

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية للبيطرة – الحراش الجزائر
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE - EL HARRACH - ALGER

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de
Magister en Sciences Vétérinaires
Option : **Nutrition et Reproduction des Bovins**

Thème

Impact de la supplémentation en
Saccharomyces cerevisiae (levure probiotique)
sur les performances de croissance et le statut sanitaire du veau

Présenté Par :

Dr. Meriem BENAKEZOUH

Devant le Jury :

Pr. AIN BAZIZ Hacina	Professeur	ENSV, Alger	Président
Pr. TEMIM Soraya	Professeur	ENSV, Alger	Promoteur
Dr. KHELEF Djamel	Maitre de Conférences - A	ENSV, Alger	Examineur
Dr. GHOZLANE Faissal	Maitre de Conférences - A	ENSA, Alger	Examineur
Dr. LAMARA Ali	Maitre de Conférences - B	ENSV, Alger	Examineur

Année Universitaire : 2010/ 2011

DÉDICACES

A papa et maman,

Pour votre présence, votre soutien, vos encouragements et ce depuis toujours...

Je vous aime.

A ma sœur,

A tous ceux que j'aime...

REMERCIEMENTS

Le travail expérimental présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein de la Station Ruminant de l'Institut Technique des Elevages de Baba-Ali, dans le cadre de la préparation du Magister en Sciences vétérinaires Option « Nutrition et reproduction des bovins » de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Je voudrai exprimer mes plus sincères remerciements à :

- ❖ Mademoiselle Hacina AINBAZIZ, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,*

- ❖ Dr Djamel KHELEF et Dr Ali LAMARA, Maîtres de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger et Dr Faissal GHOZLANE, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger qui ont accepté d'examiner ce travail.*

- ❖ A ma promotrice, Madame Soraya TEMIM, Professeur à l'ENSV d'Alger. Je voudrais par ce travail vous exprimer mon admiration pour tout ce que vous faites. Votre enthousiasme et votre dévouement dans votre travail au quotidien, sont pour moi un exemple. Je vous remercie pour l'aide et l'amitié que vous m'avez toujours témoignées.*

- ❖ *Je remercie Monsieur BOUJENAH Ahmed, Directeur Général de l'ITELV, Monsieur REZZOUG Abderrahmane, Responsable de la Ferme, ainsi que Monsieur RABER Abderlkader de m'avoir accueillie dans leur Institut et de m'avoir permis d'effectuer cet essai en mettant à ma disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de celui-ci.*

- ❖ *Je remercie chaleureusement les membres de l'équipe technique de la Station Ruminant de l'ITELV, Soraya BOUZERD, