addition had no effect on both reductions and on the accumulation of total CLA or total trans-18:1 (Table 5). Nevertheless, adding starch to incubations caused a decrease in the accumulation of c9,t11-CLA from 0.15% to 0.06% and of t11-18:1 from 1.23% to 0.61% (Figure 2), but had no effect on t10-18:1 isomers accumulation (Figure 3).

Table 3 Initial pH (before and after the addition of pH=6 buffer solution), total fatty acid amount (mg per flask) and C18 fatty acids content (% of total fatty acids) of the rumen fluids

Donor cow diet	Control diet	High starch diet	Sunflower oil diet	High starch plus oil diet	SEM	Significant effects ^a
pH of rumen fluids	6.73	6.68	6.73	6.58		
pH of incubates after buffering	6.50	6.45	6.46	6.38		
Total fatty acids	134	128	267	343	42.8	Ld**
18:0	45.2	43.3	49.6	55.7	3.24	Ld*
c9-18:1	3.13	3.47	3.92	2.73	0.20	SdxLd**
t10-18:1	0.49	0.58	1.26	13.2	2.86	
t11-18:1	4.00	4.30	14.2	1.00	0.44	Sd***, Ld***, SdxLd***
c9,c12-18:2	3.46	5.19	1.67	2.49	0.48	Sd*, Ld**
t10,c12-CLA	0.02	0.06	0.02	0.03	0.02	
c9,t11-CLA	0.05	0.04	0.19	0.01	0.01	Sd***, Ld**, SdxLd***
t9,t11-CLA	0.32	0.19	0.19	0.08	0.05	
c9,c12,c15-18:3	0.93	0.52	0.35	0.34	0.08	Sd*, Ld**, SdxLd*

^a Effects: Sd = high starch versus low starch diets; Ld = diets with sunflower oil versus diets without added oil

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Table 4 Effect of donor cow diet and in vitro substrates on final pH and rates (mg/L/h) and efficiencies of the 3 reactions of linoleic acid biohydrogenation during 5h incubations

Donor cow diet	Control diet				High starch diet				Sunflower oil diet				High starch plus oil diet				SEM	Significant effects ^b
Substrates ^a	Cs	HSs	LAs	HS+LAs	Cs	HSs	LAs	HS+LAs	Cs	HSs	LAs	HS+LAs	Cs	HSs	LAs	HS+LAs		
pH	5.64	5.40	5.69	5.46	5.42	5.24	5.46	5.26	5.58	5.35	5.59	5.38	5.40	5.17	5.44	5.24		Sd***, Ss***
Kinetic parameters ^c																		
v1	15.1	12.4	75.8	81.1	17.0	15.3	86.5	91.3	14.9	12.0	92.5	94.8	13.4	11.3	96.4	99.8	3.19	Sd*, Ld**, Ls***, SdxLs*, LdxLs***
E1	0.42	0.31	0.41	0.43	0.43	0.35	0.46	0.48	0.42	0.30	0.51	0.51	0.33	0.25	0.51	0.51	0.03	Ss**, Ls***, SdxLd*, LdxLs***, SsxLs**
v2	15.0	12.4	73.2	79.3	17.0	15.4	84.5	89.1	14.6	11.9	88.3	93.0	13.1	11.1	92.7	94.9	3.32	Sd*, Ld*, Ls***, LdxLs***
E2	0.94	0.92	0.96	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.88	0.85	0.94	0.96	0.94	0.93	0.95	0.94	0.02	Sd***, Ld***, Ls***, SdxLs**, LdxLs*
v3	11.0	10.4	55.1	61.5	12.0	13.2	53.2	59.2	16.6	18.5	68.0	79.2	17.4	20.3	67.3	68.4	3.87	Ld***, Ls***
E3	0.35	0.36	0.61	0.64	0.36	0.41	0.53	0.57	0.16	0.18	0.38	0.42	0.18	0.21	0.38	0.38	0.04	Ld***, Ls***, SdxLs*

^aCs = Control substrate; HSs= High starch substrate; LAs = added linoleic acid substrate; HS+LAs = high starch plus added linoleic acid substrate

^bEffects: Sd = high-starch versus low-starch diets; Ld = diets with sunflower oil versus diets without added oil; Ss = high-starch versus low-starch substrates; Ls = substrates with linoleic acid versus substrates without linoleic acid added.

^cv1 and E1 refer to the rate and efficiency of isomerisation of linoleic acid to conjugated linoleic acid (CLA); v2 and E2 to those of the first reduction of CLA to trans-18:1; v3 and E3 to those of the second reduction of trans-18:1 to 18:0.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Effect of sunflower oil addition to the diet

When donor cows were fed sunflower oil, v1 slightly increased compared to that in flasks incubated from cows that did not receive oil (54 versus 49 mg/L/h; Table 4), but the disappearance of LA significantly decreased from 13 to 8% (Figure 1). The v2 and v3 rates were slightly increased by the addition of sunflower oil to the diet whereas E2 and E3 were slightly decreased (Table 4).

As reported in Table 5, the accumulation of total CLA *in vitro* did not change in response to the addition of oil to the diet except for t9,t11-CLA ($P<0.05$) which slightly increased (Figure 2). The accumulation of total trans-18:1 decreased by 2.7 times (Figure 3) when cows received sunflower oil compared to others.

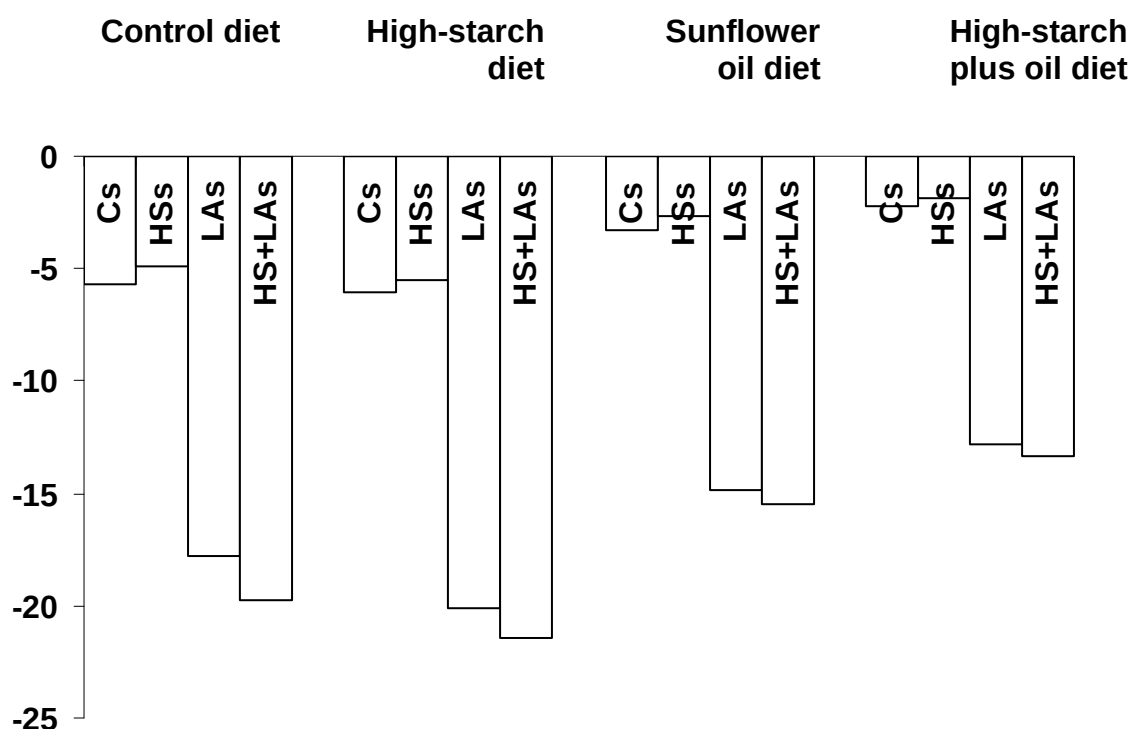


Figure 1 Effect of donor cow diet and *in vitro* substrates on the balance of c9,c12-18:2 (% of total fatty acids) after 5h incubations (Cs = Control substrate; HSs= High starch substrate; LAs = added linoleic acid substrate; HS+LAs = high starch plus added linoleic acid substrate)

Effect of starch addition to the diet

Addition of starch to the diet affected the final pH of *in vitro* cultures (Table 4): pH was lower with rumen content from high-starch diet cows than with rumen content from low-starch diet cows (5.3 versus 5.5). The v1 and v2 slightly increased (Table 4) for high compared to low starch diets ($P<0.05$). The E2 efficiency was also slightly increased (93% versus 95%) but E1 was not affected (Table 4). The third reaction was not affected (Table 4). Addition of starch to the diets of donor cows affected neither the disappearance of LA nor the accumulation of total CLA, and slightly increased the accumulation of total trans-18:1: +2.8% versus +2% when donor cows received low-starch diets (Figure 3). High-starch diets resulted in higher t10,c12-CLA but lower c9,t11-CLA accumulation than low starch diets (Figure 2). Regarding trans-18:1 isomers, the amount of starch in donor cow diets did not affect t10 or t11-18:1 accumulation (Table 5).

Effect of interactions

There were several interactions between the different factors either for the donor cow diets or the *in vitro* substrates. The main interactions were between starch and sunflower oil addition to the diet of cows and between starch or oil addition to the diet of animals on the one hand and LA addition to the incubation substrate on the other.

Increasing dietary starch increased E1 when diets did not contain oil but decreased E1 when they did. LA addition to the substrate more strongly increased E1 when the donor cows received oil (Table 4). As a result of this latter interaction (Ld×Ls), E1 was highest in cultures with added LA incubated with rumen fluid from cows receiving sunflower oil. Starch addition to the substrate interacted with LA addition (Ss×Ls), resulting in lowest E1 values in high starch cultures without added LA (Table 4).

Interactions affected the CLA accumulation, but differently according to the isomers. High starch diets or substrates resulted in a strong decrease of c9,t11-CLA accumulation in incubates with added LA, but had little effect on this balance in cultures without added LA, so that the highest balances were observed in LA-added cultures incubated with the rumen fluid of cows receiving low starch diets (0.3 versus 0.1%; Figure 2). On the other hand, dietary starch level interacted with the addition of sunflower oil to the diet (Sd×Ld) and LA in the substrate (Sd×Ls), increasing the accumulation of t10,c12-CLA only when the cows received sunflower oil or when LA was added to the substrate (Figure 4). This resulted in the highest t10,c12-CLA balances in cultures with rumen fluid from cows receiving high starch diets with oil incubated with added LA.

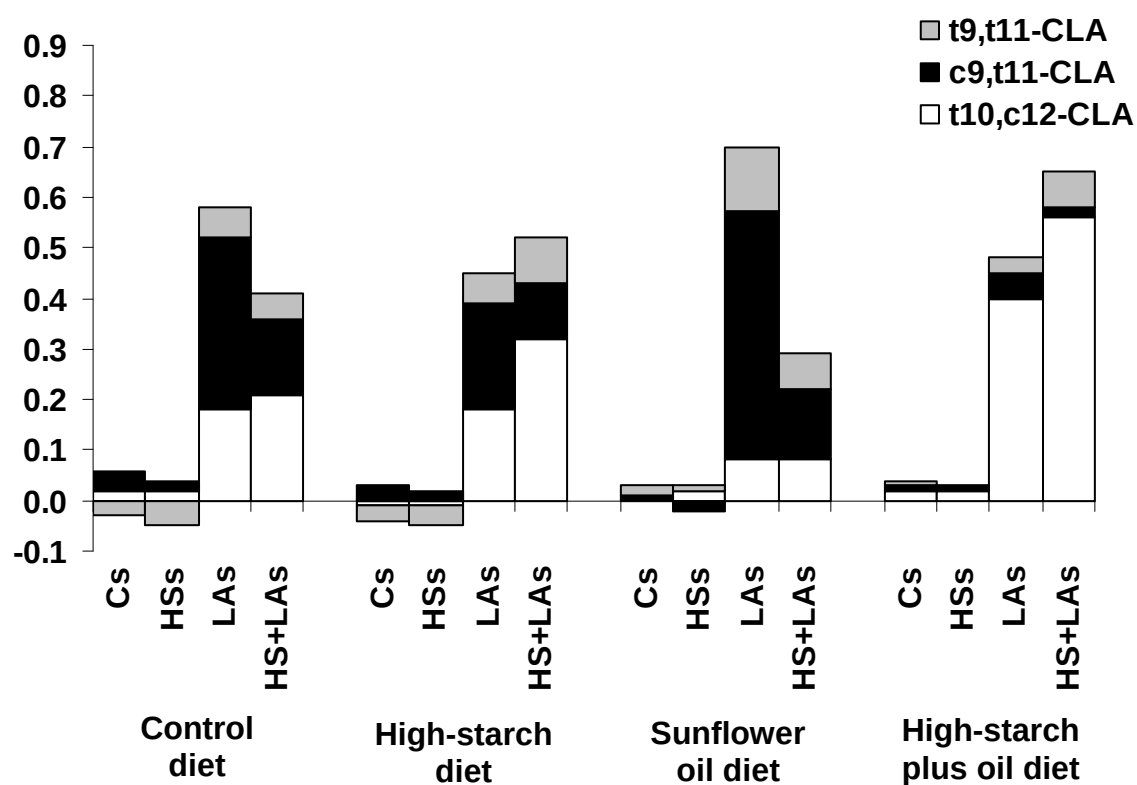


Figure 2 Effect of donor cow diet and in vitro substrates on the balance of CLA isomers (% of total fatty acids) after 5h incubations (Cs = Control substrate; HSs= High starch substrate; LAs = added linoleic acid substrate; HS+LAs = high starch plus added linoleic acid substrate)

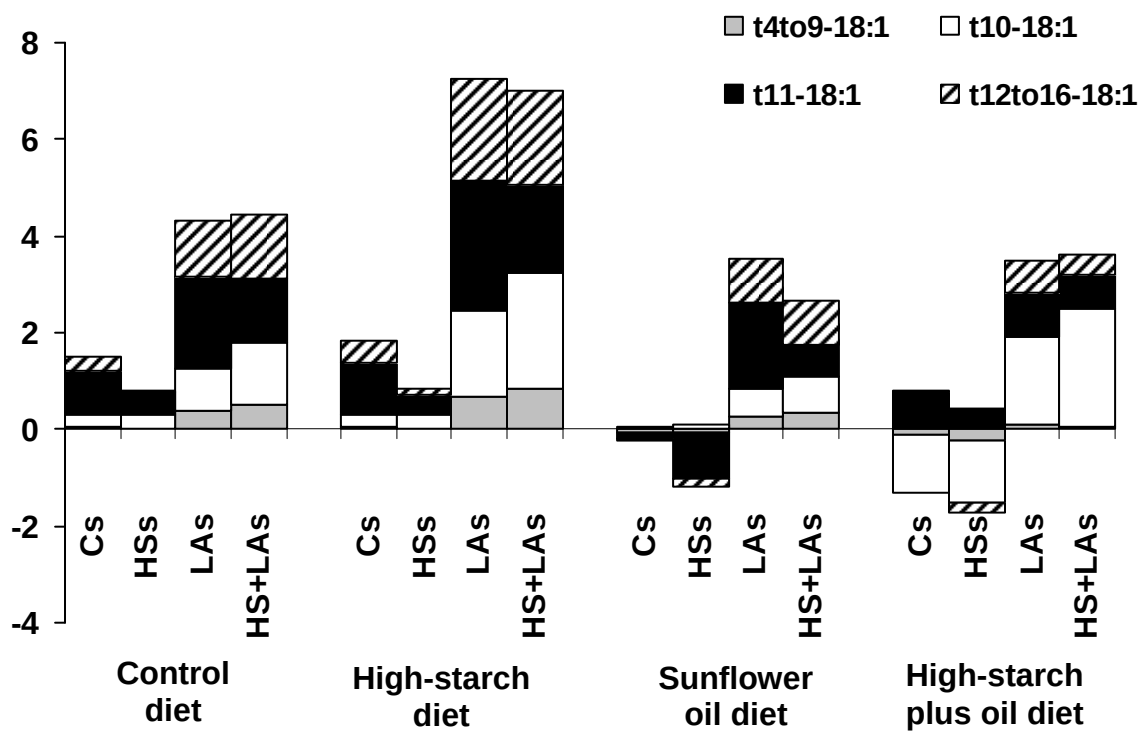


Figure 3 Effect of donor cow diet and in vitro substrates on the balance of trans-18:1 isomers (% of total fatty acids) after 5h incubations (Cs = Control substrate; HSs= High starch substrate; LAs = added linoleic acid substrate; HS+LAs = high starch plus added linoleic acid substrate)

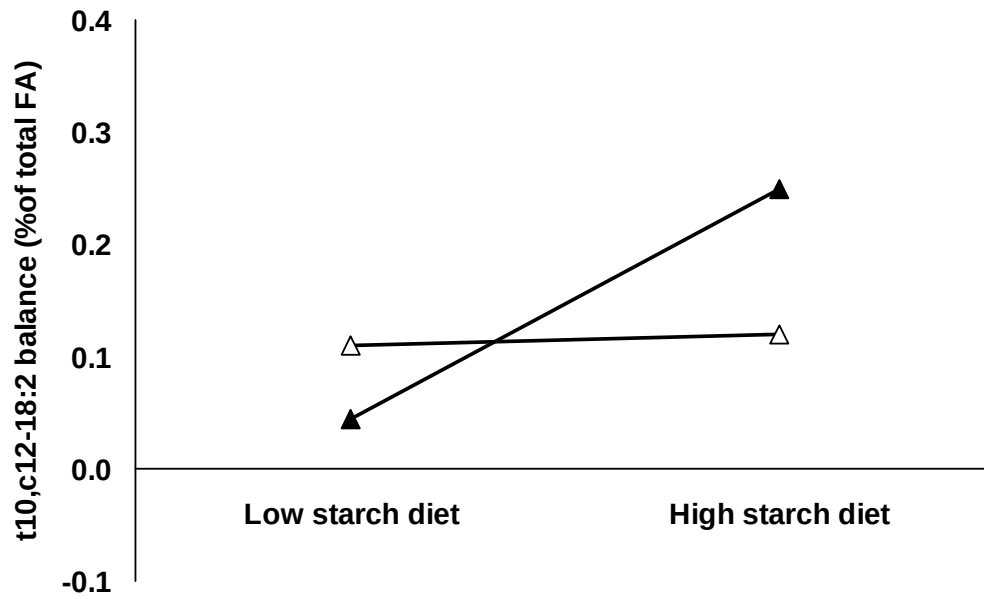


Figure 4A

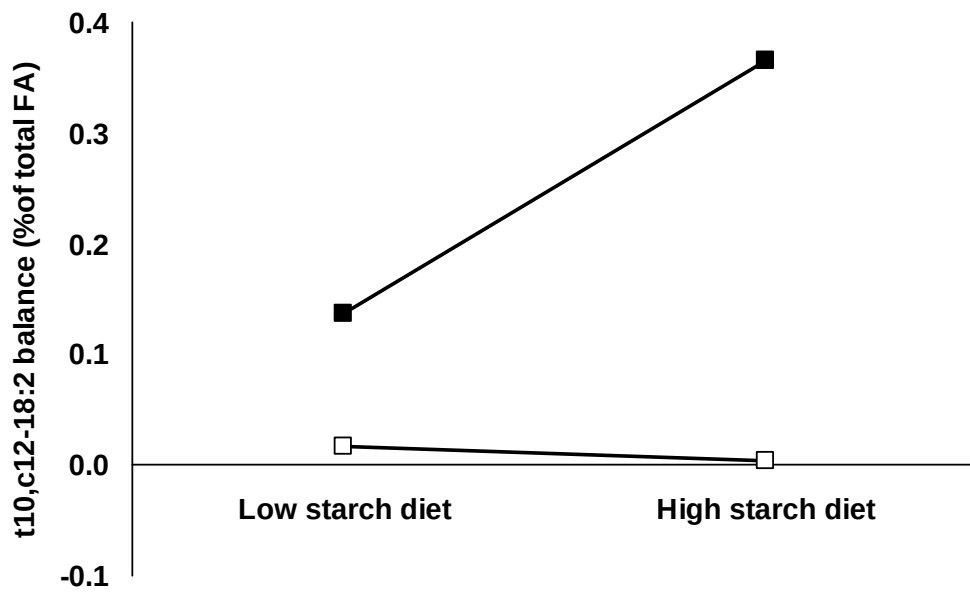


Figure 4B

Figure 4 Effect of the interaction between the amount of starch in the diet and the addition of sunflower oil to the diet (Figure 4A; Δ without SFO; ▲ with SFO) or linoleic acid addition to the substrate (Figure 4B; □ without LA; ■ with LA) on the t10,c12-CLA accumulation (% of total fatty acids)

The increase in v2 when LA was added to the substrate was greater when the diet of donor cows contained sunflower oil compared to diets without oil (Table 4). The same interaction affected E2, which was lowered by low-starch diets only when the culture substrate did not contain added LA (Table 4).

The increase in trans-18:1 balance with addition of dietary starch was observed only when cows received the diets without added oil (Figure 3). This effect was observed on the accumulation of almost all the minor isomers except t13+t14-18:1, but not on t10 and t11-18:1. The second strong interaction for the trans-18:1 balance was noticed between dietary starch level and LA addition in cultures (Sd×Ls; Table 5): high starch diets lowered this balance in cultures without LA but increased it in cultures with LA (Figure 3). Among individual trans-18:1 isomers, this interaction (Sd×Ls) only affected t10-18:1 (Table 5). As a result of these two interactions, total trans-18:1 accumulation was highest in cultures with rumen fluid from cows fed with high starch diets without sunflower oil supplementation incubated with LA added to the substrate (Figure 3). The accumulation of t11-18:1 was not affected by interactions (Table 5).

For the final step, leading to the formation of 18:0, no significant interaction was observed for v3 (Table 4). Dietary starch level interacted with LA addition to the substrate (Sd×Ls) leading to the highest E3 with low starch diets and LA in the substrate (Table 4). The interaction between dietary starch level and incubated LA (Sd×Ls) led to the highest 18:0 production in cultures with rumen fluid from cows fed with high starch diets incubated with LA added to the *in vitro* substrate (Table 5).

Table 5 *Effect of donor cow diet and in vitro substrates on the balances of fatty acids (% of total fatty acids) after 5h incubations*

Effects ^a	Sd	Ld	Ss	Ls	SdxLd	SdxSs	SdxLs	LdxSs	LdxLs	SsxLs	SEM
c9,c12-18:2	NS	***(+)	NS	***(-)	*(+)	NS	NS	NS	*(-)	NS	1.27
Total CLA	NS	NS	NS	***(+)	NS	**(-)	NS	NS	NS	NS	0.08
t10,c12-CLA	***(+)	NS	NS	***(+)	***(+)	NS	***(+)	NS	NS	NS	0.05
c9,t11-CLA	**(-)	NS	**(-)	***(+)	NS	NS	**(-)	NS	NS	**(-)	0.06
t9,t11-CLA	NS	*(+)	NS	***(+)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.02
Total trans-18:1	**(+)	***(-)	NS	***(+)	*(-)	NS	**(+)	NS	NS	NS	0.57
t4-18:1	NS	NS	*(+)	***(+)	**(+)	NS	NS	*(-)	**(+)	NS	0.01
t5-18:1	NS	***(-)	NS	***(+)	***(-)	NS	NS	NS	NS	NS	0.01
t6t7t8-18:1	NS	***(-)	NS	***(+)	***(-)	NS	NS	NS	*(-)	NS	0.05
t9-18:1	NS	***(-)	NS	***(+)	***(-)	NS	NS	NS	**(+)	NS	0.03
t10-18:1	NS	**(-)	NS	***(+)	NS	NS	***(+)	NS	NS	NS	0.35
t11-18:1	NS	***(-)	**(-)	***(+)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.37
t12-18:1	*(-)	***(-)	NS	***(+)	***(-)	NS	NS	NS	**(-)	NS	0.07
t13+t14-18:1	*(+)	NS	NS	***(+)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0.15
t15-18:1	*(+)	***(-)	***(-)	***(+)	*(-)	NS	NS	NS	***(+)	NS	0.03
t16-18:1	NS	***(-)	*(-)	***(+)	***(-)	NS	NS	NS	**(+)	NS	0.03
18:0	NS	*(-)	NS	***(+)	*(-)	NS	*(+)	NS	NS	NS	0.95

^aEffects: Sd = high-starch versus low-starch diets; Ld = diets with sunflower oil versus diets without added oil; Ss = high-starch versus low-starch substrates; Ls = substrates with linoleic acid versus substrates without linoleic acid added.

NS: non-significant $P > 0.05$

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

(+) increase

(-) decrease

Discussion

Fatty acid profile of ruminal fluids from donor cows

The wide range of proportions of trans-10 to trans-11 BH intermediates in the ruminal fluid from cows receiving the four different diets made it possible to investigate the *in vitro* effects of the modulation of ruminal activity by the diet of cows. More specifically, cows receiving the high starch diet supplemented with oil exhibited a trans-10 shift, suggesting a different equilibrium between biohydrogenating bacteria. However, samples were taken just before the morning meal, i.e. 15 hours after the evening meal, which could fail to reveal all the possible effects of the experimental diets, so that we will not further discuss the compositions of ruminal fluids in the present paper.

Rates and efficiencies of biohydrogenation reactions

The addition of LA to the substrate increased v_1 and E1, leading to increases in LA disappearance and total CLA accumulation. Troegeler-Meynadier *et al.* (2003) showed that increasing LA concentrations (from 100 to 300 mg of LA in 160 ml flasks, carried by soybean oil), decreased the LA BH efficiency but increased the amount of LA that disappeared suggesting a limit of the capacity of isomerisation rather than an inhibition. In our case, 90 mg of LA were added to 120 ml cultures as free FA. This relatively small amount of LA could explain why no saturation of the isomerisation was observed; moreover no lipolysis was necessary before BH since pure LA was directly available for the enzyme.

Dietary starch level did not affect E1 and the lowest E1 (0.25) was observed in the cultures with high starch substrate without LA addition and when the rumen fluids were collected from cows fed with high starch plus sunflower oil. Table 4 shows that the lowest final pH (5.17) corresponded to this lowest E1. A linear relationship between these two parameters suggested that the E1 variations could be partly due to pH ($r=0.44$; $P<0.01$). Van Nevel and Demeyer (1996), using an esterified source of FA, showed that the disappearance of LA liberated, by lipolysis, was 80% when the pH was 5.5 but decreased to 60% at pH=5.2.

Addition of LA to the substrate increased v_2 and significantly increased E2 but only by 3%, suggesting that the increase in v_2 could simply be the result of the rapid isomerisation due to the availability of the substrate, as LA was in the unesterified form in our experiment. The addition of LA to the substrate increased v_3 and E3, leading to a greater accumulation of 18:0. It has already been reported that concentrations of LA exceeding 1.0 mg/ml of culture contents interfere with the second reduction, leading to the accumulation of trans-18:1 at the expense of 18:0 (Harfoot *et al.*, 1973). In our case, the amount of LA added to the substrate

was 0.75 mg/ml so that no reduction of v3 was expected. The addition of sunflower oil to the diet of cows led to an increase of v3 as for v1 and v2, but to a decrease of E3. The v3 rate was increased by dietary oil because more trans-18:1 FA, which are the substrates of this reduction were produced by the previous reactions. Nevertheless, this reaction was less efficient which suggests a saturation of the second reduction.

Isomeric profile of CLA and trans-18:1

The accumulation of c9,t11-CLA was decreased when the starch level increased in the diet or the substrate. The accumulation of t11-18:1 was only significantly affected by starch in the substrate, but high dietary starch level also tended ($P=0.063$) to decrease this accumulation. Indeed, it is well established that t11-18:1 is an intermediate of LA metabolism by isolates of *Butyrivibrio fibrisolvens* (Wallace *et al.*, 2007) and feeding high-grain diets to steers has been shown to cause a rapid decline of this bacteria (Klieve *et al.*, 2003). In our experiment, its growth and/or its activity could have decreased when the media was rich in starch. Moreover, when starch was added to the diet or the substrate, the pH was lowered. Although this precludes any definitive separation between the effects of starch and pH, an effect of pH is consistent with the observations of Troegeler-Meynadier *et al.* (2003), and might be related to a decrease in the activity of Δ^{12} -isomerases produced by *Butyrivibrio fibrisolvens*, whose optimal pH is 7.0-7.2 (Kepler and Tove, 1967). Consequently, to boost the Δ^{12} -isomerisation, a preliminary selection of a trans-11 BH microflora by a low-starch diet is necessary, and addition of LA in the culture, both acting as a BH substrate and increasing E1, optimises the trans-11 isomers balance.

The t10,c12-CLA is formed during LA BH and is usually at low concentrations in digesta and milk of cows (Offer *et al.*, 2001; Shingfield *et al.*, 2003). It can accumulate under certain dietary conditions, such as diets based on maize silage containing high starch content and supplemented with oil (Loor *et al.*, 2004, Pottier *et al.*, 2006). Our results showed a significant positive effect of dietary starch level on t10,c12-CLA accumulation *in vitro*. Similarly, in the experiment of Piperova *et al.* (2002), increasing the level of concentrate in the diet increased t10,c12 CLA in the duodenum. Few bacterial species such as *Propionibacterium acnes* (Verhulst *et al.*, 1987; Devillard *et al.*, 2006) and/or *Megasphaera elsdenii* (Kim *et al.*, 2002) are known to synthesise t10,c12-CLA from LA, but the involvement of other bacteria is possible. The more probable hypothesis for explaining our observed increase of t10,c12-CLA when the dietary starch level was increased is a selection

by the fermentative substrate and/or by a low ruminal pH, inducing a better growth and/or activity of bacteria producing trans-10 isomers, or a change of BH pathway from trans-11 to trans-10 isomers without change of biohydrogenating bacteria.

In cultures with added LA, the decrease in c9,t11-CLA balance caused by a high starch level in the substrate was compensated by an increased t10,c12-CLA balance, so E1 was not affected, and similarly the decreased t11-18:1 balance was compensated by an increased t10-18:1 balance. These compensatory mechanisms with high LA substrates could be due to the toxicity of unsaturated FA for rumen bacteria (Maia *et al.*, 2010), the ecosystem having to maintain its ability to BH even when the isomerisation through the trans-11 pathway is inhibited. This adaptation of the ecosystem was also probably encountered in the rumen of cows receiving the high starch plus oil diet, since incubation of their ruminal fluids resulted in the highest t10,c12-CLA accumulation *in vitro* (Figures 2 and 4A) and the highest E1 (0.51) with LA addition. This diet also resulted in a high accumulation of trans-10 isomers in cultures with LA when a low starch substrate was used, which means that the bacteria involved in trans-10 BH remained active, at least for a few hours, in a low starch medium. On the contrary, without LA in the substrate, addition of starch to the substrate decreased, either directly or via a lowered pH, the accumulation of c9,t11-CLA but only slightly increased that of t10,c12-CLA, resulting in a decreased E1 and suggesting that the low amount of unsaturated FA did not imply a compensation of the low trans-11 BH. Consequently, to boost the $\Delta 9$ -isomerisation, a preliminary selection of a trans-10 BH microbiota by high starch plus sunflower oil diet was necessary with an addition of LA in the cultures as a substrate.

Conclusion

The shift from trans-11 to trans-10 FA after 5 hours of *in vitro* incubation was related to both the diet of donor cow and the *in vitro* substrates. An increase in trans-10 isomers balance was not observed when the culture substrates did not contain added LA. High starch diets resulted in an increase of trans-10 isomers balance *in vitro*. This increase was most important with high starch plus sunflower oil diet, which also resulted in a drastic decrease of trans-11 isomers balance. This situation shows that the addition of an unsaturated oil to the diet caused an adaptation of the microorganisms in the rumen of cows in order to increase the ability of BH, by an increase in the number of competent bacteria and/or their activity. This adaptation resulted in an increase in trans-10 BH when conditions altered the efficiency of trans-11 BH.

Further investigations on the microbial ecosystem with high starch diets supplemented with unsaturated oil are necessary to understand the microbial modifications affecting the isomeric profile of BH intermediates.

Acknowledgements

The authors thank M.L. Chemit and the staff at the experimental station (UMR 1289 Tandem).

References

- Association of Official Analytical Chemists 1998. Animal Feed. Official methods of analysis, 1 vol., 16th edition, Chap. 4, pp. 1-45. AOAC, Gaithersburg, MA, USA.
- Benjamin S and Spener F 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition and Metabolism* 18, 6–36.
- Bhattacharyaa A, Banua J, Rahmana M, Causeyb J and Fernandes G 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 789–810.
- Brouwer IA, Wanders AJ and Katan MB 2010. Effect of animal and industrial trans fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans - A quantitative review. *PLoS One* 5, e9434.
- Devillard E, McIntosh FM, Newbold CJ and Wallace RJ 2006. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *British Journal of Nutrition* 96, 697–704.
- Enjalbert F and Troegeler-Meynadier A 2009. Biosynthesis of trans fatty acids in ruminants. In *Trans fatty acids in human nutrition* (eds Destailats F, Sébédio JL, Dionisi F and Chardigny JM), pp. 1–31. The Oily Press, Bridgwater, UK.
- Griinari JM, Dwyer DA, McGuire MA, Bauman DE, Palmquist DL and Nurmela KVV 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81, 1251–1261.
- Harfoot CG, Noble RC and Moore JH 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 24, 961–970.

Ip MM, McGee SO, Masso-Welch PA, Ip C, Meng X, Ou L and Shoemaker SF 2007. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis* 28, 1269-1276.

Kepler CR and Tove SB 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of a linoleate delta-12-cis, delta-11-trans-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry* 242, 5686-5692.

Kim YJ, Liu RH, Rychlik JL and Russell JB 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology* 92, 976-982.

Klieve AV, Hennessy D, Ouwerkerk D, Forster RJ, Mackie RI and Attwood GT 2003. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology* 95, 621-630.

Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y and Doreau M 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans-fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 2472-2485.

Maia MR, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, Graham IA and Wallace RJ 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology* 18, 10-52.

Offer NW, Marsden M and Phipps RH 2001. Effect of oil supplementation of a diet containing a high concentration of starch on levels of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in bovine milk. *Animal Science* 73, 533-540.

Park PW and Goins RE 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* 59, 1262-1266.

Pipero LS, Sampugna L, Teter BB, Kalscheur KF, Yurawecz MP, Ku Y, Morehouse KM and Erdman RA 2002. Duodenal and milk trans octadecanoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 132, 1235-1241.

Pottier J, Focant M, Debier C, De Buysser G, Goffe C, Mignolet E, Froidmont E and Larondelle Y 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy Science* 89, 685-692.

Roy A, Ferlay A, Shingfield KJ and Chilliard Y 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with

particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science* 82, 479–492.

Shingfield KJ, Ahvenjärvi S, Toivonen V, Ärölä A, Nurmela KVV, Huhtanen P and Griinari JM 2003. Effect of fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science* 77, 165–179.

Shingfield KJ, Reynolds CK, Hervas G, Griinari JM, Grandison AS and Beever DE 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 714–732.

Shingfield KJ and Griinari JM 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 799–816.

Tardy AL, Morio B and Chardigny JM 2011. Ruminant and industrial sources of trans-fat and cardiovascular and diabetic diseases. *Nutrition Research Reviews* In press.

Troegeler-Meynadier A, Nicot MC, Bayourthe C, Moncoulon R and Enjalbert F 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 86, 4054–4063.

Troegeler-Meynadier A, Bret-Bennis L and Enjalbert F 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development* 46, 713–724.

Van Nevel CJ and Demeyer DI 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean rumen contents *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development* 36, 53–63.

Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583–3597.

Verhulst A, Janssen G, Parmentier G and Eyssen H 1987. Isomerization of polyunsaturated long chain fatty acids by *Propionibacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* 9, 12–15.

Wallace RJ, McKain N, Shingfield KJ and Devillard E 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research* 48, 2247–2254.

ARTICLE 3

L'addition d'amidon et d'huile dans la ration des vaches donneuses, ainsi que l'addition d'amidon dans le substrat ne modifient pas de la même manière la biohydrogénation *in vitro* de l'acide linoléique et celle de l'acide linolénique (accepté, « *Journal of Dairy Science* »)

Lors de la biohydrogénation (BH), une déviation de la voie t11 à la voie t10 peut se produire dans le rumen de vaches recevant des régimes riches en concentrés, surtout lorsqu'ils sont supplémentés avec une source de matière grasse insaturée, comme les graines oléagineuses, contenant de l'acide linoléique (LeA) et/ou de l'acide linolénique (LnA). Jusqu'à présent, l'existence de deux voies (t10 ou t11) de BH pour LeA dans le rumen a clairement été établie. En revanche, la production d'isomères t10 lors de la BH de LeA est moins bien connue. Pour rappel, elles recevaient une ration témoin, une ration enrichie en amidon, une ration additionnée d'huile de tournesol ou une ration enrichie en amidon et en huile de tournesol. Le contenu ruminal de chaque vache a été incubé pendant cinq heures avec quatre substrats, en combinant deux niveaux d'amidon et soit du LeA soit du LnA. Ces incubations ont été réalisées, à chaque période expérimentale de l'essai *in vivo*. L'analyse des profils SSCP des cultures ruminales a montré que les rations enrichies en amidon avaient une faible diversité de la communauté bactérienne et que les rations enrichies en amidon et en huile de tournesol avaient une structure altérée. L'addition d'amidon seul dans la ration n'a pas eu beaucoup d'effet sur la BH, excepté une diminution de l'efficacité de l'hydrogénation du t11,c15-C18:2 et des t-C18:1. L'addition d'huile de tournesol dans la ration a augmenté l'efficacité de l'isomérisation du LeA mais a diminué celle de l'hydrogénation des t-C18:1. Une interaction entre l'addition d'amidon et celle d'huile de tournesol dans la ration des vaches donneuses a nettement augmenté la production d'isomères t10. Dans les incubations avec le LeA, les acides gras t10 étaient significativement corrélés à la structure de la communauté bactérienne. De même, une interaction entre l'addition d'amidon dans la ration et la nature de l'acide gras présent dans le substrat fermentaire a été observée : une production de t10 n'a été notée qu'avec LeA, alors que le LnA était principalement biohydrogéné en acides gras t11 quelle que soit la ration de la vache donneuse. Cependant, il n'y a pas eu de différences entre les communautés bactériennes des incubations avec LeA et celles avec LnA.

Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids

A. Zened,*† A. Troegeler-Meynadier,*† M.C. Nicot,*†, S. Combes,* L. Cauquil,* Y. Farizon,*† and F. Enjalbert*†¹

Journal of Dairy Science 2011. 94(11) : 5634-5645. doi: 10.3168/jds.2011-4491

* INRA, UMR1289, Tandem, F-31326 Castanet-Tolosan, France

† Université de Toulouse, INP, ENSAT, ENVT, UMR1289 Tandem, F-31076 Toulouse, France

¹Corresponding author: Francis Enjalbert

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

Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids, by Zened et al. The intermediates of ruminal metabolism of polyunsaturated fatty acids can affect both cow milk production and human consumer's health, especially *trans*-10 isomers exhibiting some negative effects. This study outlined that the *trans*-10 shift of linoleic acid biohydrogenation due to a high starch plus sunflower oil diet is associated with changes of bacterial community, and demonstrated that microbiota of cows exhibiting a *trans*-10 shift does not result in *trans*-10 isomers formation when incubated with linolenic acid.

Running head: BIOHYDROGENATION OF LINOLEIC AND LINOLENIC ACIDS

ABSTRACT

Trans isomers of fatty acids exhibit different health properties. Among them, *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid has negative effects on milk fat production and can affect human health. A shift from the *trans*-11 to the *trans*-10 pathway of biohydrogenation (BH) can occur in the rumen of dairy cows receiving high concentrate diets, especially when the diet is supplemented with highly unsaturated fat sources. The differences of BH patterns between linoleic acid (LeA) and linolenic acid (LnA) in such ruminal conditions remain unknown, thus, the aim of this work was to investigate in vitro the effects of starch and sunflower oil in the diet of the donor cows and starch level in the incubates, on the BH patterns and efficiencies of LeA and LnA. The design was a 4 × 4 Latin square design with four cows, four periods, and four diets with combinations of 21 or 34% starch and 0 or 5% sunflower oil. The rumen content of each cow during each period was incubated with four substrates, combining two starch levels and either LeA or LnA addition. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism of incubates showed that dietary starch reduced the diversity of the bacterial community and high starch plus oil diet modified its structure. High starch diets poorly affected isomerization and first reduction of LeA and LnA, but decreased the efficiencies of *trans*-11,*cis*-15-C18:2 and *trans* C18:1 reduction. Dietary sunflower oil increased the efficiency of LeA isomerization but decreased the efficiency of *trans* C18:1 reduction. An interaction between dietary starch and dietary oil resulted in the highest *trans*-10 isomers production in incubates when the donor cow received the high starch plus oil diet. The partition between *trans*-10 and *trans*-11 isomers was also affected by an interaction between starch level and the fatty acid added to the incubates, showing that the *trans*-10 shift only occurred with LeA, whereas LnA was mainly hydrogenated via the more usual *trans*-11 pathway whatever the starch level in the substrate, although the bacterial communities were not different between LeA and LnA incubates. In LeA incubates, *trans*-10 isomers production significantly related with the structure of the bacterial community.

Keywords: Rumen biohydrogenation, linoleic acid, linolenic acid, *trans*-10 shift

INTRODUCTION

Ruminal biohydrogenation (**BH**) intermediates of polyunsaturated fatty acids (**FA**) have important but contrasting effects on both dairy cows and human consumers. Among conjugated linoleic acids (**CLA**), *trans*-10,*cis*-12-CLA has strong negative effects on milk fat production by dairy cows (Baumgard et al., 2001) and can have adverse effects on human health (Tricon et al., 2004; Ip et al., 2007), but is usually present at very low concentrations in milk fat. On the contrary, *cis*-9,*trans*-11-CLA has positive effects on human health (Tricon et al., 2004; Ip et al., 2007). Milk *cis*-9,*trans*-11-CLA, which is usually the predominant CLA isomer, mainly originates from a mammary desaturation of *trans*-11-C18:1 (Grinari et al., 2000), another intermediate of polyunsaturated FA BH.

The most abundant BH intermediates in the rumen and in ruminant products are *trans*-11 isomers, but a shift from the *trans*-11 to the *trans*-10 pathway of BH can occur, with high concentrate diets supplemented either with high linoleic acid (**LeA**; Roy et al., 2006) or high α -linolenic acid (**LnA**; Looor et al., 2004; Pottier et al., 2006) fat sources. This shift is, at least in part, linked to the low pH observed with high concentrate diets (Piperoova et al., 2002; Troegeler-Meynadier et al., 2003). The BH pathway leading to *trans*-10 isomers has been well described with LeA, but *trans*-10 isomers production during LnA BH has not yet been demonstrated. Besides, the *trans*-10 shift of BH pathway due to a high starch diet is associated to a lowered milk fat content, and recent studies indicate specific changes of ruminal microbiota in cows exhibiting this milk fat depression (Weimer et al., 2010). Moreover, dietary polyunsaturated FA also affect ruminal microbiota, reducing the amount of some fibrolytic bacteria, including *Butyrivibrio fibrisolvens*, the main ruminal biohydrogenating bacterium, and the negative effects of linseed oil are more important than those of sunflower oil, suggesting that LnA is more inhibiting than LeA (Yang et al., 2009).

Relative effects of ruminal microbiota, dietary starch level and fermentation substrates in this *trans*-10 shift when diets are enriched with both concentrate and polyunsaturated FA have not been clearly separated. Moreover, the differences of BH patterns between LeA and LnA in a ruminal milieu inducing this *trans*-10 shift have not been elucidated. The aim of this study was to investigate this shift in vitro, using donor cows receiving different combinations of dietary starch level and oil addition, including a high starch plus oil diet intended to result in an *trans*-10 shift, and culture substrates with different starch levels and either LeA or LnA as a BH substrate.

MATERIALS AND METHODS

In vitro cultures

Four dry Holstein cows (average BW 650 kg at the beginning of the experiment) equipped with a ruminal canula and housed in individual stalls were assigned to a 4 × 4 Latin square design, with four diets and four periods. The four diets were based on corn silage and contained soybean meal and a mineral mixture: a low starch diet (21.5% starch and 39.7% NDF, DM basis) containing alfalfa hay, a high starch diet (34.8% starch and 30.9% NDF) containing 49% of a wheat/barley mixture, a oil diet (19.8% starch and 37.3% NDF) containing alfalfa hay and 5% sunflower oil, and a high starch plus oil diet (33.1% starch and 28.6% NDF) contained 49 % wheat/barley and 5% sunflower oil. Cows received 12.5 kg of DM daily, in two equal meals at 08:00 and 17:00. Water was available *ad libitum*. The experimental periods lasted 28 days. The cows received the control diet during the first 2 weeks of each period and one of the four experimental diets during the two last weeks.

Four incubation substrates were used: low starch with LeA, high starch with LeA, low starch with LnA and high starch with LnA (Table 1). Since our objective was to study the BH pathways of LeA and LnA, we used free fatty acids, not triglycerides, in order to avoid BH being affected by lipolysis.

Table 1. Ingredients and chemical composition of incubation substrates

Incubation substrate ¹	LSLeA	HSLeA	LSLnA	HSLnA
Ingredients, g DM per flask				
Corn leaves and stems	1.07	0.55	1.07	0.55
Corn grain	0.68	0.34	0.68	0.34
Alfalfa hay	0.39	0.00	0.39	0.00
Wheat	0.00	1.31	0.00	1.31
Soybean meal	0.44	0.35	0.44	0.35
99% pure free LeA ^{2,3}	0.09	0.09	0.00	0.00
99% pure free LnA ^{2,3}	0.00	0.00	0.09	0.09
Composition, % of DM				
NDF	37.8	26.5	37.8	26.5
Starch	18.3	40.9	18.3	40.9
C18:0	0.04	0.03	0.04	0.03
cis-9-C18:1	0.22	0.20	0.22	0.20
LeA	3.96	4.11	0.62	0.73
LnA	0.05	0.10	3.39	3.48

¹LSLeA = low starch + free LeA; HSLeA = high starch + free LeA; LSLnA = low starch + free LnA; HSLnA = high starch + free LnA

²LeA = linoleic acid; LnA = α -linolenic acid

³Sigma Co., St. Louis, MO

In vitro incubations were performed on day 28. Ruminal fluid was taken from the four cows before the morning meal, strained through a metal sieve (1.6-mm mesh) and transferred quickly to the laboratory in anaerobic conditions at 39°C. One hundred ml of each sample of ruminal juice was stored at -18°C for subsequent analysis. A bicarbonate buffer solution (19.5 g/L of Na₂HPO₄·12H₂O, 9.24 g/L of NaHCO₃, 0.705 g/L of NaCl, 0.675 g/L of KCl, 0.108 g/L of CaCl₂·2H₂O, and 0.180 g/L of MgSO₄·7H₂O) was prewarmed at 39°C, saturated with CO₂, and acidified to a 6.0 pH with 6N hydrochloric acid. The ruminal fluid from each cow was incubated with the four substrates, resulting in 16 incubation flasks that contained the substrate, 60 mL of ruminal fluid and 60 ml of buffer solution. The flasks were filled with CO₂ and placed in a water bath rotary shaker (Aquatron, Infors AG, Bottmingen, Germany) at 39°C. Flasks were then closed with a rubber cap with a plastic tube leading into the water to vent fermentation gas without allowing the ingress of oxygen. Flasks were stirred at 130 rpm and kept safe from the light. After 5h of incubation, flasks were placed into ice water to stop fermentations and the pH was measured. The contents of the flasks were then immediately frozen. Samples were freeze-dried (Virtis Freezemobile 25, Virtis, Gardiner, NY), weighed, ground and homogenized in a ball mill (Dangoumau, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France), and kept at -18°C for later analysis.

Fatty acids analysis

Substrates and non incubated and incubated ruminal fluids were analyzed for FA contents and profiles. The FA were extracted and methylated using the procedure of Park and Goins (1994), except that the solution of 14% boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanolacetylchloride (10:1 v/v). Nonadecanoic acid (Sigma Co., St. Louis, MO) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg.

Fatty acid methyl esters were quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, equipped with a model 7683 auto injector, Network GC System, Palo Alto, CA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm ID, 0.20 µm film thickness; CPSil88, Varian, Middelburg, the Netherlands). For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 260°C and the injector at 255°C; the split ratio was 1:50. Hydrogen was used as the carrier gas with a constant flow of 1mL/min. The samples were injected in 1 µL of hexane. The initial temperature of the oven was 60°C, which was held for 2 min; it was then increased by 8°C/min to 150°C, held at 150°C for 12 min, increased by 2°C/min to 175°C, held at 175°C for 20 min, increased by 5°C/min to 225°C, held at 225°C for 10 min and finally increased by 10°C/min to 240°C and maintained at 240°C for 10 min. A second analysis was used to

separate LnA from C20:1 and *trans*-13+*trans*-14-C18:1 from *cis*-9-C18:1 with the same temperature of injector and detector than in the first analysis. The split ratio was 1:75 and hydrogen was the carrier gas with a constant pressure of 150 kPa. The samples were injected in 1 µL of hexane. The initial oven temperature was 60°C, which was held for 3 min; it was then increased by 8°C/min to 190°C, held at 190°C for 13 min, increased by 5°C/min to 225°C, held at 225°C for 10 min, increased by 10°C/min to a final temperature of 230°C, and maintained there for 10 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St. Louis, MO) except C18:1 FA other than *trans*-9-C18:1, *trans*-11-C18:1 and *cis*-9-C18:1 which were identified by order of elution. The major peak of conjugated linolenic acid (CLnA) was identified by order of elution (Akraim et al., 2007). Additionally, using a standard mixture of conjugated linolenic acid isomers (*cis*-9, *trans*-11,*cis*-15 and *cis*-9, *trans*-13,*cis*-15), kindly provided by P. Y. Chouinard, Université Laval, Québec, Canada, the gas chromatography method adapted to the separation of these two isomers (Gervais and Chouinard, 2008) could not detect the *cis*-9, *trans*-13,*cis*-15 isomer in our samples, so that **CLnA** will refer to *cis*-9, *trans*-11,*cis*-15 CLnA in this paper.

Bacterial community analysis

Total DNA was extracted and purified with QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd., West Sussex, UK) from approximately 0.2 g of sample with a previous bead-beating step in a FastPrep Instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France). Extraction of DNA, PCR reactions, and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (**CE-SSCP**) procedures were based on the procedure described by Privé et al. (2010). The temperature program of PCR reaction was different and consisted of 2 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 15 s at 61°C, and 15 s at 72°C; and a final extension of 7 min at 72°C.

The CE-SSCP data processing was computed with StatFingerprints software (Michelland et al., 2009), and CE-SSCP profiles were aligned using pairwise alignment of their internal standard with the same reference internal standard.

Calculations

The initial FA composition of each flask was calculated by adding the FA from ruminal fluids to the FA carried out by the substrates. All *trans* C18:1 isomers were summed to calculate *trans* C18:1, but only CLA isomers clearly known to be intermediates of LeA BH, i.e. *trans*-10,*cis*-12, *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-9,*trans*-11-CLA were summed to calculate total CLA. The

balances (negative value for disappearances and positive values for productions) were calculated for each FA as the difference between final and initial percentages.

The calculations of the LeA and LnA isomerization efficiencies (**ELeA** and **ELnA**, respectively) and the calculations of the CLA, CLnA, *trans*-11,*cis*-15-C18:2, and total *trans* C18:1 reduction efficiencies (**ECLA**, **ECLnA**, **Et11c15** and **Et18:1**, respectively) were adapted from Troegeler-Meynadier et al. (2006).

For ruminal LeA biohydrogenation:

$$\text{ELeA} = \text{LeAb} / \text{LeAi},$$

$$\text{ECLA} = (\text{LeAb} + \text{CLAb}) / (\text{LeAb} + \text{CLAi})$$

And for ruminal LnA biohydrogenation:

$$\text{ELnA} = \text{LnAb} / \text{LnAi},$$

$$\text{ECLnA} = (\text{LnAb} + \text{CLnAb}) / (\text{LnAb} + \text{CLnAi})$$

$$\text{Et11c15} = (\text{LnAb} + \text{CLnAb} + \text{t11c15b}) / (\text{LnAb} + \text{CLnAb} + \text{t11c15i})$$

where the b suffix refers to the difference between initial and final proportions and the i suffix refers to the initial proportions of each FA; CLA and t11c15 represent total CLA and *trans*-11,*cis*-15-C18:2, respectively.

The efficiency of the subsequent reduction, which is the same for the LeA and LnA BH, was calculated as:

$$\text{Et18:1} = (\text{LeAb} + \text{CLAb} + \text{LnAb} + \text{CLnAb} + \text{t11c15b} + \text{t18:1b}) / (\text{LeAb} + \text{CLAb} + \text{LnAb} + \text{CLnAb} + \text{t11c15b} + \text{t18:1i})$$

where t18:1 represents total *trans* C18:1.

To study the diversity of bacterial communities, the Simpson diversity index was calculated using the StatFingerprints software (Michelland et al., 2009) as:

$$\text{Simpson index} = -\log \sum a_i^2, \text{ where } a_i \text{ corresponds to the relative abundance of each peak (i)}$$

It is considered as a dominance index because it weights towards the abundance of the major species. The relative CE-SSCP sub-peak background area focuses on minor species and was calculated according to Loisel et al. (2006).

Statistical analysis

The fatty acid profiles in the rumen fluids were analyzed by ANOVA, using the General Linear Model of SYSTAT (version 9, SPSS Inc., Chicago, IL), according to the following model:

$Y = \mu + C + P + Sd + Od + Sd \times Od + \varepsilon$, where Y is the dependent variable, μ is the mean, C, P, Sd and Od are the effects of cow, period, dietary starch level and sunflower oil addition, respectively and ε the residual error.

Fatty acid production or disappearance, efficiencies of BH reactions, Simpson index and CE-SSCP background area were analyzed according to the following model:

$Y = \mu + C + P + Sd + Od + Ss + FAs + Sd \times Od + Sd \times Ss + Sd \times FAs + Od \times Ss + Od \times FAs + Ss \times FAs + \varepsilon$, where Ss and FAs are the effects of starch level and FA source (LnA vs LeA) in the in vitro substrates, respectively.

Because the initial amounts and balances of LnA, CLnA and *trans*-11,*cis*-15-C18:2 were very low in cultures with added LeA, the statistical analysis of these balances, ELnA, ECLnA and Et11c15 were only computed on data from LnA enriched cultures, using the model:

$Y = \mu + C + P + Sd + Od + Ss + Sd \times Od + Sd \times Ss + Od \times Ss + \varepsilon$.

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

The structures of the bacterial communities were analyzed using the StatFingerprints software (Michelland et al., 2009). We compared the communities using the pairwise Euclidean distances of the CE-SSCP profiles. To explore this distance matrix, nonmetric multidimensional scaling (**nMDS**) was carried out. Pairwise analyses of similarities (**ANOSIM**) were performed on the distance matrix to test the effect of factors and their interactions. The test is based on the comparison of distances between groups corresponding to factors levels with distances within groups to produce the ANOSIM statistic R. The ANOSIM R value indicates the degree of similarity between the groups ($R > 0.75$: well separated groups; $0.50 < R < 0.75$: separated but overlapping groups; $0.25 < R < 0.50$: separated but strongly overlapping group). We only considered effects of factors resulting in an ANOSIM $R > 0.25$.

Additionally, we studied the relationship between some FA balances affected by dietary or incubation conditions and bacterial community. Correlation between the CE-SSCP profiles and FA were tested using redundancy analysis with 10,000 Monte Carlo permutations (Legendre and Legendre, 1998), and Pearson correlation coefficients between Simpson index and CE-SSCP background area and FA balances were calculated.

RESULTS AND DISCUSSION

Fatty acids profile of ruminal fluid from donor cows

As expected, adding oil to the diets of donor cows increased the amount of total FA in the incubates (Table 2). Stearic acid was the major FA whatever the diet of dairy cows, but with a higher percentage when diets contained added oil than without dietary oil. Oil addition increased the proportions of total *trans* C18:1 but lowered the percentages of polyunsaturated FA. Actually, ruminal fluids were taken before the morning meal, i.e., 15h after the previous meal, so that most added unsaturated FA from added oil had been at least isomerized, whereas BH was less complete when diets did not contain added oil, since unsaturated FA of vegetal cells were not as available for BH as FA of added oil. Increasing dietary starch level strongly decreased *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-11-C18:1 proportions, especially in the high starch plus oil diet. On the contrary, this diet resulted in the highest *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-10-C18:1 balances, due to a tendency toward an interaction between starch and oil additions ($P = 0.079$ and $P = 0.067$ for *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-10-C18:1, respectively), and the lowest *cis*-9,*trans*-11-CLA and *trans*-11-C18:1 balances. This demonstrates that this combination efficiently resulted in a *trans*-10 shift.

However, because samples were taken a long time after the meal, the variations of FA composition could fail to accurately reflect the ruminal effects of the diets, so that we will not further discuss these results.

Structure and diversity of the bacterial community

Increasing dietary starch decreased the Simpson diversity index and the relative CE-SSCP sub-peak background area from 7.6 to 6.6 and from 0.91 to 0.85, respectively, indicating less numerous but more abundant major bacterial species. Dietary oil, starch level in the incubates, incubated FA and interactions had no significant effect on Simpson diversity index and the relative sub-peak background area.

The nMDS plot (Figure 1) of the CE-SSCP profiles of the 5h in vitro incubations showed that the structure of bacterial communities differed between the high starch plus oil diet and the three other combinations (ANOSIM $R = 0.43$, $P < 0.01$). Starch level in the diets or the incubates, dietary oil, replacement of LeA with LnA and the other interactions between these factors did not modify the structure of the bacterial community. That diversity and structure of the bacterial communities only were affected by dietary starch and its interaction with dietary oil suggests that only the effects of the diet, but not the effects of starch amount and FA nature in the incubates, could have been mediated by a change of microbial population.

Table 2. Amount of total fatty acids (mg per flask) and fatty acids profile (% of total fatty acids) of ruminal fluids

Cow diet	Low starch		Low starch	High starch	SEM	Significant effects ¹
Total FA	144.4	121.8	219.3	288.4	22.9	Od**
FA profile						
C18:0	44.48	41.97	49.57	54.62	3.15	Od*
<i>c</i> 9-C18:1 ²	2.04	2.89	2.14	1.49	0.20	Od*, Sd×Od*
<i>t</i> 10-C18:1 ²	0.48	0.46	1.15	11.49	2.32	Od*
<i>t</i> 11-C18:1	3.86	4.05	13.07	1.31	0.93	Sd***, Od*, Sd×Od***
Total <i>t</i> C18:1	7.62	6.78	19.95	17.15	2.58	Od**
LeA ³	3.61	5.15	1.71	2.90	0.51	Sd*, Od**
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA ³	0.02	0.01	0.02	0.03	0.01	Od*
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0.06	0.04	0.18	0.01	0.02	Sd**, Sd×Od**
<i>t</i> 9, <i>t</i> 11-CLA	0.35	0.20	0.20	0.10	0.07	
LnA ³	0.79	0.32	0.27	0.27	0.13	
CLnA ³	0.045	0.016	0.023	0.005	0.007	Sd**, Od*

¹Sd = dietary starch level; Od = dietary oil addition

²*c* = *cis*; *t* = *trans*.

³LeA = linoleic acid; LnA = α -linolenic acid; CLA = conjugated linoleic acid; CLnA = *cis*-9, *trans*-11,*cis*-15 conjugated linolenic acid

P* < 0.05; *P* < 0.01; ****P* < 0.001.

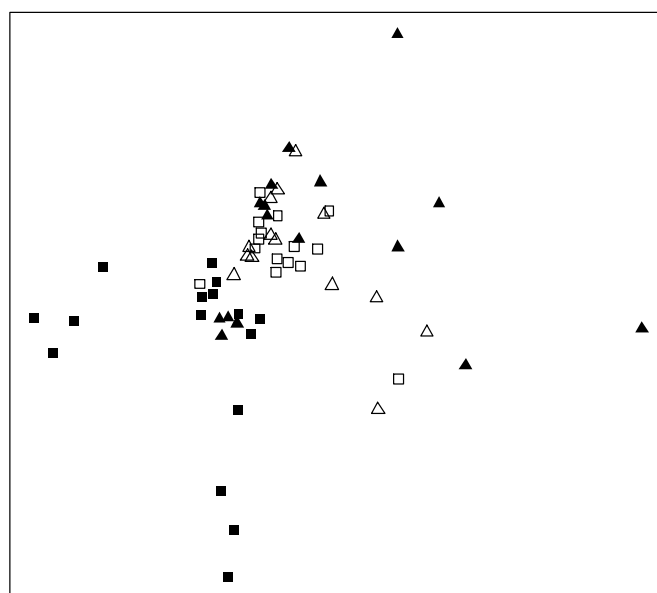


Figure 1. Nonmetric multidimensional scaling plot (nMDS) of the capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP) profiles of 5h *in vitro* cultures. The marks relate to the diets of donor cows: low starch without sunflower oil ($\triangle$), low starch with sunflower oil ($\square$), high starch without sunflower oil ($\blacktriangle$) and high starch with sunflower oil ($\blacksquare$).

Effects of donor's cow diet and starch in the incubates

Increasing starch concentration from 21 to 34% of DM on average in the diet of donor cows had no significant effect on ELeA and ELnA (Table 3). Increasing the starch content from 18 to 41% in culture substrates significantly decreased ELeA from 42.8 to 36.9% on average. However, this effect significantly interacted with the FA added to the cultures, only affecting cultures with added LnA, which had a low initial LeA amount. This shows that neither starch in the donor cows diet nor starch in the incubates affected the BH extent of added LeA. Literature data indicate that increasing the proportion of concentrates in the diet decreases the LeA BH extent in vivo (Loor et al., 2004; Glasser et al., 2008; Enjalbert and Troegeler-Meynadier et al., 2009), and that a low pH decreases BH extent in vitro (Van Nevel and Demeyer, 1996; Troegeler-Meynadier et al., 2003). In our experiment, increasing dietary starch only decreased the final pH by 0.1 and increasing starch in substrates decreased ruminal pH by 0.3 (results not shown). A 0.3 pH unit decrease has already been shown to decrease ELeA disappearance (Van Nevel and Demeyer, 1996). These authors also showed that lipolysis is much more sensitive to low pH values than isomerization. In our experiment, in cultures with added LeA, most LeA was in a free form, so that its isomerization could not be precluded by a slow lipolysis. This could explain the lack of negative effect of starch level on ELeA.

A low effect of concentrates and/or pH on isomerization compared to lipolysis could also explain why, in our cultures with added LnA, increasing starch in the substrates did not negatively affect ELnA since most LnA originated from added free LnA. Increasing starch level in the substrate even increased ELnA by 10%; to our knowledge, no other published experiment has investigated the effect of starch level on the in vitro isomerization of free LnA.

High starch diets slightly increased ECLA and ECLnA, resulting in a decreased CLnA balance (Table 4). Starch addition to the substrates did not affect ECLA but increased ECLnA, resulting in a decreased CLnA balance. Although statistically significant, these effects remained in a narrow range since ECLA and ECLnA were near 90 % whatever the diet of the donor cow or the incubation substrate. The reduction of CLA is known to be very efficient even at low pH (Troegeler-Meynadier et al., 2006), which explains the very limited effect of starch in our experiment.

Starch addition to the diet decreased Et11c15 from 94 to 88 % and Et18:1 from 53 to 48 % on average (Table 3), resulting in increased *trans*-11,*cis*-15-C18:2 and *trans* C18:1 balances (Table 4), but starch addition to the incubates did not affect Et11c15 and Et18:1.

Table 3. Effect of donor cow diet and culture substrate on the variations of efficiencies (E as %) of the reactions of biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids during 5h in vitro incubations

Cow diet	Low starch				High starch				Low starch + oil				High starch + oil				SEM	Significant effects ²
Substrate ¹	LSLeA	HSLeA	LSLnA	HSLnA	LSLeA	HSLeA	LSLnA	HSLnA	LSLeA	HSLeA	LSLnA	HSLnA	LSLeA	HSLeA	LSLnA	HSLnA		
ELeA ³	44.1	44.8	32.8	23.3	47.7	51.5	39.9	23.8	49.8	55.1	40.9	26.7	53.3	52.4	33.8	17.7	3.2	Ss**, FAs***, Sd×Od*, Ss×FAs***
ECLA ³	95.9	96.8	90.0	87.4	96.9	97.6	94.2	91.2	94.0	96.9	88.5	87.0	96.3	96.1	93.5	88.3	1.7	Sd*, FAs***, Ss×FAs*
ELnA ³			55.7	61.9			55.0	64.9			60.9	68.5			61.7	63.3	2.9	Ss**
ECLnA ³			94.4	97.5			95.4	98.2			90.0	96.2			98.8	99.4	0.9	Sd***, Ss***, Sd×Od***, Sd×Ss*
Et11c15 ³			93.4	94.3			91.3	87.9			94.1	95.0			85.1	87.3	3.7	Sd*
EtC18:1 ³	60.6	67.5	61.5	60.1	57.6	58.4	49.3	46.6	41.1	48.3	41.2	40.9	44.0	46.9	38.5	42.5	3.8	Sd*, Od***, FAs**, Sd×Od*

¹LSLeA = low starch + free LeA; HSLeA = high starch + free LeA; LSLnA = low starch + free LnA; HSLnA = high starch + free LnA

²Sd = dietary starch level; Od = dietary oil addition; Ss = starch level in the incubation substrate; FAs = fatty acid in the substrate (LnA vs LeA)

³ ELeA and ELnA = isomerization efficiencies of linoleic and linolenic acids, respectively; ECLA, ECLnA, Et11c15 and Et18:1 = efficiencies of reduction of total conjugated linoleic acids, *cis*-9, *trans*-11,*cis*-15 conjugated linolenic acid, *trans*-11,*cis*-15-C18:2, and total *trans* C18:1, respectively

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Table 4. Effect of donor cow diet and culture substrate on the variations of fatty acids profile (% of total fatty acids) during 5h in vitro incubations

Cow diet Substrate ¹	Low starch LSLeA HSLeA LSLnA HSLnA				High starch LSLeA HSLeA LSLnA HSLnA				Low starch + oil LSLeA HSLeA LSLnA HSLnA				High starch + oil LSLeA HSLeA LSLnA HSLnA				SEM	Significant effects ²
C18:0	9.9	10.2	9.3	8.0	11.2	10.9	7.2	4.6	9.4	10.6	8.9	7.8	9.1	9.0	6.5	6.7	1.3	FAs***
c9-C18:1 ³	-0.43	0.28	0.68	0.24	-1.01	-0.51	-1.06	-1.91	-0.81	-0.41	-0.78	-0.26	-0.66	-0.39	-1.13	-0.80	0.35	Sd***, Sd×Od**, Sd×FAs*
c11-C18:1	0.12	0.19	0.14	0.26	0.10	0.29	0.18	0.39	0.07	0.13	0.08	0.19	0.09	0.24	0.11	0.26	0.03	Sd***, Od***, Ss***, FAs**, Sd×Ss**
c12-C18:1	0.38	0.39	0.24	0.42	0.51	0.95	0.41	0.64	0.15	0.19	0.08	0.17	0.27	0.24	0.19	0.17	0.08	Sd***, Od***, Ss**, FAs*, Sd×Od*, Od×Ss*
c15-C18:1	0.02	0.02	0.41	0.58	0.04	0.04	0.61	0.68	0.01	0.02	0.17	0.30	0.00	0.00	0.69	0.61	0.07	Sd***, Od*, FAs***, Sd×FAs***
t5-C18:1 ³	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	-0.01	-0.02	-0.02	-0.03	0.01	Sd***, Od***, FAs*, Sd×Od***
t6+t7+t8-C18:1	0.27	0.28	0.26	0.28	0.37	0.56	0.33	0.37	0.18	0.22	0.19	0.28	0.12	0.07	0.06	0.02	0.05	Od***, Sd×Od***, Sd×FAs*
t9-C18:1	0.15	0.14	0.14	0.17	0.22	0.32	0.21	0.24	0.11	0.14	0.11	0.18	0.10	0.06	0.05	0.04	0.03	Od***, Sd×Od***
t10-C18:1	0.88	1.05	0.38	0.52	1.24	2.26	0.58	0.97	0.58	0.78	0.29	0.53	1.39	2.25	0.33	-0.18	0.27	Sd***, Ss*, FAs***, Sd×FAs**
t11-C18:1	1.93	1.23	2.03	1.90	2.67	2.34	3.44	4.34	1.90	1.20	1.42	2.09	1.05	0.25	0.46	0.34	0.33	Od***, FAs*, Sd×Od***, Od×FAs**, Ss×FAs**
t12-C18:1	0.38	0.37	0.47	0.56	0.54	0.73	0.61	0.49	0.21	0.27	0.30	0.40	0.18	0.07	0.22	0.21	0.07	Od***, Sd×Od***
t13+t14-C18:1	0.18	-0.16	0.41	1.94	0.91	1.02	2.66	3.42	0.35	0.39	1.07	1.66	0.34	0.19	1.88	1.73	0.37	Sd***, FAs***, Sd×Od**, Ss×FAs*
t15-C18:1	0.21	0.16	0.75	0.91	0.35	0.34	0.72	0.65	0.13	0.13	0.49	0.56	0.12	0.04	0.67	0.59	0.13	Od*, FAs***
t16-C18:1	0.25	0.24	0.61	0.66	0.35	0.34	0.54	0.35	0.16	0.20	0.48	0.50	0.12	0.09	0.45	0.40	0.08	Od**, FAs***
Total t C18:1	4.2	3.3	5.0	6.9	6.6	7.9	9.0	10.8	3.6	3.3	4.3	6.2	3.3	2.9	4.0	3.0	0.8	Sd**, Od***, FAs***, Sd×Od***
LeA ⁴	-18.7	-19.7	-2.7	-2.2	-21.2	-23.8	-3.6	-2.4	-15.7	-17.9	-2.4	-1.6	-14.8	-14.9	-2.0	-1.1	1.1	Od***, Lns***, Sd×Od**, Od×Lns***, Ss×Lns*
t10,c12-CLA ⁴	0.17	0.20	0.01	0.01	0.18	0.26	0.02	0.04	0.10	0.09	0.01	0.01	0.38	0.41	0.02	0.02	0.04	Sd***, FAs***, Sd×Od**, Sd×FAs***
c9,t11-CLA	0.33	0.13	0.06	0.02	0.30	0.10	0.07	0.04	0.52	0.21	0.05	0.02	0.05	0.02	0.01	0.00	0.04	Sd***, Ss***, FAs***, Sd×Od***, Sd×FAs***, Ss×FAs***
t9,t11-CLA	0.05	0.02	-0.01	0.00	0.05	0.08	0.01	0.01	0.07	-0.01	-0.01	-0.04	0.01	0.04	0.00	0.00	0.03	FAs**
t11,t13-CLA	0.02	0.02	0.27	0.39	0.02	0.02	0.36	0.67	0.00	0.01	0.08	0.10	0.01	0.00	0.22	0.19	0.05	Sd**, Od***, Lns***, Sd×Lns**, Od×Ss*, Od×Lns***, Ss×Lns*
Total-CLA	0.54	0.35	0.06	0.03	0.53	0.44	0.09	0.09	0.69	0.30	0.05	-0.01	0.44	0.47	0.04	0.02	0.05	Ss**, FAs***, Sd×Ss*, Ss×FAs*
t11,c15-C18:2			1.01	1.09			1.63	2.78			0.79	0.86			2.02	1.77	0.52	Sd**
LnA ⁴			-19.8	-22.3			-20.0	-24.1			-16.0	-18.4			-13.7	-14.3	1.5	Od***, Ss*
CLnA ⁴			1.08	0.48			0.91	0.42			1.58	0.65			0.17	0.08	0.14	Sd***, Ss***, Sd×Od***, Sd×Ss*

¹LSLeA = low starch + free LeA; HSLeA = high starch + free LeA; LSLnA = low starch + free LnA; HSLnA = high starch + free LnA

²Sd = dietary starch level; Od = dietary oil addition; Ss = starch level in the incubation substrate; FAs = fatty acid in the substrate (LnA vs LeA).

³c = *cis*; t = *trans*.

⁴LeA = linoleic acid; LnA = α -linolenic acid; CLA = conjugated linoleic acid; CLnA = *cis*-9, *trans*-11,*cis*-15 conjugated linolenic acid

An increased duodenal flow of *trans* C18:1 has already been observed when increasing dietary concentrate, and buffer addition alleviated this effect suggesting that ruminal pH played a major role in this accumulation (Kalscheur et al., 1997). In our experiment, donor cows receiving the high starch diets did not receive a buffer, so that a starch effect on the ruminal pH and consequently the microflora could be expected, affecting Et11c15 and Et18:1 in vitro. On the contrary, the 0.3 final pH difference due to starch addition to the incubates could have failed to affect these efficiencies.

Oil addition to the diets marginally increased ELeA from 39 to 41% and did not affect ECLA, ELnA, ECLnA and Et11c15. On the contrary, Et18:1 decreased from 58 to 43% on average when oil was added to the diets. Troegeler-Meynadier et al. (2006) previously reported that this BH reaction is easily saturated. Shingfield et al. (2008) observed an increased proportion of *trans* C18:1 among omasal FA when increasing dietary sunflower oil in the diet of lactating dairy cows, and modelling data from several in vivo experiments, Moate et al. (2004) established that the BH rate of *trans* C18:1 is negatively affected by the concentration of free FA in the rumen. Moreover, Lourenço et al. (2010) showed that *Butyrivibrio proteoclasticus*, which is the main bacteria responsible of this last reduction (Wallace et al., 2006) is more sensitive to unsaturated FA than *B. fibrisolvens* which is the main bacteria responsible of the previous BH steps. In spite of this negative effect on Et18:1, oil addition to the diets decreased the in vitro balances of most *trans* C18:1 BH intermediates, which could be due to the higher initial proportions of *trans* C18:1 (Table 2).

Taken together, our results relative to the effects of starch and/or oil addition to the diets of donor cows suggest that the last BH reduction was inhibited by either high starch or oil supplemented diets. The effect of dietary starch on Et18:1 interacted with dietary oil, being observed only when the diets did not contain added oil. This shows that starch and oil additions had no additive effect, since increasing dietary starch level did not lower *trans*-C18:1 reduction when this reduction was already inhibited by oil addition to the diet, suggesting that they affected the same target.

The main isomer-specific effect of high starch diets was observed on the equilibrium between *trans*-10- and *trans*-11 isomers in incubates (Table 4). High starch diets decreased the *cis*-9,*trans*-11-CLA balance by 2.3 times, increased the *trans*-10,*cis*-12-C18:2 and *trans*-10-C18:1 balances by 2.2 and 1.8 times, respectively, but did not affect the *trans*-11-C18:1 balance. The effect of the starch content or forage/concentrate ratio of the production of *trans*-10-isomers in fat supplemented diets has been previously observed in vivo with diets without (Piperova et al., 2002) or with (Lóor et al., 2004) added fat. In vitro, Choi et al. (2005)

reported that, whatever the culture pH, in vitro cultures contained more *trans*-10,*cis*-12-C18:2 when the donor cow received a high concentrate diet.

As discussed later, we did not observe a *trans*-10 shift in LnA incubates, thus, we studied the relationship between *trans*-10 isomers (*trans*-10,*cis*-12-C18:2 + *trans*-10-C18:1) balance and bacterial community only on LeA incubates. Redundancy analysis showed that total *trans*-10 isomers balance explained 11% ($P = 0.005$) of the total inertia of CE-SSCP profiles. This is consistent with the results of Weimer et al. (2010) who observed that bacterial community was affected in cows experiencing milk fat depression, usually associated with a *trans*-10 shift. In our experiment, with the same data set of LeA incubates, *trans*-10 isomers balance did not significantly correlate with the Simpson index and the CE-SSCP background area ($r = 0.33$, $P = 0.069$ and $r = 0.23$, $P = 0.21$, respectively).

Dietary starch interacted with dietary oil for *cis*-9,*trans*-11-CLA, *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-11-C18:1 balances: the increase of *trans*-10,*cis*-12-CLA due to dietary starch addition was higher when the diets contained sunflower oil, and high starch diets decreased the balance of *trans*-11 isomers only when oil was added to the diets, resulting in the highest *trans*-10,*cis*-12-CLA and lowest *trans*-11 isomers balances when donor cows received the high starch plus oil diet (Table 4). This reveals a clear shift from *trans*-11 to *trans*-10 BH pathway. These changes could have been driven by the strong changes of bacterial community structure observed with the high starch plus oil diet. Griinari et al. (1998), studying the effect of concentrate level and unsaturation level of dietary fat found a trend toward a similar interaction, with a strong decrease of *trans*-11-C18:1 in milk fat when increasing the concentrate level in diets containing unsaturated fat carried out by corn oil. Additionally, they described a significant interaction between dietary concentrate and unsaturated fat for milk *trans*-10-C18:1, highest levels being observed with high concentrate diets containing unsaturated fat. In our experiment, the trend toward this interaction could be observed on the ruminal fluid of donor cows (Table 2) but was not observed on in vitro balances: as discussed later, the production of *trans*-10-C18:1 in cultures incubated with LnA was low, which could have masked the effects on LeA of a *trans*-10 producing ruminal microflora.

Similar to high starch diets, high starch substrates decreased *cis*-9,*trans*-11-CLA balance, which was numerically but not statistically observed by Fuentes et al. (2009), and increased *trans*-10-C18:1 balance whereas Fuentes et al. (2009) observed an opposite effect. Unlike dietary starch, increasing the starch content of substrates had no significant effect on *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-11-C18:1 balances.

Among BH intermediates that mainly result from LnA BH, high starch diets strongly increased *trans*-11,*cis*-15-C18:2, *trans*-11,*trans*-13-CLA and *trans*-13+*trans*-14-C18:1. The high starch substrates numerically increased *trans*-11,*trans*-13-CLA and *trans*-13+*trans*-14-C18:1 balances ($P = 0.052$ and $P = 0.109$, respectively), which is consistent with the in vivo results of Loor et al. (2004). Increasing starch in the diets also increased *cis*-11, *cis*-12 and *cis*-15-C18:1 balances.

Effects of the incubated fatty acid and interactions with starch in diets and substrates

On average, ELeA was 50% in the cultures with added LeA but only 30% in the cultures with added LnA (Table 3). In vitro, LnA addition has already been shown to inhibit LeA isomerization (Troegeler-Meynadier et al., 2003), which at least in part explains this very low LeA BH in our cultures with added LnA. In our experiment, most LeA in the cultures with added LeA was the pure free LeA added to the medium whereas in the cultures with added LnA, LeA originated from the ruminal fluid and the forage and concentrates used as a substrate, in an acylglycerols form, needing a digestion of the vegetal structures and a lipolysis before BH.

On average, ELnA was 61% in cultures with LnA, compared to 50% for ELeA in cultures with LeA (Table 3). This higher BH extent of LnA compared to LeA is consistent with literature data (Enjalbert and Troegeler-Meynadier, 2009). However, in our experiment, this higher extent of LnA than LeA BH was not necessarily due to the nature of the FA, but could also be due to different physical forms: 97% of LnA in cultures with added LnA originated from pure added LnA, compared to 79% of LeA originating in pure LeA in cultures with added LeA.

Adding LnA resulted in a ten times lower increase of total-CLA proportion than LeA addition (0,05 and 0,47% on average, respectively), but resulted in high CLnA and *trans*-11,*cis*-15-C18:2 balances (Table 4), which is consistent with the present knowledge relative to LeA and LnA BH. Incubation of LnA resulted in a *trans*-11,*cis*-15-C18:2 balance that was 44 times greater than the *cis*9,*trans*-11-CLA balance, which is similar to the 47 ratio observed by Loor et al. (2004) in vivo when supplementing diets with linseed oil. On the contrary, incubation with added LeA resulted in negligible balances of CLnA, *trans*-11,*trans*-13-CLA and *trans*-11,*cis*-15-C18:2 (results not shown), but increased *trans*-10,*cis*-12- and *cis*-9,*trans*-11- and *trans*-9,*trans*-11-CLA balances.

During incubations, the percentage of total *trans* C18:1 increased by 4.4% on average in cultures with added LeA compared to 6.2% in cultures with LnA, in relationship with a higher

Et18:1 than in cultures with LnA. The reduction of *trans*-C18:1 to C18:0 is inhibited in vitro by a LeA concentration over 1mg/mL (Harfoot et al., 1973), and Troegeler-Meynadier et al. (2006) demonstrated that this effect was due to a saturation of the reduction when the concentration of *trans* C18:1 was high. A similar effect can be expected when LnA is incubated since LnA BH also produces *trans* C18:1, but an inhibition of the last reduction by other LnA BH intermediates, or different inhibiting effects of different *trans* C18:1 isomers could have resulted in this lower Et18:1 with LnA than LeA.

Compared to cultures with LeA, cultures with LnA had a quite different distribution of octadecenoic BH intermediates. Incubation of LnA instead of LeA increased the balances of *cis*-11-, *cis*-15-, *trans*-11-, *trans*-13+*trans*-14-, *trans*-15- and *trans*-16-C18:1, tended to increase the balance of *trans*-12-C18:1 ($P = 0.092$), and decreased the balances *cis*-12-, *trans*-5- and *trans*-10-C18:1. Most of these changes are consistent with the present knowledge on LeA and LnA BH, the latter being in particular known to result in *cis*-15-, *trans*-13+*trans*-14-, *trans*-15- and *trans*-16- isomers (Kemp and Lander, 1984; Jouany et al., 2007)..

Destailats et al. (2005) proposed a biohydrogenation pathway of LnA where LnA was in part isomerized to *cis*-9,*trans*-13,*cis*-15-C18:3, whose reductions produced *trans*-13-C18:1. Whatever the diets of cows and the incubation substrates, we did not find *cis*-9,*trans*-13,*cis*-15-C18:3, even in samples with high *trans*-13+*trans*-14-C18:1 balances.

Formation of *trans*-10 isomers during LeA and LnA BH have been proposed by Griinari and Bauman (1999). This production from LeA has been clearly demonstrated in vivo with a corn oil supplemented diet (Griinari et al., 1998), and in in vitro ruminal cultures with added LeA (Troegeler-Meynadier et al., 2003; Jouany et al., 2007). In the pathway proposed by Griinari and Bauman (1999), LnA could be hydrogenated via the *trans*-10 pathway instead of the more classical *trans*-11 pathway with *trans*-10,*cis*-12,*cis*-15-C18:3 and *trans*-10,*cis*-15-C18:2 as intermediates. As far as we are aware, only Kemp et al. (1975) reported traces of this latter isomer to be produced by a strain of ruminal bacteria. The *trans*-10,*cis*-12,*cis*-15-C18:3 isomer has been isolated in ewe cheese (Winkler and Steinhart, 2001), but it could result from a microbial isomerization of LnA or *cis*-9,*trans*-11,*cis*-15 CLnA in milk or cheese.

Increasing dietary starch strongly increased *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-10-C18:1 when LeA was incubated, but not when LnA was incubated (Figure 2).

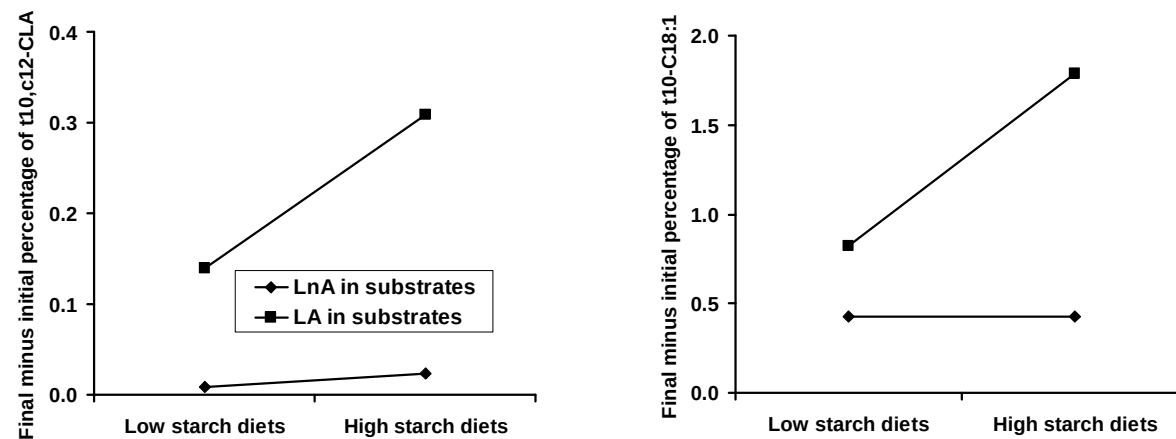


Figure 2. Effects of interaction between dietary starch level and the incubated fatty acid on the balances of *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-10-C18:1 in 5h in vitro cultures.

Using a high concentrate diet, Loor et al. (2005) also observed 6.3 and 3.8 times lower proportions of *trans*-10,*cis*-12-CLA and *trans*-10-C18:1, respectively, in the duodenal flow of cows supplemented with linseed oil, whose main FA is LnA, compared to cows supplemented with sunflower oil, whose main FA is LeA.

Similarly, incubated starch interacted with incubated FA for *trans*-11-C18:1 and *trans*-13+*trans*-14-C18:1 balances and a trend toward this interaction was observed for *trans*-10-C18:1 balance ($P = 0.073$). Actually, in cultures with LeA, increasing starch level in the substrate increased the *trans*-10-C18:1 balance by 55% but decreased the *trans*-11-C18:1 balance by 34%, clearly showing a shift of BH pathway (Figure 3). On the contrary, in cultures with LnA, increasing starch increased *trans*-10, *trans*-11 and *trans*-13+*trans*-14-C18:1 balances by 15, 18 and 45%, respectively, showing no major shift of BH pathway.

This lack of *trans*-10 shift in cultures with LnA, whatever the starch content of the diets or the incubation substrates, strongly suggests that LnA BH does not produce *trans*-10 isomers. Moreover, the lack of effect of dietary starch on the isomeric profile of BH intermediates with LnA incubation, as opposed to the shift toward *trans*-10 isomers with LeA incubation, suggests that dietary conditions that result in a *trans*-10 shift of LeA BH do not produce this shift on LnA BH. This *trans*-10 shift has been described with high starch diets without added fat (Griinari et al., 1998), with added sunflower oil (Roy et al., 2006), but also with diets supplemented with linseed oil (Loor et al., 2004; Pottier et al., 2006). However, LeA respectively represented 20 and 36% of total dietary FA in these experiments, making it impossible to ascertain what FA *trans*-10 isomers originated in.

That the incubated FA did not affect the structure and diversity of the bacterial community suggests that the differences of BH pathways between LeA and LnA observed in our incubations did not relate to differences of microbiota, but only to differences of BH substrate.

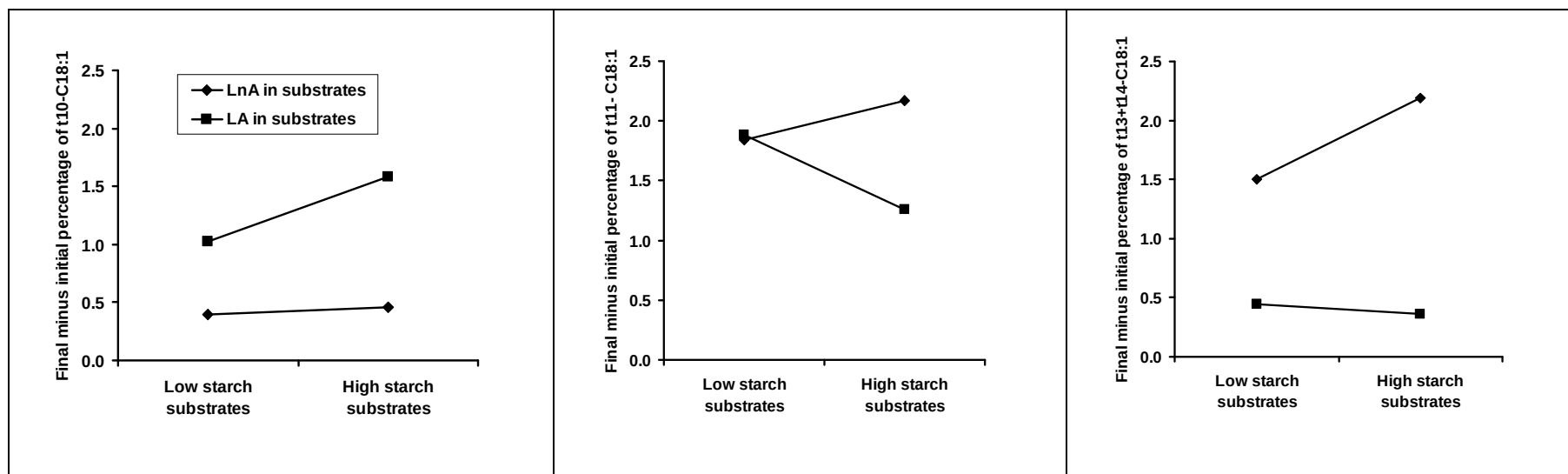


Figure 3. Effects of interaction between starch level in the incubation substrate and the incubated fatty acid on the balances of *trans*-10-C18:1, *trans*-11-C18:1 and *trans*-13+*trans*-14-C18:1 in 5h in vitro cultures.

CONCLUSIONS

The high starch plus oil diet resulted in a *trans*-10 shift of LeA BH in donor cows. This shift was also observed in vitro when ruminal fluids from cows receiving the high starch plus oil diet were incubated with LeA, and it related to a change of structure of the bacterial community. Increasing starch level in the incubates also increased *trans*-10-C18:1 balance. On the contrary, no *trans*-10 shift was observed when LnA was incubated with the rumen fluid from cows receiving this high starch plus oil diet or when incubated with high starch substrate. Because LeA and LnA incubations resulted in similar bacterial communities at the end of the incubations, differences of BH pathways between these two FA when incubated with ruminal fluid from cows exhibiting a *trans*-10 shift are intrinsic to the nature of FA.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank M.L. Chemit and the staff at the experimental station (UMR 1289 Tandem). The work of the staff at the Centre de Ressources, Génomique et Séquençage of Toulouse is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Akram, F., M. C. Nicot, P. Juaneda, and F. Enjalbert. 2007. Conjugated linolenic acid (CLnA), conjugated linoleic acid (CLA) and other biohydrogenation intermediates in plasma and milk fat of cows fed raw or extruded linseed. *Animal* 1:835-843.
- Baumgard, L., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing amounts of *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 131:1764–1769.
- Choi, N. J., J. Y. Imm, S. Oh, B. C. Kim, H. J. Hwang, and Y. J. Kim. 2005. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:643-653.
- Destailats F., J. P. Trottier, J. M. G. Galvez, and P. Angers. 2005. Analysis of α -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *J. Dairy Sci.* 88:3231-3239.
- Enjalbert, F., and A. Troegeler-Meynadier. 2009. Biosynthesis of *trans* fatty acids in ruminants. Pages 1-31 in *Trans fatty acids in human nutrition*. F. Destailats, J.L. Sébédio, F. Dionisi, and J. M. Chardigny, ed. The Oily Press, Bridgwater, UK.

- Fuentes, M. C., S. Calsamiglia, W. Cardozo, and B. Vlaeminck. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 92:4456-4466.
- Gervais R., and P. Y. Chouinard. 2008. Effects of intravenous infusion of conjugated diene C18:3 isomers on milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3568-3578.
- Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal.* 2:691-704.
- Griinari, J. M., and D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid. Pages 180-200 in *Advances in conjugated linoleic acid research*, Vol. 1. M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson, ed. AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta9-desaturase. *J. Nutr.* 130:2285-2291.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. Nurmela. 1998. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:251-1261
- Harfoot, C. G., R. C. Noble, and J. H. Moore. 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. *J. Sci. Food. Agric.* 24:961-970.
- Ip M. M., S. O. McGee, P. A. Masso-Welch, C. Ip, X. Meng, L. Ou, and S. F. Shoemaker. 2007. The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis.* 28:1269-1276.
- Jouany, J. P., B. Lassalas, M. Doreau, and F. Glasser. 2007. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured in vitro. *Lipids* 42:351-360.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter, L. S. Piperova, and R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114.
- Kemp, P., and D. J. Lander. 1984. Hydrogenation in vitro of alpha-linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 130:527-533.

- Kemp, P., R. R. White, and D. J. Lander. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.* 90:100-114.
- Legendre P., and L. Legendre. 1998. Numerical ecology. 2nd ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Loisel P., J. Harmand, O. Zemb, E. Latrille, C. Lobry, J. P. Delgenès, and J.J. Godon. 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and singlestrand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8:720-731.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2472-2485.
- Loor, J. J., K. Ueda, A. Ferlay, Y. Chilliard, and M. Doreau. 2005. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, and sunflower oil. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:203-225.
- Lourenço M., E. Ramos-Morales, and R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation *Animal.* 4:1008-1023.
- Michelland, R., S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, and L. Cauquil. 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprints profiles. *Mol. Ecol. Resour.* 9:1359–1363.
- Moate, P. J., W. Chalupa, T. C. Jenkins, and R. C. Boston. 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long-chain fatty acids. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 112:79-105.
- Park P. W., and R. E. Goins; 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.* 59:1262–1266.
- Piperoova, L. S., J. Sampugna, B. B. Teter, K. F. Kalscheur, M. P. Yurawecz, Y. Ku, K. M. Morehouse, and R. A. Erdman. 2002. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9containing CLA in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 132:1235-1241.
- Pottier, J., M. Focant, C. Debler, G. De Buysser, C. Goffe, E. Mignolet, E. Froidmond, and Y. Larondelle. 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high fat diets. *J. Dairy Sci.* 89:685-692.

- Privé F., S. Combes, L. Cauquil, Y. Farizon, F. Enjalbert, and A. Troegeler-Meynadier. 2010. Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid in vitro. *J. Dairy Sci.* 93:711-722.
- Roy, A., A. Ferlay, K. J. Shingfield, and Y. Chilliard. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows fed different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Anim. Sci.* 82:479-492.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Vanhatalo., P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2008. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *Brit. J. Nutr.* 99:971-983.
- Tricon S., G. C. Burdge, S. Kew, T. Banerjee, J. J. Russell, E. L. Jones, R. F. Grimble, C. M. Williams, P. Yaquob, and P. Calder. 2004. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:614-620.
- Troegeler-Meynadier, A., L. Bret-Bennis, and F. Enjalbert, F. 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:713-724.
- Troegeler-Meynadier, A., M. C. Nicot, C. Bayourthe, R. Moncoulon, and F. Enjalbert. 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* 86:4054-4063.
- Van Nevel, C. J., and D. I. Demeyer. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:53-63.
- Wallace, R. J., L. C. Chaudhary, N. McKain, N. R. McEwan, A. J. Richardson, P. E. Vercoe, N. D. Walker, and D. Paillard. 2006. *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacteria that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:195-201.
- Weimer P. J., D. M. Stevenson, and D. R. Mertens. 2010. Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy. Sci.* 93:265-278.
- Winkler, K., and H. Steinhart. 2001. Identification of conjugated isomers of linolenic acid and arachidonic acid in cheese. *J. Separation Sci.* 24:663-668.
- Yang S. L., D. P. Bu, J. Q. Wang, Z. Y. Hu, D. Li, H. Y. Wei, L. Y. Zhou, and J. J. Looor. 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal* 3:1562-1569.

ARTICLE 4

Effet de la ration de la vache donneuse et du pH sur les isomérisations ruminales Δ^{12} et Δ^9 de l'acide linoléique (soumis, « *British Journal of Nutrition* »)

En raison des différents effets des acides gras *trans* sur la santé humaine et sur la production du lait de vache, il est nécessaire de mieux comprendre les réactions d'isomérisation des acides gras polyinsaturés dans le rumen. L'acide linoléique peut être isomérisé par les bactéries du rumen selon deux voies d'isomérisation, la Δ^{12} et la Δ^9 conduisant respectivement aux isomères t11 et t10. Cette expérience a été menée *in vitro* à pH 5.5 ou 7.0 avec deux solutions enzymatiques provenant de contenus ruminiaux de deux vaches, l'une recevant une ration riche en amidon à haute teneur en matière grasse (huile de tournesol) induisant une forte production d'isomères t10 dans le rumen et l'autre recevant une ration pauvre en amidon non enrichie en huile permettant une bonne production d'isomères t11. Avant la mise en incubation, du chloramphénicol a été ajouté aux contenus ruminiaux prélevés dans le but d'arrêter toute activité bactérienne.

Les résultats montrent que la production des acides gras t11 diminue à pH 5.5 par rapport au pH 7.0. Le faible pH a également inhibé la production des acides gras t10. La Δ^9 -isomérisation ne s'est clairement exprimée que dans les incubations avec les contenus ruminiaux provenant de vaches ayant reçu la ration riche en amidon et en huile de tournesol. En revanche, la Δ^{12} -isomérisation n'a été que légèrement affectée par la ration de la vache donneuse.

Short Communication

Effects of pH and donor cow diet on ruminal linoleic acid

Δ^{12} - and Δ^9 - isomerisation

Asma Zened^{1,2}, Francis Enjalbert^{1,2} and Annabelle Troegeler-Meynadier^{1,2*}

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

² Université de Toulouse, INPT, ENSAT, ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

*Corresponding author: Annabelle Troegeler-Meynadier

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 address: a.troegeler@envt.fr

Abbreviations: HSHF, enzymatic solution obtained from the cow receiving the high-starch high-fat diet; LSLF, enzymatic solution obtained from the cow receiving the low-starch low-fat diet; Ei, efficiency of isomerisation; CLA, conjugated linoleic acid.

ABSTRACT

Due to the different effects of *trans* fatty acids on human health and cows' milk production, it is necessary to better understand the reactions of ruminal isomerisation of polyunsaturated fatty acids, which lead to different isomers. Linoleic acid can be isomerised by ruminal bacteria according to two isomerisation pathways (Δ^{12} and Δ^9), leading to *trans*-11 and *trans*-10 isomers, respectively. This experiment was conducted *in vitro* at pH 5.5 or 7.0 with two enzymatic solutions originating from rumen fluids collected from two cows, one receiving a high-starch high-fat diet inducing a high ruminal *trans*-10 isomer production and the other receiving a low-starch low-fat diet inducing high *trans*-11 isomers production. Before incubation, ruminal fluids were inactivated with chloramphenicol. As expected, *trans*-11

isomer production was lower at pH 5.5 than at pH 7.0, but the low pH also resulted in a lower *trans*-10 production. The Δ^9 -isomerisation was clearly observed only in incubations prepared with rumen fluid from the high starch and high fat diet fed cow. By contrast, the Δ^{12} -isomerisation was only slightly affected by the donor cow diet.

Isomerisation: Linoleic acid: *trans* fatty acids: pH: Donor cow diet: Rumen

Trans fatty acids of ruminant products originate partly from the ruminal biohydrogenation of linoleic acid (18 : 2*n*-6). *Trans*-11 isomers are usually the most abundant biohydrogenation intermediates and are most desirable because of their health-promoting properties in human consumers (Kritchevsky 2000; Whigham, Cook, & Atkinson 2000). When a high-concentrate diet containing fat is fed to cows, *trans*-10 isomers can become the major biohydrogenation intermediates, inducing milk fat depression in dairy cows (Shingfield & Griinari 2007) and having possible detrimental effects on human health (Tricon et al. 2004; Ip et al. 2007). This increase of *trans*-10 isomers could be due to a better growth and/or an enhanced activity of *trans*-10-producing bacteria through a greater synthesis and/or activity of the Δ^9 -isomerase, possibly because of the low ruminal pH induced by high-concentrate diets. Our hypothesis was that a high production of *trans*-10 isomers from 18 : 2*n*-6 needs both a high-starch high-fat diet fed to the donor cow and a low incubation pH. Consequently, this study was designed to separate the effect of the diet of the donor cow, potentially affecting enzyme amounts in the ruminal fluid, from the effect of incubation pH, potentially affecting enzyme activity. To avoid enzyme production during incubations, ruminal fluids were inactivated with chloramphenicol.

Materials and methods

Rumen fluids were collected before the morning meal from two dry dairy cows equipped with a ruminal canula, one of them receiving a high-starch high-fat diet, and the other a low-starch low-fat diet, in two equal meals per day, after 14 days of adaptation. The two diets were based on corn silage and contained soybean meal and a mineral mixture: the high-starch high-fat diet (33.1% starch and 7.3% crude fat, DM basis) contained 49 % of wheat and barley mixture and 5% of sunflower oil and the low-starch low-fat diet (21.5% starch and 2.9% crude fat, DM basis) contained 14% of alfalfa hay. The ruminal fluids were strained through a metal sieve (1.6 mm mesh) and quickly transferred to the laboratory at 39°C under anaerobic conditions. They were mixed with chloramphenicol, an inhibitor of protein synthesis in prokaryotes (Allison et al. 1962; Rocha et al. 1996), at a rate of 1 mg of chloramphenicol for

1 ml of ruminal fluid. Then, both mixtures were gassed with CO₂ and placed at 39°C for 5h for a complete inhibition of bacterial growth by chloramphenicol (Allison et al. 1962; Rocha et al. 1996). The enzymatic solution obtained from the cow receiving the high-starch high-fat diet will be referred as HSHF, and that from the cow receiving the low-starch low-fat diet will be referred as LSLF. Afterward, 1 ml of each enzymatic solution was incubated with 1 ml of a buffer solution (pH 5.5 or 7.0) in vials containing 0.5 mg of 18 : 2n-6 (purity ≥ 99%, Sigma). The buffer solutions were based on a pH 7.0 bicarbonate buffer solution (19.5g/l of Na₂HPO₄.12H₂O, 9.24g/l of NaHCO₃, 0.705g/l of NaCl, 0.675g/l of KCl, 0.108g/l of CaCl₂.2H₂O, and 0.180g/l of MgSO₄.7H₂O), pre-warmed to 39°C and saturated with CO₂. The 5.5 pH buffer was obtained from the 7.0 pH buffer by addition of 6N hydrochloric acid. For each of the four combinations of pH buffer and rumen fluid, four vials were immediately frozen, and four vials were gassed with CO₂, placed in a water bath at 39°C and agitated for one hour. After incubation, reactions were stopped by placing the vials into ice. The vial contents were then frozen and lyophilised.

FA of vials were extracted and analysed by gas chromatography as previously described by Privé *et al.* (Privé et al. 2010). Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St. Louis, MO) except *trans*-18:1 other than *trans*-9-18 : 1 and *trans*-11-18 : 1 which were identified by order of elution. Values were expressed as mg of fatty acid per vial.

The quantities (mg) of total *trans* isomers in each vial were calculated as the sums of the quantities of the respective isomers assayed by gas chromatography:

$$\text{trans-11 isomers} = \text{trans-11-18 : 1} + \text{cis-9,trans-11 CLA} + \text{trans-9,trans-11 CLA}$$

$$\text{trans-10 isomers} = \text{trans-10-18 : 1} + \text{trans-10,cis-12 CLA}$$

Production of each FA during incubation was calculated by difference between the amount after incubation and the average initial amount, determined in the four respective non-incubated vials.

The efficiency of the 18 : 2n-6 isomerisation (Ei) was calculated as previously described by Troegeler-Meynadier *et al.* (Wallace et al. 2007) :

$$Ei = ([18 : 2n-6]b - [18 : 2n-6]e) / [18 : 2n-6]b,$$

where [18 : 2n-6]b and [18 : 2n-6]e represent the concentrations of 18 : 2n-6 at the beginning and at the end of the 1-h incubation period, respectively. Ei represents the isomerisation extent of 18 : 2n-6.

Data were analyzed using General Linear Model of SYSTAT (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, IL). Initial amounts of FA were analyzed using the model:

$$\text{Variable} = \text{mean} + \text{effect of cow's diet} + \varepsilon$$

Productions of *trans* FA were analyzed using the model:

$$\text{Variable} = \text{mean} + \text{effect of cow's diet} + \text{effect of buffer pH} + \text{interaction} + \varepsilon$$

Results

At the beginning of the incubation, the amounts of 18 : 2*n*-6 and 18 : 0 were significantly higher ($P < 0.05$) in vials with HSHF than with LSLF (0.61 and 3.44 vs. 0.46 and 1.40 mg, respectively). Besides, the amount of *trans*-10 isomers (Fig. 1a) was significantly higher ($P < 0.001$) in vials with HSHF than with LSLF (0.16 and 0.01 mg, respectively), while the amount of *trans*-11 isomers was almost identical (0.07 mg), whatever the origin of the enzymatic solution.

During one hour's incubation with pure 18 : 2*n*-6, Ei depended on the origin of the enzymatic solution ($P = 0.02$) and on the pH of the buffer ($P < 0.001$), with a significant interaction ($P = 0.03$) between these two factors (Fig. 1b): the highest Ei values were obtained with HSHF and LSLF incubated at pH 7.0, and the lowest was noticed with LSLF incubated at pH 5.5. The amount of 18 : 2*n*-6 that disappeared (Table 1), was therefore affected by the origin of enzymatic solution and the pH buffer, but no interaction between the two effects was observed ($P = 0.82$). The greatest 18 : 2*n*-6 disappearance was noticed with HSHF incubated at pH 7.0 (Table 1). As a consequence, the highest production of total CLA (+0.07 mg vs. +0.01 mg) and of total *trans*-18 : 1 (+0.10 mg vs. +0.06 mg) were obtained in these conditions (HSHF, pH 7.0). The production of 18 : 0 was very low in all the media, especially with LSLF incubated at pH 5.5, in which no 18 : 0 appeared.

The production of *trans*-10 isomers (*trans*-10,*cis*-12 CLA + *trans*-10-18 : 1) was 3.7 times higher with HSHF at pH 7.0 than with the other media (+0.11 mg vs. +0.03 mg on average, respectively), due to a significant interaction ($P < 0.001$) between the origin of the enzymatic solution and the incubation pH (Table 1).

A single significant effect of pH ($P < 0.001$) was noticed on the production of *trans*-11 isomers (*cis*-9,*trans*-11 CLA + *trans*-9,*trans*-11 CLA + *trans*-11-18 : 1). At pH 5.5, *trans*-11 isomers were produced in very small quantities (+0.02 mg on average), whereas the highest *trans*-11 isomers production were noticed at pH 7.0 (+0.06 mg with LSLF vs. +0.04 mg with HSHF), with *trans*-11-18 : 1 being the main *trans*-11 isomer (Table 1).

Table 1. Effect of the origin of the enzymatic solution and incubation pH on the production or disappearance of fatty acids intermediates (mg per 2 ml vial) of linoleic acid biohydrogenation after 1 h incubation *in vitro* with chloramphenicol (an inhibitor of protein synthesis in prokaryotes)

Enzymatic solution ¹	HSHF		LSLF		SEM	Significance of effects (<i>P</i>)		
Incubation pH	7.0	5.5	7.0	5.5		ES	pH	ES×pH
18 : 0	0.03	0.06	0.04	-0.01	0.015	0.11	0.40	0.03
<i>trans</i> -18 : 1 isomers	0.10	0.06	0.08	0.03	0.007	0.02	<0.001	0.59
<i>trans</i> -10-18 : 1	0.06	0.03	0.02	0.02	0.006	<0.01	0.02	0.04
<i>trans</i> -11-18 : 1	0.03	0.02	0.05	0.01	0.004	0.02	<0.001	<0.01
18 : 2 <i>n</i> -6	-0.21	-0.14	-0.14	-0.06	0.015	<0.001	<0.001	0.82
CLA isomers	0.07	0.01	0.02	0.01	0.008	0.04	<0.01	<0.01
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0.05	0.01	0.01	0.01	0.006	<0.05	<0.01	<0.01
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.00	0.00	0.01	0.00	0.003	0.05	0.15	0.60
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0.01	0.00	0.00	0.00	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
<i>trans</i> -10 isomers	0.11	0.03	0.03	0.03	0.006	<0.001	<0.001	<0.001
<i>trans</i> -11 isomers	0.04	0.02	0.06	0.02	0.006	0.09	<0.001	0.09

¹HSHF = enzymatic solution prepared from the cow receiving the high-starch high-fat diet; LSLF = enzymatic solution prepared from the cow receiving the low-starch low-fat diet.

²ES = Enzymatic solution effect; pH = incubation pH effect; ES×pH = enzymatic solution by incubation pH interaction effect.

Discussion

High initial 18 : 2*n*-6 and 18 : 0 amounts in HSHF were expected because of oil addition in the high starch diet of cows. According to the literature (Shingfield & Griinari 2007), this diet led to a shift from *trans*-11 to *trans*-10 isomers.

The high initial quantities of *trans*-10 isomers in HSHF, as opposed to their small quantities in LSLF, showed that the HSHF diet resulted in a stronger capacity of Δ^9 -isomerisation, either due to a higher enzyme production or to a higher activity. On the other hand, the initial quantities of *trans*-11 isomers were very similar with the two diets, suggesting similar capacities of *trans*-11 isomer production.

During incubation, Ei was reduced by a low pH: this inhibition was drastic with LSLF but quite small with HSHF. In one hour, 18 : 2*n*-6 biohydrogenation was incomplete and *trans* intermediates (CLA and *trans*-18 : 1 isomers) were the major products. Consequently, their production depended mainly on the isomerisation activity, and so was the greatest with the 7.0 pH buffer.

Furthermore, at pH 7.0, the isomerisation was equally efficient in HSHF or LSLF media (Fig. 1b), but a significant difference in the quantity of 18 : 2*n*-6 that disappeared and in the quantity of CLA that appeared was noticed between these two media. With the HSHF diet, there was a larger initial quantity of 18 : 2*n*-6 (due to the addition of oil in the diet of cows) than with LSLF diet, so that a larger quantity of 18 : 2*n*-6 disappeared and a larger quantity of CLA, mainly composed of *trans*-10, *cis*-12 CLA, was produced. The production of total *trans*-18 : 1 isomers was not significantly different between HSHF and LSLF, with a predominant production of *trans*-10-18 : 1 with HSHF and *trans*-11-18 : 1 with LSLF.

As opposed to HSHF, LSLF was unable to produce large quantities of *trans*-10 isomers, whatever the incubation pH, which suggests that LSLF had a low capacity of Δ^9 -isomerisation. With HSHF, *trans*-10 isomer production depended on the incubation pH. Contrary to our hypothesis that a low pH could promote the Δ^9 -isomerisation efficiency, the highest production of *trans*-10 isomers was obtained with HSHF at pH 7.0. A previous *in vitro* study (Maia, Bessa, & Wallace 2009) reported that the amount of *trans*-10 isomers produced in continuous ruminal incubations was similar at pH 6.0 and 7.0. By contrast with *trans*-10 isomers, the production of *trans*-11 isomers was mainly affected by pH.

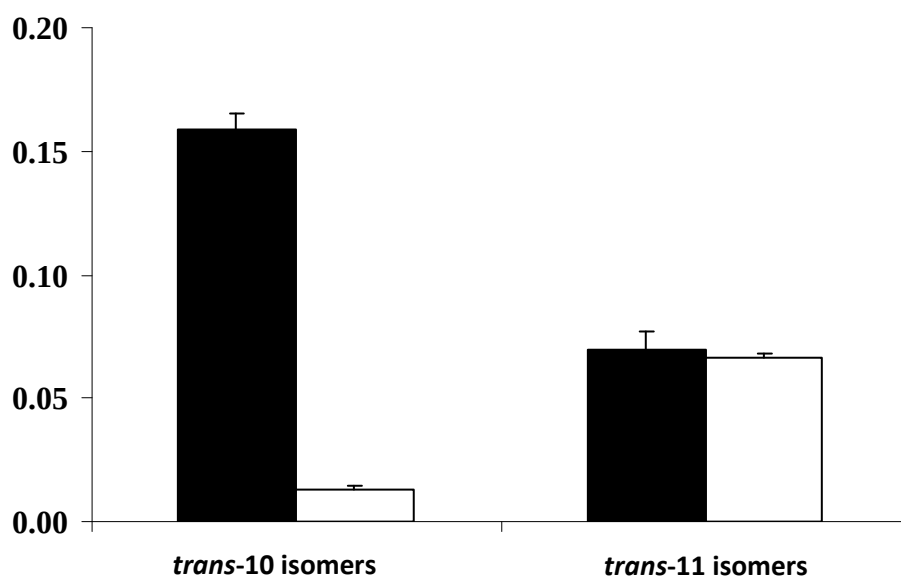


Fig. 1a

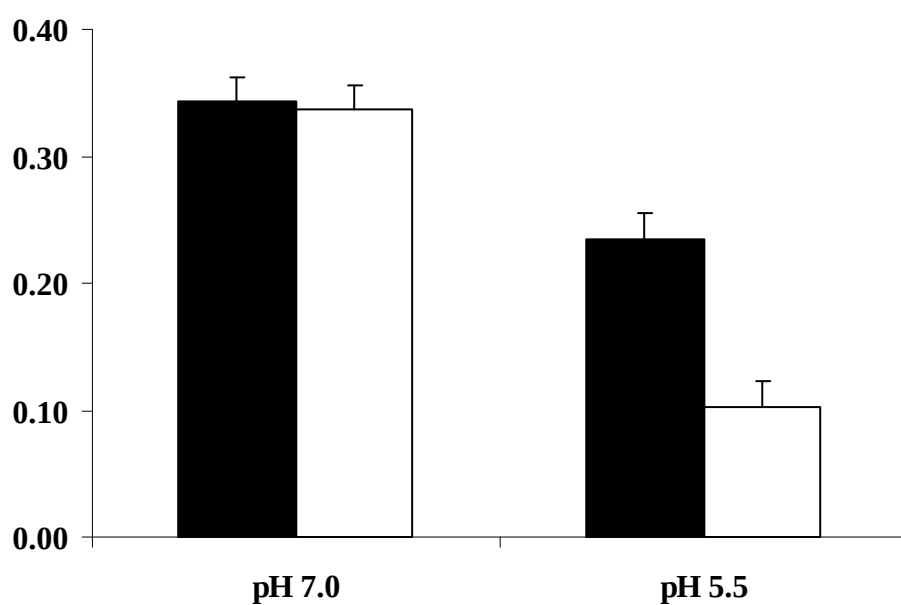


Fig. 1b

Fig. 1a. Initial amount of total *trans*-10 and *trans*-11 isomers (mg per 2 ml vial) originating from ruminal fluids of cows fed high-starch high-fat diet (black bars) or low-starch low-fat diet (white bars). **Fig. 1b.** Efficiency of ruminal isomerisation (E_i) in the enzymatic solutions originating from the high-starch high-fat diet (black bars) and the low-starch low-fat diet (white bars) fed cows at pH 7.0 or 5.5.

As previously described (Troegeler-Meynadier et al. 2006), it was drastically inhibited at pH 5.5. This could be explained by the optimal pH activity of Δ^{12} -isomerase, lying between 7.0 and 7.2 (Kepler & Tove, 1967).

These results showed that, compared to a pH of 7.0, a pH of 5.5 decreased both Δ^9 - and Δ^{12} -isomerisations efficiencies, nevertheless, the Δ^9 -isomerisation was maintained at low pH, unlike Δ^{12} -isomerisation which was very inhibited. Besides, the capacity of *trans*-10 isomers production by Δ^9 -isomerisation was much higher when the donor cow received a high-starch high-fat diet than a low-starch low-fat diet. This suggests that the high *trans*-10 isomer production in cows exhibiting a low ruminal pH due to high starch diets is due to a high production of Δ^9 -isomerase by the ruminal microbiota.

Acknowledgements

The authors thank M.L. Chemit (UMR 1289 Tandem) for technical assistance.

References

1. Kritchevsky D (2000) Antimutagenic and some other effects of conjugated linoleic acid. *Br. J. Nutr* **83**, 459–465.
2. Whigham LD, Cook ME & Atkinson RL (2000) Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacol. Res* **42**, 503–510.
3. Shingfield KJ & Griinari JM (2007) Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* **109**, 799–816.
4. Tricon S, Burdge GC, Kew S, *et al.* (2004) Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr* **80**, 614–620.
5. Ip MM, McGee SO, Masso-Welch PA, *et al.* (2007) The *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium. *Carcinogenesis* **28**, 1269–1276.
6. Allison JL, Hartman RE, Hartman RS, *et al.* (1962) Mode of action of chloramphenicol. VII. Growth and multiplication of *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol* **83**, 609–615.
7. Rocha ER, Selby T, Coleman JP, *et al.* (1996) Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. *J. Bacteriol* **178**, 6895–6903.
8. Privé F, Combes S, Cauquil L, *et al.* (2010) Temperature and duration of heating of

- sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid *in vitro*. *J. Dairy Sci.* **93**, 711–722.
9. Troegeler-Meynadier A, Bret-Bennis L & Enjalbert F (2006) Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev* **46**, 713–724.
 10. Maia MR, Bessa RJ & Wallace RJ (2009) Is the *trans*-10 shift that sometimes occurs in the ruminal biohydrogenation of linoleic acid caused by low pH or starch? A Rusitec study. In *Ruminant Physiology*, XIth International Symposium, Clermont-Ferrand (France), September 6-9, pp 276-277 [Y Chilliard, F Glasser, Y Faulconnier, F Bocquier, I Veissier & M Doreau, editors]. The Netherlands, Academic Publishers, Wageningen.
 11. Kepler CR & Tove SB (1967) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. 3. Purification and properties of a linoleate delta-12-*cis*, delta-11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem* **242**, 5686–5692.

ARTICLE 5

L'écologie microbienne du rumen évaluée par pyroséquençage 454 GS FLX est modifiée par l'addition d'amidon et d'huile dans la ration (*en préparation*)

L'équilibre microbien dans le rumen a un impact direct sur la productivité et la santé des animaux. Toutefois, jusqu'à présent, les études concernant la communauté bactérienne impliquée dans la digestion des AGPI ont été réalisées *in vitro* sur des monocultures de souches pures ou isolées à partir de contenu ruminal. D'autre part, la contribution réelle *in vivo* des espèces cultivées à la digestion ruminale ainsi que celle des espèces non cultivables n'est pas encore connue. Dans cette étude un pyroséquençage à haut débit basé sur l'ARNr 16S a été utilisé afin d'évaluer la composition de la communauté bactérienne dans le contenu ruminal de vaches recevant des rations différentes. Quatre vaches Holstein tarées et équipées de canules ruminales avaient reçu 4 rations différentes durant 4 périodes expérimentales. La ration témoin (T) comprenait 22% d'amidon et moins de 3% de matière grasse (MG), la ration A était enrichie à 35% d'amidon (<3% de MG), la ration H était enrichie en huile de tournesol (20% d'amidon, 7,6 % de MG) et la ration AH était enrichie en amidon (33%) et en huile (7,3% de MG).

Dans tous les échantillons, la communauté bactérienne était dominée par les Firmicutes et les Bacteroidetes, qui représentaient plus de 80% des séquences totales. L'identification des séquences jusqu'à l'espèce n'a pas été possible, en revanche, 83,3% et 52,6% des séquences ont pu respectivement être assignées à une famille et à un genre bactérien. Parmi les familles identifiées, les *Lachnospiraceae*, les *Ruminococcaceae*, les *Prevotellaceae* et les *Rikenellaceae* étaient les plus abondantes et leur abondance dépendait de la ration de la vache. Par exemple, dans le rumen des vaches recevant la ration AH, l'abondance des *Prevotellaceae* était supérieure, par contre celle des *Ruminococcaceae* et *Rikenellaceae* était inférieure par rapport aux autres rations. Au niveau des genres, l'alimentation des vaches a également eu un effet significatif sur de nombreux groupes. L'addition d'amidon dans la ration a favorisé ou inhibé certains genres bactériens alors que l'addition d'huile seule a eu peu d'effet. L'addition d'amidon et d'huile a modifié la communauté mais d'une manière différente par comparaison avec l'addition d'amidon sans huile. Ce type d'approche apporte des informations intéressantes quant aux effecteurs de la digestion ruminale et apparaît indispensable pour une meilleure compréhension du fonctionnement de cet écosystème.

**Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing
is affected by starch and oil supplementation of diets.**

**Zened A.^{1, 2}, Combes S.^{1, 2}, Cauquil L.^{1, 2}, Mariette J.³, Rousseau C.⁴, Klopp C.³,
Troegeler-Meynadier A.^{1,2}, Enjalbert F.^{1,2}**

¹ INRA, UMR1289, Tandem, F-31326 Castanet-Tolosan, France

² Université de Toulouse, INP, ENSAT, ENVT, UMR1289 Tandem, F-31076 Toulouse, France

³ INRA, Plateforme bio-informatique Genotoul, Biométrie et Intelligence Artificielle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁴ INPT-ENSAT, Castanet-Tolosan, France

Corresponding author: Francis ENJALBERT

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

Ruminal bacterial microbiota equilibrium plays an important role in animal health and productivity. In the present study, CE SSCP coupled with a high-throughput 16S rRNA-based pyrosequencing was used to provide a comprehensive examination of the bacterial diversity in the rumen content of cows fed different diets.

Four rumen fistulated non-lactating Holstein cows were assigned to a 4×4 Latin square design with 4 different diets during 4 periods. Cows received 12 kg of dry matter per day of four diets based on corn silage during four successive periods: a low starch diet (LS; 22% starch, <3% fat), a high starch diet (HS), supplemented with wheat plus barley (35% starch, <3% crude fat), a low starch plus oil diet (LSO), supplemented with 5% of sunflower oil (20% starch, 7.6% crude fat) and a high starch plus sunflower oil diet (HSO; 33% starch, 7.3% crude fat). Samples were taken after 12 days of adaptation with the different diets, 5 hours postfeeding. Whatever the diet, bacterial community was primarily dominated (more than 80% of total sequences) by Firmicutes and Bacteroidetes. Sequences were assigned at 83.3% to family level and 52.6% to genus level. At family level, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Prevotellaceae* and *Rikenellaceae* were highly present (26.1, 17.2, 17.1 and 5.9%, respectively) compared to the other families and were clearly affected by cow diet. In particular the highest abundance of *Prevotellaceae* and the lowest abundance of *Ruminococcaceae* and *Rikenellaceae* families were found with the HSO diet. Several genera were also affected by cow diet. Dietary starch affected the ruminal bacterial community, increasing the abundance of some genera (*Acetivibrio*, *Barnesiella*, *Oribacterium*, *Olsenella*,...) and decreasing some others (*Butyrivibrio*-*Pseudobutyrvibrio*, *Catabacter*, *Ruminococcus*, *RC9*, *Atopobium*,...). Oil alone had a limited effect, but interestingly, the addition of starch plus oil to the diet differently affected the microbiota compared to starch addition without oil.

Introduction

The rumen is the major site of digestion in ruminants, due to a complex microbial community, including bacteria, archaea, protozoa and fungi. The main effects of this microbiota are degradation of dietary polysaccharides to volatile fatty acids, which are the main energetic fuels of ruminants, degradation of a major part of dietary proteins, synthesis of microbial protein and hydrogenation of dietary unsaturated fatty acids.

The equilibrium of ruminal microbiota is dependent on the diet, which carries fermentation substrates, and its efficiency can be strongly affected by dietary changes. High starch diets lead to a decreased efficiency of fiber digestion, associated with a decreased number of some fibrolytic bacteria, *i.e.* *Ruminococcus flavefasciens* (Tajima et al., 2001), *Fibrobacter succinogenes* (Tajima et al., 2001; Brown et al., 2006; Fernando et al., 2010) or *Butyrivibrio fibrisolvens* (Fernando et al., 2010), and a shift toward more lactate producers like *Lactobacilli* (Brown et al., 2006). Similarly, enrichment of diets with unsaturated fat has long been known to negatively affect the fibrolytic activity of ruminal microbiota (Brooks et al., 1954). *Butyrivibrio fibrisolvens*, a fibrolytic bacteria, is usually assumed as being the main biohydrogenating bacteria in the rumen (Enjalbert and Troegeler-Meynadier 2009). Recent data indicate that this biohydrogenation is a detoxification process necessary to prevent the bacteriostatic effect of polyunsaturated fatty acids (Maia et al., 2010). Dietary unsaturated fatty acids have been shown to inhibit the growth of numerous bacteria in in vitro pure cultures (Maczulak et al., 1981; Maia et al., 2007), but in vivo experiments showed more variable and limited effects (Yang et al. 2009; Belenguer et al. 2010; Huws et al. 2010). Most studies regarding the effects of dietary changes acting as microbiota troublemakers have focused on bacterial species considered as responsible of main digestive processes in the rumen, as assessed by cultivation studies. However, as outlined by Kelly et al. (2010), direct amplification and sequencing of 16S ribosomal RNA indicate that, in the rumen, the majority of sequences are derived from organisms that are phylogenetically distinct from currently cultivated species. Such molecular methods have been used to approach the effects of changes of dietary forage (Pitta et al., 2010) or concentrates (Callaway et al., 2010). The objective of this study was to assess the effects of starch and/or oil addition to the diet on the rumen bacterial community of dairy cows, using CE SSCP coupled with FLX amplicon pyrosequencing.

Material and methods

Experimental design

Four dry ruminally fistulated Holstein cows were assigned to a 4×4 Latin square design with 4 different diets based on corn silage and soybean meal during 4 periods. The low starch diet (LS) contained alfalfa hay (21.5% starch, 2.9% fat and 39.7% neutral detergent fiber, on dry matter basis). In the low starch plus oil diet (LSO), 4.8% of the control diet was replaced with 4.8% of sunflower oil, a high linoleic acid fat source. In the high starch diet (HS), alfalfa hay was removed and incorporation of a mixture of wheat and barley increased the starch content to 34.8% and decreased the NDF content to 30.9%. The high starch plus oil diet (HSO) was enriched with both a mixture of wheat and barley and sunflower oil. The composition of the diets is shown in Table 1. Cows were housed in individual stalls and received 12.5 kg of DM daily, in two equal meals at 08:00 and 17:00 and were allowed *ad libitum* access to water. Periods were divided into a two weeks of washout subperiod during which all cows received the control diet, and two weeks of treatment subperiod, during which each cow received one of the four experimental diets. In order to avoid carry-over effects, treatment orders were different among cows : (HSO, LSO, HS and LS for cow 1; LSO, LS, HSO, HS for cow 2; LS, HS, LSO, HSO for cow 3; HS, HSO, LS, LSO for cow 4). Ruminal samples were taken from each cow 5 hours post feeding on day 0 (last day of the wash-out) and day 12 (d12) of the treatment subperiod, strained through a metal sieve (1.6mm mesh) and then 0.2 g of filtrate were stored in a 2-mL sterile Eppendorf tube, RNase and DNase free, at -80°C.

Table 1 *Ingredients and chemical composition of donor cow diets*

Diets ^a	LS	LSO	HS	HSO
Ingredients (% of DM ^b)				
Corn silage	68.7	63.2	37.7	32.3
Alfalfa hay	14.3	14.3	0.0	0.0
Wheat and barley mix	0.0	0.0	48.5	48.5
Soybean meal	15.5	16.2	12.4	13.1
Sunflower oil	0.0	4.8	0.0	4.7
Minerals and vitamins ^c	1.5	1.5	1.5	1.5
Composition (% of DM ^b)				
Crude protein	14.6	14.6	14.2	14.2
Neutral Detergent Fiber	39.7	37.3	30.9	28.6
Starch	21.5	19.8	34.8	33.1
Crude fat	2.9	7.6	2.7	7.3

^aLS = low starch diet, LSO = low starch + oil diet, HS diet = high starch diet, HSO = high starch + oil diet

^bDM = dry matter

^cContained (per kg of premix, DM basis) P: 40g, Ca: 260g, Mg: 50g, Na: 20g, Zn: 5g, Mn: 4g, Cu: 1g, I: 40 mg, Co: 20 mg, Se: 20mg, vitamin A: 450 000 IU, vitamin D3: 100 000 IU and vitamin E: 1 500 IU.

DNA extraction and bacterial community analysis of day 0 samples

Total DNA was extracted from 0.2 g of ruminal sample, combining a mechanic lysis with a FastPrep instrument (MP Biomedicals) and the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nano- Drop Technologies, Wilmington, DE).

On day 0, PCR reactions, and capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) of all the samples were carried out based on the procedure described by Privé et al. (2010). The temperature program of PCR reaction was different and consisted of 2 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 15 s at 61°C, and 15 s at 72°C; and a final extension of 7 min at 72°C. The CE-SSCP data processing was computed with StatFingerprints software (Michelland et al., 2009), and CE-SSCP profiles were aligned using pairwise alignment of their internal standard with the same reference internal standard.

16S rRNA gene amplicon pyrosequencing of 16 samples on day 12

Amplicons from the V3 to V4 regions of 16S rRNA genes of day 12 were amplified with bacterial forward 343F (TACGGRAGGCAGCAG; (Liu et al., 2007) and reverse 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT; (Andersson et al., 2008) primers. Each primer had a barcode sequence of ten nucleotides on 5' which was unique for each sample. PCRs were performed in a total volume of 100 µL) containing 1X PCR buffer, 200 µM of dNTP, 1U IsisTM DNA polymerase (MP Biomedicals), 0.5 µM of forward and reverse primers, and 1µL of DNA.

The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min; 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s; and a final extension step at 72°C for 7 min. PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, France) followed by DNA yield quantification and quality estimation using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The size of the PCR products was confirmed by gel electrophoresis. The purified PCR products were quantified using Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay kit (Invitogen, France) on a ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) and then mixed in equimolar amounts to a final DNA concentration of 1000 ng/µL for each library. The pooled amplicons were pyrosequenced using an on 454 FLX Titanium (454 Life Sciences—a Roche Company, Branford, CT, USA) sequencer at the GeT (Genomic and Transcriptomic) platform of Toulouse. Sequencing occurred on a picotiter plate, of which a half space was available for samples included in this study. To facilitate pyrosequencing using titanium chemistry, each

forward primer was appended with the titanium sequencing adaptor A and the reverse primer carried the titanium adaptor B at the 5' end.

Pyrotag handling and analysis

A total of 115 158 16S rDNA sequences (also referred to as 16S pyrotags) were obtained from 454 Titanium pyrosequencing run for the 16 samples. The 16S pyrotags were sorted based on their respective barcodes to form a total of 16 pyrotag library representing the 16 collected ruminal samples. Sequences were filtered using a Python script developed by the platform bioinformatic of Toulouse, 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 primers, barcodes and adaptor sequences, and had an average read length of 370 nucleotides after trimming.

Taxonomical classification and statistical analysis

After cleaning, raw sequences were analyzed using MOTHUR software (v 1.12; Schloss et al., 2009). Reads were aligned over SILVA alignment database (Pruesse et al., 2007). After calculating a pairwise distance between aligned sequences, they were clustered into OTU (cutoff 0.03). Taxonomic assignment was performed with a bootstrap of 60%.

Sequences corresponding to *Butyrivibrio* genus which were not identified at species level in SILVA data base, were compared with deposited sequences in ncbi database using Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). This comparison did not allow to discriminate between *B. proteoclasticus* and *B. hungatei*.

Statistical analysis

The relative abundances of bacteria in the rumen fluids were analyzed by ANOVA, using the General Linear Model of SYSTAT (version 9, SPSS Inc., Chicago, IL), according to the following model:

$Y = \mu + C + P + Sd + Od + Sd \times Od + \varepsilon$, where μ is the mean, C, P, Sd and Od are the effects of cow, period, dietary starch level and sunflower oil addition, respectively, and ε the residual error. Significant differences among treatments were declared at $P < 0.05$ and trends at $P < 0.10$. The nMDS ordination was used to visualize differences between diets of bacterial community structure assessed by high throughput sequencing, using Vegan package (R Software)

Results

Microbial community in the rumen of dairy cows

Within the bacterial population, 13 phyla were found in all samples. Firmicutes and Bacteroidetes together represented more than 80% of total sequences: 49.6% and 40.3% of total sequences on average, respectively, but with high variations (residual SEM = 4.5 and 4.7 respectively for mean values presenting on Figure 1A). Rumen bacterial populations had Bacteroidetes in varying relative abundances, ranging from 31.7 to 47.3% of the total microbial community (Figure 1A). The remaining rumen microbiota comprised low relative abundance phyla (<20 % of total microbial community). Proteobacteria and Actinobacteria represented around 4.3% and 5.5% of total sequences on average, respectively. Other phyla (<1% of total microbial community), like Fibrobacteres, Spirochaetes, Lentisphaerae or Fusobacteria, were not consistently present in the different microbiota. At phylum level, unclassified bacteria accounted for a moderate proportion of the total microbial community, and represented 0.5, 1.6, 0.5 and 0.6% (on average of total sequences) with LS, LSO, HS and HSO diets, respectively.

Evaluation at finer taxonomical level was carried out to determine the distribution of microorganisms in cows fed different diets. When sequences were analyzed at the class level (Figure 1B), Firmicutes were dominated by Clostridia (48.6% on average of the total sequences) and Bacteroidia class made a significant contribution (39.2% on average of the total sequences) in Bacteroidetes phylum.

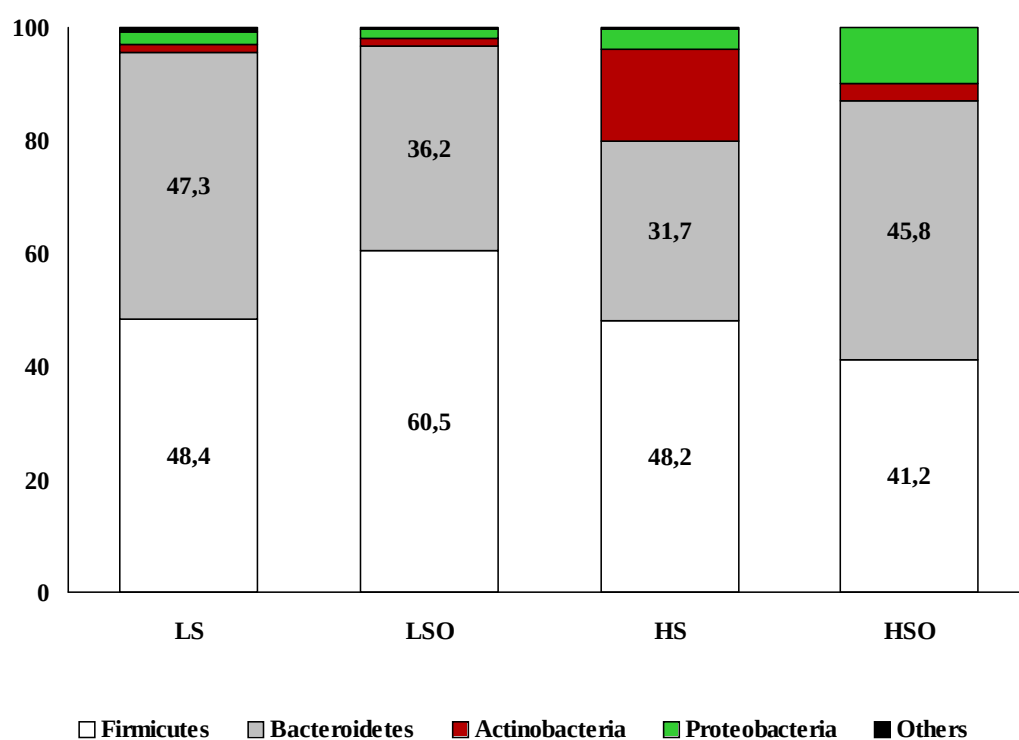


Fig. 1A

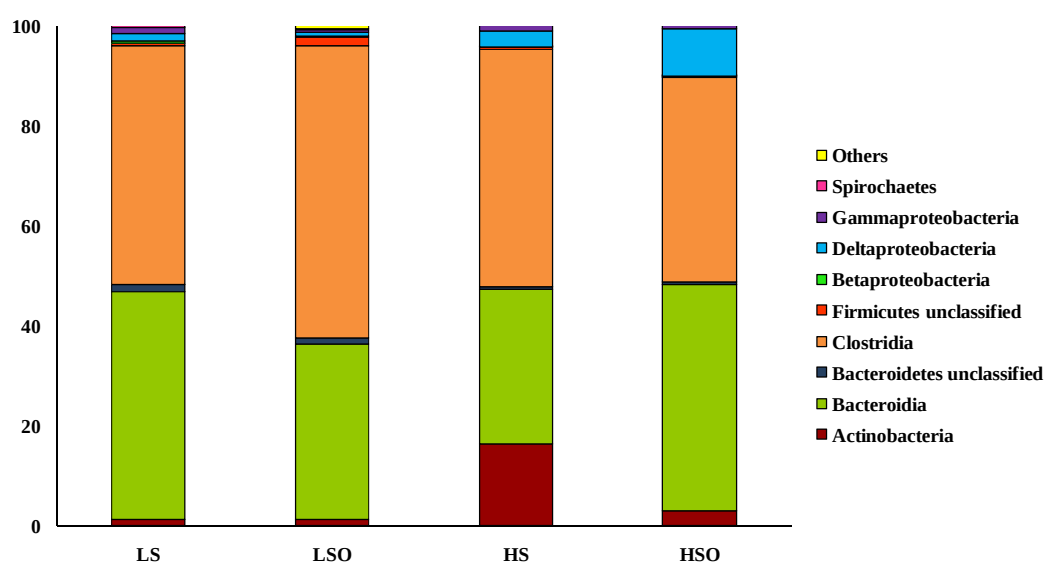


Fig. 1B

Figure 1 Percentage contribution of sequences (%) evaluated at the phylum (1A) and class (1B) levels to the total number of sequences in the database (LS = low starch diet, LSO = low starch + oil diet, HS diet = high starch diet, HSO = high starch + oil diet)

Using a minimal bootstrap of 60%, 83.3% and 52.6% of sequences were assigned to family and genus levels, respectively. On the totality of samples, 45 orders and 98 families were detected. Further evaluation of the two major classes (Table 2) showed that Clostridia was mainly composed of the families *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae* (26.1 and 17.2% on average of the total sequences, respectively), belonging to the Clostridiales order. Predominant bacterial families in Bacteroidia class were *Prevotellaceae* and *Rikenellaceae* (17.1 and 5.9% on average of the total sequences, respectively; Table 2), belonging to the Bacteroidales order. In Bacteroidia class, the relative abundance of Bacteroidales unclassified was quite high (9.3 % on average of the total sequences), and among Clostridia, Clostridiales unclassified averaged 3.1%. Other bacterial orders and families of both classes were detected at very low levels (i.e. under 0.3% of total sequences). Regarding Actinobacteria phylum, the major class was Actinobacteria represented mainly by *Bifidobacteriaceae* family (4.1% of total sequences on average).

Table 3a indicates the relative abundances of the genera representing more than 0.3% of total sequences. Over the totality of samples, 219 genera were detected. Among these genera 11.3% of the sequences belonged to the genus *Prevotella* followed by more than 5% of the genus *Ruminococcaceae* Incertae_Sedis (5.8%) and RC9 (5.6%). The most common unclassified genera are presented in table 3b, in which 12% of total sequences belonged to *Lachnospiraceae* family, 9.3% to unclassified families of Bacteroidales order and 7.8% to *Ruminococcaceae* family. Uncultured genera were also found such as *Lachnospiraceae* at 5% of total sequences. Other genera not presented in tables 3a and 3b, were detected at very low levels (i.e. under 0.3% of total sequences).

Table 2 Effect of the diet on the relative abundance (%) of predominant rumen bacterial families (average of total sequences)

Diets ^a	LS	LSO	HS	HSO	SEM	Significance of effects ^b
Clostridia class						
<i>Lachnospiraceae</i>	26.01	29.95	20.62	27.77	1.91	O°
<i>Ruminococcaceae</i>	17.04	21.33	23.00	7.28	2.61	O×S*
<i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i>	1.57	2.26	0.86	1.73	0.21	O*, S°
<i>Veillonellaceae</i>	0.08	0.23	0.55	1.35	0.25	S°
<i>Clostridiales unclassified</i>	2.88	4.50	2.32	2.52	0.30	O°, S*
Bacteroidia class						
<i>Prevotellaceae</i>	17.02	14.39	12.25	24.67	2.37	O×S°
<i>Rikenellaceae</i>	11.77	7.43	3.55	0.75	0.68	O*, S****
<i>BS11</i>	4.41	4.13	1.84	0.16	0.40	S**
<i>Porphyromonadaceae</i>	1.39	1.71	3.99	4.59	0.69	S*
<i>RF16</i>	1.18	0.35	0.42	0.07	0.12	O*, S*
Actinobacteria class						
<i>Bifidobacteriaceae</i>	0.45	0.35	15.04	0.38	2.45	O×S°
<i>Corionobacteraceae</i>	0.72	0.78	1.13	2.65	0.55	S°

^aLS = low starch diet, LSO = low starch + oil diet, HS diet = high starch diet, HSO = high starch + oil diet

^bEffects: O = effect of oil addition, S = high-starch versus low-starch diets, O×S = effect of interaction of starch by oil additions

°P<0.10; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

Clustering differences in bacterial community and their relative abundances

The nMDS plot (Figure 2) of the CE-SSCP profiles of 5 hours post-feeding ruminal contents showed that the structure of bacterial communities did not differ between the different cows before distribution of experimental diets. The comparison of the relative abundances of total ruminal microbiota by nMDS plot (Figure 3) showed that cows fed HS and HSO diets were separated from those receiving low starch diet, but LS and LSO diets were very close in the plot.

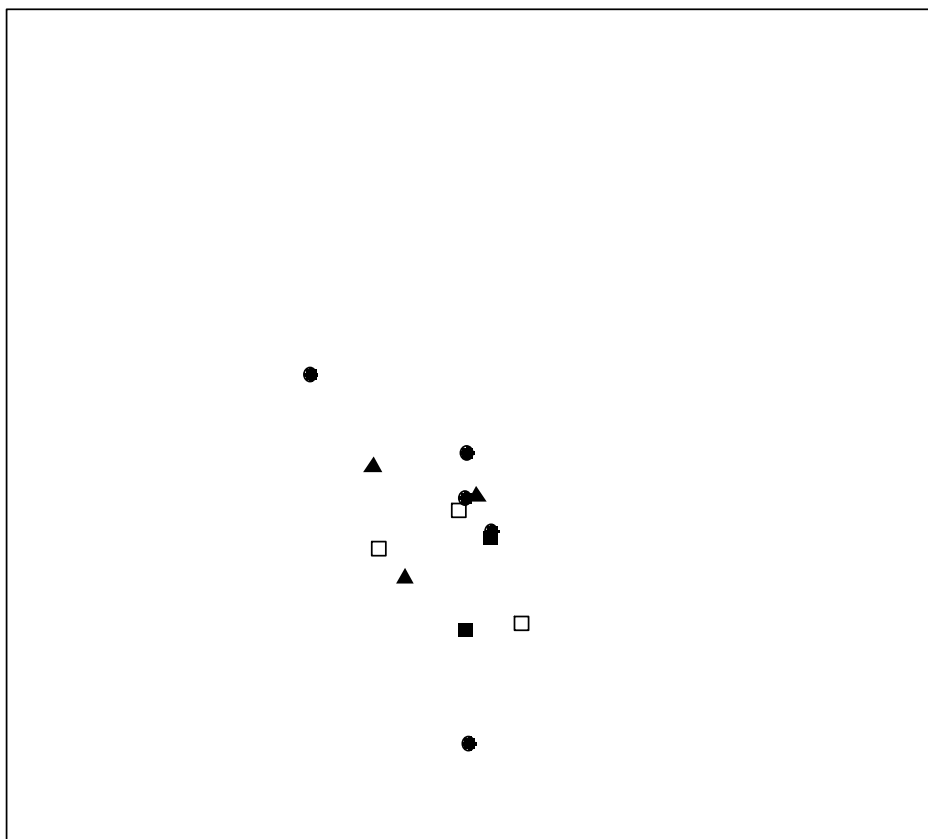


Figure 2 *Nonmetric multidimensional scaling plot (nMDS) of the capillary electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) profiles of 5 hours post-feeding ruminal contents taken on day 0, corresponding to the last day of the washout subperiod. The marks relate to the diet received by the cows during the previous experimental period: low starch diet (●), low starch + oil diet (▲), high starch diet (□) and high starch + oil diet (■). Before the beginning of the experiment, cows received the low starch diet.*

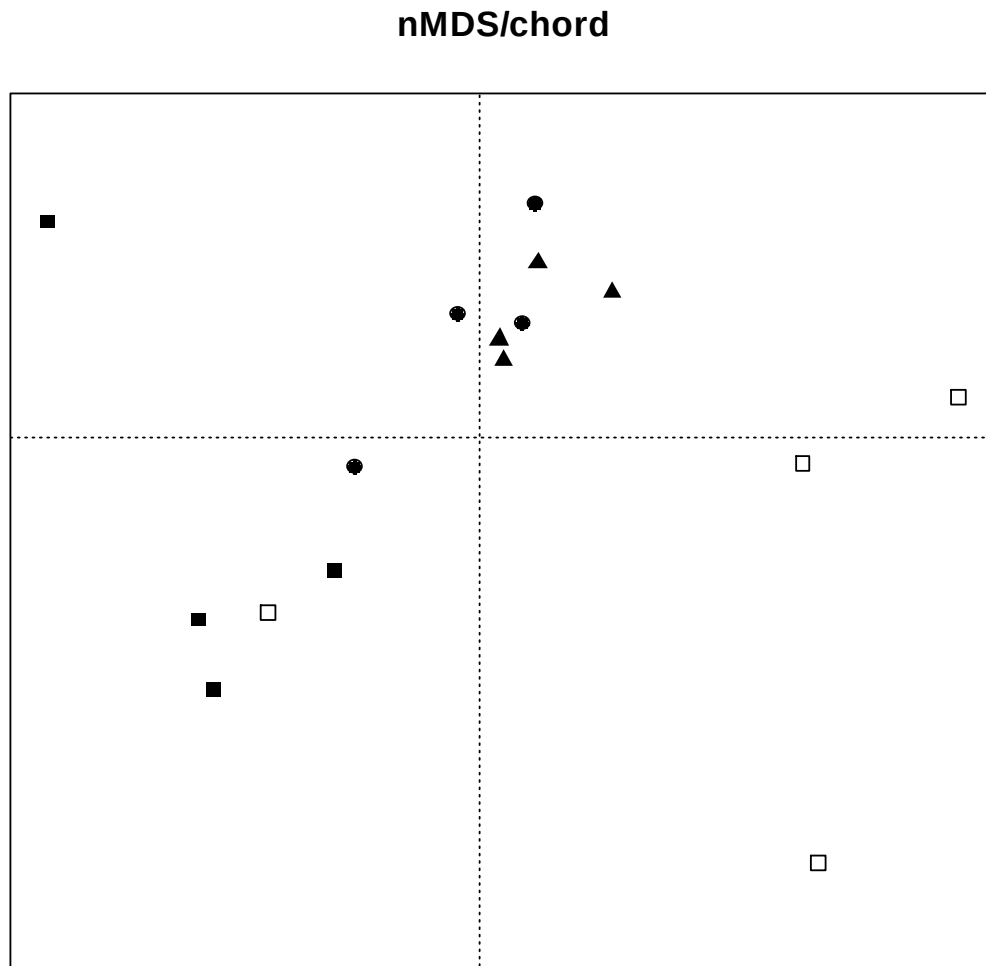


Figure 3 *Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) plot of bacterial 16S rRNA gene sequence tags generated from 454 pyrosequencing run. The marks relate to the diets of donor cows: low starch diet (●), low starch + oil diet (▲), high starch diet (□) and high starch + oil diet (■).*

Effect of diet on the relative abundance of bacterial groups

At the phylum level, both starch and oil additions negatively affected ($P < 0.05$) Fibrobacteres and Spirocheteae phyla, and starch addition resulted ($P = 0.05$) in high Actinobacteria relative abundance, but the major phyla were not significantly affected (data not shown).

Evaluation of the effects of diets on Clostridia and Bacteroidia classes' members showed that the dietary starch level and/or the addition of sunflower oil had an effect on the predominant ones (Table 2). In Clostridia class, in rumen fluid of cows fed HSO diet, the relative abundance of *Ruminococcaceae* was 2.8 times lower than with the other diets due to an interaction between starch and oil additions (Table 2). Oil addition had a positive effect on the abundance of Clostridiales *Family_XIII_Incertae_Sedis* (Table 2). In Bacteroidia class, the relative abundances of *BS11* and *Rikenellaceae* were lower and that of *Porphyromonadaceae* was higher in ruminal microbiota of cows fed high starch diets compared to cows fed low starch diets (Table 2). In addition to the effect of starch, the abundances of *Rikenellaceae* and *RF16* families were negatively affected by the addition of sunflower oil (Table 2), resulting in a very low abundance (0.75% and 0.07% of total sequences, respectively) with HSO diet compared to the other diets (7.58% and 0.65% on average of total sequences). *Prevotellaceae* relative abundance was numerically higher with HSO diet due to a trend ($P = 0.06$) toward an interaction between starch level and oil addition (Table 2). The relative abundance of Clostridiales unclassified was significantly lowered with high starch diet (Table 2). Concerning Actinobacteria, *Bifidobacteriaceae* relative abundance tended ($P < 0.10$) to be affected by an interaction between starch level and oil addition leading to the highest value with HS diet.

Table 3a Most common bacteria genera (average relative abundance across diets, % of total sequences)

Class	Family	Genera	Average relative abundance
Bacteroidia	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	11.3
Clostridia	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Incertae_Sedis</i>	5.8
Bacteroidia	<i>Rikenellaceae</i>	<i>RC9</i>	5.6
Actinobacteria	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	3.9
Bacteroida	<i>Porphyromonadaceae</i>	<i>Barnesiella</i>	2.4
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio</i>	2.1
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Acetitomaculum</i>	1.9
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Incertae_Sedis</i>	1.8
Bacteroidia	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Xylanibacter</i>	1.0
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Moryella</i>	1.0
Actinobacteria	<i>Coriobacteraceae</i>	<i>Olsenella</i>	0.9
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Syntrophococcus</i>	0.6
Clostridia	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	0.6
Clostridia	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Fastidiosipila</i>	0.4
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio</i>	0.4
Clostridia	<i>Eubacteriaceae</i>	<i>Eubacterium</i>	0.4
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Coprococcus</i>	0.3
Clostridia	<i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i>	<i>Mogibacterium</i>	0.3
Clostridia	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Oscillibacter</i>	0.3
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	0.3
Gammaproteobacteria	<i>Succinivibrionaceae</i>	<i>Succinivibrio</i>	0.3
Clostridia	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Lachnospira</i>	0.3
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	0.3
Clostridia	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Dialister</i>	0.3

Table 3b Most common uncultured or unclassified bacteria genera (average relative abundance across diets, % of total sequences)

Phylum;Class;Order;Family;Genera	Average relative abundance
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ;unclassified	12.0
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;unclassified	9.3
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ;unclassified	7.8
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ;uncultured	5.0
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Prevotellaceae</i> ;unclassified	3.4
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;unclassified	3.1
Proteobacteria;Gammaproteobacteria;unclassified	3.0
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>BS11</i> ;unclassified	2.6
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ;uncultured	2.0
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Prevotellaceae</i> ;uncultured	1.3
Bacteroidetes;unclassified	1.0
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>S24-7</i> ;unclassified	0.9
Firmicutes;unclassified	0.7
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Porphyromonadaceae</i> ;unclassified	0.5
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i> ;unclassified	0.5
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>RF16</i> ;unclassified	0.5
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i> ;uncultured	0.4
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Rikenellaceae</i> ;unclassified	0.3

Taxonomic evaluation of bacterial genus of the ruminal fluids (LS, LSO, HS and HSO) showed that the relative abundances of some genera were affected by the addition of starch and oil to the diet (Table 4a). Starch addition increased the relative abundance of only three genera: *Barnesiella*, *Oribacterium* and *Bulleida* (the two latter having very low relative abundances), but decreased the relative abundance of several genera, with very significant effects ($P < 0.001$) for *Rikenellaceae_RC9*, *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*, *Anaerovorax* and *Acetivibrio*. Oil addition increased the relative abundance of the *Bulleidia* genus, but decreased *Rikenellaceae_RC9*, *Acetitomaculum*, *Treponema* and *Anaeroplasma* (Table 4a). As a consequence of an additive effect of oil and starch additions, *Rikenellaceae_RC9* abundance was lowest with HSO diet. Significant interactions between starch level and oil addition were also observed on some genera. The slope of the effect of starch addition on relative abundance was negative without oil addition and positive with oil addition for *Prevotella*, *Lachnospiraceae_Incertae_Sedis*, *Desulfovibrio* and *Bulleidia*; the highest abundances were observed with the HSO diet. The slope of the effect of starch addition on relative abundance was positive without oil addition and negative with oil addition for *Ruminococcaceae_Incertae_Sedis*, *Acetitomaculum*, *Anaerosinus* and *Bifidobacterium*, which exhibited very high percentages only with the HS diet. Concerning *Burytirivibrio* genus, it tended to be decreased by starch addition. In particular *Butyrivibrio proteoclasticus* or *hungatei* was significantly decreased by starch; *Butyrivibrio fibrisolvens* was present at low level and a trend toward an interaction between starch and oil addition led to the lowest value with HSO diet. Nevertheless, a lot of affected genera were unclassified or uncultured (Table 4b). In particular, unclassified and uncultured *Ruminococcaceae* and uncultured *Lachnospiraceae* presented lowest abundances with HSO diet.

Table 4a Bacterial genus and selected species (#) affected by dietary changes on day 12, ranked by family and average relative abundance order (% of total sequences)

Diets ^a	LS	LSO	HS	HSO	SEM	Effects ^b
Clostridia class						
<i>Lachnospiraceae</i>						
<i>Acetitomaculum</i>	1.34	2.05	3.06	1.18	0.13	O*, S*, O×S ***
<i>Incertae_Sedis</i>	1.91	1.51	0.53	3.08	0.39	O°, O×S*
<i>Butyrivibrio</i>	2.39	2.61	1.64	1.86	0.24	S°
<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> or <i>hungatei</i> [#]	0.86	0.67	0.45	0.24	0.12	S*
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> [#]	0.07	0.12	0.09	0.05	0.01	O×S°
<i>Butyrivibrio-Pseudobutyrovibrio</i>	0.73	0.61	0.16	0.17	0.05	S***
<i>Blautia</i>	0.30	0.65	0.13	0.16	0.07	O°, S*
<i>Lachnospira</i>	0.56	0.12	0.03	0.46	0.13	O×S°
<i>Catabacter</i>	0.12	0.13	0.03	0.01	0.02	S*
<i>Oribacterium</i>	0.01	0.03	0.06	0.15	0.02	S*
<i>Ruminococcaceae</i>						
<i>Incertae_Sedis</i>	4.18	5.34	12.01	1.52	1.71	O×S*
<i>Ruminococcus</i>	0.92	0.59	0.41	0.41	0.09	S*
<i>Fastidiosipila</i>	0.63	0.67	0.34	0.03	0.10	S*
<i>Oscillibacter</i>	0.52	0.49	0.27	0.03	0.07	S*
<i>Papillibacter</i>	0.15	0.14	0.06	0.02	0.03	S*
<i>Acetivibrio</i>	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	S**
<i>Ethanoligenens</i>	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	S*
<i>Clostridiaceae</i>						
<i>Acetanaeobacterium</i>	0.04	0.09	0.01	0.01	0.02	S*
<i>Sporacetigenium</i>	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	S*

<i>Veillonellaceae</i>							
	<i>Anaerosinus</i>	0.01	0.04	0.03	0.00	0.01	O×S*
<i>Unclassified Clostridales</i>							
	<i>Anaerovorax</i>	0.03	0.04	0.01	0.01	0.00	S***
Bacteroidia class							
<i>Prevotellaceae</i>							
	<i>Prevotella</i>	10.89	9.19	7.89	17.26	1.95	O×S°
<i>Rikenellaceae</i>							
	RC9	11.28	7.03	3.43	0.56	0.69	O*, S***
	<i>Petrimonas</i>	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	S*
<i>Porphyromonadaceae</i>							
	<i>Barnesiella</i>	0.96	1.31	3.17	4.09	0.66	S*
Actinobacteria class							
<i>Bifidobacteraceae</i>							
	<i>Bifidobacterium</i>	0.37	0.24	14.48	0.38	2.45	O°, S°, O×S°
<i>Corionobacteraceae</i>							
	<i>Olsenella</i>	0.18	0.13	0.71	2.48	0.56	S*
	<i>Atopobium</i>	0.15	0.19	0.08	0.05	0.03	S*
Spirochaetes class							
<i>Spirochaetaceae</i>							
	<i>Treponema</i>	0.20	0.06	0.09	0.02	0.02	O*, S°
Deltaproteobacteria class							
<i>Desulfobacteriaceae</i>							
	<i>Bilophila</i>	0.08	0.05	0.01	0.02	0.01	S*
	<i>Desulfovibrio</i>	0.02	0.00	0.01	0.07	0.01	O×S*

Mollicutes class (Tenericutes phylum)

Anaeroplasmataceae

<i>Anaeroplasma</i>	0.08	0.02	0.05	0.00	0.01	O**
---------------------	------	------	------	------	------	-----

Erysipelotrichaceae

<i>Bulleidia</i>	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	O*, S*, O×S*
------------------	------	------	------	------	------	--------------

^aLS = low starch diet, LSO = low starch + oil diet, HS diet = high starch diet, HSO = high starch + oil diet

^bEffects: O = effect of oil addition, S = high-starch versus low-starch diets, O×S = effect of interaction of starch by oil additions

[°]P<0.10; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

Table 4b Unclassified or uncultured bacterial genera species affected by dietary changes at day 12, ranked by average relative abundance order (% of total sequences)

Diets ^a	LS	LSO	HS	HSO	SEM	Effects ^b
Phylum;Class;Order;Family;Genera						
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ;unclassified	8.01	11.57	7.30	4.42	1.08	S*, O×S*
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ;uncultured	6.65	9.78	3.07	0.40	0.60	S***, O×S*
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;unclassified	2.88	4.50	2.32	2.52	0.30	O°, S*
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>BS11</i> ;unclassified	4.41	4.13	1.84	0.16	0.40	S**
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ;uncultured	2.43	2.26	2.55	0.79	0.25	O*, O×S°
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Prevotellaceae</i> ;uncultured	2.02	1.66	0.74	0.95	0.26	S*
Bacteroidetes;unclassified	1.51	1.25	0.66	0.48	0.13	S**
Firmicutes;unclassified	0.46	1.82	0.47	0.22	0.15	O*, S*, O×S *
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i> ;unclassified	0.57	0.88	0.26	0.32	0.03	O**, S***, O×S*
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>RF16</i> ;unclassified	1.18	0.35	0.42	0.07	0.12	O*, S*
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i> ;uncultured	0.47	0.78	0.17	0.18	0.06	O°, S**
Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Rikenellaceae</i> ;unclassified	0.49	0.37	0.11	0.17	0.04	S**
Fibrobacteres;Fibrobacteria;Fibrobacterales; <i>Fibrobacteraceae</i> ;uncultured	0.34	0.19	0.11	0.01	0.04	O*, S**
Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Veillonellaceae</i> ;unclassified	0.05	0.14	0.31	0.15	0.04	S*, O×S*

^aLS = low starch diet, LSO = low starch + oil diet, HS diet = high starch diet, HSO = high starch + oil diet

^bEffects: O = effect of oil addition, S = high-starch versus low-starch diets, O×S = effect of interaction of starch by oil additions

°P<0.01; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

Discussion

Average microbial community

In this study, high throughput sequencing approach proved to be a powerful tool to reveal rumen bacterial diversity, and effects of diet on that diversity. It also gave much greater coverage of bacterial diversity than could be provided by other molecular diversity techniques (fingerprints, cloning...). Our 16S rRNA pyrosequencing revealed that, at the phylum level, the microbial community of the cows, regardless of individual and diet, was dominated by Firmicutes and Bacteroidetes. This microbial distribution of major phyla is similar to those found with culture-based and standard molecular approaches (Stewart et al., 1997) suggesting that Firmicutes and Bacteroidetes play important roles in the ruminal metabolism (Turnbaugh et al., 2006, 2008). Similarly, the most abundant classes observed in this study were Clostridia and Bacteroidia. At the family level, common features between this study and other rumen 16S rRNA gene studies (Koike et al., 2003; Edwards et al., 2004; Kong et al., 2010) included the dominance of *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Prevotellaceae*. The fourth prevalent family was Bacteroidales unclassified, which fits with the results of Kong et al. (2010). *Rikenellaceae* had 5.9% relative abundance, which is consistent with the observation of Pitta et al. (2010) but higher than the results Kong et al. (2010). *Bifidobacteriaceae* were strongly represented in our samples (4% relative abundance in average). They were not found by Pitta et al. (2010) in cattle receiving forage diets or by Callaway et al. (2010) in cattle receiving very high concentrate diets, but were found in the study of Boguhn et al. (2010) in the rumen of dairy cows with diets that were similar to ours.

Our study, using short-length pyrosequencing, was not able to identify the bacterial groups at species level, but allowed identification of numerous genera, part of them being uncultured or unclassified (Tables 2a and 2b). Our observed predominance of *Prevotella* is in accordance with both results of Callaway et al. (2010), using high concentrate diets, and Pitta et al. (2010) who found, with pasture wheat diet, that *Prevotella* was the major ruminal genus, representing up to 52% of total bacteria of rumen content. These authors also found a high abundance of *Rikenella*-like bacteria, which could correspond to our results, showing *Rikenellaceae_RC9* being among the most abundant genus of ruminal bacteria. We also found high relative abundances of *Ruminocaccaceae* genera, including *Incertae-sedis* and *Ruminococcus*, and *Lachnospiraceae* genera, including *Butyrivibrio*, *Acetitomaculum*, *Incertae-Sedis*, *Moriella* and *Syntrophococcus*.

Fibrobacter and *Ruminococcus* species are major cellulolytic bacteria in the rumen. In our study, the *Ruminococcus* genus represented 0.58% of total bacteria, in average. These results contrast with those of Palmonari et al. (2010), who found that *Ruminococcus albus* represented more than 10% of total 16S rRNA. However, in our study, a *Ruminococcaceae Incertae-sedis* represented about 6% of total bacteria. Similarly, Kong et al. (2010) found a much higher abundance of *Ruminococcaceae unclassified* than *Ruminococcus*.

The *Fibrobacteraceae* family accounted for almost 10% of the sequences in the study of de Menezes et al. (2011), whereas in the study of Callaway et al. (2010), this family seemed to be minor as it was not mentioned and Pitta et al. (2010) noticed that the genus *Fibrobacter* was not abundant. In our study, the relative abundance of *Fibrobacteraceae* was only 0.16% in average of total bacterial community, which could be due to all diets containing starch, not suitable for the growth or the activity of fibrolytic bacteria in general, as it was demonstrated by Klieve et al. (2003). Moreover, *Fibrobacter* DNA is known to be difficult to amplify (Tajima et al., 2001). So the difference between results of the different experiments could reflect PCR bias. Besides, comparison between results must be done with caution because studies using targeted specific bacterial species are different from pyrosequencing approach which poses no such restrictions.

Effects of diets

The washout period was successful in restoring a microbiota that did not depend on the experimental diet given during the previous period (Figure 2). Sequencing analysis revealed that diets affected bacterial communities, which could relate to diet being used as a growth substrate for ruminal bacteria, and/or from diet potentially resulting in toxic or inhibiting effects on the ruminal bacteria, due to dietary components or results of diet fermentation. Our deep sequencing enabled quantitative study of the effects of diet on gut microbiota. The comparison of the relative abundances of total ruminal microbiota by nMDS plot (Figure 3) showed that cows fed LS and LSO diets were very close in the plot suggesting similarities in the bacterial community compositions and showing that sunflower oil addition did not modify the microbiota. On the contrary, dietary starch affected the ruminal bacterial community, which was clearly separated from that of cows fed low starch diet. Interestingly, the combination of starch and oil supplementations modified the composition of the bacterial community, which was different from that induced by starch addition alone.

Most effects of starch addition were observed at the genus level. Starch addition increased the relative abundance of a very limited number of genera belonging to Firmicutes (Table 4),

including *Oribacterium* and *Bulleidia*, which have only recently been identified in the rumen of cows fed forage based diets (Kong et al., 2010; Kenters et al., 2011), and whose functions in the rumen are not known. To our knowledge, effects of diet on the abundance of these genera have not been published. Starch addition tended ($P = 0.071$) to increase the abundance of *Selenomonas*, a starch utilizing bacteria, but in a much more narrow range than observed by Tajima et al. (2001), whose dietary changes were much more important than ours. Previous studies, investigating the effects of dietary starch addition on ruminal bacteria showed variable effects on *Streptococcus bovis* (Tajima et al., 2001; Palmonari et al., 2010; Fernando et al., 2010), another amylolytic bacteria, involved in ruminal acidosis. The relative abundance of *Streptococcus* exhibited a wide variability in our dataset, so that the effect of starch addition was not statistically significant ($P = 0.28$). Similarly, the relative abundance of *Lactobacillus* was 0.04%, and the diet did not affect this genus, consistent with Brown et al. (2006), who reported increases of this genus only when the diets contained 71% of concentrate.

Starch addition to the diet also decreased the relative abundance of *Ruminococcaceae* family, including *Ruminococcus*, a major cellulolytic genus (Bryant 1959). *Ruminococcus flavefasciens* has already been shown to be highly depressed when switching from hay to grain diet (Tajima et al., 2001). However, in our study, the most affected genera by starch addition were *Rikenellaceae_RC9* and *Anaerovorax*, which have not been extensively studied in the rumen, and the genus *Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio*. Other *Lachnospiraceae* also were negatively affected by the high starch diets, including *Butyrivibrio proteoclasticus* or *hungatei*. In our study, *Butyrivibrio fibrisolvens* was not affected by the single effect of starch addition, as opposed to the results of Fernando (2010). However, in this latter study, the reference values were obtained when animals received a diet containing only hay, progressively changed to a diet containing 80% grain, which represents a more important dietary change than our switch from 20 to 35% starch.

Besides these observed differences in the Firmicutes phylum, we also observed differences due to dietary starch level in the relative abundances of the quantitatively minor phyla Fibrobacteres and Spirochaetes, whose relative abundances were decreased by more than 2 times when the dietary starch level increased. A decreased abundance of Spirochaetes has already been described by de Menezes et al. (2011) when switching from 100% to 36% forage in the diet, and increasing dietary starch resulted in a strong decrease of *Fibrobacter succinogenes* in the experiment of Tajima et al. (2001). On the contrary, de Menezes et al. (2011) observed that a concentrate diet resulted in a higher abundance of *Fibrobacteraceae*

than a forage diet, and explained this paradoxical effect by the presence of straw in their concentrate diet. In our experiment, the high starch diets had less fibrous material than the low starch diets, so this paradoxical effect was not observed. In the Bacteroidetes phylum, *Barnesiella*, which has recently been identified in the ruminal content (Kim, Morrison, & Yu 2011), was strongly and positively affected by starch addition. Starch addition did not affect the predominant genus *Prevotella* but lowered the relative abundance of *Prevotellaceae* uncultured. In the Actinobacteria phylum, the addition of starch increased the abundance of *Bifidobacterium* and *Olsenella* genera but decreased that of *Atopobium* genus. Informations about these genera were not commonly found in the literature except *Bifidobacterium* genus which seems to be implicated in the production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers (Gorissen et al., 2010; Park et al., 2011). *Bifidobacterium* spp. have been identified in animals receiving diets rich in starch, which implies a role for these microorganisms in the hydrolysis of this carbohydrate; hence, they can ferment starch to produce acetic and lactic acids (Stewart et al., 1997).

The genera *Olsenella*, *Atopobium* and *Bifidobacterium* constitute the high-G+C-content group of the lactic acid bacteria that ferment carbohydrates to predominant (*Olsenella*, *Atopobium*) or important (*Bifidobacterium*) amounts of lactic acid (Kraatz et al., 2011). *Olsenella* and *Atopobium* genera have already been found in the rumen of sheep and present sequence similarities (Kraatz et al., 2011).

Uncultured or unclassified bacteria also were also negatively affected by starch addition (Table 4b), the three most abundant affected genera being Clostridiales.

Oil addition had only a positive effect on *Bulleidia* and two unclassified taxa (Firmicutes; unclassified and Clostridiales; Family_XIII_Incertae_Sedis; unclassified). Oil addition negatively affected some minor or poorly known genera, but had no significant effect on *Butyrivibrio proteoclasticus* or *hungatei*, and interacted with the effects of starch addition for *Butyrivibrio fibrisolvens*, whose lowest relative abundance was observed with the HSO diet. These three *Butyrivibrio* species are known to be able to biohydrogenate unsaturated fatty acids. Contrary to our results, Maia et al. (2007) showed in pure cultures that many bacteria, including *Butyrivibrio hungatei*, *Butyrivibrio. proteoclasticus*, together with cellulolytic bacteria belonging to the *Ruminococcus* and *Fibrobacter* genera, have increased lag phases when the medium contains linoleic acid. In our experiment, the limited effect of sunflower oil on these species could be due to differences between in vivo and in vitro studies, for example due to interferences with other bacterial species or substrates. In vivo, Belenguer et al. (2010) did not find any effect of 2% sunflower oil in the diet of ewes on the

abundances of *Butyrivibrio* involved in ruminal biohydrogenation.. Similarly, in the rumen of cows, Yang et al. (2009) did not evidence any effect of dietary addition of 4% of soybean oil, another high linoleic acid fat, on the amount of *Butyrivibrio fibrisolvens*, and showed a negative effect on *Fibrobacter succinogenes*, and *Ruminococcus albus* but not *Ruminococcus flavefaciens*. In our experiment, we could not discriminate between species of *Ruminococcus*, and since in the experiment of Yang et al. (2009), *Ruminococcus flavefaciens* abundance was 100 times that of *Ruminococcus albus*, our lack of oil effect on the *Ruminococcus* genus is consistent with their results.

The *Prevotella* genus comprises a wide range of species, with different variations due to dietary starch level (Tajima et al., 2001) and whose in vitro sensitivity to oil is low (Maia et al., 2007). In the present experiment, the relative abundance of this genus was not affected by single effects of starch or oil addition, but was strongly affected by an interaction between starch and oil additions: switching from LS to HS diet slightly decreased their relative abundance whereas switching from LSO to HSO diet resulted in a 2 times increase of relative abundance. Such interaction, resulting in highest relative abundances with the HSO diet, was also observed on *Lachnospiraceae Incertae_Sedis*, *Desulfovibrio*, and *Bulleida*. An opposite interaction between starch and oil, with the lowest relative abundance being found with the HSO diet, was observed for *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerostipes*, *Acetivibrio*, *Ruminococcaceae Incertae_Sedis*, *Ruminococcae* unclassified, *Ruminococcae* uncultured, *Lachnospiraceae* uncultured and Firmicutes unclassified. Interestingly, bacteria involved in interactions between starch and oil in our experiment in part fit with the results of Huws et al. (2011). These authors found that putative taxonomic identification of many terminal restriction fragments associated with *trans*-11 18:1 and *cis*-9,*trans*-11 CLA, intermediates of ruminal biohydrogenation of dietary unsaturated fatty acids, revealed that more than 60% of the predicted phylotypes belonged to the genera *Prevotella*, *Lachnospiraceae Incertae Sedis* and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridia*, *Ruminococcaceae* and *Lachnospiraceae*.

In conclusion, this study, based on 16S rRNA pyrosequencing of ruminal microbiota sampled from cows fed different diets, provided a detailed account of the microbial community inhabiting the rumen and the effects of four diets on the bacterial relative abundances of some bacterial groups. The diets had significant effects in shaping the microbial community in the rumen of dairy cows, in particular starch and starch plus oil addition. Microbial profile was primarily predominated by Firmicutes and Bacteroidetes, and a large portion of the bacteria genus and species were not identified because not yet cultured. With a better understanding of

the microbial diversity in dairy cows, future studies would aim to investigate their relationship with digestion products and efficiency in order to elucidate their functional roles. Such a study should be of great interest for researchers investigating rumen microbial ecology and would facilitate possible discoveries of novel enzymes that are involved in rumen digestion, as well as microbial-associated pathways.

References

- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P. & Engstrand, L. (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS One*, 3, e2836.
- Belenguer, A., Toral, P.G., Frutos, P. & Hervás, G. (2010) Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 93, 3275-3286.
- Boguhn, J., Neumann, D., Helm, A., Strobel, E., Tebbe, C.C., Dänicke, S. & Rodehutsorda, M. (2010) Effects of concentrate proportion in the diet with or without Fusarium toxin-contaminated triticale on ruminal fermentation and the structural diversity of rumen microbial communities in vitro. *Archives of Animal Nutrition*, 64, 467-483.
- Brooks, C.C., Garner, G.B., Muhrer, M.E. & Pfander, W.H. (1954) Effect of some steroid compounds on ovine rumen function. *Science (New York, N.Y.)*, 120, 455-456.
- Brown, M.S., Ponce, C.H. & Pulikanti, R. (2006) Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *Journal of Animal Science*, 84 Suppl, E25-33.
- Bryant, M. (1959) Bacterial species of the rumen. *Bacteriological Reviews*, 23, 125-153.
- Callaway, T.R., Dowd, S.E., Edrington, T.S., Anderson, R.C., Krueger, N., Bauer, N., Kononoff, P.J. & Nisbet, D.J. (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. *Journal of Animal Science*, 88, 3977-3983.
- Edwards, J.E., McEwan, N.R., Travis, A.J. & Wallace, R.J. (2004) 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86, 263-281.
- Enjalbert, F. & Troegeler-Meynadier, A. (2009) Biosynthesis of trans fatty acids in ruminants. *Trans fatty acids in human nutrition* p. 1–31. The Oily Press, Bridgwater, UK.
- Fernando, S.C., Purvis, H.T., Najar, F.Z., Sukharnikov, L.O., Krehbiel, C.R., Nagaraja, T.G., Roe, B.A. & Desilva, U. (2010) Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to

a High Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*.

Gorissen, L., Raes, K., Weckx, S., Dannenberger, D., Leroy, F., De Vuyst, L. & De Smet, S. (2010) Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2257-2266.

Huws, S.A., Kim, E.J., Lee, M.R.F., Scott, M.B., Tweed, J.K.S., Pinloche, E., Wallace, R.J. & Scollan, N.D. (2011) As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae* incertae sedis and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environmental Microbiology*, 13, 1500-1512.

Huws, S.A., Lee, M.R.F., Muetzel, S.M., Scott, M.B., Wallace, R.J. & Scollan, N.D. (2010) Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 396-407.

Kelly, W.J., Leahy, S.C., Altermann, E., Yeoman, C.J., Dunne, J.C., Kong, Z., Pacheco, D.M., Li, D., Noel, S.J., Moon, C.D., Cookson, A.L. & Attwood, G.T. (2010) The glycobiome of the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus* B316(T) highlights adaptation to a polysaccharide-rich environment. *PloS One*, 5, e11942.

Kenters, N., Henderson, G., Jeyanathan, J., Kittelmann, S. & Janssen, P.H. (2011) Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *Journal of Microbiological Methods*, 84, 52-60.

Kim, M., Morrison, M. & Yu, Z. (2011) Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, 49-63.

Kim, Y.J., Liu, R.H., Rychlik, J.L. & Russell, J.B. (2002) The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 976-982.

Klieve, A.V., Hennessy, D., Ouwkerk, D., Forster, R.J., Mackie, R.I. & Attwood, G.T. (2003) Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 621-630.

Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. & Tanaka, K. (2003) Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229, 23-30.

Kong, Y., Teather, R. & Forster, R. (2010) Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiology Ecology*, 74, 612-622.

- Kraatz, M., Wallace, R.J. & Svensson, L. (2011) *Olsenella umbonata* sp. nov., a microaerotolerant anaerobic lactic acid bacterium from the sheep rumen and pig jejunum, and emended descriptions of *Olsenella*, *Olsenella uli* and *Olsenella profusa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 795-803.
- Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., Schlegel, M.L., Tucker, T.A., Schrenzel, M.D., Knight, R. & Gordon, J.I. (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science (New York, N.Y.)*, 320, 1647-1651.
- Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R. & Gordon, J.I. (2008) Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews. Microbiology*, 6, 776-788.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D. & Knight, R. (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, 35, e120.
- Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y. & Doreau, M. (2004) Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87, 2472-2485.
- Maczulak, A.E., Dehority, B.A. & Palmquist, D.L. (1981) Effects of long-chain Fatty acids on growth of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 856-862.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Bestwick, C.S., Richardson, A.J., McKain, N., Larson, T.R., Graham, I.A. & Wallace, R.J. (2010) Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, 10, 52.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L. & Wallace, R.J. (2007) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 303-314.
- de Menezes, A.B., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B.F., Clipson, N. & Doyle, E.M. (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. & Cauquil, L. (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*, 9, 1359-1363.
- Palmonari, A., Stevenson, D.M., Mertens, D.R., Cruywagen, C.W. & Weimer, P.J. (2010) pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 279-287.
- Park, H.G., Heo, W., Kim, S.B., Kim, H.S., Bae, G.S., Chung, S.H., Seo, H. & Kim, Y.J.

(2011) Production of conjugated linoleic acid (CLA) by *Bifidobacterium breve* LMC520 and its compatibility with CLA-producing rumen bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 984-988.

Pitta, D.W., Pinchak, E., Dowd, S.E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J.D., Wickersham, T.A. & Malinowski, D.P. (2010) Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microbial Ecology*, 59, 511-522.

Privé, F., Combes, S., Cauquil, L., Farizon, Y., Enjalbert, F. & Troegeler-Meynadier, A. (2010) Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid in vitro. *Journal of Dairy Science*, 93, 711-722.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. & Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35, 7188-7196.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. & Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 7537-7541.

Stewart CS, Bryant MP, J.P. (1988) The rumen bacteria. *The rumen microbial ecosystem* p. 21-76. Elsevier, London and New York.

Stewart, C., Flint, H. & Bryant, M. (1997) The rumen bacteria. *The Rumen Microbial Ecosystem* p. 10-72. Blackie Academic and Professional, London.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Benno, Y. (2001) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2766-2774.

Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, 3, 213-223.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-1031.

Yang, S.L., Bu, D.P., Wang, J.Q., Hu, Z.Y., Li, D., Wei, H.Y., Zhou, L.Y. & Looor, J.J. (2009) Soybean Oil and Linseed Oil Supplementation Affect Profiles of Ruminal Microorganisms in Dairy Cows. *animal*, 3, 1562-1569.

ANNEXE 2

Effet du jour de prélèvement sur les populations bactériennes

Dans le cadre du Pyroséquençage 454 GS FLX décrit dans l'article précédent, des prélèvements réalisés en début de distribution des rations expérimentales (J2) avaient également été analysés. Les données présentées ci-dessous rapportent uniquement les familles bactériennes pour lesquelles un effet du jour de prélèvement (J2 vs. J12) ou une interaction entre le jour de prélèvement et un composant de la ration a été noté ($P < 0,05$, Tableau 13). Pour rappel, les 4 rations expérimentales étaient à base d'ensilage de maïs : une ration témoin (T ; F/C⁴ = 83/17), une ration riche en amidon (A ; F/C = 38/62), une ration riche en huile (H ; F/C = 78/22) et une ration riche en amidon et en huile (AH ; F/C = 32/68). Le plan expérimental était un carré latin : 4 vaches taries × 4 rations × 4 périodes.

Dans le rumen des vaches recevant les rations T et H, l'abondance relative des familles bactériennes du tableau 13 était peu modifiée entre J2 et J12, excepté la famille des *Porphyromonadaceae* et les *Bacteroidales unclassified* (diminution de leur abondance). Par contre, dans le rumen des vaches recevant des rations enrichies en amidon, A et AH, l'abondance relative des *Lachnospiraceae* et des *Prevotellaceae* était supérieure et celle des *Family_XIII_Incertae_Sedis*, *Ruminococcaceae* et *BS11* était inférieure à J12 par rapport à J2. Pour les *Porphyromonadaceae*, l'effet du jour de prélèvement n'était visible que pour les rations non enrichies en amidon. Pour les *Bacteroidales unclassified*, l'abondance diminuait entre J2 et J12 pour les régimes sans addition d'amidon, et augmentait dans le même temps pour les régimes enrichis en amidon.

⁴ F/C = ratio %fourrages / %concentrés dans la ration en MS

Tableau 13. Effet du jour de prélèvement (J), de l'addition d'amidon (A) et d'huile (H) dans la ration des vaches, et leurs interactions. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

	Effets observés
<i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i>	J*, A×J*
<i>Lachnospiraceae</i>	A*, J*, A×J*
<i>Ruminococcaceae</i>	A*, J*, A×J*, A×H×J**
<i>BS11</i>	A×J*
<i>Porphyromonadaceae</i>	A×J*
<i>Prevotellaceae</i>	A*, J*
<i>Bacteroidales unclassified</i>	A*, A×J*

Conclusion :

Les modifications temporelles des abondances des familles bactériennes sont à rapprocher des modifications temporelles enregistrées au niveau des paramètres fermentaires et des acides gras longs, et soulignent l'importance des phénomènes d'adaptation de l'écosystème ruminal, et en particulier du microbiote.

ARTICLE 6

La déviation de la voie *trans* 11 vers la voie *trans* 10 provoquée par une ration riche en amidon et en huile est associée à une modification de l'écologie microbienne du rumen évaluée par un pyroséquençage 454 GS FLX (en préparation)

L'équilibre microbien dans le rumen a un impact direct sur la productivité et la santé des animaux. Une modification de cet équilibre peut induire l'apparition de produits de digestion indésirables, par exemple d'isomères t10 issus de la biohydrogénation ruminale des acides gras insaturés. Deux bactéries ruminales semblent être capables de synthétiser les AG t10 *in vitro* : *Propionibacterium acnes* et *Megasphaera elsdenii*, mais leur action réelle dans le rumen est encore très controversée. Dans des conditions normales, les isomères majoritairement produits sont les t11, ils résulteraient principalement de l'action de certaines *Butyrivibrio*, surtout *Butyrivibrio fibrisolvens*. Toutefois, jusqu'à présent, les études concernant la communauté bactérienne du rumen sont uniquement descriptives, c'est pourquoi une approche plus fonctionnelle recherchant des relations entre la variation du microbiote et la production de t10 et de t11 a été menée afin de mieux comprendre les mécanismes de cette déviation. Dans cette étude, un pyroséquençage à haut débit basé sur l'ARNr 16S a été utilisé afin d'évaluer la diversité de la communauté bactérienne dans le contenu ruminal de vaches recevant 4 rations différentes (combinant deux niveaux d'amidon, 20 vs. 35% et deux niveaux d'huile de tournesol 0 vs. 5%). Ces rations ont permis d'obtenir une large gamme de valeurs quant aux proportions de t10 et de t11 dans le contenu ruminal. Dans cette étude, bien que le genre *Butyrivibrio* soit présent à 2,39% (abondance relative), il n'a pas été corrélé à la proportion de t11, d'ailleurs aucun genre n'a été corrélé à celle-ci. Les deux taxa corrélés positivement à la proportion de t11 dans le rumen ont été : *Clostridiales* unclassified et Firmicutes unclassified ($r = 0,618$ et $0,747$), suggérant que les bactéries responsables de la production de t11 dans le rumen ne sont pas encore toutes identifiées. Quelques genres ont été identifiés comme positivement corrélés à la proportion de t10 : *Eubacterium*, *Bulleidia*, *Olsenella*, *Dialister*, and *Desulfovibrio* ($r = 0.813$, 0.773 , 0.754 , 0.740 et 0.691 , respectivement), qui sont des genres plus ou moins impliqués dans le métabolisme ruminal du lactate, et *Syntrophococcus* ($r = 0.781$), dont la croissance connue pour être optimisée par les acides gras à 18 carbones.

**Trans11 to trans10 shift of fatty acids ruminal biohydrogenation
is linked to changes of rumen microbiota evaluated by 454 GS
FLX pyrosequencing**

**Zened A.*†, Troegeler-Meynadier A.*†, Cauquil L.*†, Mariette J.[#], Klopp C.[#], Dejean S.
‡, Gonzalez I. ‡, Bouchez O.[#], Enjalbert F.*†, Combes S.*†.**

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

† Université de Toulouse, INPT, ENVT, ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion, F-31076 Toulouse Cedex 3, France

[#] INRA, Plateforme bio-informatique Genotoul, Biométrie et Intelligence Artificielle, F-31326 Castanet-Tolosan, France

‡ Institut de Mathématiques, Université Paul Sabatier, 31062 Toulouse cedex 9, France.

Corresponding author: Sylvie COMBES

INRA UMR 1289 / INP-ENSAT/ INP-ENV'T 'TANDEM'

Chemin de Borde Rouge, BP52627

31326 Castanet-Tolosan - France

Phone: +33 5 61 28 51 06

Fax: +33 5 61 28 53 19

Email address: sylvie.combes@toulouse.inra.fr

Abstract

Ruminal microbiota plays an important role in ruminants' health and productivity. Ruminal metabolism of dietary fatty acids (FA) converts polyunsaturated FA (PUFA) to saturated FA, and this biohydrogenation (BH) produces FA with usually a *trans*11 (t11) double-bond. High starch and high oil diets are known to result in a shift of BH pathway from t11 to *trans*10 (t10) isomers, and t10 FA are known to decrease milk fat content and to potentially negatively affect human consumer health. The present study, using a high-throughput 16S rRNA-based pyrosequencing, aimed to provide a comprehensive examination of the bacterial diversity found in the rumen content of cows fed four different diets (two levels of starch combined with two levels of unsaturated fat), leading to wide ranges of t10 and t11 proportions. A multivariate regression (sPLS) was used for statistical analysis.

Among taxa that positively correlated with t11 FA, unclassified *Clostridiales* and unclassified Firmicutes showed the highest correlations ($r = 0.618$ and 0.747 , respectively), suggesting that the major t11 producers are still unknown. Some genera were identified to be strongly and positively correlated with t10 FA: *Eubacterium*, *Bulleidia*, *Olsenella*, *Dialister*, and *Desulfovibrio* ($r = 0.813$, 0.773 , 0.754 , 0.740 and 0.691 , respectively), all more or less implicated in lactate ruminal metabolism and *Syntrophococcus* ($r = 0.781$), which needs octadecenoic FA for an optimal growth. These genera also positively correlated with rumen pH and acetate:propionate ratio. *In vitro* cultures would be needed to ascertain the capacity of these taxa to produce t10 isomers.

Introduction

Knowledge about the gastrointestinal microbial population of ruminants is important to consider in order to improve host health and productivity. A complex microbial community inhabits the rumen. Most of the ruminal digestion of plant material ingested by the animal is due to bacteria. They are responsible of degradation of dietary polysaccharides to volatile fatty acids (VFA), which are the main energetic fuels of ruminants, degradation of a major part of dietary proteins, synthesis of microbial protein, lipolysis of dietary fat and biohydrogenation (BH) of unsaturated fatty acids (FA).

The diet has an effect on the equilibrium of ruminal microbiota so that its efficiency can be strongly affected by dietary changes and such modifications could lead to alterations of ruminant production. In ruminant products, FA, which are of interest for consumer's health, in part originate from the ruminal digestion of dietary FA. The main feature of this digestion is BH of polyunsaturated FA (PUFA), which comprises several successive reactions. For

linoleic acid, the three successive steps are an isomerisation to conjugated linoleic acids (CLA), followed by a reduction to *trans* octadecenoic FA, further reduced to stearic acid (Enjalbert and Troegeler-Meynadier, 2009). Recent data indicate that this BH is a detoxification process necessary to prevent the bacteriostatic effect of unsaturated FA (Maia et al., 2010). Dietary unsaturated FA have been shown to inhibit the growth of numerous bacteria in *in vitro* pure cultures (Maczulak et al., 1981; Maia et al., 2007), but recent *in vivo* experiments showed more variable and limited effects (Yang et al., 2009; Belenguer et al., 2010; Huws et al., 2010). *Butyrivibrio fibrisolvens*, a fibrolytic bacteria, is usually assumed to be the main biohydrogenating bacteria in the rumen and produces t11 FA as major intermediates of PUFA BH, these FA having some benefits for human health. The interaction of high dietary starch level by fat supplementation is known to affect the BH pathway, leading to a shift from t10 to t11 BH intermediates (Lor et al., 2004). *Trans*10 FA induce milk fat depression in dairy cows and have potentially deleterious effects for human consumers. Few cultivated bacterial species are known to synthesize t10,c12-CLA from linoleic acid. Isolates of the t10,c12-CLA-producing *Propionibacterium acnes* have been found in the rumen (Verhulst et al., 1987) and a strain of *Megasphaera elsdenii*, another lactate consuming bacteria isolated from the rumen, has also been reported to produce t10,c12-CLA in media with high starch level supplemented with PUFA (Kim et al., 2002). These bacteria producing t10 or t11 isomers have been identified with culture based studies, which do not preclude that other rumen bacteria also product t10 and t11 FA and be involved in the t11 to t10 shift of BH.

Although several studies have used molecular based culture-independent techniques to investigate the profiles of bacteria in the rumen (Edwards et al., 2004; McEwan et al., 2005), few results correlated these findings with products of ruminal digestion. Molecular methods utilizing rapid deep sequencing methods, such as pyrosequencing, are now being used to evaluate differences in the microbial diversity of complex ecosystems (Roesch et al., 2007). So, in the present experiment, a study based on pyrosequencing was used, to investigate the relationship between changes of ruminal microbiota and changes of t10 and t11 isomers proportions induced in dairy cows by diets varying in starch and oil levels.

Material and methods

Experimental design

Four dry ruminally fistulated Holstein cows were assigned to a 4×4 Latin square design with 4 different diets based on corn silage and soybean meal during 4 periods. The low starch diet

(LS) contained alfalfa hay (21.5% starch, 2.9% fat and 39.7% neutral detergent fiber, on dry matter basis). In the low starch plus oil diet (LSO), 4.8% of the LS diet was replaced with sunflower oil, a high linoleic acid fat source. In the high starch diet (HS), alfalfa hay was removed and incorporation of mixture of wheat and barley increased the starch content to 34.8% and decreased the NDF content to 30.9%. The high starch plus oil diet (HSO) was enriched with both a mixture of wheat and barley and sunflower oil. The composition of the diets is shown in Table 1. Cows were housed in individual stalls and received 12.5 kg of DM daily, in two equal meals at 08:00 and 17:00 and were allowed ad libitum access to water. Periods were divided into a two weeks of washout subperiod during which all cows received the LS diet, and two weeks of treatment subperiod, during which each cow received one of the four experimental diets. In order to avoid carry-over effects, treatment orders were different among cows : (HSO, LSO, HS and LS for cow 1; LSO, LS, HSO, HS for cow 2; LSC, HS, LSO, HSO for cow 3; HS, HSO, LS, LSO for cow 4). A total of 50 ruminal samples were taken from cow, 5 hours post feeding on throughout the treatment subperiod and strained through a metal sieve (1.6 mm mesh). The pH was measured, 0.2 g of filtrate was stored at -80°C in a 2-mL sterile Eppendorf tube, RNase and DNase free and 5mL were transferred to 10mL vials with 0.5mL of 2% HgCl₂ for VFA analysis.

DNA extraction

Total DNA was extracted from 0.2 g of ruminal sample, combining a mechanic lysis with a FastPrep instrument (MP Biomedicals) and the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nano- Drop Technologies, Wilmington, DE).

16S rRNA gene amplicon pyrosequencing

Amplicons from the V3 to V4 regions of 16S rRNA genes of day 12 were amplified with bacterial forward 343F (TACGGRAGGCAGCAG; (Liu et al., 2007) and reverse 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT; (Andersson et al., 2008) primers. Each primer had a barcode sequence of ten nucleotides on 5' which was unique for each sample. PCRs were performed in a total volume of 100 µL) containing 1X PCR buffer, 200 µM of dNTP, 1U IsisTM DNA polymerase (MP Biomedicals), 0.5 µM of forward and reverse primers, and 1µL of DNA.

Table 1 *Ingredients and chemical composition of donor cow diets*

Diets ^a	LS	LSO	HS	HSO
Ingredients (% of DM ^b)				
Maize silage	68.7	63.2	37.7	32.3
Alfalfa hay	14.3	14.3	0.0	0.0
Wheat and barley mix	0.0	0.0	48.5	48.5
Soybean meal	15.5	16.2	12.4	13.1
Sunflower oil	0.0	4.8	0.0	4.7
Minerals and vitamins ^c	1.5	1.5	1.5	1.5
Composition (% of DM ^b)				
Crude protein	14.6	14.6	14.2	14.2
Neutral detergent fiber	39.7	37.3	30.9	28.6
Starch	21.5	19.8	34.8	33.1
Crude fat	2.9	7.6	2.7	7.3

^aLS = low starch diet, LSO = low starch + oil diet, HS diet = high starch diet, HSO = high starch + oil diet

^bDM = dry matter

^cContained (per kg of premix, DM basis) P: 40g, Ca: 260g, Mg: 50g, Na: 20g, Zn: 5g, Mn: 4g, Cu: 1g, I: 40 mg, Co: 20 mg, Se: 20mg, vitamin A: 450 000 IU, vitamin D3: 100 000 IU and vitamin E: 1 500 IU.

The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min; 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s; and a final extension step at 72°C for 7 min. PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, France) followed by DNA yield quantification and quality estimation using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. The size of the PCR products was confirmed by gel electrophoresis. The purified PCR products were quantified using Quant-iT PicoGreen ds DNA Assay kit (Invitrogen, France) on a ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems) and then mixed in equimolar amounts to a final DNA concentration of 1000 ng/μL for each library.

The pooled amplicons were pyrosequenced using an on 454 FLX Titanium (454 Life Sciences—a Roche Company, Branford, CT, USA) sequencer at the GeT (Genomic and Transcriptomic) platform of Toulouse. Sequencing occurred on a picotiter plate, of which a half space was available for samples included in this study. To facilitate pyrosequencing using titanium chemistry, each forward primer was appended with the titanium sequencing adaptor A and the reverse primer carried the titanium adaptor B at the 5' end.

Pyrotag handling and analysis

A total of 248 594 16S rDNA sequences (also referred to as 16S pyrotags) were obtained from 454 Titanium pyrosequencing run. The 16S pyrotags were sorted based on their respective barcodes to form a total of 50 pyrotag library representing the 50 collected ruminal samples. Sequences were filtered using a Python script developed by the platform bioinformatic of Toulouse, 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 primers, barcodes and adaptor sequences, and had an average read length of 370 nucleotides after trimming.

Taxonomical classification

After cleaning, raw sequences were analyzed using MOTHUR software (v 1.12; Schloss et al., 2009). Reads were aligned over SILVA alignment database (Pruesse et al., 2007). After calculating a pairwise distance between aligned sequences, they were clustered into OTU (cutoff 0.03). Taxonomic assignation was performed with a bootstrap of 60. A taxonomic profile could be built for each of the fifty samples. A fifty-row matrix was constructed with the 360 taxa identified, sorted in alphabetic order in column.

Chemical analysis

Concentrations of VFA were determined by the method of Playne (1985) using automated gas separation, modified as follows: the ruminal samples were first centrifuged at 4000 x g for 20 minutes to separate the liquid phase. For protein removal, 1 mL of supernatant was mixed with 200 µL of 25 % metaphosphoric acid and further centrifuged at 20 000 x g for 15 minutes. One mL of supernatant was added to 200 µL (1% v/v) of 4-methylvaleric acid as internal standard and 1 µL of the mixture was then injected into a gas chromatograph (Hewlett Packard, Model 5890 Series II equipped with FID detector, Avondale, PA). Ruminal fluids were analyzed for FA contents and profiles. The FA were extracted and methylated using the procedure of (Park & Goins, 1994), except that the solution of 14% boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanolacetylchloride (10:1 v/v). Nonadecanoic acid (Sigma Co., St. Louis, MO) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg. Fatty acid methyl esters were quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, equipped with a model 7683 auto injector, Network GC System, Palo Alto, CA) using a fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm ID, 0.20 µm film thickness; CPSil88, Varian, Middelburg, the Netherlands), according to the two temperature programs detailed in (Zened et al., 2011). Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St. Louis, MO) except C18:1 FA other than t9-C18:1, t11-C18:1 and c9-C18:1 which were identified by order of elution.

Calculations and statistical analysis

Sums of t10 and t11 isomers were obtained by adding assayed t10 and t11 isomers:

Sum of t10 isomers = t10,c12-CLA + t10-C18:1

Sum of t11 isomers = c9, t11-CLA + t9,t11-CLA + t11-C18:1

t10/ t11 ratio = sum of t10 isomers / sum of t11 isomers

Among VFA, propionate is greatly produced by amylolytic and lactolytic bacteria, and acetate by fibrolytic bacteria, so that they commonly serve as fermentation markers. In the present study, the acetate:propionate ratio (C2 / C3) was computed.

Relationships between one chemical parameter (pH, C2/C3, t10 isomers, t11 isomers or t10/t11 ratio) and microbiota were performed using the Sparse Partial Least Squares in a regression mode (sPLS), using the package mixomics (Lê Cao et al., 2009) of the R software (version 2.11).

PLS is a multivariate projection-based method that is extremely efficient when the number of variable is much higher than the number of samples ($p + q \gg n$). Unlike PCA that maximizes

the variance in a single data set, PLS maximizes the covariance between two data sets by seeking for linear combinations of the variables from both sets. These linear combinations are called the latent variables. The weight vectors that are used to compute the linear combinations are called the loading vectors. Both latent variables and loading vectors come in pairs (one for each data set). The regression mode of PLS compute a relationship between the two data sets, i.e. PLS will predict Y from X where the Y matrix correspond to physicochemical parameters ($n=50$, $p= 5$) and X the taxonomic matrix ($n=50$, $q =360$). sPLS has been recently developed to perform simultaneous variable selection in the two data sets (Lê Cao et al., 2008). Variable selection is achieved by introducing LASSO penalization on the pair of loading vectors. In the present study variable selection was only performed in the X matrix. The choice of the number of components as well as the number of variables kept in the X matrix was done according to a leave on leave-one-out to compute the Mean Square Error of prediction.

Results

Taxonomic assignation using a bootstrap of 60, allowed to assign sequences to phyla division (98.5% of the sequences), class division (96.6 % of the sequences), order division (94.9% of the sequences), family division (83.3% of the sequences) and genus division (52.6% of the sequences). Some sequences could be assigned to genus level while some others could only be assigned to the family or the phyla level. On the 50 cow ruminal fluids, a total of 360 taxa could be identified including 14 phyla, 45 orders, 21 classes, 98 families and 219 genera. Finally for each of the 50 ruminal bacterial community, a taxonomic profile could be obtained.

Figure 1 illustrates the mean taxonomic profile of the 50 ruminal bacterial communities. Among the 360 taxa identified, Firmicutes and Bacteroidetes were the predominant phyla (54.5 % and 37.4 % corresponding to the sum of all the bars above dark green and red area, respectively, in the figure 1). Actinobacteria and Proteobacteria phyla were also present but in lower abundances (3.5 % and 2.8 % corresponding to the sum of the bars above blue and light green area, respectively, figure 1). The thirty most abundant taxa (Matrix X data of the bacterial community of 50 cow ruminal fluids) had average relative abundances ranging from 13.19% to 0.48% (Table 2). On the 50 samples, among the most abundant taxa belonging to Firmicutes phylum, 13.19% and 8.66% of the sequences were assigned to unclassified *Lachnospiraceae* and unclassified *Ruminococcaceae* group.

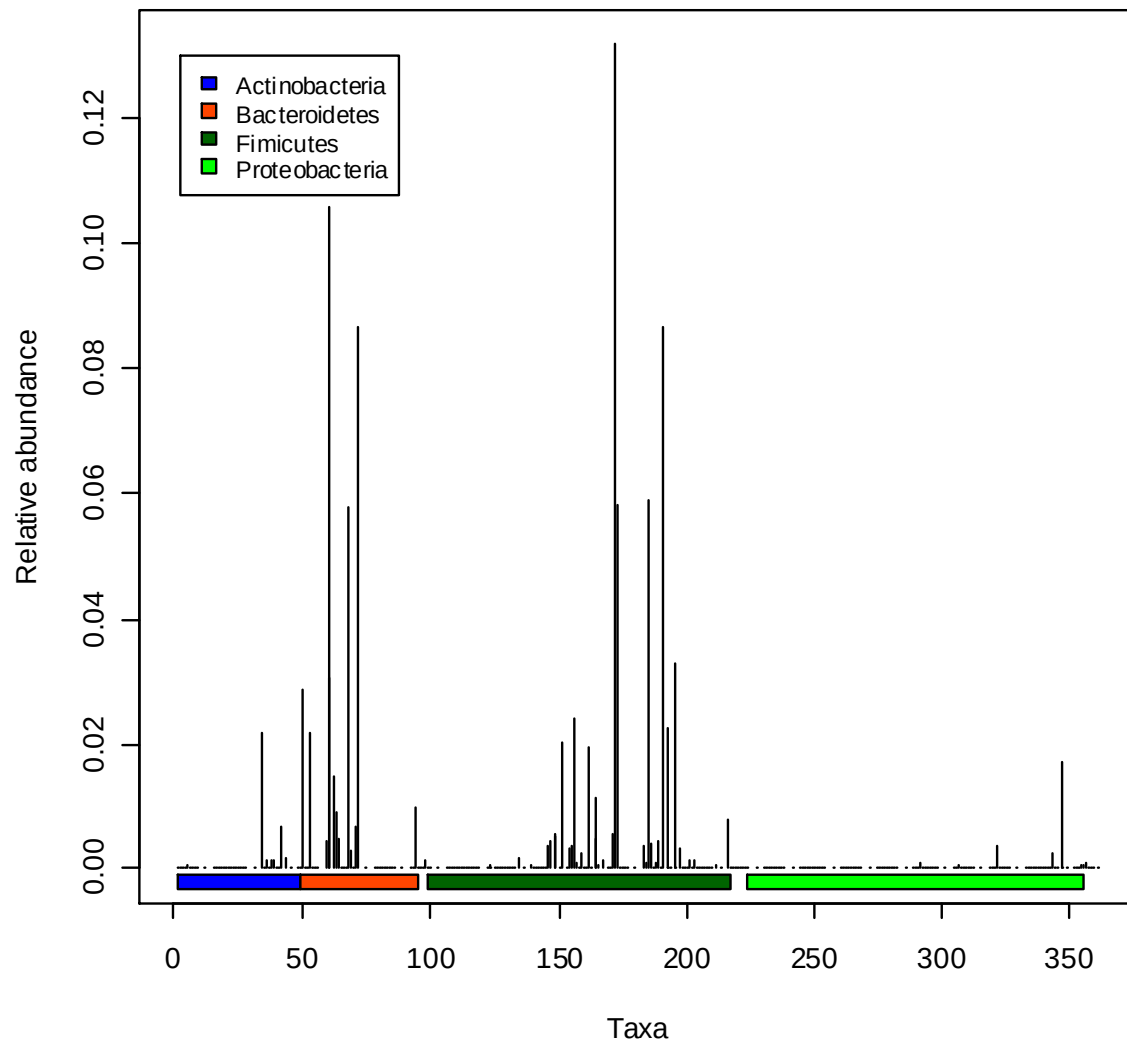


Figure 1 Average relative abundance of the 360 taxa present in the 50 cow ruminal fluid bacterial communities. Taxa are ranked by alphabetic order. Colors correspond to the sum of all the bars above each phyla.

Table 2 The relative abundance (%) of the 30 most abundant taxa present in the 50 cow ruminal fluid bacterial communities (mean values extract from the X matrix; taxa data file)

Taxa numbers ¹	Taxa	Mean	Sd	Min	Max
5	Actinobacteria;Actinobacteria;Actinobacteridae;Bifidobacteriales; <i>Bifidobacteriaceae</i> ; <i>Bifidobacterium</i> ;unclassified	2.17	5.51	0.00	32.28
13	Actinobacteria;Actinobacteria;Coriobacteridae;Coriobacteriales;Coriobacterineae; <i>Coriobacteriaceae</i> ; <i>Olsenella</i> ;unclassified	0.68	1.25	0.02	4.88
18	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>BS11</i> ;unclassified	2.83	2.00	0.00	7.05
21	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Porphyromonadaceae; <i>Barnesiella</i> ;unclassified	2.15	2.15	0.04	11.07
24	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae; <i>Prevotella</i> ;unclassified	10.56	6.12	0.74	27.67
25	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Prevotellaceae</i> ;unclassified	3.07	1.86	0.26	11.21
26	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Prevotellaceae</i> ;uncultured;	1.48	0.85	0.05	3.70
27	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae; <i>Xylanibacter</i> ;unclassified	0.91	0.91	0.17	5.36
28	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>RF16</i> ;unclassified	0.49	0.59	0.00	2.94
31	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>Rikenellaceae</i> ; <i>RC9</i> ;unclassified	5.81	4.46	0.05	17.16
34	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales; <i>S24-7</i> ;unclassified	0.66	0.70	0.05	3.14
35	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;unclassified	8.67	6.22	0.49	35.24
41	Bacteroidetes; unclassified	0.99	0.52	0.04	2.06
64	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i> ;unclassified	0.54	0.27	0.09	1.11
65	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Family_XIII_Incertae_Sedis</i> ;uncultured;	0.52	0.37	0.03	2.03
66	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Acetitomaculum</i> ;unclassified	2.01	1.52	0.24	10.01
70	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Butyrivibrio</i> ;unclassified	2.39	0.95	0.53	4.16
76	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Incertae_Sedis</i> ;unclassified	1.92	2.04	0.45	11.76

78	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Lachnospira</i> ;unclassified	0.49	1.43	0.00	8.15
79	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Moryella</i> ;unclassified	1.16	0.59	0.05	3.35
85	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ; <i>Syntrophococcus</i> ;unclassified	0.59	1.19	0.08	4.79
86	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ;unclassified	13.19	6.24	4.42	32.99
87	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Lachnospiraceae</i> ;uncultured;	5.82	4.09	0.07	13.73
94	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ;Incertae_Sedis;	5.92	4.89	0.05	21.92
98	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ; <i>Ruminococcus</i> ;unclassified	0.48	0.33	0.00	1.59
100	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ;unclassified	8.66	3.70	0.46	15.74
102	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;unclassified	3.28	1.11	0.59	5.40
116	Firmicutes; unclassified	0.79	0.60	0.08	2.93
152	Proteobacteria;Gammaproteobacteria;unclassified	1.72	5.29	0.00	30.58

¹taxa numbers were assigned alphabetically.

In Bacteroidetes phylum, unclassified *Prevotellaceae* (10.56%) and unclassified *Bacteroidales* (8.67%) taxa were predominant (Table 2). *Butyrivibrio* genus, known as a major ruminal producer of t11 FA, was detected at a maximum of 4.16% relative abundance. *Propionibacterium acnes* (Actinobacteria phylum; *Propionibacteriaceae* family) and *Megasphaera elsdenii* (Firmicutes phylum; *Veillonellaceae* family) are known to be able to produce t10,c12-CLA (Kim et al., 2002; Wallace et al., 2007). In our study, *Propionibacterium* genus was not detected. However, in our samples, the only genus identified at high abundance among Actinobacteria phylum was *Olsenella*, which had a 4.88% relative abundance. Similarly, the genus *Megasphaera* was not detected (0.00%) in our samples, but among *Veillonellaceae* family, *Dialister* genus and unclassified *Veillonellaceae* were the most represented (8.25% and 0.48% relative abundances, respectively).

As expected from diets given to cows, the five physicochemical parameters measured in the rumen exhibited a wide range of values (Table 3). The ruminal pH ranged from 5.19 to 6.76 and C2/C3 ranged from 0.87 to 4.86. The percentage of t10 isomers ranged from 0.44 to 36.37% of total FA and that of t11 isomers similarly ranged from 1.03 to 31.59%. The t10/t11 ratio ranged from 0.87 to 4.86.

Table 3 Physicochemical parameters (matrix Y) of 50 cows ruminal fluids

	Mean	Sd	Min	Max
t10 ¹	4.15	6.77	0.44	36.37
t11 ²	8.55	7.21	1.03	31.59
t10 / t11 ³	1.59	3.59	0.03	20.70
pH	6.10	0.41	5.19	6.76
C2/C3 ⁴	3.19	1.17	0.87	4.86

¹ Sum of t10 FA = t10,c12-CLA + t10-C18:1.

² Sum of t11 FA = c9, t11-CLA + t9,t11-CLA + t11-C18:1.

³ t10 / t11 ratio = sum of t10FA / sum of t11 FA.

⁴ C2 / C3 ratio = acetate : propionate ratio.

The correlation matrix between bacterial taxa (matrix X) and the five physicochemical parameters (matrix Y) was carried out. Figure 2 shows the importance of each X variable according to its explanatory power of Y in the prediction model. Among the ten most important taxa that could predict or explain the best the variability of physicochemical parameters, seven of them belonged to Firmicutes, (in which six of them were of Clostridiales order), two belonged to Bacteroidetes and one to Actinobacteria . The relative abundance of those ten most important taxa in the prediction had a relative abundance between 8.66% (unclassified *Ruminococcaceae*) and 0.01% (unclassified *Bulleidia*). According to a leave one on leave-one-out to compute the Mean Square Error of Prediction, three components were computed and two projection planes (components 1 and 2, and components 1 and 3) were considered.

Figures 3A and 3B show the correlations between the main bacterial taxa and physicochemical parameters; all correlation coefficients were greater than 0.5.

Concerning the relationships between the five physicochemical parameters, when components 1 and 2 were considered, C2/C3 and pH were in an opposite area compared to t10 isomers and t10/t11 ratio. The component 2 was linked to t11 isomers which were correlated neither to t10 isomers nor to t10 / t11 ratio or C2 / C3 (vectors were orthogonal).

The highest correlations evaluated between bacterial taxa and physicochemical parameters are presented in table 4 and illustrated in figures 3A and 3B. The relationships between bacterial taxa and C2 / C3 had almost the same tendency than ruminal pH values (Table 4). For example, *RC9*, *BS11*, *Papillibacter* and uncultured *Lachnospiraceae* group positively correlated to C2/C3 and pH.

Six taxa were positively and highly correlated ($r \geq 0.7$) to t10 isomers proportions in the rumen (Table 4): *Eubacterium* genus (number 62) was the most correlated ($r = 0.813$) to t10 isomers followed by *Syntrophococcus* genus (number 85, $r = 0.78$). *Bulleidia*, *Olsenella*, *Dialister* and *Desulfovibrio* genera were also positively correlated ($r \geq 0.7$) to t10 FA. All these bacteria positively correlated with t10 / t11 ratio but negatively with C2 / C3.

When high levels of t11 isomers were noticed in the rumen, there was a high abundance of unclassified *Firmicutes* taxa ($r = 0.747$) and unclassified *Clostridiales* ($r = 0.618$). To a lesser extent ($0.5 < r < 0.6$), other taxa: 64, 65 and 87 (corresponding to unclassified *Family_XIII_Incertae_Sedis*, uncultured *Family_XIII_Incertae_Sedis* and uncultured *Lachnospiraceae*, respectively) were positively correlated with t11 isomers.



Figure 2 Variable importance in projection (VIP) coefficients reflect the relative importance of each *X* variable for each *X* component in the prediction model. VIP coefficients thus represent the importance of each *X* variable in fitting both the *X*- and *Y*-components, since the *Y* components are predicted from the *X* components. VIP allows to classify the *X*-variables according to their explanatory power of *Y*. VIP larger than 1 are the most relevant for explaining *Y*

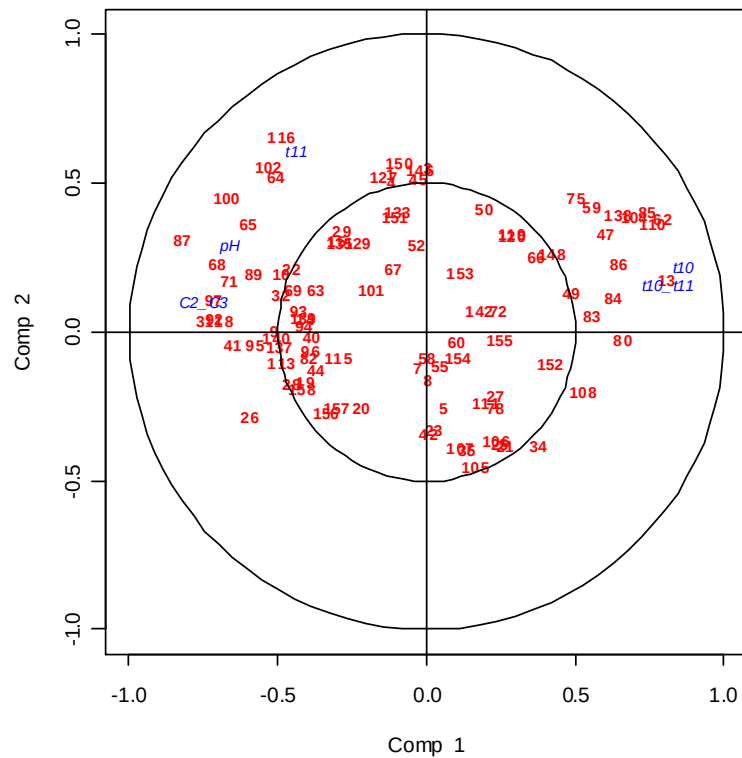


Fig 3A

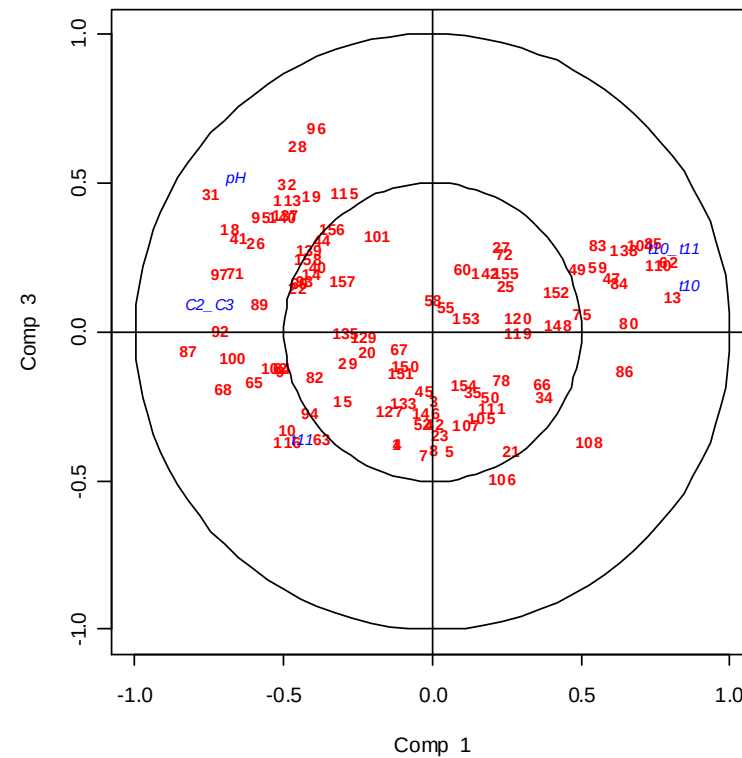


Fig 3B

Figure 3 Correlation circles of the physicochemical parameters (blue) and the main taxa (red) present in the 50 cow ruminal fluid bacterial communities with component 1 and component 2 (Fig 2A) or component 1 and component 3 (Fig 2B). Numbers correspond to names of the taxa and are given in table 2.

Table 4 Highest correlations extract from the correlation matrix between the taxa (matrix X) and the physicochemical parameters (matrix Y)

Taxa numbers ¹	Taxa	t10 ²	t11 ³	t10/t11 ⁴	pH	C2/C3 ⁵
13	Actinobacteria;Coriobacteridae;Coriobacteriales;Coriobacterineae;Coriobacteriaceae;Olsenella; unclassified	0.754	-0.279	0.714	-0.407	-0.571
18	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;BS11;unclassified	-0.519	0.198	-0.446	0.639	0.547
31	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae;RC9; unclassified	-0.557	0.189	-0.466	0.747	0.610
32	Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae;unclassified	-0.308	0.118	-0.233	0.620	0.428
62	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family_XIII_Incertae_Sedis;Eubacterium; unclassified	0.813	-0.193	0.773	-0.282	-0.534
64	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family_XIII_Incertae_Sedis;unclassified	-0.340	0.584	-0.362	0.431	0.425
65	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family_XIII_Incertae_Sedis;uncultured;	-0.463	0.547	-0.476	0.417	0.473
71	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Catabacter; unclassified	-0.503	0.326	-0.456	0.598	0.539
85	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Syntrophococcus;unclassified	0.781	-0.177	0.751	-0.204	-0.484
87	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;uncultured;	-0.647	0.572	-0.631	0.605	0.643
97	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae;Papillibacter;unclassified	-0.560	0.312	-0.507	0.608	0.569
102	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;unclassified	-0.352	0.618	-0.375	0.454	0.445
104	Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Veillonellaceae;Dialister;unclassified	0.740	-0.167	0.712	-0.187	-0.455
110	Firmicutes;Erysipelotrichi;Erysipelotrichales;Erysipelotrichaceae;Bulleidia;unclassified	0.773	-0.184	0.736	-0.268	-0.508
116	Firmicutes;unclassified	-0.335	0.747	-0.395	0.327	0.399
138	Proteobacteria;Deltaproteobacteria;Desulfovibrionales;Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio; unclassified	0.691	-0.134	0.663	-0.158	-0.415

¹ taxa numbers were assigned alphabetically.

² Sum of t10 isomers = t10,c12-CLA + t10-C18:1.

³ Sum of t11 isomers = c9, t11-CLA + t9,t11-CLA + t11-C18:1.

⁴ Ratio t10/ t11 = sum of t10 isomers / sum of t11 isomers.

⁵ C2 / C3 ratio = acetate : propionate ratio.

Discussion

Using sPLS analysis and 16S rRNA gene barcoded 454 pyrosequencing, we pointed out for the first time the relationship between five physicochemical parameters (t10, t11 t10 / t11 ratio, pH and C2 / C3 ratio) and the relative composition of the bacterial community of ruminal fluids. To maximize variability of the physicochemical parameters, cows were fed four different diets differing in starch and oil content.

As expected, physicochemical parameters measured in the rumen showed a very high variability. Indeed, t11 isomers proportion greatly increased in the rumen content of cows fed LSO compared to LS diet but the other parameters were not different (data not shown). With HS diet, all the parameters were quite similar to those of LS diet except the ruminal pH which was low compared to the LS diet. With HSO diet, there were a high proportion of t10 FA, low level of t11 FA, low C2/C3 and low pH. There are numerous reports in the literature illustrating similar effects when a source of polyunsaturated FA is added to high starch diets fed to dairy cows (Loor et al., 2004; Roy et al., 2006; Weimer et al., 2010).

Concerning bacterial community, thanks to pyrotag methodology, a taxonomic profile could be obtained for each of the 50 ruminal fluid sample. On the overall samples, the taxonomic profile was spread out in 360 taxa which were sorted in alphabetic order. We could assign sequences from phyla level (98.5% of the sequences) to the genus level (52.6% of the sequences). In this study, there was a predominance of Firmicutes and Bacteroidetes phyla in the 50 rumen samples studied. The predominance of these two phyla in rumen content has already been observed with culture-based and standard molecular approaches (Stewart et al., 1997) suggesting that both play important roles in the ruminal metabolism (Kraatz et al., 2011; Turnbaugh et al., 2006). Actinobacteria and Proteobacteria phyla were widely detected in the rumen but at low abundances.

The use of pyrosequencing coupled with a sparse Partial Least Square analysis in a regression mode (sPLS) revealed correlations between bacterial taxa and physiochemical parameters measured in the rumen. The correlation circle highlighted a positive relationship between C2 / C3 ratio and ruminal pH. Indeed, when pH is high, fibrolytic bacteria are promoted and a high production of acetate (C2) is noticed (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). When the diet contains large quantities of readily fermentable carbohydrates, the pH drops because of the high rates of production, resulting in a proliferation of propionate (C3) producing bacteria, as opposed to fibrolytic bacteria that are negatively affected (Fonty G, & Chaucheyras-Durand F, 2007).

Production of t11 FA is usually important in high pH media, as it is carried out by fibrolytic bacteria, especially *Butyrivibrio fibrisolvens*. Surprisingly, in our experiment, t11 isomers were not in relationship with pH or C2/C3 in the correlation circles (Figure 3), suggesting that t11 isomers production could depend on other parameters than pH. Nevertheless, bacteria positively correlated to t11 FA proportion (unclassified Clostridiales and uncultured *Lachnospiraceae*) were positively correlated to C2 / C3 and pH, underlying that a high pH, which is favorable for fibrolytic, bacteria was also favorable for t11 producing bacteria.

In our study, *Butyrivibrio* genus had a 2.39% relative abundance on average and was not correlated to t11 FA, whereas *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Butyrivibrio proteoclasticus* are considered as being the major t11 biohydrogenating bacteria (Maia et al., 2007). Several *Bifidobacterium*, isolated from the human gut, can produce different CLA isomers, mainly c9,t11-CLA, in the presence of linoleic acid (Gorissen et al., 2010). The LMC520 strain of *Bifidobacterium* is twice more efficient than *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 for conversion of linoleic acid to CLA (Park et al., 2011). In our study, unclassified *Bifidobacterium* taxa was at high abundance (up to 32.28%) but was not linked to the proportion of t11 isomers. So, none of the two genera known as t11 producers in the rumen were evidenced, suggesting that the major t11 producers are still unknown. However, the lack of relationship between the abundance of a genus and the proportion of one of its metabolites does not necessarily mean that this genus is of minor importance for the production of this metabolite. In the same way, Belenguer et al. (2010) hypothesized that the metabolic activity of *B. proteoclasticus* might not be proportional to the 16S rRNA gene concentration. The first explanation for this lack of relationship could be due to BH being a detoxication process and not a nutritional function for bacteria, so that with our LS and HS low fat diets, large populations of *Butyrivibrio* can exist in the rumen, using dietary carbohydrates but producing low amounts of t11 FA due to lack of substrate. A second explanation could be a low production of t11 FA in spite of a high abundance of bacteria due to a limited capacity of production of enzyme by the bacteria, or a low activity of the enzyme even when the responsible bacteria are abundant. The enzyme of *B. fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to CLA is known to have a maximal activity at pH 7.0 to 7.2 (Kepler and Tove, 1967), and our 5.19-6.76 pH range could have resulted in strong differences of enzyme activity. Finally, the *Butyrivibro* genus comprises many species, which could have masked the relationship between those able to biohydrogenate and BH products.

Putative taxonomic identification of many terminal restriction fragments associated with t11-C18:1 and c9,t11-CLA, intermediates of ruminal BH of dietary unsaturated FA, revealed that more than 60% of the predicted phylotypes belonged to uncultured bacteria phylogenetically

classified in *Prevotella* and *Lachnospiraceae* Incertae_Sedis genera, and unclassified Bacteroidales, Clostridiales and *Ruminococcaceae* (Huws et al., 2011). Among these bacteria, only unclassified Clostridiales ($r = 0.618$) was linked to high levels of t11 isomers in our dataset. The relative abundances of some of the bacteria listed by Huws et al. (2011) were high in our study: *Prevotella* (10.56%), unclassified Bacteroidales (8.67%), *Ruminococcaceae* (8.66%) and *Lachnospiraceae* Incertae sedis (1.92%) but they were not linked to t11 FA proportion. In the experiment of Huws et al. (2011), the variability in the dataset was carried by the level of dietary fish oil, which inhibits the last step of BH, i.e. the reduction of *trans* octadecenoic acids to stearic acid (AbuGhazaleh & Jenkins, 2004). This differs from our dietary conditions which did not clearly address a specific step of BH, which could explain different conclusions between our studies. Nevertheless, some bacteria belonging to unclassified Firmicutes, unclassified Clostridiales, unclassified *Family_XIII_Incertae_Sedis* and uncultured *Lachnospiraceae* bacteria were linked to t11 FA proportion ($r = 0.747, 0.618, 0.584$ and 0.572 , respectively).

*Trans*10 isomers proportion and t10/t11 ratio were placed opposite to pH and C2/C3 ratio in the correlation circle (Figure 3A), showing that high t10 isomers proportions and t10/t11 ratio were associated with low pH and C2/C3. At the same time, bacteria positively correlated with t10 FA and t10/t11 ratio were negatively correlated with pH and C2/C3 (Table 4). This result is in agreement with literature which reports an appearance of such isomers when high starch diets are given to cows (Piperova et al., 2002). Surprisingly and by contrast with t11 correlated taxa, all t10 correlated taxa were identified at the genus level.

Few cultivated bacterial species have been shown to synthesize t10,c12-CLA from linoleic acid. *Propionibacterium acnes* (Verhulst et al., 1987), a *Propionibacteriaceae* from Actinobacteria phylum and *Megasphaera elsdenii* (Kim et al., 2002), a *Veillonellaceae* from Firmicutes phylum, both lactate consuming bacteria, are able to produce t10,c12-CLA in pure mono-culture. In our samples, these bacteria were not detected (0.00%). Nevertheless, our study revealed other bacteria strongly linked to t10 isomers such as *Olsenella* and *Dialister* ($r = 0.754$ and 0.740 , respectively). *Olsenella* was identified at a relatively high abundance (average 0.68%, range from 0.02 to 4.88%) but *Dialister* genus was at lesser abundance (average 0.29%, range from 0.00 to 8.25%). The genus *Olsenella* has already been found in the rumen of sheep, and ferments carbohydrates predominantly to lactic acid (Kraatz et al., 2011). Concerning *Dialister* genus, only one species (*Dialister pneumosintes*) has been isolated from human respiratory system but this bacterium, whereas not being a common rumen inhabitant, has been isolated from ruminants (Garner et al., 2003). *Veillonellaceae* is a

common family found in the digestive tract of ruminants, these bacteria are able to produce lactic acid, but they mainly ferment it in various VFA, mainly propionate (de Menezes et al., 2011).

Other taxa were highly correlated with high t10 isomers in the rumen such as *Eubacterium*, *Syntrophococcus*, *Bulleidia* and *Desulfovibrio* ($r = 0.813, 0.781, 0.773$, and 0.691 , respectively), but had low relative abundances (0.35, 0.59, 0.01, 0.04% on average, respectively). *Eubacterium* genus has already been found in the rumen (Sundset et al., 2008; Chen et al., 2011). *Eubacterium* species have different metabolic functions (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). *Eubacterium ruminantium*, the most frequent species in the rumen, is fibrolytic, majorly produces butyrate, and is negatively affected when grain is introduced into cow diets (Tajima et al., 2001). On the contrary, *Eubacterium pyruvativorans* scavenges amino acids, lactate and possibly other metabolites to generate ATP via acetate formation in the rumen (Wallace et al., 2004).

Syntrophococcus sucromutans is the only species of *Syntrophococcus* genus described and isolated; it uses sugars as electron donors with acetate as the only organic product (Krumholz & Bryant, 1986). Besides, Doré & Bryant (1989) showed that growth of *Syntrophococcus sucromutans* requires octadecenoic FA, and is particularly increased by t9-C18:1 and t11-C18:1 but they did not observe any PUFA BH by this species and did not test the effect of t10-C18:1. Bacteria belonging to *Bulleidia* genus from *Erysipelotrichaceae* family are strictly anaerobic and the only isolated species is *Bulleidia extructa*, found in animals' oral cavity, which ferments glucose and maltose into acetate and lactate (Dubreuil 2002). No study reported the presence of this genus in the rumen, but Perumbakkam et al. (2011) evidenced some taxa belonging to *Erysipelotrichaceae* in the rumen of sheep, without identifying at genus level. Genus *Desulfovibrio* from Gamma-Proteobacteria class has already been isolated from rumen (Huisinigh et al., 1974) and is mainly implicated in sulfate reduction. The main ruminal species is *Desulfovibrio desulfuricans*, which is able to oxidize some alcohols and short-chain FA, in particular lactate (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2007). So, in our study, most of the genera positively correlating with t10 FA in the rumen are more or less implicated in ruminal metabolism of lactate, and one uses octadecenoic FA as growth factors.

Conclusion

Pyrosequencing data can be used to correlate bacterial populations with ruminal physiochemical parameters. In the present study, some genera positively correlated with t10 isomers levels in the rumen. For t11 isomers, no relationship with bacterial genus was

identified, even with *Butyrivibrio*, suggesting that either major t11 producers do not belong to this genus or their BH activity is not related to their abundance. However, the use of molecular techniques is only a tool that can provide information about the evolution of the bacterial populations, but does not on enzymatic and metabolic specific activities of the identified members of the microbial ecosystem. This must still be completed by pure monocultures to fully understand ruminal metabolism in order to improve animal health and productivity.

References

AbuGhazaleh, A.A. & Jenkins, T.C. (2004) Short communication: docosaheanoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *Journal of Dairy Science*, **87**, 1047-1050.

Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P. & Engstrand, L. (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PloS One*, **3**, e2836.

Belenguer, A., Toral, P.G., Frutos, P. & Hervás, G. (2010) Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, **93**, 3275-3286.

Chen, Y., Penner, G.B., Li, M., Oba, M. & Guan, L.L. (2011) Changes in Bacterial Diversity Associated with Epithelial Tissue in the Beef Cow Rumen during the Transition to a High-Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 5770-5781.

Doré, J. & Bryant, M.P. (1989) Lipid growth requirement and influence of lipid supplement on fatty acid and aldehyde composition of Syntrophococcus sucromutans. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 927-933.

Dubreuil, L. (2002) Taxonomie des anaérobies stricts. *Revue Française des Laboratoires*, 41-60.

Edwards, J.E., McEwan, N.R., Travis, A.J. & Wallace, R.J. (2004) 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **86**, 263-281.

Fonty G, & Chaucheyras-Durand F. (2007) *Les écosystèmes digestifs*. Lavoisier, Paris, France.

Garner, M.R., Hay, A.G., Guard, C.L. & Russell, J.B. (2003) Bovine laminitis and allisonella histaminiformans. *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, 199-208.

Gorissen, L., Raes, K., Weckx, S., Dannenberger, D., Leroy, F., De Vuyst, L. & De Smet, S. (2010) Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 2257-2266.

Huisingh, J., McNeill, J.J. & Matrone, G. (1974) Sulfate reduction by a *Desulfovibrio* species isolated from sheep rumen. *Applied Microbiology*, **28**, 489-497.

Huws, S.A., Kim, E.J., Lee, M.R.F., Scott, M.B., Tweed, J.K.S., Pinloche, E., Wallace, R.J. & Scollan, N.D. (2011) As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae* incertae sedis and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environmental Microbiology*, **13**, 1500-1512.

Kim, Y.J., Liu, R.H., Rychlik, J.L. & Russell, J.B. (2002) The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 976-982.

Kraatz, M., Wallace, R.J. & Svensson, L. (2011) *Olsenella umbonata* sp. nov., a microaerotolerant anaerobic lactic acid bacterium from the sheep rumen and pig jejunum, and emended descriptions of *Olsenella*, *Olsenella uli* and *Olsenella profusa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**, 795-803.

Krumholz, L.R. & Bryant, M.P. (1986) *Syntrophococcus sucromutans* sp. nov. gen. nov. uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxymonobenzenoids or *Methanobrevibacter* as electron acceptor systems. *Archives of Microbiology*, **143**, 313-318.

Lê Cao, K., González, I. & Déjean, S. (2009) integrOmics: an R package to unravel relationships between two omics datasets. *Bioinformatics (Oxford, England)*, **25**, 2855-2856.

Lê Cao, K., Rossouw, D., Robert-Granié, C. & Besse, P. (2008) A sparse PLS for variable selection when integrating omics data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, **7**, Article 35.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D. & Knight, R. (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research*, **35**, e120.

Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y. & Doreau, M. (2004) Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **87**, 2472-2485.

Maczulak, A.E., Dehority, B.A. & Palmquist, D.L. (1981) Effects of long-chain Fatty acids on growth of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**, 856-862.

Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Bestwick, C.S., Richardson, A.J., McKain, N., Larson, T.R., Graham, I.A. & Wallace, R.J. (2010) Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, **10**, 52.

Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L. & Wallace, R.J. (2007) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**, 303-314.

McEwan, N.R., Abecia, L., Regensbogenova, M., Adam, C.L., Findlay, P.A. & Newbold, C.J. (2005) Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Letters in Applied Microbiology*, **41**, 97-101.

de Menezes, A.B., Lewis, E., O'Donovan, M., O'Neill, B.F., Clipson, N. & Doyle, E.M. (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiology Ecology*.

Park, H.G., Heo, W., Kim, S.B., Kim, H.S., Bae, G.S., Chung, S.H., Seo, H. & Kim, Y.J. (2011) Production of conjugated linoleic acid (CLA) by *Bifidobacterium breve* LMC520 and its compatibility with CLA-producing rumen bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 984-988.

Park, P. & Goins, R. (1994) In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *Journal of Food Science*, **59**, 1262-1266.

Perumbakkam, S., Mitchell, E.A. & Craig, A.M. (2011) Changes to the rumen bacterial population of sheep with the addition of 2,4,6-trinitrotoluene to their diet. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **99**, 231-240.

Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M. & Erdman, R.A. (2002) Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*, **132**, 1235-1241.

Playne, M.J. (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **36**, 638-644.

Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. & Glöckner, F.O. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, **35**, 7188-7196.

Roesch, L.F.W., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K.M., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A.O., Farmerie, W.G. & Triplett, E.W. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, **1**, 283-290.

Roy, A., Ferlay, A., Shingfield, K.J. & Chilliard, Y. (2006) Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science*, **82**, 479-492.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. & Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 7537-7541.

Stewart CS, Bryant MP, J.P. (1988) The rumen bacteria. *The rumen microbial ecosystem* p. 21-76. Elsevier, London and New York.

Stewart CS, Flint HJ and M.P. B. (1997) The rumen bacteria. *The Rumen Microbial Ecosystem* p. 10-72. Chapman & Hall, London.

Sundset, M.A., Kohn, A., Mathiesen, S.D. & Praesteng, K.E. (2008) *Eubacterium rangiferina*, a novel usnic acid-resistant bacterium from the reindeer rumen. *Die Naturwissenschaften*, **95**, 741-749.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Benno, Y. (2001) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2766-2774.

Turnbaugh, P.J., Bäckhed, F., Fulton, L. & Gordon, J.I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host & Microbe*, **3**, 213-223.

Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. & Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**, 1027-1031.

Verhulst, A., Janssen, G., Parmentier, G. & Eyssen, H. (1987) Isomerization of polyunsaturated long chain fatty acids by propionibacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **9**, 12-15.

Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., Miyagawa, E., McKain, N. & Walker, N.D. (2004) Metabolic properties of *Eubacterium pyruvativorans*, a ruminal 'hyper-ammonia-producing' anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*. *Microbiology (Reading, England)*, **150**, 2921-2930.

Wallace, R.J., McKain, N., Shingfield, K.J. & Devillard, E. (2007) Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*, **48**, 2247-2254.

Weimer, P.J., Stevenson, D.M. & Mertens, D.R. (2010) Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *Journal of Dairy Science*, **93**, 265-278.

Yang, S.L., Bu, D.P., Wang, J.Q., Hu, Z.Y., Li, D., Wei, H.Y., Zhou, L.Y. & Looor, J.J. (2009) Soybean Oil and Linseed Oil Supplementation Affect Profiles of Ruminal Microorganisms in Dairy Cows. *animal*, **3**, 1562-1569.

Zened, A., Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M., Combes,, S., Cauquil, L., Farizon, Y. & Enjalbert, F. (2011) Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the in vitro ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Journal of Dairy Science*, accepted for publication.

ANNEXE 3

Evolution temporelle des populations bactériennes corrélées aux isomères *trans*-10 ou *trans*-11 à partir de la distribution de la ration enrichie en amidon et en huile

Les données obtenues dans le cadre du Pyroséquençage 454 GS FLX décrit dans l'article précédent, et concernant les vaches recevant la ration enrichie en huile et en amidon (ration AH, induisant une sévère déviation de la voie t11 vers la voie t10), ont subi une nouvelle analyse statistique afin de déterminer si les populations corrélées positivement avec les t10 ou les t11 totaux variaient significativement au cours de la période d'adaptation à la ration AH. Cette variation temporelle a été démontrée pour les isomères t10 et t11 dans le premier article (**page 107**). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un modèle linéaire généralisé (SYSTAT) en incluant les effets liés à la vache et au jour de prélèvements (les effets vaches étant confondus avec les effets périodes).

Au sein de ces données une relation linéaire a été recherchée entre les t11 ou les t10 et les populations liées. Les figures 14 et 15 présentent les résultats obtenus.

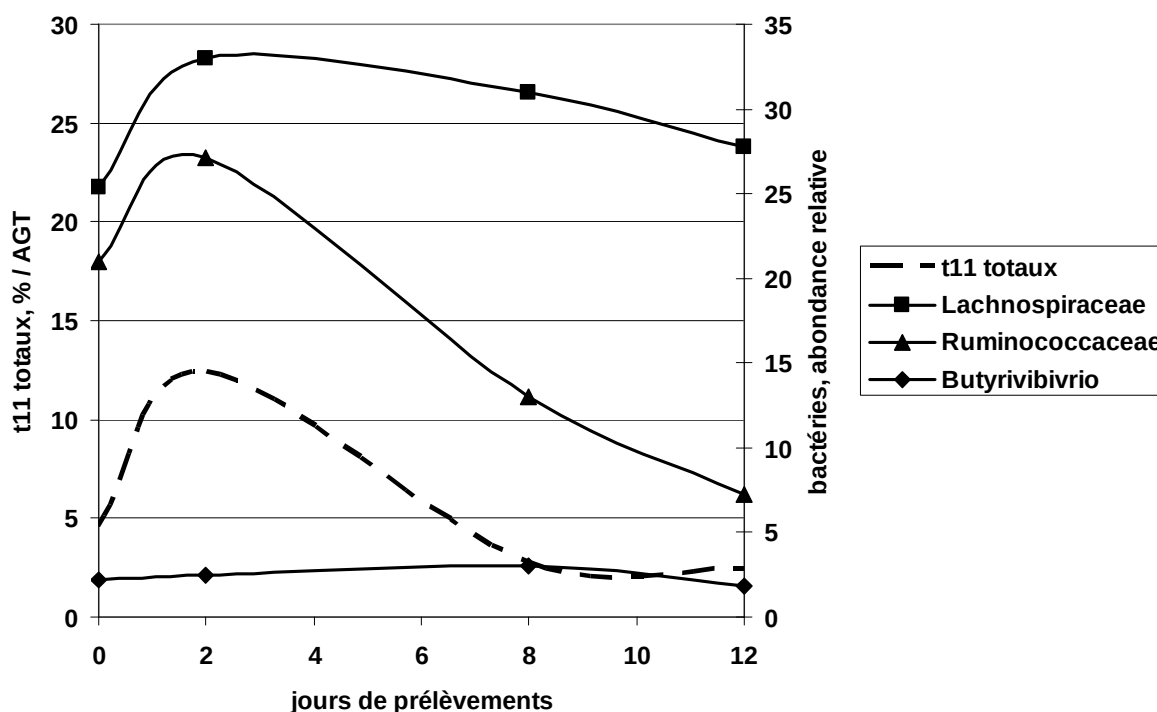


Figure 14. Evolution des populations bactériennes corrélées aux t11 totaux au cours de l'adaptation à la ration enrichie en amidon et en huile.

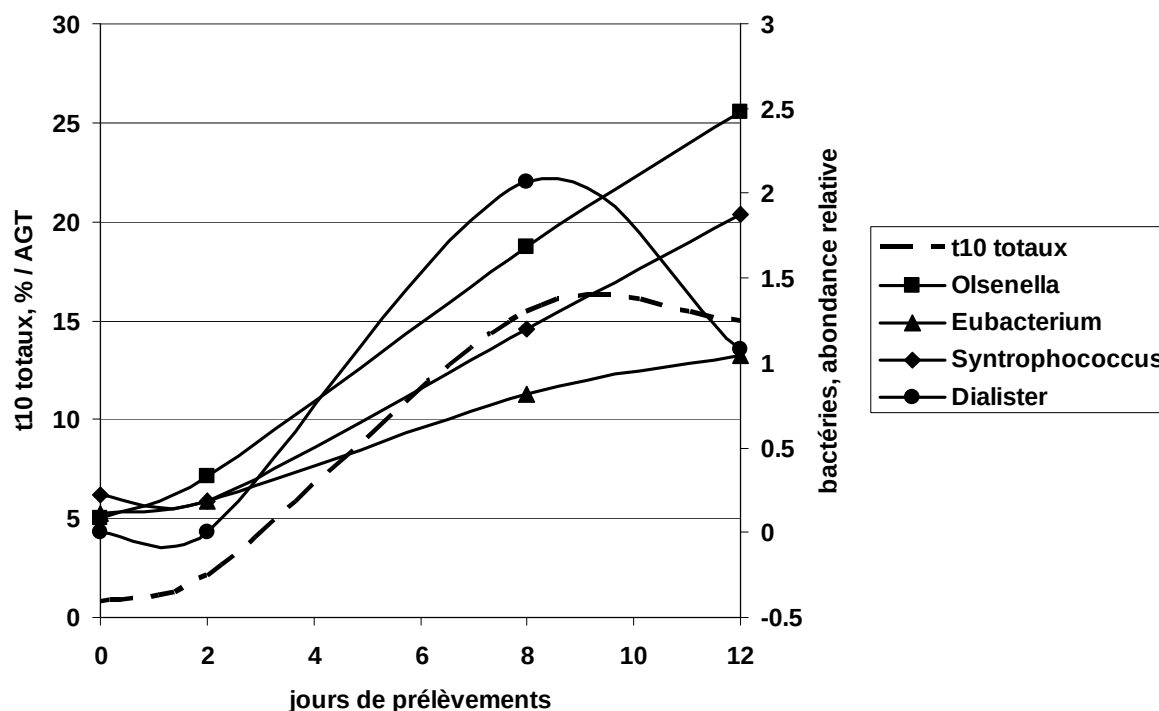


Figure 15. Evolution des populations bactériennes corrélées aux t10 totaux au cours de l'adaptation à la ration enrichie en amidon et en huile.

Pour les populations corrélées aux AG t11, une évolution temporelle significative a été notée uniquement pour les *Ruminococcaceae* ($P=0,01$), seules à présenter une corrélation significative ($P<0,01$, $r^2=0,56$). Leur évolution parallèle au cours du temps est bien visible sur la figure 14. Pour les populations corrélées aux AG t10, aucun effet significatif du jour de prélèvement n'a été observé, y compris pour *Bulleidia* (abondance relative trop faible pour figurer sur la figure 15). Cependant les populations des genres *Osenella* et *Eubacterium* présentaient une tendance vers une corrélation positive avec la proportion d'AG t10 ($P=0,14$ et $0,11$, respectivement), bien que le genre *Dialister* soit celui qui présente l'évolution la plus proche des AG t10 sur la figure 15. Toutes ces populations présentaient une relation significative avec les AG t10.

Conclusion :

Cette nouvelle analyse a permis de souligner l'importance de la relation entre la famille des *Ruminococcaceae* et la production de t11, mais n'a pas permis de faire ressortir un lien privilégié entre la production de t10 et l'un des genres précédemment corrélés à ces t10.

ANNEXE 4

The ruminal level of *trans*-10 fatty acids of dairy cows is linked to the composition of bacterial community

Cette annexe présente des résultats obtenus dans un troupeau laitier présentant une forte hétérogénéité de taux butyreux (TB) entre vaches, certaines ayant un TB très faible. Des analyses de microbiote ruminal et de profils d'AG du contenu ruminal et du lait ont été effectuées sur 10 vaches.

4th Congress of European Microbiologists, FEMS 2011 Switzerland, June 26-30

The ruminal level of *trans*-10 fatty acids of dairy cows is linked to the composition of bacterial community

A. ZENED¹, S. COMBES¹, L. CAUQUIL¹, J. MARIETTE², C. ROUSSEAU³, C. KLOPP², A. TROEGELER-MEYNADIER¹, F. ENJALBERT¹

¹UMR 1289 Tandem, INRA / INPT-ENSAT / ENVT, Castanet-Tolosan, France, France ²Plateforme bio-informatique Genotoul, Biométrie et Intelligence Artificielle, INRA, Castanet-Tolosan, France, France ³INPT-ENSAT, Castanet-Tolosan, France

a.zened@envt.fr

Objective and Methods

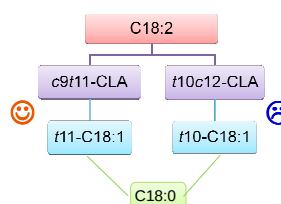


Fig.1 Biohydrogenation of linoleic acid (C18:2)

In dairy cows, *trans*-10 fatty acids (*t10*-FA) are produced by ruminal bacteria during lipid digestion, in particular during C18:2 biohydrogenation (Fig. 1), thereafter absorbed and secreted into milk (Fig. 2).

High *t10* FA production causes milk fat depression and is detrimental for human consumer health.

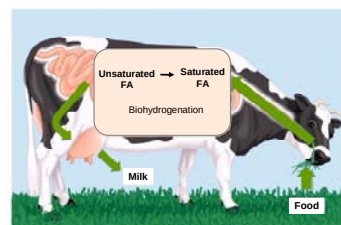
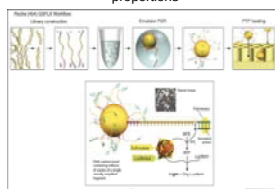


Fig. 2

This study investigated the relationship between the ruminal proportion of *t10* FA and the composition of rumen bacterial community in a dairy cow herd.

Ruminal fluids of 10 cows receiving the same diet and exhibiting a high heterogeneity of *t10*-FA ruminal proportions



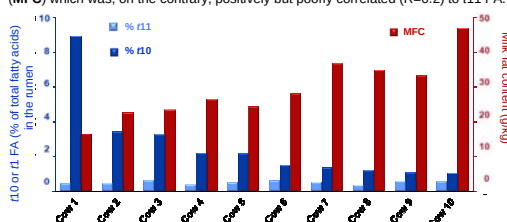
Barcoded reads of the V3-V4 regions of the 16S rRNA genes, were obtained from a 454 GS-FLX sequencer

Taxonomic assignments were performed using the open-source software Mothur V.1.12.3 (www.mothur.org)



Results and conclusions

A negative correlation ($R = -0.7$) was noticed between *t10* FA and milk fat content (MFC) which was, on the contrary, positively but poorly correlated ($R = 0.2$) to *t11* FA.



Variation in ruminal percentage of *t10* FA was associated with changes in the ruminal bacterial community

A relationship between lactic acid production and high levels of *t10* FA has already been observed. In this study, an increase in Veillonellaceae family and *Lactobacillus* genus, which are consumers and producers of lactic acid respectively, is noticed in ruminal fluids exhibiting high *t10* FA percentage.

The abundance of other bacteria were also linked to *t10* FA production but their functions are not yet well-established.

Phylum	Order	Family	Genus	R(±0.7)	P-value	Abundance (%)
Firmicutes	Clostridiales	Lachnospiraceae		0.8	***	18.05
Firmicutes	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Syntrophococcus</i>	0.9	***	0.87
Firmicutes	Clostridiales	Lachnospiraceae	<i>Butyrivibrio-Pseudobutyrvibrio</i>	-0.8	**	0.18
Firmicutes	Clostridiales	Veillonellaceae	<i>Dialister</i>	0.7	**	0.97
Firmicutes	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>	0.8	***	0.14
Bacteroidetes	Bacteroidales	Prevotellaceae	uncultured	-0.7	*	1.91
Bacteroidetes	Bacteroidales	RF16		-0.7	**	0.70
Actinobacteria	Coriobacteriales	Coriobacteriaceae	<i>Olsenella</i>	0.9	***	0.80

* <0.05
** <0.01
*** <0.001



ARTICLE 7

Effets de la vitamine E naturelle et de synthèse sur la composition en acides gras du lait et du contenu ruminal chez des vaches laitières recevant une ration riche en amidon et en matière grasse(en préparation)

L'objet de cette étude était de vérifier les effets de la vitamine E en tant que modulateur des voies de biohydrogénation (BH) ruminale, et en particulier d'évaluer son efficacité à restaurer la voie t11, lors de shift de la voie t11 vers la voie t10. En effet plusieurs études ont été réalisées à son sujet (cf. chap 3. **page 60** de l'étude bibliographique), mais les résultats obtenus présentent une grande variabilité.

Une première expérimentation a été menée *in vivo* avec de la vitamine E naturelle (RRR- α -tocophérol) sur des vaches présentant un shift t11 vers t10. Six vaches en lactation de race Holstein et équipées d'une canule ruminale ont été adaptées deux semaines à une ration riche en amidon : 20 kg MS par jour d'une ration à base d'ensilage de maïs contenant 22% de blé tendre. Ensuite, 600g d'huile de tournesol ont été intégrés à cette ration durant les deux semaines suivantes. Enfin, la dernière semaine de ces quatre semaines de période expérimentale, les vaches ont été divisées en deux lots : le premier recevait 30g de vitamine E par jour, le deuxième n'était pas supplémenté. Bien que la ration riche en amidon et en huile ait induit un shift t11 vers t10 ainsi qu'une diminution du taux butyreux (TB) dans le lait, l'addition de vitamine E dans la ration n'a pas permis de restaurer la voie t11 de la BH ruminale, ni le TB.

Une seconde expérimentation a été menée en parallèle *in vitro*, en utilisant les mêmes vaches comme donneuses de contenu ruminal pour les cultures. Cette deuxième expérience avait également pour objectif de vérifier les effets de la vitamine E sur le shift t11 vers t10 mais aussi de comparer vitamine E naturelle (RRR- α -tocophérol) et de synthèse (acétate de dl- α -tocophérol). Bien que les effets des deux types de vitamine E n'aient pas été tout à fait identiques, ils sont restés très limités. D'autre part, dans cette étude, la vitamine E, quelque soit son origine, ne serait pas un modulateur de la BH ruminale, elle n'a pas permis d'orienter le métabolisme des lipides vers l'une ou l'autre voie de la BH.

Effects of natural and synthetic vitamin E on ruminal and milk fatty acid profiles in cows receiving high starch high fat diets

A. Zened^{a,b}, A. Troegeler-Meynadier^{a,b}, T. Najar^c, F. Enjalbert^{a,b,*}

^a INRA, UMR1289, Tandem, F-31326 Castanet-Tolosan, France

^b Université de Toulouse, INP, ENSAT, ENVT, UMR1289 Tandem, F-31076 Toulouse, France

* Corresponding author: Francis Enjalbert

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

Among *trans* fatty acids, exhibiting different health properties, *trans*₁₀,*cis*₁₂ CLA has negative effects on cows' milk fat production and can affect human health. In high yielding dairy cows, a shift from the *trans*₁₁ to the *trans*₁₀ pathway of biohydrogenation (BH) can occur in the rumen of cows receiving high concentrate diets, especially when the diet is supplemented with unsaturated fat sources. In some but not all experiments, vitamin E has been shown to control this shift. In order to ascertain the effects of vitamin E on this shift of BH pathway, two studies were conducted. An *in vivo* study investigated the effect of natural vitamin E (RRR- α -tocopherol) on this shift and subsequent milk fat depression. Six rumen fistulated lactating Holstein cows were assigned to a 2×2 cross-over design. Cows received 20 kg DM of a control diet based on maize silage with 22% of wheat, and after two weeks adaptation, diet was supplemented with 600g of sunflower oil for two other weeks. The last week of this four weeks experimental period, cows were divided into two groups: a control group and a group receiving 11g of vitamin E per day, the other none. A *trans*₁₀ shift of ruminal BH associated with a milk fat depression due to oil supplementation of a high wheat diet was observed, but vitamin E supplementation of dairy cows did not result in a reversal toward a *trans*₁₁ BH pathway, and did not restore milk fat content. The second study was conducted *in vitro* with the same cows as rumen content donors, and explored the effects of vitamin E, comparing natural (RRR- α -tocopherol acetate) and synthetic (dl- α -tocopherol acetate) vitamin E. Although not completely similar, the effects of natural and synthetic vitamin E were very limited, suggesting that vitamin E was neither a limiting factor in rumen BH nor a modulator of BH pathway.

1. Introduction

Due to a partial and incomplete ruminal biohydrogenation (BH) of unsaturated fatty acids, ruminant products, especially milk, contain BH intermediates, mainly *trans* fatty acids (FA), including *trans* C18:1 and conjugated linoleic acid (CLA). A large number of isomers can be encountered, and the properties of the different positional and geometric isomers in human nutrition can differ (Bhattacharyaa *et al.*, 2006). Moreover, *trans*10, *cis*12 CLA can alter milk fat content (Shingfield and Griinari, 2007) in dairy cows. In most dietary conditions, *trans*11 isomers are much more abundant than *trans*10 isomers. However, high concentrate diets (Piperova *et al.*, 2002) can result in a shift of BH from *trans*11 to *trans*10 pathway, especially when associated with an enrichment of the diet with an unsaturated fatty acids (FA) source (Loor *et al.*, 2004). After addition of such a FA source, the isomeric profile strongly evolves, *trans*10 C18:1 reaching a plateau after 10 days, and *trans*11 C18:1 reaching a peak after 6 days and then decreasing (Roy *et al.*, 2006; Shingfield *et al.*, 2006).

Because such a shift is not encountered on grass based diets, Kay *et al.* (2005) hypothesised that vitamin E, which is abundant in pasture, could prevent this shift. Supplementing a total mixed ration with a high amount of vitamin E indeed tended to decrease the *trans*10 C18:1 in milk, but values remained much over that encountered in pasture cows. Pottier *et al.* (2006) partly succeeded in preventing the low milk fat syndrome due to *trans*10 FA in cows receiving linseed supplemented diets by adding vitamin E to the diet, but when this vitamin addition started 3 weeks after beginning fat supplementation, no effect could be observed, suggesting an interaction between vitamin E and disturbance over time of ruminal microbiota. Pottier *et al.* (2006) measured the effects of vitamin E after 21 days of distribution, and discussed the changes due to vitamin E as probably resulting from effects on ruminal BH, but did not directly study BH. Moreover, they used synthetic vitamin E (dl- α -tocopherol), whose biological activity is lower than that of natural vitamin E (RRR- α -tocopherol; Dersjant-Li and Peisker, 2010). As a consequence, the objectives of our study were, with a diet inducing a *trans*10 shift, to investigate the effects of vitamin E supplementation beginning one week after fat supplementation on ruminal and milk fatty acids profiles, and to investigate *in vitro* the differences of effects between natural and synthetic vitamins E.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental design

For the *in vivo* experiment, six ruminally fistulated mid-lactation Holstein dairy cows were used in a 2×2 cross-over design. Cows were housed in individual stalls. Each period lasted four weeks, and was divided into two subperiods. The first two weeks were a wash-out period, and cows received 20 kg DM of a control diet based on maize silage (Table 1). During the two subsequent weeks, cows received the oil diet, *i.e.* the control diet supplemented with 600g of sunflower oil. The ingredients of the control diet were mixed before distribution, and oil was poured on the mixed ration. From day 8 of the second subperiod, cows received daily either no supplemental vitamin E or 30g of a 37% RRR- α -tocopherol acetate oil solution (Artimon, France). Diets and vitamin E supplement were distributed in two equal meals at 09.00 and 17.00 and water was available *ad libitum*.

For the *in vitro* experiment, two ruminally fistulated lactating cows were used. They were adapted for two weeks to the control diet described for the *in vivo* experiment.

2.2. Animals measurements and samples

Milk yield was weighed daily at each milking (06.30 and 17.30). Ruminal and milk samples were taken on days 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 of the second subperiod. One litre of ruminal content was taken 5 hours after the morning meal, strained through a metal sieve (1.6mm mesh) and the pH was measured. Two 8mL aliquots were transferred into 10mL vials containing 0.8mL of 2% HgCl₂ and were stored at -20°C until NH₃ and VFA analysis, and a 100 mL sample was kept at -20°C for FA analysis. Milk samples were taken from morning and evening milking and were composited based on milk yield.

2.3. In vitro incubations

In vitro incubations were conducted during 3 consecutive weeks, and lasted 52 hours. One litre of rumen fluid was collected from each donor cow before the morning meal, and strained through a metal sieve (1.6mm mesh). The rumen fluids were transported quickly (30 min) to the laboratory in anaerobic conditions at 39°C. In the laboratory, the pH of the rumen fluids was measured and the two rumen fluids were mixed. The incubation substrate (Table 1) was based on the same ingredients as the cow's diet, ground through a 0.5mm screen and supplemented with pure linoleic acid (Sigma Co., St. Louis, MO).

Table 1 *Ingredient and chemical composition of cows diets and in vitro incubation substrate*

	In vivo experiment		In vitro substrate
	Control diet	Oil diet	
Ingredients (kg/kg DM)			
Maize silage	0.57	0.55	0.37
Wheat	0.22	0.21	0.44
Soybean meal	0.20	0.20	0.15
Sunflower oil	0.00	0.03	0.00
Pure linoleic acid	0.00	0.00	0.045
Minerals-vitamins ¹	0.01	0.01	0.00
Composition (g/kg DM)			
Crude protein	170	165	155
NDF	310	301	246
Starch	319	310	415
Crude fat	25	54	66

DM = dry matter

¹Contained (per kg of premix) P: 40g, Ca: 260g, Mg: 50g, Na: 20g, Zn: 5g, Mn: 4g, Cu: 1g, I: 40 mg, Co: 20 mg, Se: 20mg, vitamin A: 450 000 IU, vitamin D3: 100 000 IU and vitamin E: 1 500 IU.

During each of the three weeks of incubation, on day 1 of incubation, 40 mL of each rumen fluid and 40 mL of a bicarbonate buffer solution (19.5 g/L of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9.24 g/L of NaHCO_3 , 0.705 g/L of NaCl , 0.675 g/L of KCl , 0.108 g/L of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 0.180 g/L of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were placed into six 250-mL flasks containing 1.20g of substrate, including 60mg of pure linoleic acid. Two flasks were not supplemented with vitamin E, two flasks were supplemented with 30mg of a 37% RRR- α -tocopherol oil solution (Artimon, France) and two flasks were supplemented with 24 mg of 50% dl- α -tocopherol acetate. The buffer solution was pre-warmed to 39°C and saturated with CO_2 . Its pH was then lowered to 6.0 with hydrochloric acid (6N) before being added to the 40 mL of rumen fluid. Next the flasks were gassed with CO_2 , closed with a rubber cap with a plastic tube leading into the water to vent fermentation gas without allowing the ingress of oxygen. Incubations were carried out at 39°C in a water-bath rotary shaker (Aquatron, Infors AG, 4103 Bottmingen, Germany). Flasks were stirred at 130 rpm and kept out of the light during incubation. After 24 and 48 hours of incubation, flasks were opened and 30 mL of buffer solution and the same substrate than at day 1, including linoleic acid and the same vitamins, was added. Flasks were filled with CO_2 before closing.

After 52 hours of incubation, fermentations were stopped by placing the flasks into ice and the pH was measured. The contents of the flasks were immediately frozen at -20°C and freeze-dried (Virtis Freezemobile 25, Virtis, Gardiner, NY), weighed, ground and homogenised in a ball mill (Dangoumau, Prolabo, Nogent-sur-Marne, France), and then stored at -20°C until analysis.

2.4. Chemical analyses

Milk fat and true protein contents were determined by infrared analysis (Milkoscan 605, Foss Electric, F-75001 Paris).

The FA of milk and rumen in vivo and in vitro samples were extracted and methylated using the procedure of Park and Goins (1994), except that the solution of 14% of boron trifluoride in methanol was replaced by a solution of methanolacetylchloride (10:1 v/v). Nonadecanoic acid (Sigma Co., St. Louis, MO) was used as the internal standard at a dose of 0.8 mg. Fatty acid methyl esters were quantified by gas chromatography (Agilent 6890N, equipped with a model 7683 auto injector, Network GC System, Palo Alto, CA) using a fused silica capillary column (100 m $\times$ 0.25 mm ID, 0.20 μm film thickness; CPSil88, Varian, Middelburg, the Netherlands). For analysis, the flame ionization detector temperature was maintained at 260°C and the injector at 255°C; the split ratio was 1:50. Hydrogen was used as the carrier

gas with a constant flow of 1ml/min. The samples were injected in 1 µl of hexane. The initial temperature of the oven was 60°C, which was held for 2 min; it was then increased by 8°C/min to 150°C, held at 150°C for 12 min, increased by 2°C/min to 175°C, held at 175°C for 20 min, increased by 5°C/min to 225°C, held at 225°C for 10 min and finally increased by 10°C/min to 240°C and maintained at 240°C for 10 min. Peaks were identified and quantified by comparison with commercial standards (Sigma Co., St. Louis, MO) except C18:1 other than *trans*9 C18:1, *trans*11 C18:1 and *cis*9 C18:1, which were identified by order of elution.

Concentrations of volatile fatty acids (VFA) in the rumen were determined by the method of Playne (1985) using automated gas separation, modified as follow: the ruminal samples were first centrifuged at 4000 x g for 20 minutes to separate the liquid phase. For protein removal, 1 mL of supernatant was mixed with 200 µL of 25 % metaphosphoric acid and further centrifuged at 20 000 x g for 15 minutes. One mL of supernatant was added to 200 µL (1% v/v) of 4-methylvaleric acid as internal standard and 1 µL of the mixture was then injected into a gas chromatograph (Hewlett Packard, Model 5890 Series II equipped with FID detector, Avondale, PA, USA). The determination of NH₃-N was based on the modified Berthelot reaction with the Skalar Method followed by a colorimetric test (Krom, 1980).

2.5. Calculations and statistical analyses

Sums of CLA, of *trans* C18:1, of *trans*10 and *trans*11 isomers were calculated by adding the assayed isomers.

Data from the *in vivo* experiment collected from day 1 to day 7, i.e. before vitamin E supplementation, were analysed using a repeated measures procedure with SYSTAT (version 9, SPSS Inc, 1998, Chicago), using the model:

$$\text{Variable} = \text{mean} + \text{period effect} + \text{cow effect} + \text{residual error}.$$

Data from the *in vivo* experiment collected from day 7 to day 13, i.e. the last sampling day before the beginning of vitamin E supplementation and the samples following vitamin E supplementation were analysed using a repeated measures procedure, with the model

$$\text{Variable} = \text{mean} + \text{period effect} + \text{cow effect} + \text{vitamin E effect} + \text{residual error}.$$

For both these analyses, linear, quadratic and cubic effects of time were determined, and for the second analyses, linear, quadratic and cubic effects of the interaction of sampling day by vitamin E supplementation (day × VitE) was assessed.

Data from the in vitro experiment were analysed using the model:

Variable = mean + week incubation effect + treatment effect + residual error.,
where treatment levels were no vitamin, natural vitamin E and synthetic vitamin E. When the treatment effect was significant, a Tukey test was used for pairwise comparisons. Effects were declared significant at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. In vivo experiment

During the first week with the oil diet, milk yield was not affected over time (Table 2), but milk fat content decreased from 33.4 on day 1 to 25.0 g/kg on day 7. Milk protein content varied quadratically but in a narrow range. During the second week of the oil diet subperiod, milk yield was not affected by time and no day $\times$ VitE interaction was detected. Milk fat content increased with quadratic and cubic components, and a quadratic day $\times$ VitE was linked to a drop of milk fat content at day 9 in supplemented cows. Milk protein content slightly increased over time and no day $\times$ VitE was observed.

Changes of milk fatty acids composition during the first week with the oil diet comprised a decrease of the proportions of all FA containing less than 18 carbons (Table 3). For C18 FA, C18:0 proportion slightly increased and the proportion of cis9,cis12 C18:2, which is the main FA of sunflower oil, quadratically decreased over time, as did total CLA, mainly due to a decrease of trans10,cis12 CLA. On the contrary, the proportion of total trans octadecenoic FA increased over time, due to a more than two fold increase of trans10 C18:1. During the second week of oil diet distribution, time effects on FA with less than 18 carbons were much more limited: decreases of proportions were in a narrower range than during the first week, and were not observed for C14:0 and C16:0. On the contrary, the proportion of this latter FA increased over time, but remained far lower than that observed at the beginning of the oil diet subperiod. Quadratic day $\times$ VitE interaction for C4:0, C6:0 and C8:0 reflected higher and less evolving values with vitamin E supplementation than in the unsupplemented cows. For C18 FA, cis9,cis12 C18:2 proportion was fairly constant with vitamin E addition and followed a quadratic pattern with a maximal value at d9 in unsupplemented cows. Total CLA were not affected by time or day $\times$ VitE interaction, but the proportion of trans10,cis12 CLA was affected by a day $\times$ VitE interaction, resulting in 40% lower proportion in supplemented than unsupplemented cows.

Table 2 *In vivo* experiment: effects of time from the beginning of oil incorporation to the diet and vitamin E supplementation on milk yield and composition

	Week 1						Week 2								
Day	1 ¹	3	5	7	SE	Effect ³	9		11		13		SE	Effect ⁴	
Vitamin E addition ²	No	No	No	No		Time	No	Yes	No	Yes	No	Yes		Time	Time×Vit E
Milk yield, kg/day	33.9	33.9	33.1	32.8	0.7		30.8	32.9	30.9	32.6	30.4	32.1	0.8		
Milk fat content, g/kg	33.4	28.2	24.2	25.0	2.3	L, Q	18.3	25.0	21.3	26.3	23.7	26.8	3.3	QC	Q
Milk protein content, g/kg	34.1	34.0	34.0	34.5	0.6	Q	35.5	35.5	37.0	35.1	37.4	35.4	0.6	L	

¹First day = switch from control to oil diet

²Vitamin E was added from day 8; 30mg of 37% RRR- α -tocopherol acetate

³L = linear effect, Q = quadratic effect, C = cubic effect

⁴Repeated measures analysis from day 7 to day 13

Table 3 *In vivo* experiment: effects of time from the beginning of oil incorporation to the diet and vitamin E supplementation on milk fatty acids profile (% of total fatty acid methyl esters)

Day ¹	Week 1						Week 2						SE	Effect ⁴	
	1	3	5	7	SE	Effect ³	9		11		13			Time	Time×Vit E
Vitamin E addition ²	No	No	No	No		Time	No	Yes	No	Yes	No	Yes			
C4:0	1.65	1.35	1.34	1.16	0.09	L	0.87	1.02	0.76	1.12	0.88	1.05	0.06	L, Q	Q
C6:0	1.15	0.90	0.84	0.76	0.06	L	0.57	0.66	0.50	0.73	0.55	0.72	0.05	Q	Q
C7:0	0.06	0.05	0.05	0.04	0.00		0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.00	L	
C8:0	0.90	0.69	0.65	0.58	0.04	L	0.45	0.52	0.40	0.57	0.43	0.56	0.04	Q	Q
C9:0	0.05	0.04	0.03	0.03	0.00	L, Q	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.00	L, Q	
C10:0	2.29	1.65	1.47	1.32	0.10	L, Q	1.05	1.21	0.96	1.29	0.98	1.32	0.11	Q	
C11:0	0.11	0.08	0.07	0.06	0.01	L, Q	0.05	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.00		
C12:0	3.91	2.97	2.65	2.50	0.14	L, Q	2.14	2.25	2.05	2.33	1.97	2.48	0.12	Q	
C13:0	0.19	0.17	0.16	0.15	0.01	L	0.14	0.13	0.13	0.13	0.12	0.14	0.01		
Anteiso C13:0	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	L, Q	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Iso C13:0	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01		0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.00	L, Q	
C14:0	10.50	9.05	8.18	7.89	0.34	L, Q	7.24	7.78	7.48	7.78	7.23	8.07	0.22		
Iso C14:0	0.06	0.05	0.05	0.03	0.01	LC	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.01		
C14:1	0.59	0.64	0.65	0.61	0.04		0.65	0.62	0.67	0.67	0.64	0.65	0.03		
C15:0	1.29	1.12	0.99	0.91	0.04	L, Q	0.94	0.91	0.95	0.93	0.93	0.96	0.04		
Anteiso C15:0	0.39	0.32	0.29	0.32	0.01	L, Q	0.31	0.29	0.28	0.27	0.27	0.29	0.02	L	
Iso C15:0	0.16	0.11	0.09	0.07	0.01	LC	0.06	0.08	0.06	0.08	0.06	0.10	0.01	Q	C
C16:0	25.43	21.51	19.71	18.53	0.53	L, Q, C	19.29	20.10	20.49	20.34	20.55	20.42	0.78	L	
C16:1	1.66	1.72	1.76	1.64	0.09		1.99	1.92	2.10	2.09	2.07	1.99	0.11	L, Q	
C17:0	0.53	0.44	0.38	0.38	0.01	L, Q	0.39	0.38	0.38	0.37	0.37	0.38	0.01		
Anteiso C17:0	0.53	0.43	0.39	0.43	0.02	L, Q	0.43	0.41	0.41	0.41	0.39	0.42	0.01		
Iso C17:0	0.37	0.33	0.31	0.31	0.01	L	0.31	0.29	0.29	0.30	0.29	0.31	0.02		

¹First day = switch from control to oil diet

²Vitamin E was added from day 8; 30mg of 37% RRR- α -tocopherol acetate

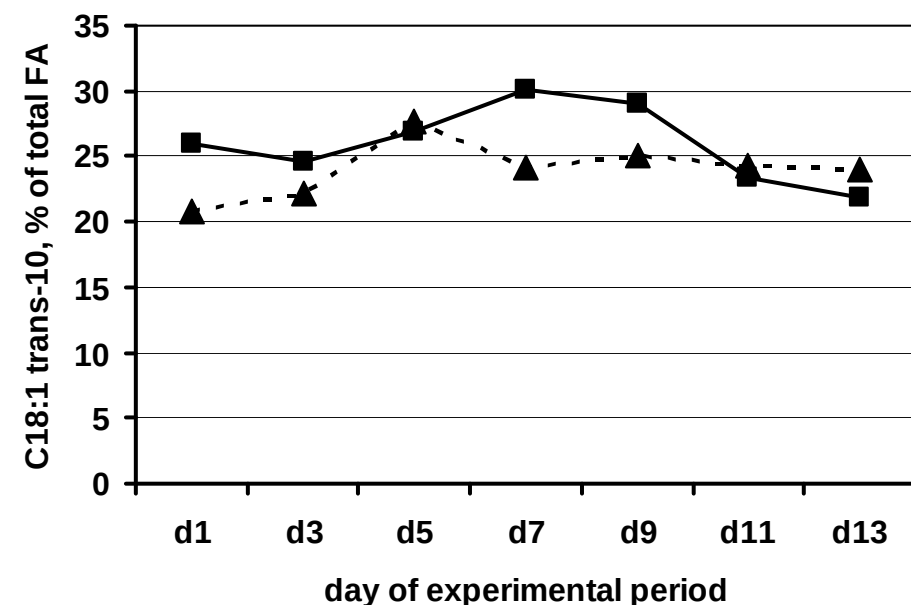
³L = linear effect, Q = quadratic effect, C = cubic effect

⁴Repeated measures analysis from day 7 to day 13

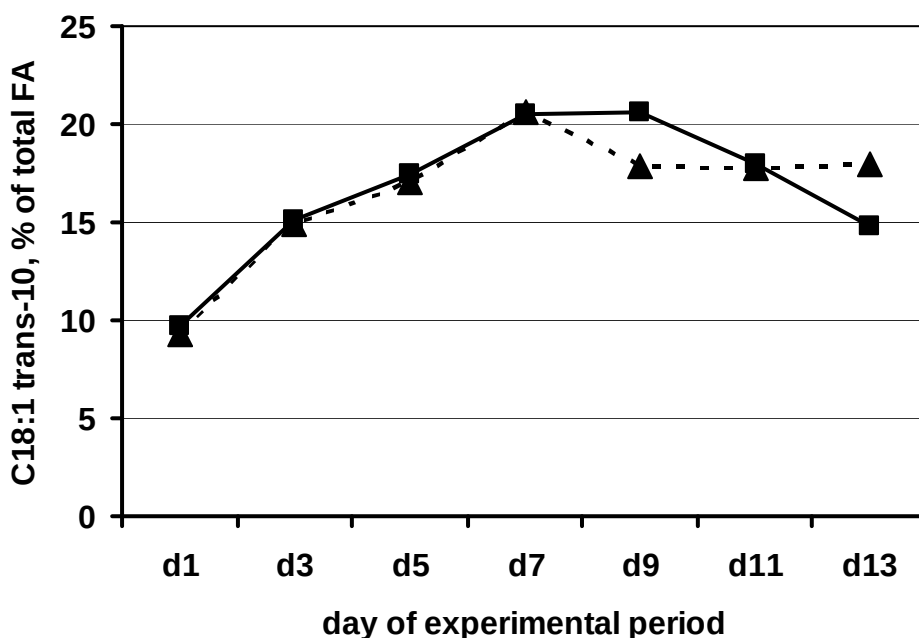
Table 3 Continued

Day ¹	Week 1						Week 2						SE	Effect ⁴
	1	3	5	7	SE	Effect ³	9	11	13	SE	Effect ⁴	Time× Vit E		
Vitamin E addition ²	No	No	No	No		Time	No	Yes	No	Yes	No	Yes		Time
C18:0	6.67	8.04	8.48	8.28	0.50	L, Q	7.39	8.38	8.22	8.11	9.85	7.98	0.57	
<i>Iso</i> C18:0	0.08	0.06	0.06	0.06	0.01	L	0.06	0.06	0.07	0.06	0.05	0.07	0.00	C
<i>cis</i> 9 C18:1	16.70	18.23	18.82	17.83	0.52	L, Q	18.17	19.51	19.41	19.14	22.07	18.66	1.06	Q
<i>cis</i> 11+ <i>trans</i> 15 C18:1	1.27	1.46	1.54	1.63	0.06	L	1.71	1.62	1.79	1.69	1.74	1.74	0.07	
<i>cis</i> 12 C18:1	0.43	0.38	0.38	0.43	0.05	Q	0.56	0.39	0.69	0.44	0.55	0.39	0.09	
<i>cis</i> 15 C18:1	0.07	0.12	0.15	0.16	0.01	L	0.18	0.19	0.19	0.22	0.18	0.23	0.01	L
<i>trans</i> 4 C18:1	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	L, Q	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	
<i>trans</i> 5 C18:1	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	L	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.00	C
<i>trans</i> 6+ <i>trans</i> 7+ <i>trans</i> C18:1	0.55	0.66	0.65	0.62	0.05		0.63	0.56	0.70	0.52	0.71	0.57	0.09	
<i>trans</i> 9 C18:1	0.32	0.40	0.46	0.49	0.06		0.38	0.48	0.43	0.34	0.40	0.40	0.09	
<i>trans</i> 10 C18:1	9.50	14.99	17.22	20.58	0.69	L, C	20.61	17.88	17.98	17.74	14.77	17.92	1.17	L, Q, C
<i>trans</i> 11 C18:1	2.43	2.25	2.13	1.96	0.25		1.91	1.95	1.80	2.05	1.76	2.00	0.17	
<i>trans</i> 12 C18:1	0.89	0.99	0.89	1.03	0.07		1.13	0.91	1.07	0.96	1.08	0.91	0.13	
<i>trans</i> 16 C18:1	0.24	0.22	0.21	0.19	0.02	L	0.19	0.19	0.21	0.18	0.27	0.16	0.04	
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12 C18:2	2.79	2.39	2.41	2.44	0.16	Q	2.80	2.54	2.57	2.42	2.32	2.32	0.09	Q, C, Q
<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 CLA	0.26	0.09	0.07	0.07	0.03	L, Q, C	0.10	0.05	0.08	0.05	0.08	0.05	0.01	Q, C
<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 CLA	0.88	0.94	0.92	0.76	0.08		0.89	0.88	0.87	0.82	0.82	0.80	0.05	
<i>trans</i> 9, <i>trans</i> 11 CLA	0.09	0.09	0.09	0.08	0.00		0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.01	
<i>trans</i> 11, <i>cis</i> 15 C18:2	0.08	0.09	0.10	0.12	0.01	L	0.12	0.10	0.10	0.11	0.07	0.11	0.02	L, C
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, <i>cis</i> 15 C18:3	0.23	0.19	0.19	0.21	0.01	Q	0.23	0.22	0.22	0.20	0.19	0.19	0.01	Q
<i>cis</i> 9 C20:1	0.09	0.11	0.12	0.13	0.00	L	0.14	0.12	0.12	0.13	0.10	0.13	0.01	Q
total <i>trans</i> C18:1	13.98	19.55	21.59	24.89	0.88	L, C	24.88	22.01	22.23	21.79	19.02	21.98	1.34	L, Q, C
total CLA	1.23	1.11	1.07	0.91	0.09	L	1.08	1.01	1.04	0.95	0.97	0.93	0.06	
total <i>trans</i> 10 FA	9.76	15.08	17.30	20.64	0.70	L, C	20.71	17.93	18.06	17.79	14.85	17.96	1.18	L, Q, C
total <i>trans</i> 11 FA	3.40	3.27	3.13	2.80	0.31		2.89	2.91	2.75	2.95	2.66	2.88	0.20	
<i>trans</i> 10 / <i>trans</i> 11 ratio	3.86	5.03	5.78	7.36	0.39	L	7.41	6.63	6.58	5.91	5.41	5.96	0.31	L, Q, C

Trans10 C18:1 was also affected by a day $\times$ VitE interaction (Figure 1), but average values during the supplementation period were similar in supplemented and unsupplemented cows. During this second week, C18:0 proportion was not affected over time and did not depend on vitamin E supplementation.



A



B

Figure 1 Evolution of rumen trans10 C18:1 (expressed as % of total fatty acids) and milk fat content (B) during the two weeks of experimental period with oil supplementation in cows unsupplemented (■) or supplemented with vitamin E from day 7 to day 13 (▲)

In the rumen, pH and ammonia and VFA concentrations were not affected by time during the two weeks of oil supplementation, and were not affected by day $\times$ VitE interaction (Table 4). The proportions of acetate and iso valerate decreased during the first week and increased during the second week, independently of vitamin E supplementation, whereas the proportion of valerate followed an opposite pattern. The ruminal proportions of FA with less than 18 carbons were poorly affected by time (Table 5): C17:0 increased at the beginning of the first week and then remained stable whereas C16:0 decreased between days 1 and 3. During the second week, C14:0 and C15:0 increased over time, and vitamin E supplementation did not affect these evolutions.

The proportions of cis9 C18:1, cis9,cis12 C18:2 and cis9,cis12,cis15 C18:3 in the rumen content were not affected by time or day $\times$ VitE interaction. Total CLA decreased during week 2, but with a high variability. Among CLA isomers, trans10,cis12 CLA remained fairly constant over time and did not depend on vitamin E supplementation, and cis9,trans11 CLA strongly increased from 0.14 to 0.51 of total FA during week 1, and decreased to 0.03% during week 2, independently on vitamin E supplementation. Trans10 C18:1 was the major trans isomer and increased during week 1 and decreased during week 2. A trend toward a linear day $\times$ VitE interaction ($P = 0.057$) was observed, proportions of trans10 C18:1 being fairly constant from day 7 to day 13 in vitamin supplemented cows, but decreasing in unsupplemented cows (Figure 1). The proportion of C18:0 also remained stable at around 27% during week 2 in vitamin supplemented cows, but increased from 22.2 to 31.3% between day 9 and day 13 in unsupplemented cows.

3.1. In vitro experiment

Natural and synthetic vitamins E resulted in different changes in fatty acid composition (Table 6). Compared to control, natural vitamin E increased the percentages of C16:0, cis9 C18:1, total trans C18:1 and some minor individual trans C18:1, total CLA and trans10,cis12 CLA, but decreased the percentages of cis9,cis12 C18:2. Compared to control, synthetic vitamin E increased both trans10,cis12 CLA and cis9,trans11 CLA. Compared to natural vitamin E, synthetic vitamin E resulted in lower cis9 C18:1 and higher cis9,cis12 C18:2 and CLA proportions.

Table 4 *In vivo* experiment: effects of time from the beginning of oil incorporation to the diet and vitamin E supplementation on rumen fermentation parameters

Day ¹	Week 1						Week 2							
	1	3	5	7	SE	Effect ³	9		11		13		SE	Effect ⁴
Vitamin E addition ²	No	No	No	No		Time	No	Yes	No	Yes	No	Yes		Time Time×Vit E
pH	5.79	5.85	5.66	5.82	0.11		5.72	5.77	5.79	5.76	5.77	5.74	0.11	
NH ₃ , mg/L	22.9	29.5	29.0	21.1	10.6		30.2	32.5	24.8	19.6	15.1	47.5	10.5	
Total VFA, mM	116	107	118	116	6		117	108	115	95	102	99	7	
Individual VFA, % of total VFA														
Acetate	52.9	51.9	50.1	48.5	1.4	L	48.3	48.9	47.6	50.3	55.4	54.2	1.6	L
Propionate	32.0	33.5	34.9	34.0	1.8		33.3	34.0	36.7	32.1	28.2	29.4	2.1	
<i>Iso</i> butyrate	0.69	0.64	0.62	0.65	0.05		0.64	0.63	0.70	0.84	1.18	1.00	0.09	L
Butyrate	9.54	8.92	9.38	10.82	0.65	Q	12.10	10.59	9.59	11.27	10.58	10.63	0.72	
<i>Iso</i> valerate	1.38	1.36	1.22	1.30	0.17	L	1.27	1.14	1.24	1.27	1.99	1.68	0.17	Q
Valerate	3.41	3.65	3.80	4.72	0.31	L	4.43	4.70	4.12	4.20	2.60	3.10	0.42	L, Q

¹First day = switch from control to oil diet

²Vitamin E was added from day 8; 30mg of 37% RRR- α -tocopherol acetate

³L = linear effect, Q = quadratic effect, C = cubic effect

⁴Repeated measures analysis from day 7 to day 13

Table 5 *In vivo* experiment: effects of time from the beginning of oil incorporation to the diet and vitamin E supplementation on rumen fatty acids profile (% of total fatty acid methyl esters)

Day ¹	Week 1						Week 2						Effect ⁴ Time×Vit E ³	
	1	3	5	7	SE	Effect ³	9	11	13	SE	Effect ³	SE		
Vitamin E addition ²	No	No	No	No		Time	No	Yes	No	Yes	No	Yes	Time	
C6:0	1.31	1.08	0.80	1.07	0.17	Q	1.01	0.76	1.00	1.00	0.97	1.02	0.17	
C7:0	0.20	0.17	0.13	0.17	0.05		0.19	0.11	0.20	0.16	0.19	0.18	0.04	
C8:0	0.14	0.13	0.12	0.14	0.01	Q	0.13	0.14	0.14	0.15	0.14	0.15	0.01	L
C9:0	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	
C10:0	0.02	0.02	0.02	0.02	0.00		0.02	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	
C11:0	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	Q	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	L
C12:0	0.27	0.27	0.26	0.26	0.02		0.27	0.29	0.28	0.31	0.29	0.31	0.02	L
C13:0	0.06	0.07	0.06	0.07	0.01		0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.01	
<i>Anteiso</i> C13:0	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Iso</i> C13:0	0.05	0.03	0.03	0.02	0.01	L	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	Q
C14:0	0.86	0.91	0.88	0.87	0.06		0.89	0.95	0.99	0.94	1.04	1.03	0.06	L
<i>Iso</i> C14:0	0.08	0.08	0.07	0.08	0.01		0.07	0.07	0.06	0.07	0.05	0.07	0.01	C
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
C15:0	0.23	0.23	0.21	0.22	0.02		0.19	0.22	0.21	0.24	0.23	0.25	0.02	L, Q
<i>Anteiso</i> C15:0	0.59	0.49	0.49	0.57	0.03	Q	0.51	0.49	0.47	0.54	0.47	0.48	0.04	
<i>Iso</i> C15:0	0.17	0.13	0.15	0.12	0.03	L	0.10	0.12	0.09	0.14	0.10	0.13	0.02	
C16:0	8.74	8.15	8.33	8.21	0.24	C	8.32	8.34	8.28	8.33	8.29	8.38	0.30	
C16:1	0.07	0.09	0.08	0.07	0.01	Q	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.00	
C17:0	0.12	0.15	0.14	0.15	0.01	C	0.14	0.15	0.14	0.16	0.14	0.16	0.00	
<i>Anteiso</i> C17:0	0.13	0.08	0.07	0.08	0.01	L, Q	0.05	0.07	0.06	0.09	0.06	0.07	0.00	
<i>Iso</i> C17:0	0.09	0.06	0.05	0.06	0.01	L, Q	0.05	0.06	0.04	0.07	0.04	0.06	0.00	

¹First day = switch from control to oil diet

²Vitamin E was added from day 8

³Repeated measures analysis from day 7 to day 13

⁴L = linear effect, Q = quadratic effect, C = cubic effect

Table 5 Continued

Day ¹	Week 1					Effect ³	Week 2					SE	Effect ⁴	Time×Vit E ³
	1	3	5	7	SE		9	11	13	SE				
Vitamin E addition ²	No	No	No	No		Time	No	Yes	No	Yes	No	Yes		Time
C18:0	22.59	26.47	25.45	24.01	2.45		22.24	27.24	28.59	26.57	31.32	26.70	2.57	L
<i>Iso</i> C18:0	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	C
<i>cis</i> 9 C18:1	5.67	4.63	5.05	4.34	0.49		5.33	4.70	4.88	4.03	4.85	4.19	0.58	
<i>cis</i> 11+ <i>trans</i> 15 C18:1	1.27	1.26	1.38	1.29	0.09		1.36	1.38	1.51	1.32	1.39	1.37	0.08	
<i>cis</i> 12 C18:1	0.59	0.46	0.51	0.61	0.12		0.81	0.44	0.81	0.50	0.81	0.44	0.17	
<i>cis</i> 15 C18:1	0.09	0.08	0.08	0.09	0.01	Q	0.10	0.08	0.11	0.08	0.09	0.09	0.01	Q
<i>trans</i> 4 C18:1	0.06	0.04	0.04	0.04	0.01		0.05	0.07	0.05	0.04	0.08	0.05	0.02	
<i>trans</i> 5 C18:1	0.06	0.05	0.05	0.05	0.01		0.06	0.07	0.05	0.04	0.08	0.05	0.02	
<i>trans</i> 6+ <i>trans</i> 7+ <i>trans</i> 8 C18:1	0.98	0.72	0.70	0.62	0.12	L, C	0.78	0.58	0.81	0.56	0.79	0.61	0.15	
<i>trans</i> 9 C18:1	0.65	0.45	0.54	0.39	0.13	C	0.72	0.24	0.44	0.48	0.35	0.42	0.09	Q
<i>trans</i> 10 C18:1	23.37	23.43	27.23	27.16	2.18	L, C	29.03	25.05	23.31	24.29	21.79	24.04	2.75	L
<i>trans</i> 11 C18:1	4.04	3.07	3.11	2.66	0.50		2.79	2.83	2.44	2.65	2.11	2.81	0.45	
<i>trans</i> 12 C18:1	1.46	1.29	1.59	1.23	0.19	C	1.41	1.19	1.42	1.11	1.31	1.10	0.19	
<i>trans</i> 16 C18:1	0.28	0.23	0.21	0.18	0.04	L	0.17	0.21	0.28	0.18	0.29	0.18	0.05	
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12 C18:2	2.62	2.91	2.89	3.00	0.41		3.97	3.48	3.09	2.94	3.11	3.69	0.79	
<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 CLA	0.31	0.31	0.47	0.34	0.11		0.29	0.26	0.34	0.26	0.27	0.28	0.10	
<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 CLA	0.14	0.39	0.41	0.51	0.12	L	0.10	0.52	0.01	0.03	0.02	0.04	0.17	L
<i>trans</i> 9, <i>trans</i> 11 CLA	0.10	0.14	0.14	0.13	0.03		0.10	0.18	0.08	0.06	0.08	0.06	0.04	L
<i>trans</i> 11, <i>cis</i> 15 C18:2	0.18	0.19	0.23	0.24	0.02	L	0.23	0.21	0.16	0.20	0.16	0.19	0.03	L
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, <i>cis</i> 15 C18:3	0.23	0.22	0.20	0.22	0.02		0.21	0.20	0.22	0.23	0.18	0.22	0.02	
<i>cis</i> 9 C20:1	0.13	0.14	0.15	0.15	0.01	L, C	0.16	0.14	0.13	0.14	0.13	0.14	0.01	L
total <i>trans</i> C18:1	30.90	29.29	33.47	32.31	2.42	C	35.00	30.24	28.81	29.36	26.80	29.25	3.07	L
total CLA	0.55	0.84	1.02	0.98	0.21		0.49	0.97	0.43	0.35	0.37	0.38	0.20	L
total <i>trans</i> 10 FA	23.68	23.74	27.69	27.50	2.22	L, C	29.32	25.31	23.65	24.55	22.05	24.32	2.73	L
total <i>trans</i> 11 FA	4.28	3.59	3.66	3.30	0.51		2.99	3.54	2.53	2.73	2.22	2.91	0.57	L
<i>trans</i> 10 / <i>trans</i> 11 ratio	8.18	8.68	9.16	11.10	1.26		11.19	11.18	9.63	9.92	9.87	9.84	0.99	C

Table 6 *In vitro* experiment: effects natural or synthetic vitamin E on rumen fatty acids profile (% of total fatty acid methyl esters)

Vitamin E	No vitamin	Natural	Synthetic	SE	P
C14:0	0.58	0.60	0.61	0.01	0.051
<i>Iso</i> C14:0	0.11	0.11	0.11	0.00	0.864
C15:0	0.33	0.34	0.34	0.00	0.114
<i>Anteiso</i> C15:0	0.82	0.83	0.84	0.01	0.218
<i>Iso</i> C15:0	0.26	0.27	0.27	0.00	0.506
C16:0	7.35 ^b	7.62 ^a	7.58 ^{ab}	0.06	0.022
C16:1	0.06	0.08	0.06	0.01	0.204
C17:0	0.25	0.25	0.25	0.00	0.758
<i>Anteiso</i> C17:0	0.28	0.28	0.28	0.00	0.610
<i>Iso</i> C17:0	0.17	0.17	0.17	0.00	0.381
C18:0	25.04	24.31	25.13	0.24	0.060
<i>cis</i> 9 C18:1	3.97 ^b	4.90 ^a	4.08 ^b	0.08	<0.001
<i>cis</i> 11+ <i>trans</i> 15 C18:1	0.88	0.97	0.88	0.03	0.045
<i>cis</i> 12 C18:1	0.78 ^b	1.39 ^a	0.76 ^b	0.04	<0.001
<i>cis</i> 15 C18:1	0.06 ^b	0.08 ^a	0.07 ^{ab}	0.00	0.008
<i>trans</i> 4 C18:1	0.03 ^b	0.04 ^{ab}	0.05 ^a	0.00	0.031
<i>trans</i> 5 C18:1	0.03 ^b	0.05 ^a	0.05 ^a	0.00	0.017
<i>trans</i> 6+ <i>trans</i> 7+ <i>trans</i> 8 C18:1	0.51 ^b	0.66 ^a	0.53 ^b	0.02	<0.001
<i>trans</i> 9 C18:1	0.25 ^b	0.33 ^a	0.25 ^b	0.01	<0.001
<i>trans</i> 10 C18:1	13.02	14.36	13.31	0.36	0.052
<i>trans</i> 11 C18:1	1.23	1.21	1.36	0.05	0.133
<i>trans</i> 12 C18:1	0.72 ^b	0.87 ^a	0.72 ^b	0.02	<0.001
<i>trans</i> 16 C18:1	0.44	0.43	0.44	0.01	0.752
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12 C18:2	25.10 ^a	22.25 ^b	24.28 ^a	0.45	0.002
<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12 CLA	1.76 ^c	2.11 ^b	2.46 ^a	0.09	<0.001
<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11 CLA	0.06 ^b	0.09 ^{ab}	0.16 ^a	0.02	0.023
<i>trans</i> 11, <i>cis</i> 15 C18:2	0.12	0.11	0.10	0.01	0.328
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, <i>cis</i> 15 C18:3	0.65	0.65	0.68	0.01	0.139
<i>cis</i> 9 C20:1	0.07	0.07	0.08	0.01	0.266
total <i>trans</i> C18:1	16.24 ^b	17.96 ^a	16.72 ^{ab}	0.41	0.030
total CLA	1.82 ^c	2.20 ^b	2.62 ^a	0.10	<0.001
total <i>trans</i> 10 FA	14.78 ^b	16.46 ^a	15.78 ^{ab}	0.43	0.046
total <i>trans</i> 11 FA	1.29	1.30	1.52	0.07	0.047
<i>trans</i> 10 / <i>trans</i> 11 ratio	12.56 ^b	13.60 ^a	11.64 ^c	0.77	0.235

^{a-c}Mean values within the same row sharing no common superscript are significantly different ($P<0.05$).

4. Discussion

3.1. Effects of oil addition

Our dietary management resulted in a very rapid and important trans10 shift, since ruminal and milk proportions of trans10,cis12 CLA and trans10 C18:1 were over that of cis9,trans11 CLA and trans11 C18:1 from the first day of oil supplementation, and the trans10/trans11 ratio reached around 10 in the rumen and 6 in milk from day 3. These results contrast with those of Roy et al. (2006) who, using a 72% concentrate diet based on maize silage and adding sunflower oil, observed trans10/trans11 ratios around 0,6 before oil supplementation and during the first week of oil supplementation, and around 5 after 10 days of oil feeding. The difference between studies could be due to the nature of concentrate: we used wheat, a highly fermentable starch, whereas Roy et al. (2006) used maize grain, a low fermentable starch. Accordingly, Jurjanz et al. (2004) observed higher milk trans10 content when cows received wheat than potatoes, another slowly fermentable starch. Milk fat content linearly and quadratically decreased during the first week of oil supplementation, which is in line with present knowledge (Shingfield and Griinari, 2007) regarding the relationship between trans10,cis12 CLA and milk fat content. Nevertheless, in spite of very high values of trans10,cis12 CLA in milk and rumen at day 1, milk fat content decrease was delayed, which is in agreement with the study of Perfield et al. (2004) using ruminal protected CLA. Thereafter, milk fat content remained steady during the second week (Figure 2). At day 1, milk trans10,cis12 CLA exhibited a very high value compared to other days, whereas rumen trans10,cis12 CLA was similar to values observed the following days. This decrease of trans10,cis12 CLA in milk in spite of a constant ruminal proportion could suggest an evolution of the transfer of this FA into milk fat. Chouinard et al. (1999) already demonstrated a low transfer of trans10,cis12 CLA from the digestive tract to milk, but their measures were performed after 5 days of abomasal infusion, which does not preclude a time evolution at the beginning of infusions. Such a decrease of trans10,cis12 CLA transfer from the digestive tract to milk could be explained by an effect of this FA on milk transfer of FA with more than 16 carbons, since enzymes implicated in their mammary uptake are inhibited by this trans10,cis12 CLA (Perterson et al., 2003). As for milk fat depression, reduction of FA uptake could have been delayed in the present study, underlying a time-dependent adaptation of mammary metabolism to high ruminal production of trans10,cis12 CLA.

Beside this rapid change of trans FA, time effects were observed on other milk FA. The percentages of short and medium chain FA decreased during the first week of oil supplementation, which is consistent with literature relative to the effects of fat

supplementation (Glasser et al., 2007). Some odd and branched-chain VFA and FA in the rumen, and FA in milk fat also decreased, which suggests modifications of microbial populations (Vlaeminck et al., 2006).

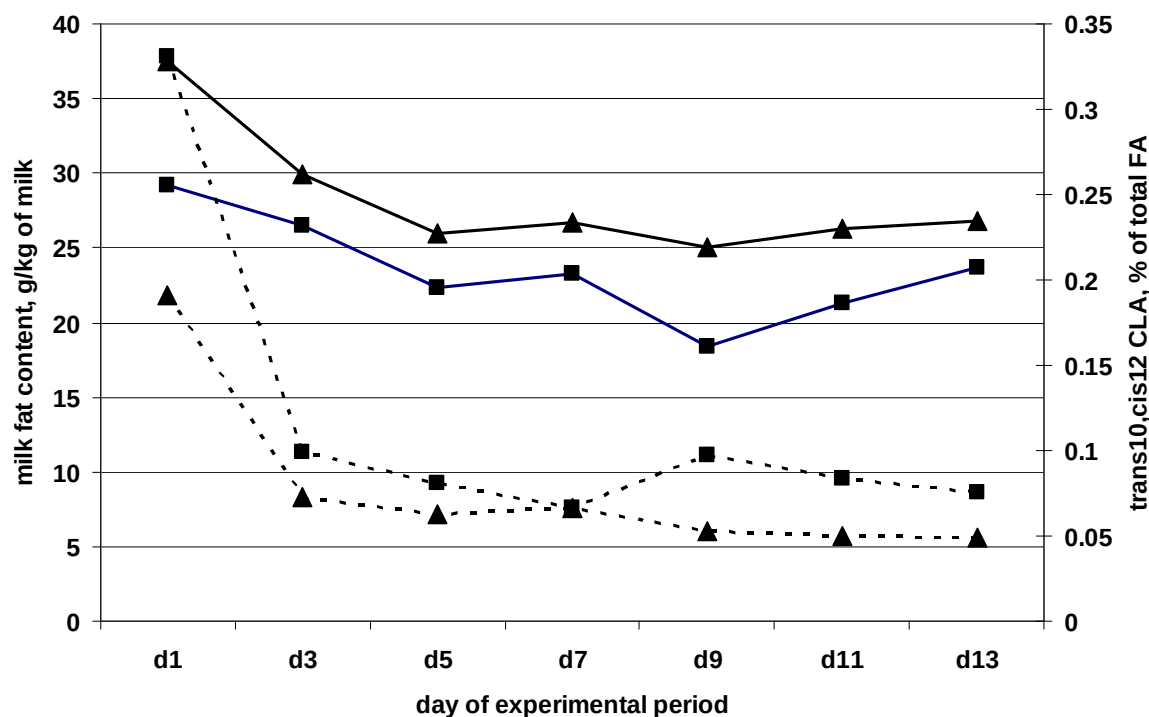


Figure 2 Evolution of *trans*₁₀,*cis*₁₂ CLA (expressed as % of total fatty acids) in milk fat (---) and of milk fat content (—) during the two weeks of experimental period with oil supplementation in cows unsupplemented (■) or supplemented with vitamin E from day 7 to day 13 (▲)

3.1. Effects of vitamin E addition

As a whole, effects of vitamin E were limited, and not completely consistent between rumen and milk measurements. During the second week of oil supplementation in the *in vivo* experiment, vitamin E resulted in more steady percentages of rumen C18:0, rumen and milk total trans C18:1 and milk *trans*₁₀ C18:1, whereas without vitamin E supplementation, C18:0 percentage decreased and trans C18:1 percentage increased over time. These different patterns could suggest a more rapid adaptation of the reduction of trans C18:1 fatty acids to C18:0 with an oil rich diet, but with a very transient effect. The implication of vitamin E in the reduction of trans C18:1 to C18:0 has not been studied, contrary to the known implication of

vitamin E in the reduction of CLA to trans C18:1 (Hughes et al., 1982). In this latter reaction, α -tocopherolquinol acts as an electron donor during the reduction, but, as far as we are aware, no quantitative recommendation of vitamin E supply for cows related to this function has been proposed. In our study, vitamin E supplementation did not affect the ratio of trans C18:1 to CLA, which could be due to the 300 mg of vitamin E supplied by the standard commercial premix to all cows being sufficient to sustain this reduction. The more stable proportion of trans₁₀ C18:1 observed in milk fat in vitamin E supplemented cows was due to a drop of this proportion at day 9, i.e. one day after the beginning of vitamin E supplementation. However, the same drop was observed in the rumen at day 7 in cows that began to receive vitamin E at day 8 (Figure 1), which makes a true relationship between vitamin E and this stabilisation questionable. Previous experiments also showed limited effects of vitamin E supplementation on the trans₁₀ shift. In steers receiving high grain diets, Juárez et al. (2010) observed a reduction of the trans₁₀/trans₁₁ ratio in the backfat when steers received supplemental vitamin E, but the same authors observed no effect of vitamin E on trans₁₀ C18:1 in intramuscular fat when steers received flax as a source of polyunsaturated FA (Juárez et al., 2011). In dairy cows, Bell et al. (2006) and Ferlay et al. (2010) observed an increase or no effect of vitamin E on trans₁₀ FA, respectively, but with a trans₁₀ to trans₁₁ ratio that was far under 1. In dairy cows, Pottier et al. (2006) observed a decrease of this ratio with supplemental vitamin E in cows supplemented from the beginning with linseed oil, but did not observe this effect when vitamin E was provided 3 weeks after oil supplementation. Similarly, in our experiment, vitamin E was supplemented after the trans₁₀ shift, so our lack of effects is in line with the results of Pottier et al. (2006).

In vitro, both vitamin E forms increased the proportions of cis₉,trans₁₁ and trans₁₀,cis₁₂ CLA, synthetic vitamin E resulting in larger increases than the natural form. This result could relate to a slightly decreased proportion of C18:2 with natural vitamin E. Similarly, the proportion of total trans₁₀ C18:1 was increased by natural vitamin E, but, whereas statistically significant, the change was in a narrow range. Although not completely similar, the effects of natural and synthetic vitamin E were very limited, suggesting that vitamin E was neither a limiting factor of rumen BH nor a modulator of BH pathway.

In conclusion, vitamin E supplementation of dairy cows exhibiting a *trans*₁₀ shift of ruminal BH due to oil supplementation of a high wheat diet did not result in a reversal of BH pathway, which precluded any conclusion regarding differential effects of natural and synthetic vitamin E.

References

- Bell JA, Griinari JM and Kennelly JJ 2006. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science* 89, 733–748.
- Bhattacharyya A, Banua J, Rahmana M, Causey J and Fernandes G 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17, 789–810.
- Chouinard PY, Corneau L, Barbano DM, Metzger LE and Dale E. Bauman DE 1999. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *Journal of Nutrition* 129, 1579–1584.
- Dersjant-Li Y and Peisker M 2010. Utilization of stereoisomers from alpha-tocopherol in livestock animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94, 413–421.
- Ferlay A, Martin B, Lerch S, Gobert M, Pradel P and Chilliard Y 2010. Effects of supplementation of maize silage diets with extruded linseed, vitamin E and plant extracts rich in polyphenols, and morning v. evening milking on milk fatty acid profiles in Holstein and Montbéliarde cows. *Animal* 4, 627–640.
- Glasser F, Doreau M, Ferlay A, Looor JJ and Chilliard Y 2007. Milk fatty acids: Mammary synthesis could limit transfer from duodenum in cows. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 817–827.
- Hughes PE, Hunter WJ and Tove SB 1982. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. purification and properties of cis-9,trans-11-octadecadienoate reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 3643–3649.
- Juárez M, Dugan MER, Aalhus JL, Aldai N, Basarab JA, Baron VS and McAllister TA 2010. Dietary vitamin E inhibits the trans 10-18:1 shift in beef backfat. *Canadian Journal of Animal Science* 90, 9–12.

Juárez M, Dugan MER, Aalhus JL, Aldai N, Basarab JA, Baron VS and McAllister TA 2011. Effects of vitamin E and flaxseed on rumen-derived fatty acid intermediates in beef intramuscular fat. *Meat Science* 88, 434–440.

Jurjanz S, Monteils V, Juaneda P and Laurent F 2004. Variations of trans octadecenoic acid in milk fat induced by feeding different starch-based diets to cows. *Lipids* 37, 19–24.

Kay JK, Roche JR, Kolver ES, Thomson NA and Lance H Baumgard LH 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research* 72, 322–332.

Krom, M.D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia. *The Analyst* 105, 305–316.
Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y and Doreau M 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans-fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 2472–2485.

Park PW and Goins RE 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *Journal of Food Science* 59, 1262–1266.

Perfield JW, Lock AL, Pfeiffer AM and Bauman DE 2004. Effects of amide-protected and lipid-encapsulated conjugated linoleic acid (CLA) supplements on milk fat synthesis. *Journal of Dairy Science* 87, 3010–3016.

Peterson DG, Matitashvili EA and Bauman DE 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10, cis-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *Journal of Nutrition* 133, 3098–3102.

Piperova LS, Sampugna L, Teter BB, Kalscheur KF, Yurawecz MP, Ku Y, Morehouse KM and Erdman RA 2002. Duodenal and milk trans octadecanoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *Journal of Nutrition* 132, 1235–1241.

Playne MJ 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic acid and succinic acid in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36, 638–644.

Pottier J, Focant M, Debier C, De Buysser G, Goffe C, Mignolet E, Froidmont E and Larondelle Y 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy Science* 89, 685–692.

Roy A, Ferlay A, Shingfield KJ and Chilliard Y 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science* 82, 479–492.

Shingfield KJ and Griinari JM 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 799–816.

Shingfield KJ, Reynolds CK, Herva G., Griinari JM, Grandison AS and Beever D.E. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89, 714-732.

Vlaeminck B, Fievez V, Cabrita ARJ, Fonseca AJM and Dewhurst RJ 2006a. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology* 131, 389-417.

DISCUSSION

GÉNÉRALE

En élevage, l'utilisation de rations à base d'ensilage de maïs, riches en concentrés surtout si elles comprennent une source de matière grasse insaturée, peut conduire à une déviation de la voie t11 à la voie t10 de la BH ruminale. Cette déviation ou « shift » induit chez la vache une baisse importante du taux butyreux représentant une contrainte pour les éleveurs, mais pourrait également altérer les qualités nutritionnelles des matières grasses du lait. Ce « shift » a été défini comme étant une augmentation significative des isomères t10 au détriment des isomères t11, sachant que dans des conditions physiologiques normales, ces derniers sont les principaux isomères *trans* dans le rumen et que la proportion des isomères t10 est très faible (<1% des AG totaux).

Ce travail de thèse avait pour objectif de préciser les mécanismes microbiens et enzymatiques impliqués dans ce « shift » afin de mieux comprendre les modalités de son apparition, en utilisant deux approches conduites en parallèle : une approche *in vivo*, qui nous a permis d'étudier les modifications du microbiote, en terme de composition bactérienne mais aussi des différents paramètres physicochimiques dans le rumen de vaches laitières, et une approche *in vitro* pour une meilleure compréhension des activités microbiennes et enzymatiques associées à ce shift.

Dans notre expérimentation (**Article 1 page 107**), le shift de la voie t11 à la voie t10 ne s'est produit *in vivo* que lorsqu'il y a eu association de deux facteurs alimentaires : une ration riche en amidon (mélange blé-orge) et une source d'AGPI (huile de tournesol). Cette constatation a déjà été soulignée dans les études de Griinari et al. (1998), Roy et al. (2006) et Loor et al. (2004). Ce résultat a été validé *in vitro* dans notre étude (**Article 2 page 133**) et dans ce cas, le shift n'était observé que lorsque du c9,c12-C18:2 avait été ajouté dans des cultures dont le contenu ruminal provenait de vaches ayant reçu des rations riches en amidon, surtout si elles étaient en plus enrichies en huile. Cette observation montre l'importance d'une part d'un microbiote adapté de la vache donneuse à un enrichissement du milieu en amidon rapidement fermentescible et d'autre part de l'addition d'AGPI agissant principalement comme substrat.

Par ailleurs, sachant que lors d'une supplémentation lipidique, généralement apportée sous forme de matières grasses insaturées en particulier de lin (Loor et al., 2004) contenant du c9,c12-C18:2 et du c9,c12,c15-C18:3, ce shift pouvait se produire, la question était de savoir quelle était la contribution du c9,c12,c15-C18:3 dans la production des isomères t10. Pour ce faire, des incubations *in vitro* ont été réalisées en comparant des cultures contenant du c9,c12-

C18:2 à d'autres contenant du c9,c12,c15-C18:3. Les résultats de cette étude (**Article 3 page 159**) révèlent qu'il n'y a pas eu de production d'isomères t10 lorsque du c9,c12,c15-C18:3 était incubé, ce qui montre que ces AG proviendraient exclusivement de la BH du c9,c12-C18:2 contrairement à la voie t10 de BH du c9,c12,c15-C18:3 proposée par Kramer et al. (2004). Ainsi les facteurs alimentaires de maîtrise de la déviation de la voie t11 vers la voie t10, sont la teneur en amidon rapidement fermentescible et la teneur en c9,c12-C18:2.

La forte augmentation de la proportion d'AG t10 ou de t11 peut être expliquée soit par une augmentation du nombre de bactéries compétentes et/ou une augmentation de leurs productions d'enzymes, soit par des enzymes plus actives avec un nombre de bactéries productrices non modifié, soit les deux. Une étude enzymatique (**Article 4 page 187**) a été réalisée dans le but d'explorer les effets du régime (quantité d'enzymes) et du pH (activité enzymatique) sur les deux types d'isomérisation. Les résultats ont montré que les deux voies sont inhibées à pH bas (5,5) et que la Δ^{12} isomérisation est peu affectée par le régime de la vache donneuse contrairement à la Δ^9 isomérisation qui n'a été réellement détectée que dans le contenu ruminal de la vache recevant le régime riche en amidon et en huile de tournesol.

L'augmentation de la production des AG t10 liée à l'amidon ne résulte donc pas d'une augmentation de l'activité de la Δ^9 isomérisation mais plutôt d'une augmentation du nombre de bactéries compétentes à biohydrogéner et/ ou d'une augmentation de leurs productions d'enzymes. Par contre l'amidon, via l'abaissement du pH ruminal qu'il induit, fait baisser l'activité de la Δ^{12} isomérisation. Ceci est en accord avec les travaux de Kepler et Tove (1967), montrant que le pH optimal de la Δ^{12} isomérisation est situé entre 7 et 7,2.

Ainsi, ces différents résultats nous ont permis d'apporter quelques éléments de réponses quant aux voies de BH et aux mécanismes microbiens et enzymatiques qui y sont associés.

La quantité de métabolites formés (AG t10 et t11 dans notre étude) est théoriquement le résultat de quatre facteurs : la quantité de substrat disponible, le nombre de bactéries et leurs quantités d'enzymes produites et enfin l'activité des enzymes. Le tableau 14 regroupe les observations de nos études *in vivo* et enzymatique (**Articles 1 et 4**) et nous permet d'avancer un certain nombre d'hypothèses.

Tableau 14. Observations de nos études *in vivo* et enzymatiques

	Ration Témoin		Ration Amidon		Ration Huile		Ration Amidon + Huile	
Voie de BH	t10	t11	t10	t11	t10	t11	t10	t11
AG produits	0	+	0	+	0	+++	+++	0
Substrat BH	+		+		+++		+++	
Activités enzymatiques (Δ^9 ou Δ^{12})	+++	+++	+	+	+++	+++	+	+
pH ruminal (5h après repas)	6,3		5,7		6,3		5,7	

Pour la ration T, les activités enzymatiques sont bonnes en raison du pH, mais il y a peu de substrat de BH et aucun shift de la voie t11 à la voie t10 n'a été observé. En effet, Kepler et Tove (1967) ont montré que la Δ^{12} isomérase bactérienne de *Butyrivibrio fibrisolvens* a une très grande affinité pour le c9,c12-C18:2, donc probablement supérieure à l'affinité de la Δ^9 isomérase. Quand la ration « Amidon » est administrée, suite au faible pH induit par l'amidon, les isomérisations (Δ^9 et Δ^{12}) sont toutes les deux diminuées. Dans ce cas, le shift n'a pas lieu, les AG t11 sont produits en quantité équivalente à la celle de la ration « témoin », suggérant qu'il existerait un nombre suffisant de bactéries productrices d'AG t11 bien que l'isomérisation Δ^{12} soit ralentie par l'abaissement du pH. Cependant, les bactéries productrices d'AG t10 sont présentes et potentiellement actives puisque quand le contenu

ruminal des vaches recevant la ration « Amidon » est mis à incuber avec du c9,c12-C18:2 (**Article 2 page 133**), les isomères t10 deviennent majoritaires. La ration « Huile » quant à elle réunit toutes les conditions (disponibilité du substrat, pH élevé) pour produire des AG t11. Au contraire avec la ration « Amidon + Huile », il y a une forte production d'AG t10 au détriment des t11, suggérant qu'un excès de substrat sature la voie t11 qui est de faible efficacité en raison des conditions de pH bas, induites par l'amidon, ne sont pas favorables aux bactéries effectrices et/ou à leurs synthèses d'enzymes, et surtout en raison de l'activité de Δ^{12} isomérisation qui est très fortement ralentie. L'augmentation de la production d'AG t10 avec la ration « Amidon + Huile » par rapport à « Amidon » peut s'expliquer par la capacité limitée de la Δ^{12} isomérisation à prendre en charge le supplément de substrat dans des conditions de pH faible. L'augmentation de la production d'AG t10 avec la ration « Amidon + Huile » par rapport à « Huile » peut s'expliquer par la baisse de la capacité de la Δ^{12} isomérisation lorsque le pH est bas. Bien que la Δ^9 isomérase soit également peu efficace à pH bas et que son affinité pour le substrat soit inférieure à celle de la Δ^{12} isomérase, la production d'AG t10 est élevée avec le régime « Amidon + Huile ». Ceci suggère une quantité de Δ^9 isomérase plus élevée, en raison d'une augmentation du nombre de bactéries effectrices et/ou d'une augmentation de leurs productions d'enzymes.

En résumé, ces constatations nous permettent de conclure que l'amidon oriente la BH en faveur de la production d'AG t10, et que cette voie ne s'exprime fortement que lorsque du substrat (c9,c12-C18:2) est ajouté en grande quantité dans le milieu, engendrant une saturation des capacités de BH de la voie t11, par manque de bactéries effectrices et/ou une production réduite d'enzymes, s'ajoutant à une inhibition sévère de l'enzyme. C'est pourquoi l'amidon seul peut ne pas avoir d'effet sur les voies de la BH, l'effet dépendant de la teneur en c9,c12-C18:2 dans la ration. Dans l'étude de Piperova et al. (2002), l'amidon de maïs a induit ce shift avec des rations à 2% de c9,c12-C18:2 dans la ration. Dans notre étude, ce shift n'a pas eu lieu lorsque le c9,c12-C18:2 était à une dose inférieure à 1% (/MS). La dose seuil est donc probablement comprise dans cet intervalle (1 à 2% de la MSI). En effet les AGPI sont reconnus être toxiques pour les bactéries (Maia et al., 2010), qui doivent les hydrogéner quelles que soient les conditions dans le rumen. D'où notre hypothèse de mise en place par le microbiote de la voie t10 lorsque la voie t11 ne suffit pas à détoxiquer le milieu.

En termes de microbiote ruminal, nos études se sont concentrées sur la communauté bactérienne. Bien que les bactéries ruminales aient fait l'objet de nombreux travaux, la majorité des chercheurs ont utilisé des méthodes de culture pure. Ainsi les implications réelles *in vivo* des bactéries étudiées dans les différentes voies de la BH ruminale restent encore mal connues. Nos principaux résultats ont porté sur la structure et la diversité de la communauté bactérienne en réponse à des perturbations alimentaires (addition d'amidon et/ou de matière grasse insaturée) et de façon plus précise sur les variations de la composition de cette communauté.

L'écosystème ruminal de tous les échantillons collectés *in vivo* a été caractérisé dans un premier temps par la technique CE-SSCP donnant une image globale de la communauté bactérienne et permettant de comparer cette communauté entre nos échantillons. Néanmoins, cette technique ne permet pas de savoir à quelles populations attribuer les modifications observables, en revanche, elle nous a permis de repérer les échantillons montrant des variations inter-profils SSCP intéressantes. Les échantillons ainsi sélectionnés ont été analysés par pyroséquençage 454 aboutissant à une détermination plus précise de la composition de la communauté bactérienne et des modifications de profils bactériens induites par nos différents régimes.

Nos résultats ont montré que la composition de la communauté bactérienne du rumen est en effet liée aux régimes administrés aux vaches (**Article 5 page 199**). En particulier, la ration riche en amidon et en huile de tournesol a entraîné une augmentation significative de l'abondance relative des *Prevotellaceae* et une diminution de celles des *Ruminococcaceae* et des *Rikenellaceae* par rapport aux autres rations. Parmi les genres bactériens identifiés, nombre d'entre eux ont été affectés par l'addition d'amidon, de manière cohérente avec la littérature. L'addition d'huile seule a eu peu d'effet sur la communauté bactérienne, contrairement à ce que l'on attendait de son effet toxique sur les bactéries fibrolytiques, montré *in vitro* par Maia et al. (2010), quoique cet l'impact sur le microbiote était limité dans certaines études menées *in vivo* (Yang et al., 2009; Belenguer et al., 2010; Huws et al., 2011). Néanmoins cette approche ne nous permettait pas de conclure quand à la relation entre les AG t10 et le microbiote, bien que la ration riche en amidon et en huile ait été la seule à induire un shift. A l'aide d'une régression multiple SPLS, des corrélations ont alors été recherchées entre d'une part les proportions d'AG t10 ou t11 dans le contenu ruminal et les taxons obtenus par pyroséquençage d'autre part (**Article 6 page 233**).

Selon la littérature, deux bactéries sont capables de réaliser la voie t10 de la BH *in vitro* : *Megasphaera elsdenii* (Kim et al., 2002) et *Propionibacterium acnes* (Verhulst et al., 1987) mais leurs réelles implications *in vivo* dans la production ruminale d'AG t10 demeurent très controversées. Ces deux genres n'ont pas été détectées dans nos échantillons. En revanche, nos résultats montrent que les genres *Eubacterium*, *Syntrophococcus*, *Bulleidia*, *Olsenella*, *Dialister* et *Desulfovibrio* sont très fortement corrélés ($r \geq 0,7$) aux isomères t10. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse des contenus ruminiaux de vaches d'un troupeau présentant des baisses de TB (**Annexe 4 page 263**) : les genres *Olsenella*, *Syntrophococcus* et *Dialister* y sont également positivement corrélés aux AG t10, ainsi que le genre *Lactobacillus*. Excepté pour le genre *Syntrophococcus*, les bactéries appartenant aux six autres genres sont plus ou moins impliquées dans le métabolisme ruminal du lactate (production, fermentation, oxydation).

La relation entre le lactate et la production d'AG t10 avait déjà été soulignée par Kim et al. (2002), qui avaient observé une augmentation de la production du t10,c12-CLA dans des cultures *in vitro* de contenu ruminal contenant du lactate. Il est toutefois impossible de conclure quant à la (les) bactérie(s) responsable(s) de la production ruminale d'isomères t10, puisque la technique utilisée dans cette étude n'a permis d'identifier que 52% des genres. Nous ne pouvons exclure l'hypothèse que des espèces minoritaires pourraient éventuellement être à l'origine des AG t10. Par contre, il est probable que l'orientation du microbiote en faveur des productrices de t10 se ferait dans des conditions ruminales acidogènes, c'est-à-dire lorsque le pH ruminal est bas. En effet, les bactéries consommatrices/productrices de lactate sont des bactéries qui se développent à ces pH. D'ailleurs, le lien entre pH et bactéries productrices d'AG t10 est également illustré par la représentation de ces deux paramètres dans le cercle des corrélations où leur opposition sur l'axe 1 est bien visible (**Figure 3 de l'article 6 page 249**). Certes, l'amidon est un substrat fermentaire pour les bactéries, mais son action sur l'orientation de la BH vers les t10 serait surtout liée à l'abaissement du pH qu'il induit dans le rumen. Par opposition, Maia et al. (2009) ont montré *in vitro* que la production d'AG t10 était indépendante du pH mais dépendante de la teneur en amidon dans la ration des vaches donneuses et le substrat d'incubation. Premièrement, les tampons utilisés dans cette étude comparaient un pH de 7,0 à un pH de 6,0, ce dernier n'étant probablement pas suffisamment bas pour induire le shift vers la voie t10. D'autre part les pH initiaux des contenus ruminiaux des vaches donneuses n'étaient pas indiqués dans cette publication.

Ainsi, comme dans notre étude *in vitro* (étude 2), la sélection des bactéries s'est probablement faite chez les vaches donneuses et s'est maintenue dans leurs incubations de 15 jours *in vitro* sur un substrat favorable (l'amidon) et à des pH favorisant la Δ^9 isomérisation. Plus en accord avec notre hypothèse, dans l'étude de Piperova et al. (2002), l'addition de bicarbonate dans une ration riche en concentrés a permis de diminuer la production d'isomères t10, soulignant l'importance du pH dans la sélection des bactéries effectrices. Par ailleurs, un pH bas (<5,7) est connu pour être défavorable à la croissance de *Butyrivibrio fibrisolvens* (Russel et al., 1980), reconnue comme la principale productrice des AG t11 *in vitro* (Kepler et al., 1966) et inhibe l'action de la Δ^{12} isomérase, d'où la diminution de la production des AG t11 en parallèle de l'augmentation de celle des t10 observée lors du shift. Dans notre étude, bien que le genre *Butyrivibrio* fasse partie des 30 taxons les plus abondants (2,4%) dans les contenus ruminiaux, aucune corrélation n'a été observée entre ce genre et la production d'AG t11, en particulier pour *Butyrivibrio fibrisolvens*, très faiblement représentée dans nos échantillons (0,05 à 0,12%). Dans notre étude, l'identification des taxons les plus corrélés aux AG t11 n'a pas abouti à l'identification du genre auquel appartiennent les bactéries productrices de t11 mais s'arrête à l'ordre des *Clostridiales*. Si nous mettons en parallèle ces résultats avec ceux de l'étude enzymatique (**Article 4 page 187**), le défaut d'identification précise des bactéries productrices de t11 pourrait être lié à deux facteurs : 1) la population bactérienne productrice d'AG t11 est peu affectée lors de shift t10 (en nombre ou en activité), d'où des capacités à isomériser en Δ^{12} tendant à être faiblement différentes (-33%) entre les contenus ruminiaux issus de vaches recevant la ration « témoin » par rapport à la ration « Amidon + Huile » à pH 7,0 ($P = 0,09$) ; 2) la Δ^{12} isomérisation est très fortement inhibée à pH 5,5 (-67%, par rapport au pH 7,0 pour le régime T, $P < 0,001$). Cette très forte inhibition purement enzymatique de la production des t11 a pu introduire un biais dans la recherche d'une relation entre les valeurs de t11 et les groupes bactériens.

Les résultats de notre régression multiple ont montré par ailleurs que tous les taxons corrélés positivement aux isomères t10 étaient corrélés négativement au ratio C2/C3, au pH ruminal et aux isomères t11, et que tous les taxons corrélés positivement aux isomères t11 l'étaient également au pH et au ratio C2/C3. Cela souligne bien l'importance du pH ruminal dans les deux voies de la BH. De plus, le plan orthogonal entre les AG t10 et les AG t11 projetés dans le cercle de corrélation (**Figure 3A de l'article 6 page 249**) montre que la voie t11 et la voie t10 sont dues à des bactéries différentes. Nos résultats démontrent que les caractéristiques d'une espèce en culture pure ne permettent pas d'extrapoler avec certitude son implication

réelle *in vivo*. En effet, la capacité des principales espèces à dégrader ou fermenter les principaux constituants a été déterminée *in vitro* et n'est donc connue que pour les espèces cultivables. Cette détermination est toutefois indispensable pour étudier le métabolisme des bactéries, mais demande un travail considérable d'isolement et d'entretien des cultures microbiennes. C'est le moyen de confirmer l'implication d'une espèce bactérienne dans la production d'un métabolite.

Dans des conditions de shift de la voie t11 à la voie t10, l'addition de vitamine E dans la ration des vaches n'a pas permis de restaurer un ratio $t10 / t11 < 1$. Nos résultats sont en accord avec les résultats de Pottier et al. (2006), qui avait démontré un léger effet préventif mais aucun effet correctif avec de la vitamine E de synthèse. La vitamine E pourrait agir de deux manières : en tant que cofacteur de la c9t,11 réductase (Hughes et al., 1982) et / ou en favorisant la flore fibrolytique (Hino et al., 1993) à l'origine des AG t11. Mais dans des conditions très défavorables à la voie t11 sur le plan enzymatique et sans effets marqués sur les bactéries productrices de t11, la vitamine E serait inefficace.

CONCLUSIONS
&
PERSPECTIVES

Nos travaux montrent que le shift de la BH ruminale de la voie t11 vers la voie t10 se produit sous l'effet de deux facteurs alimentaires, un pourcentage d'amidon élevé (plus de 22% de la MSI dans nos conditions) et une addition de c9,c12-C18:2 dans la ration. L'installation du shift commencerait par une inhibition de la Δ^{12} isomérisation, due à un pH bas induit par l'amidon, provoquant une rapide diminution de la production de t11. L'effet du pH au niveau enzymatique est probablement supérieur à l'effet au niveau des bactéries produisant les AG t11.

Lorsque la quantité de c9,c12-C18:2 présente dans le rumen est faible, même avec une ration riche en amidon, la voie t11 suffit à en assurer l'hydrogénation. En effet, bien que les bactéries produisant des AG t10 soient présentes et actives, la Δ^9 isomérisation est elle aussi peu efficace à pH bas. Par contre, lorsqu'en plus de l'amidon, du c9,c12-C18:2 est ajouté dans la ration, la voie t11 est insuffisante et donc une autre voie prend le relais. Cette autre voie, la voie t10, met un certain temps à se mettre en place car elle nécessite une adaptation du microbiote, c'est-à-dire une sélection des bactéries productrices par le pH bas induit par l'amidon. Par ailleurs, ce délai peut également s'expliquer par le fait que dans ces conditions de pH bas, l'efficacité de la Δ^9 isomérisation est faible, et nécessite de nombreuses bactéries effectrices et/ou une adaptation des bactéries à une forte production d'enzymes pour que la voie t10 se mette en place, compensant l'insuffisance de BH par la voie t11 afin de détoxifier le milieu.

D'un point de vue cognitif, le séquençage à très haut débit, nous a permis de mettre en évidence les bactéries les plus abondantes associées à cette perturbation. Il s'avère que certaines bactéries plus ou moins impliquées dans le métabolisme ruminal du lactate sont fortement corrélées aux AG t10 et à un faible pH ruminal. Il est à noter que certaines bactéries utilisant le lactate ont été testées en tant que probiotiques pour prévenir l'acidose ruminale, or ces bactéries peuvent être productrices d'AG t10. Ainsi par exemple, Aikman et al. (2009) ont observé une forte baisse de taux butyreux du lait lors d'apport de *Megashaera elsdeni* dans la ration des vaches. Cet effet secondaire devrait être systématiquement testé.

Bien que nous ayons obtenus des résultats intéressants lors de l'étude des bactéries impliquées dans la BH de c9,c12-C18:2, nous n'avons pu identifier que 52% des genres bactériens, et les bactéries positivement corrélées à la production de t11 étaient non cultivées ou non classées. Par contre, nous avons pu identifier plusieurs genres corrélés à la production d'AG t10. Ces

nouvelles techniques d'écologie moléculaire donnent une vision plus complète de la diversité des micro-organismes mais ne doivent pas ralentir l'approche culturelle, indispensable à la caractérisation physiologique et métabolique des espèces bactériennes. Une complémentarité entre ces deux approches serait donc intéressante pour enrichir davantage les bases de données taxonomiques. Par ailleurs, la protéomique apparaît également comme une stratégie intéressante puisque le produit final d'un gène est plus informatif d'une fonction que le gène lui-même. Le criblage et le séquençage du métagénome, discipline en émergence actuellement, ouvrent en effet une voie à la recherche d'enzymes issues de micro-organismes non cultivables et inconnus à l'heure actuelle. Cette approche innovante constitue un véritable tournant dans la stratégie de recherche des enzymes présentes dans un milieu.

D'un point de vue pratique, dans la filière des bovins laitiers, les systèmes intensifs nécessitent des rations énergétiques riches en glucides rapidement fermentescibles. Par ailleurs, les éleveurs soucieux de la qualité de leurs produits utilisent souvent des matières grasses insaturées dans la ration de leurs vaches puisque c'est un moyen d'améliorer facilement et à court terme la composition de la matière grasse du lait. En pratique, pour éviter la déviation de la voie t11 à la voie t10 avec ces rations à la fois riches en amidon et en matière grasse, il conviendrait :

- de limiter l'apport en c9,c12-C18:2 à 1-2% de la matière sèche ingérée pour des vaches à haut niveau de production, nécessitant des rations riches en amidon. En effet, les études relatives à la déviation de la voie t11 vers la voie t10, basées sur l'utilisation d'huile, n'ont en effet jamais montré de déviation t10 avec des teneurs en c9,c12-C18:2 inférieures à 1%, et en élevage, les matières grasses sont en général apportées sous forme de graines, dont la matière grasse est moins disponible que dans l'huile. Ce seuil serait aussi à moduler en fonction de la teneur en amidon et de sa vitesse de fermentation. Ainsi par exemple, pour une vache laitière produisant 30 kg de lait par jour, une ration classique (22 kg MS) à base d'ensilage de maïs plante entière (14 kg MS) avec 3 kg de blé, 2,5 kg de tourteau de soja et 1 kg de paille, devrait comporter au maximum 2,5 kg de graines de soja extrudées, soit 400g (1,8% de la MS totale de la ration) de c9,c12-C18:2, dont 1/3 apporté par l'ensilage de maïs.

- dans le cas de la recherche d'un enrichissement important du lait en AGPI (CLA, oméga 3) via un apport alimentaire de matières grasses insaturées, des rations peu acidogènes (à base de foin, d'ensilage d'herbe, voire de pâture) doivent être préférées. Avec des rations riches en

ensilage de maïs et céréales, l'apport de lin, riche en c9,c12,c15-C18:3 entraîne moins de risques que l'apport de sources de c9,c12-C18:2. La mise en place de mesures préventives dès l'addition de matières grasses peut aussi être envisagée : à cet égard, les données de la littérature indiquent une plus grande efficacité du bicarbonate de sodium que de la vitamine E.

- si une chute du TB en élevage s'avère liée aux AG t10 dans le lait, l'apport de vitamine E à titre correctif est inefficace. Par contre, l'apport de bicarbonate de sodium peut être envisagé.

Nos travaux démontrent que la déviation de la voie t11 vers la voie t10 est observée lorsque la ration est à la fois riche en amidon et en c9,c12-C18:2. La combinaison de ces deux facteurs entraîne une perturbation du microbiote et une réorientation de son métabolisme lipidique. Ces connaissances ouvrent la voie vers une meilleure maîtrise du risque en élevage et donc une amélioration de la production. Elles pourront être complétées par des études microbiologiques ciblant les espèces identifiées comme potentiellement responsables des AG t10, et des approches fonctionnelles de l'écosystème ruminal comme la métagénomique.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Aikman, P.C, Henning, P.H., Horn, C.H. & Jones, A.K. (2009) Effect of using *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 as a probiotic on feed intake and milk production in early lactation dairy cows. *International Symposium of Ruminant Physiology*. p. 110-111. Y. Chilliard, F. Glasser, Y. Faulconnier, F. Bocquier, I. Veissier and M. Doreau, ed. Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, Clermont-Ferrand, France.

AFSSA (2005) Risques et bénéfices pour la santé des AG *trans* apportés par les aliments.

Allen, M.S. (2000) Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **83**, 1598-1624.

Amann, R.I., Krumholz, L. & Stahl, D.A. (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, **172**, 762-770.

Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995a) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.

Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995b) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143-169.

Andersen, J.B., Sehested, J. & Ingvarsen, K.L. (1999) Effect of Dry Cow Feeding Strategy on Rumen pH, Concentration of Volatile Fatty Acids and Rumen Epithelium Development. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, **49**, 149.

Ariesyady HD, Ito T, Okabe S (2007a). Functional bacterial and archaeal community structures of major trophic groups in a full-scale anaerobic sludge digester. *Water Res* **41**: 1554-1568.

Ashes, J.R., Gulati, S.K. & Scott, T.W. (1997) Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *Journal of Dairy Science*, **80**, 2204-2212.

Baldwin, R. & Emery, R. (1960) The Oxidation-Reduction Potential of Rumen Contents. *Journal of Dairy Science*, **43**, 506-511.

Barber, M.C., Clegg, R.A., Travers, M.T. & Vernon, R.G. (1997) Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1347**, 101-126.

Bauchart, D., Legay-Carmier, F. & Doreau, M. (1990) Ruminal hydrolysis of dietary triglycerides in dairy cows fed lipid-supplemented diets. *Reproduction, Nutrition, Development*, Suppl 2, 187s.

Bauchart, D. (1993) Lipid absorption and transport in ruminants. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3864-3881.

Baumgard, L.H., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Saebø, A. & Bauman, D.E. (2000) Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **278**, R179-184.

Bauman, D.E. & Griinari, J.M. (2000) Regulation and nutritional manipulation of milk fat. Low-fat milk syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **480**, 209-216.

Bhatnagar, D. & Durrington, P.N. (2003) Omega-3 fatty acids: their role in the prevention and treatment of atherosclerosis related risk factors and complications. *International Journal of Clinical Practice*, **57**, 305-314.

Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Golyshina, O.V., Zumárraga, M., Yakimov, M.M., García-Arellano, H., Alcalde, M., Fernández, V.M., Elborough, K., Andreu, J.M., Ballesteros, A., Plou, F.J., Timmis, K.N., Ferrer, M. & Golyshin, P.N. (2006) Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 22933-22942.

Beam, T.M., Jenkins, T.C., Moate, P.J., Kohn, R.A. & Palmquist, D.L. (2000) Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science*, **83**, 2564-2573.

Belenguer, A., Toral, P.G., Frutos, P. & Hervás, G. (2010) Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, **93**, 3275-3286.

Bessa, R.J.B., Santos-Silva, J., Ribeiro, J.M.R. & Portugal, A.V. (2000) Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*, **63**, 201-211.

Bradford, B.J. & Allen, M.S. (2004) Milk fat responses to a change in diet fermentability vary by production level in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **87**, 3800-3807

Brinkmann, N., Martens, R. & Tebbe, C.C. (2008) Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Applied and Environmental Microbiology*, **74**, 7189-7196.

Brodie, E.L., Desantis, T.Z., Joyner, D.C., Baek, S.M., Larsen, J.T., Andersen, G.L., Hazen, T.C., Richardson, P.M., Herman, D.J., Tokunaga, T.K., Wan, J.M. & Firestone, M.K. (2006) Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 6288-6298.

Brugère H. (1983) Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV*, **3**, 5-22.

Bryant MP, Burkey LA (1953) Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science* **36**: 205-217

Bryant, M. & Robinson, I. (1963) Apparent Incorporation of Ammonia and Amino Acid Carbon During Growth of Selected Species of Ruminal Bacteria. *Journal of Dairy Science*, **46**, 150-154.

Cardinale, B.J., Palmer, M.A. & Collins, S.L. (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature*, **415**, 426-429.

Case, R.J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W.F. & Kjelleberg, S. (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 278-288.

Chesson, A., Stewart, C.S. & Wallace, R.J. (1982) Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**, 597-603.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M. & Doreau, M. (2000) Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, **49**, 181 – 205.

Chilliard, Y., Ferlay, A. & Doreau, M. (2001) Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA Productions Animales*, **14**, 323-335.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. & Lamberet, G. (2003) A Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis¹. *Journal of Dairy Science*, **86**, 1751-1770.

Chilliard, Y. & Ferlay, A. (2004) Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction, Nutrition, Development*, **44**, 467-492.

Cho S.J., Cho K.M., Shin E.C., Lim W.J., Hong S.Y., Choi B.R., Kang J.M., Lee S.M., Kim Y.H., Kim H. (2006) 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**, 92-101.

Choi, N.J., Imm, J.Y., Oh, S., Kim, B.C., Hwang, H.J. & Kim, Y.J. (2005) Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Animal Feed Science and Technology*, **123-124**, 643-653.

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Bauman, D.E., Butler, W.R., Chilliard, Y. & Drackley, J.K. (1998) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different sources of dietary fat. *Journal of Animal Science*, **76** (Suppl.), 233.

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Barbano, D.M., Metzger, L.E. & Bauman, D.E. (1999a) Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *The Journal of Nutrition*, **129**, 1579-1584.

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Saebø, A. & Bauman, D.E. (1999b) Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **82**, 2737-2745.

Chouinard, P.Y., Corneau, L., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K. & Bauman, D.E. (2001) Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *Journal of Dairy Science*, **84**, 680 – 690.

Clarke RTJ, Bauchop T (1977) *Microbial ecology of the gut*, London, UK.

Clément, L., Poirier, H., Niot, I., Bocher, V., Guerre-Millo, M., Krief, S., Staels, B. & Besnard, P. (2002) Dietary trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *Journal of Lipid Research*, **43**, 1400 – 1409.

CNIEL, 2009

Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Bosset, J. & Jeangros, B. (2001) Conjugated linoleic acid and trans fatty acid composition of cows' milk fat produced in lowlands and highlands. *Journal of Dairy Research*, **68**, 519 – 523.

Collomb, M., Sieber, R. & Bütikofer, U. (2004) CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, **39**, 355-364.

Counotte, G.H., Prins, R.A., Janssen, R.H. & Debie, M.J. (1981) Role of *Megasphaera elsdenii* in the Fermentation of dl-[2-C]lactate in the Rumen of Dairy Cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, **42**, 649-655.

Czerkawski, J.W. (1969) Methane production in ruminants and its significance. *World Review of Nutrition and Dietetics*, **11**, 240-282.

Dawson, R.M., Hemington, N., Grime, D., Lander, D. & Kemp, P. (1974) Lipolysis and hydrogenation of galactolipids and the accumulation of phytanic acid in the rumen. *The Biochemical Journal*, **144**, 169-171.

Dawson, R.M., Hemington, N. & Hazlewood, G.P. (1977) On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *The British Journal of Nutrition*, **38**, 225-232.

Demeyer, D. & Doreau, M. (1999) Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **58**, 593-607.

DeLong, E.F., Wickham, G.S. & Pace, N.R. (1989) Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science (New York, N.Y.)*, **243**, 1360-1363.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K *et al* (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5069-5072.

Destailats, F., Trottier, J.P., Galvez, J.M.G. & Angers, P. (2005) Analysis of alpha-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *Journal of Dairy Science*, **88**, 3231-3239.

Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D. & Pariza, M.W. (1999) Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, **82**, 2146 – 2156.

Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K. & Tolosa, M.X. (2000) Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. . *Journal of Dairy Science*, **83**, 1016 – 1027.

Din, J.N., Newby, D.E. & Flapan, A.D. (2004) Omega 3 fatty acids and cardiovascular

disease--fishing for a natural treatment. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, **328**, 30-35.

Doreau, M. & Ferlay, A. (1994) Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, **45**, 379-396.

Doreau, M., Lee, R.R.F., Ueda, K. & Scollan, N.D. (2005) Métabolisme ruminal et digestibilité des acides gras des fourrages. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, **12**, 101-104.

Doreau, M. & Chilliard, Y. (1997) Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *The British Journal of Nutrition*, **78** (Suppl 1), S15-35.

Duckett, S.K., Andrae, J.G. & Owens, F.N. (2002) Effect of high-oil corn or added corn oil on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *Journal of Animal Science*, **80**, 3353-3360.

Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O. & Kuske, C.R. (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3035-3045.

Edwards JE, McEwan NR, McKain N, Walker N, Wallace RJ (2005) Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiology* **151**(3): 717- 725.

Enjalbert, F. & Troegeler-Meynadier, A. (2009) Biosynthesis of trans fatty acids in ruminants. *Trans fatty acids in human nutrition* p. 1–31. The Oily Press, Bridgwater, UK.

Engle, T.E. & Spears, J.W. (2000) Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. *Journal of Animal Science*, **78**, 2452 – 2458.

Faruque, A.J., Jarvis, B.D. & Hawke, J.C. (1974) Studies on rumen metabolism. IX. Contribution of plant lipases to the release of free fatty acids in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **25**, 1313-1328.

Fellner, V., Sauer, F.D. & Kramer, J.K.G. (1997) Effect of nigericin, monensin and tetracycline on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *Journal of Dairy Science*, **80**, 921-928.

Ferrer, M., Beloqui, A., Golyshina, O.V., Plou, F.J., Neef, A., Chernikova, T.N., Fernández-Arrojo, L., Ghazi, I., Ballesteros, A., Elborough, K., Timmis, K.N. & Golyshin, P.N. (2007) Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. *Biotechnology Journal*, **2**, 207-213.

Fievez, V., Vlaeminck, B., Jenkins, T., Enjalbert, F. & Doreau, M. (2007) Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 740-756.

Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J. & Senaud, J. (1987) Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Journal of General Microbiology*, **133**, 1835-1843.

Fonty G., Jouany J.-P., Forano E., Gouet P. (1995) L'écosystème microbien du réticulo-rumen. *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion*. p. 299-347. Institut National de la Recherche Agronomique : Paris.

Fonty G. & Chaucheyras-Durand F. (2007) *Les écosystèmes digestifs*. Lavoisier, Paris, France.

Forsberg CW, Cheng KJ, White BA. (1997) Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. *Gastrointestinal microbiology* p. 319–379. Springer, New York, USA: Chapman and Hall.

Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. & Rossi, P. (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, **4**, 634-643.

Fujimoto, K., Kimoto, H., Shishikura, M., Endo, Y. & Ogimoto, K. (1993) Biohydrogenation of Linoleic Acid by Anaerobic Bacteria Isolated from Rumen. *Bioscience, biotechnology, and*

biochemistry, **57**, 1026-1027.

Fukuda, S., Furuya, H., Suzuki, Y., Asanuma, N. & Hino, T. (2005) A new strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that has high ability to isomerize linoleic acid to conjugated linoleic acid. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **51**, 105-113.

Fukuda, S., Suzuki, Y., Murai, M., Asanuma, N. & Hino, T. (2006) Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. *Journal of Applied Microbiology*, **100**, 787-794.

Fukuda, S., Suzuki, Y., Komori, T., Kawamura, K., Asanuma, N. & Hino, T. (2007) Purification and gene sequencing of conjugated linoleic acid reductase from a gastrointestinal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Applied Microbiology*, **103**, 365-371.

Galbraith, E.A., Antonopoulos, D.A. & White, B.A. (2004) Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environmental Microbiology*, **6**, 928-937.

Gerson, T. John, A. & Sinclair, B.R. (1983) The effect of dietary N on in vitro lipolysis and fatty acid hydrogenation in rumen digesta from sheep fed diets high in starch. *Journal of Agricultural Science*, **101**, 97-101.

Gerson, T., John, A. & King, A.S.D. (1985) The effects of dietary starch and fibre on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *The Journal of Agricultural Science*, **105**, 27-30.

Glasser, F., Schmidely, P., Sauvant, D. & Doreau, M. (2008) Digestion of Fatty Acids in Ruminants: A Meta-Analysis of Flows and Variation Factors: 2. C18 Fatty Acids. *animal*, **2**, 691-704.

Griinari, J.M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L. & Nurmela, K.V. (1998) Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **81**, 1251-1261.

Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V. & Bauman, D.E. (2000) Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta(9)$ -desaturase. *The Journal of Nutrition*, **130**, 2285-2291.

Godon, J.J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. & Moletta, R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 2802-2813.

Harfoot, C.G. & Hazlewood, G.P. (1988) Lipid metabolism in the rumen. *The rumen microbial ecosystem* p. 285- 322. Elsevier, UK.

Harfoot C.G., Hazlewood G.P., P.N. (1997) Lipid metabolism in the rumen. *The Rumen microbial ecosystem. Second edition* p. 382-426. Hobson PN , Stewart DS, Chapman and Hall, London, UK.

Harmsen, H.J.M., Raangs, G.C., He, T., Degener, J.E. & Welling, G.W. (2002) Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2982-2990.

Hillman, K., Lloyd, D. & Williams, A.G. (1985) Use of a portable quadrupole mass spectrometer for the measurement of dissolved gas concentrations in ovine rumen liquor in situ. *Current Microbiology*, **12**, 335-339.

Hino, T. & Fuduka, S. (2006) Biohydrogenation of linoleic and linolenic acids, and production of their conjugated isomers by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Fourth Euro Fed Lipid Congress*, Madrid.

Henderson, C. (1971) A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *Journal of General Microbiology*, **65**, 81-89.

Hobson, P.N. (1965) Continuous Culture of Some Anaerobic and Facultatively Anaerobic Rumen Bacteria. *Journal of General Microbiology*, **38**, 167-180.

Hobson PN, Mann SO, Summers R (1976) Rumen micro-organisms in red deer, hill sheep and reindeer in the scottish highlands. In *Royal Society of Edinburgh. Section B: Natural environment*, pp 171-180.

Hong, H., Pruden, A. & Reardon, K.F. (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbiological Methods*, **69**, 52-64.

Hughes, P.E., Hunter, W.J. & Tove, S.B. (1982) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. Purification and properties of cis-9,trans-11-octadecadienoate reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**, 3643-3649.

Hungate RE (1966) *The Rumen and its Microbes*. . New York and London: Academic Press

Huws, S.A., Kim, E.J., Lee, M.R.F., Scott, M.B., Tweed, J.K.S., Pinloche, E., Wallace, R.J. & Scollan, N.D. (2011) As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as Prevotella, Lachnospiraceae incertae sedis and unclassified Bacteroidales, Clostridiales and Ruminococcaceae may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environmental Microbiology*, **13**, 1500-1512.

Ives, A.R. & Carpenter, S.R. (2007) Stability and Diversity of Ecosystems. *Science*, **317**, 58 - 62.

Jahreis, G., Fritsche, J. & Steinhart, H. (1997) Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutrition Research*, **17**, 1479 – 1484.

Jenkins, T.C. (1993) Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3851-3863.

Jenkins, T.C., Fellner, V. & McGuffey, R.K. (2003) Monensin by fat interactions on trans fatty acids in cultures of mixed ruminal microorganisms grown in continuous fermentors fed corn or barley. *Journal of Dairy Science*, **86**, 324-330.

Jouany JP (1994) Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *Productions Animales*, **7** (3), 207-225

Jouany JP, Broudiscou L, Prins RA, Komisarczuk-Bony S (1995) Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques.*, Jarrige R, Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (ed), pp 349-383. Paris, France: Inra editions

Julien C, Marden JP, Bonnefont C, Moncoulon R, Auclair E, Monteils V, Bayourthe C 2010. Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal* 4, 1641-1646.

Jurjanz, S., Monteils, V., Juaneda, P. & Laurent, F. (2004) Variations of trans octadecenoic acid in milk fat induced by feeding different starch-based diets to cows. *Lipids*, **39**, 19-24.

Kalscheur, K.F., Teter, B.B., Piperova, L.S. & Erdman, R.A. (1997) Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **80**, 2104-2114.

Kay JK, Roche JR, Kolver ES, Thomson NA and Lance H Baumgard LH 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, **72**, 322–332.

Kelly, M.L., Berry, J.R., Dwyer, D.A., Griinari, J.M., Chouinard, P.Y., Van Amburgh, M.E. & Bauman, D.E. (1998) Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*, **128**, 881-885.

Kennelly, J.J. (1996) Producing milk with 2.5% fat - the biology and health implications for dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, **60**, 161-180.

Kemp, P., White, R.W. & Lander, D.J. (1975) The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *Journal of General Microbiology*, **90**, 100-114.

Kemp, P. & Lander, D.J. (1984) Hydrogenation in vitro of α -Linolenic Acid to Stearic Acid by Mixed Cultures of Pure Strains of Rumen Bacteria. *Journal of General Microbiology*, **130**,

Kepler, C.R., Hirons, K.P., McNeill, J.J. & Tove, S.B. (1966) Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *The Journal of Biological Chemistry*, **241**, 1350-1354.

Kepler, C.R. & Tove, S.B. (1967) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: purification and properties of linoleate Δ^{12} cis - Δ^{11} trans isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Biological Chemistry*, **242**, 5686-5692.

Kim, Y.J., Liu, R.H., Rychlik, J.L. & Russell, J.B. (2002) The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 976-982.

Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J. & Scollan, N.D. (2008) Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *The Journal of Nutrition*, **138**, 889-896.

King, S., McCord, B.R. & Riefler, R.G. (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **60**, 83-92.

Klappenbach, J.A., Saxman, P.R., Cole, J.R. & Schmidt, T.M. (2001) rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, **29**, 181-184.

Klieve, A.V. & Swain, R.A. (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 2299-2303.

Kopečný, J., Zorec, M., Mrázek, J., Kobayashi, Y. & Marinsek-Logar, R. (2003) *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 201-209.

Krause KM, Combs DK, Beauchemein KA 2002. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. *Journal of Dairy Science* 85, 1947-1957.

Kramer, J.K., Parodi, P.W., Jensen, R.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P. & Adlof, R.O. (1998) Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids*, **33**, 835.

Kramer, J.K.G., Cruz-Hernandez, C., Deng, Z., Zhou, J., Jahreis, G. & Dugan, M.E.R. (2004) Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 1137S-1145S.

Krause, Smith, Ryan, Mackie & McSweeney. (1999) Use of 16S-rRNA Based Techniques to Investigate the Ecological Succession of Microbial Populations in the Immature Lamb Rumen: Tracking of a Specific Strain of Inoculated Ruminococcus and Interactions with Other Microbial Populations in Vivo. *Microbial Ecology*, **38**, 365-376.

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology* 7(4): 530-543

Latham, M.J., Storry, J.E. & Sharpe, M.E. (1972) Effect of low-roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. *Applied Microbiology*, **24**, 871-877.

Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Moloney, A.P. & Scollan, N.D. (2005) The Effects of Fish Oil Supplementation on Rumen Metabolism and the Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids in Beef Steers Given Diets Containing Sunflower Oil. *Animal Science*, **80**, 361-367.

Lévêque, C. (2001) *Ecologie. De l'écosystème à la biosphère*, Dunod.

Lin, C. & Stahl, D. (1995) Taxon-specific probes for the cellulolytic genus Fibrobacter reveal abundant and novel equine-associated populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1348-1351.

Livi, S., Cordisco, C., Damiani, C., Romanelli, M. & Crosetti, D. (2006) Identification of bivalve species at an early developmental stage through PCR-SSCP and sequence analysis of partial 18S rDNA. *Marine Biology*, **149**, 1149-1161.

Lock, A.L. & Garnsworthy, P.C. (2003) Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livestock Production Science*, **79**, 47-59.

Lock, A.L. & Bauman, D.E. (2004) Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, **39**, 1197-1206.

Loesche, W.J. (1969) Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Applied Microbiology*, **18**, 723-727.

Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J. & Godon, J. (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, **8**, 720-731.

Loor, J.J. & Herbein, J.H. (2003) Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, **103**, 63-83.

Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y. & Doreau, M. (2004) Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **87**, 2472-2485.

Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y. & Doreau, M. (2005) Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology*, **119**, 203-225.

Lundy, F.P., Block, E., Bridges, W.C., Bertrand, J.A. & Jenkins, T.C. (2004) Ruminant biohydrogenation in Holstein cows fed soybean fatty acids as amides or calcium salts. *Journal*

of *Dairy Science*, **87**, 1038-1046.

Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L. & Wallace, R.J. (2007) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**, 303-314.

Maia, M.R.G., Bessa, R.J.B. & Wallace R.J. (2009) Is the trans-10 shift that sometimes occurs in the ruminal biohydrogenation of linoleic acid caused by low pH or starch? A Rusitec study. *International Symposium of Ruminant Physiology*. p. 276-277. Y. Chilliard, F. Glasser, Y. Faulconnier, F. Bocquier, I. Veissier and M. Doreau, ed. Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, Clermont-Ferrand, France.

Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Bestwick, C.S., Richardson, A.J., McKain, N., Larson, T.R., Graham, I.A. & Wallace, R.J. (2010) Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiology*, **10**, 52.

Maidak BL, Larsen N, McCaughey MJ, Overbeek R, Olsen GJ, Fogel K *et al* (1994). The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res* **22**: 3485-3487.

Marden, J.P., Bayourthe, C., Enjalbert, F. & Moncoulon, R. (2005) A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **88**, 277-281.

Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R, Bayourthe C 2010. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *Journal of Dairy Science* 91, 3528-3535.

Martin C, Fonty G, Michalet-Doreau B (2002) Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in Ruminants. In *Gastrointestinal microbiology in animals*, SA M (ed), pp 1-17. India: Research Signpost

Mayr, E. (1982) Biology is not postage stamp collecting. Interview by R. Lewin. *Science (New York, N.Y.)*, **216**, 718-720.

- McCowan, RP, Cheng KJ, Costerton JW (1980) Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **39**(1): 233-241
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J. & Morgan, C. (1981) *Animal Nutrition*. New York, USA: Longman.
- Michelland RJ. (2009): Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores: approche comparée vache/lapin, thèse soutenue à l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L. & Cauquil, L. (2009) StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1359-1363.
- Moletta M. (2005): Caractérisation de la diversité microbienne aéroportée des biogaz, thèse soutenue à l'Université de Montpellier II.
- Moon, C.D., Pacheco, D.M., Kelly, W.J., Leahy, S.C., Li, D., Kopecny, J. & Attwood, G.T. (2008) Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate-producing ruminal bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**, 2041-2045.
- Nocek JE (1997) Bovine acidosis: implication on laminitis. *Journal of Dairy Science* **80**: 1005-1028.
- Nunoura, T., Oida, H., Miyazaki, J., Miyashita, A., Imachi, H. & Takai, K. (2008) Quantification of *mcrA* by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **64**, 240-247.
- Odenyo, A.A., Mackie, R.I., Stahl, D.A. & White, B.A. (1994) The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: pure-culture studies with cellulose and alkaline peroxide-treated wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3697-3703.

Oetzel GR 2000. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. Pages 46-53 dans 33rd Annual Conference Proc., American Association of Bovine Practitioners, Rapid City, SD.

Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L.C., Walker, N.D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N.R., Kopečný, J., Vercoe, P.E., Louis, P. & Wallace, R.J. (2007) Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **91**, 417-422.

Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D. & Barbano, D.M. (1993) Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*, **76**, 1753-1771.

Palmquist, D.L. (1998) Why is it important to know how feeding alters the fatty acid content of milk? Tri-state *Dairy Nutrition Conference*, Fort Wayne, IN, USA. pp :65 – 77.

Pariza, M.W., Park, Y. & Cook, M.E. (2001) The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, **40**, 283-298.

Park, P. & Goins, R. (1994) In Situ Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Analysis of Fatty Acid Composition in Foods. *Journal of Food Science*, **59**, 1262-1266.

Piperova, L.S., Teter, B.B., Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S.E., Yurawecz, M.P., Fritsche, J., Ku, K. & Erdman, R.A. (2000) Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *The Journal of Nutrition*, **130**, 2568-2574.

Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M. & Erdman, R.A. (2002) Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition*, **132**, 1235-1241.

Polan, C.E., McNeill, J.J. & Tove, S.B. (1964) Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *Journal of Bacteriology*, **88**, 1056-1064.

Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E. & Larondelle, Y. (2006) Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy Science*, **89**, 685-692.

Prins, R.A., Lankhorst, A., van der Meer, P. & Van Nevel, C.J. (1975) Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica* a rumen lipolytic organism. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **41**, 1-11.

Privé, F., Combes, S., Cauquil, L., Farizon, Y., Enjalbert, F. & Troegeler-Meynadier, A. (2010) Temperature and duration of heating of sunflower oil affect ruminal biohydrogenation of linoleic acid in vitro. *Journal of Dairy Science*, **93**, 711-722.

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J *et al* (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* **35**: 7188-7196.

Qi, Y., Patra, G., Liang, X., Williams, L.E., Rose, S., Redkar, R.J. & DelVecchio, V.G. (2001) Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 3720-3727.

Raes K. & Demeyer D. (2004) Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology*, **113**, 199-221.

Ribeiro, C.V.D.M., Karnati, S.K.R. & Eastridge, M.L. (2005) Biohydrogenation of fatty acids and digestibility of fresh alfalfa or alfalfa hay plus sucrose in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, **88**, 4007-4017.

Rigottier-Gois, L., Rochet, V., Garrec, N., Suau, A. & Doré, J. (2003) Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent in situ hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Systematic and Applied Microbiology*, **26**, 110-118.

Roche, H.M., Noone, E. & Gibney, A.N.M.J. (2001) Conjugated Linoleic Acid: A Novel Therapeutic Nutrient? *Nutrition Research Reviews*, **14**, 173-188.

Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S. & Gouet, P. (1990) Effects of Physicochemical Factors on the Adhesion to Cellulose Avicel of the Ruminal Bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**, 3081-3087.

Romo, G.A., Casper, D.P., Erdman, R.A. & Teter, B.B. (1996) Abomasal infusion of cis or trans fatty acid isomers and energy metabolism of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **79**, 2005-2015.

Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363-365

Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* **11**: 3-11.

Roy, A., Ferlay, A., Shingfield, K.J. & Chilliard, Y. (2006) Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science*, **82**, 479-492.

Russell JB, Dombrowsky DB 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 39, 604-610.

Russell JB, Wilson DB (1996) Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* **79**(8): 1503-1509.

Sackmann, J.R., Duckett, S.K., Gillis, M.H., Realini, C.E., Parks, A.H. & Eggelston, R.B. (2003) Effects of forage and sunflower oil levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *Journal of Animal Science*, **81**, 3174-3181.

Sadet, S., Martin, C., Meunier, B. & Morgavi, D.P. (2007) PCR-DGGE Analysis Reveals a

Distinct Diversity in the Bacterial Population Attached to the Rumen Epithelium. *animal*, **1**, 939-944.

Sauvant D, Meshy F, Mertens D 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales* 12, 49-60.

Sauvant, D. & Bas, P. (2001) La digestion des lipides chez le ruminant. *INRA Productions Animales*, **14**, 303-310.

Scheifinger CC, Linehan B, Wolin MJ (1975) H₂ production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methagenic bacteria. *Applied Microbiology* **29**: 480-483

Schloss PD (2008). Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. *Isme J* **2**: 265-275.

Schmalenberger, A. & Tebbe, C.C. (2003) Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*, **12**, 251-262.

Schmidely, P., Glasser, F., Doreau, M. & Sauvant, D. (2008) Digestion of Fatty Acids in Ruminants: A Meta-Analysis of Flows and Variation Factors. 1. Total Fatty Acids. *Animal*, **2**, 677-690.

Scupham AJ (2007) Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiology Ecology* **60**: 136-147

Sehat, N., Kramer, J.K., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P., Roach, J.A., Eulitz, K., Morehouse, K.M. & Ku, Y. (1998) Identification of conjugated linoleic acid isomers in cheese by gas chromatography, silver ion high performance liquid chromatography and mass spectral reconstructed ion profiles. Comparison of chromatographic elution sequences. *Lipids*, **33**, 963-971.

Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R. & Doré, J. (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's

disease of the colon. *Gut*, **52**, 237-242.

Singh, B., Gautam, S.K., Verma, V., Kumar, M. & Singh, B. (2008) Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: Potential biotechnological prospects. *Anaerobe*, **14**, 138-144.

Shingfield, K.J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, S., Ärölä, A., Nurmela, K.V.V., Huhtanen, P. & Griinari, J.M. (2003) Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Journal of Dairy Science*, **63**, 1235-1241.

Shingfield, K.J., Reynolds, C.K., Hervás, G., Griinari, J.M., Grandison, A.S. & Beever, D.E. (2006) Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **89**, 714-732.

Skillman, Evans, Naylor, Morvan, Jarvis, Jorblin (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**(5): 277-285

Sol-Morales, M., Palmquist, D.L. & Weiss, W.P. (2000) Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, **83**, 2105–2111.

Stewart CS, Flint HJ and M.P. B. (1997) The rumen bacteria. *The Rumen Microbial Ecosystem* p. 10-72. Chapman & Hall, London.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D. & Doré, J. (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 4799-4807.

Suzuki, M.T. & Giovannoni, S.J. (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 625-630.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H. & Benno, Y.

(1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*, **29**, 159-169.

Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. & Benno, Y. (2001) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 2766-2774.

Tamminga S, J.P. & Doreau M. (1991) Lipids and rumen digestion. *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion* p. 151-163. Editions Quae, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

Tiret, L. (2001) Physiologie de la digestion.

Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Jones, E.L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Yaqoob, P. & Calder, P.C. (2004) Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 614-620.

Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L. & Enjalbert, F. (2006) Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction, Nutrition, Development*, **46**, 713-724.

Uden P, Van Soest PJ (1982) The determination of digesta particle size in some herbivores. *Animal Feed Science Technology* **7**: 35-44

Ushida, K. & Jouany, J.P. (1985) Effect of protozoa on rumen protein degradation in sheep. *Reproduction, Nutrition, Development*, **25**, 1075-1081.

Van de Vossenberg, J.L.C.M. & Joblin, K.N. (2003) Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of *Butyrivibrio hungatei* from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology*, **37**, 424-428.

Van Nevel, C.J. & Demeyer, D.I. (1996) Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reproduction, Nutrition, Development*, **36**, 53-63.

Vázquez-Añón, M. & Jenkins, T. (2007) Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. *Journal of Dairy Science*, **90**, 4361-4367.

Veira, D.M., Charmley, L.L., Charmley, E. & Lee, A.J. (2001) The effect of feeding soybean oil to mid-lactation dairy cows on milk production and composition and on diet digestion. *Canadian Journal of Animal Science*, **81**, 425-428.

Ward, A.T., Wittenberg, K.M., Froebe, H.M., Przybylski, R. & Malcolmson, L. (2003) Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleum acid levels in plasma and milk. *Journal of Dairy Science*, **86**, 1742–1750.

Welch, J.G. (1982) Rumination, Particle Size and Passage from the Rumen. *J. Anim Sci.*, **54**, 885-894.

Wallace, R.J. & Brammell, M.L. (1985) The Role of Different Species of Bacteria in the Hydrolysis of Protein in the Rumen. *J Gen Microbiol*, **131**, 821-832.

Wallace R.J., Onodera R., Cotta M.A., P.N. (1997) Metabolism of nitrogen-containing compounds. *The Rumen microbial ecosystem* p. 283-328. Londres, England: Chapman & Hall.

Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., McKain, N., McEwan, N.R., Richardson, A.J., Vercoe, P.E., Walker, N.D. & Paillard, D. (2006) *Clostridium proteoclasticum*: A ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiology Letters*, **265**, 195-201.

Wallace, R.J., McKain, N., Shingfield, K.J. & Devillard, E. (2007) Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*, **48**, 2247-2254.

Ward, P.F., Scott, T.W. & Dawson, R.M. (1964) The hydrogenation of unsaturated fatty acids in the ovine digestive tract. *The Biochemical Journal*, **92**, 60-68.

Weimer, P.J., Waghorn, G.C., Odt, C.L. & Mertens, D.R. (1999) Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **82**, 122-134.

Williams, C.M. (2000) Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, 49, 16.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, **51**, 221-271.

Yang, S.L., Bu, D.P., Wang, J.Q., Hu, Z.Y., Li, D., Wei, H.Y., Zhou, L.Y. & Looor, J.J. (2009) Soybean Oil and Linseed Oil Supplementation Affect Profiles of Ruminal Microorganisms in Dairy Cows. *animal*, **3**, 1562-1569.

Yergeau, E., Kang, S., He, Z., Zhou, J. & Kowalchuk, G.A. (2007) Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect. *The ISME Journal*, **1**, 163-179.

Yu, Z. & Morrison, M. (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, **36**, 808-812.

Zehnder AJB (1988). *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley & sons Inc.

Zitnan, R., Sommer, A., Gallo, J., Lauková, A., Bomba, A. & Venglovský, J. (1994) Volatile fatty acid concentrations, enzyme activities and microflora in the rumen contents of heifers during transition to pasture. *Archiv Für Tierernährung*, **46**, 51-60.

Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and hosts specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 3854-3859

Zuckerkandl, E. & Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, **8**, 357-366.

ABSTRACT

Rumen biohydrogenation (BH) of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is responsible of the production of *trans* intermediates found in ruminant products (mainly milk). There are two BH pathways leading to *trans* fatty acids (FA) with different biological properties: t11 isomers have beneficial effects for consumer's health and t10 isomers result in low milk fat content, representing a major constraint for farmers. In most conditions, t11 FA are the major *trans* FA, but in some conditions, especially with diets based on corn silage and including lipid supplements rich in PUFA, a shift from t11 to t10 pathway can occur with a significant increase of t10 isomers at the expense t11 isomers.

The objective of this work was to explain modalities of this shift to better control it in animal production. Our results demonstrated that dietary factors responsible of the shift from t11 to t10 pathway are starch rapidly fermentable and c9, c12-C18:2 contents. When the amount of c9, c12-C18:2 present in the rumen is low, even though the diet is rich in starch and the pH is low in the rumen, the shift does not occur, t11 pathway being sufficient to ensure the hydrogenation of PUFA since in these conditions, the $\Delta 9$ isomerization is also poorly effective at low pH. However, when c9, c12-C18:2 is supplemented to the diet in addition to starch, t11 pathway becomes insufficient for FA BH, and t10 pathway becomes dominant. 454 pyrosequencing coupled to a multiple sPLS regression allowed us to establish correlations between some identified taxa and FA proportions (t10 or t11) in the rumen. It appears that bacterial genera that are strongly and positively correlated with t10 FA are more or less involved in the metabolism of ruminal lactate and also positively correlated with a low ruminal pH. However, identification of taxa correlated with t11 FA was less accurate, stopping at Clostridiales order. Finally, once the shift occurred, the subsequent addition of vitamin E was not able to counteract this process. These results lead to a better understanding of this shift to better control it in animal livestock.

Keywords: Biohydrogenation, rumen, starch, linoleic acid, diet, *trans*10 / *trans*11 ratio, 454 pyrosequencing, microbiota.

RÉSUMÉ

La biohydrogénation (BH) ruminale des acides gras polyinsaturés (AGPI) est à l'origine de la production d'intermédiaires *trans* retrouvés dans les productions de ruminants (essentiellement le lait). Il existe deux voies de BH produisant des acides gras (AG) *trans* qui auraient des propriétés différentes : les isomères t11 auraient des effets bénéfiques pour la santé des consommateurs et les isomères t10 seraient responsables d'une forte diminution du taux butyreux du lait, représentant une contrainte majeure pour les éleveurs. Dans des conditions physiologiques normales, la voie t11 est fortement majoritaire, par contre avec des rations à base d'ensilage de maïs, riches en concentrés et surtout si elles comprennent des suppléments lipidiques riches en AGPI, une déviation de la voie t11 à la voie t10 peut se produire avec une augmentation significative des isomères t10 au détriment des isomères t11. L'objectif de cette thèse est d'expliquer les modalités de cette déviation, afin de mieux la maîtriser en élevage. Nos travaux permettent de conclure que les facteurs alimentaires de maîtrise de la déviation de la voie t11 vers la voie t10, sont la teneur en amidon rapidement fermentescible et la teneur en c9,c12-C18:2. Lorsque la quantité de c9,c12-C18:2 présente dans le rumen est faible, même avec une ration riche en amidon et un pH bas dans le rumen, la déviation n'a pas lieu, la voie t11 suffisant à assurer l'hydrogénation des AGPI puisque dans ces conditions, la Δ^9 isomérisation est elle aussi peu efficace à pH bas. En revanche, lorsqu'en plus de l'amidon, du c9,c12-C18:2 est ajouté dans la ration, la voie t11 devient insuffisante et c'est la voie t10 qui prend le relais. Le pyroséquençage 454 couplé à une régression multiple SPLS nous ont permis d'établir des corrélations entre les taxons identifiés et la proportion d'AG (t10 ou t11) dans le rumen. Il s'avère que les genres bactériens corrélés fortement et positivement aux AG t10 sont plus ou moins impliqués dans le métabolisme ruminal du lactate ainsi qu'au faible pH ruminal. Cependant, l'identification des taxons les plus corrélés aux AG t11 était moins précise, elle s'arrête à l'ordre des *Clostridiales*. Enfin, dans des conditions de déviation de la voie t11 à la voie t10, l'addition de vitamine E dans la ration des vaches n'a pas permis de restaurer un ratio déjà élevé. Ces résultats ont abouti à une meilleure compréhension de cette déviation et orientent vers une meilleure maîtrise en élevage.

Mots clés : Biohydrogénation, rumen, amidon, acide linoléique, alimentation, ratio *trans*10 / *trans*11, pyroséquençage 454, microbiote.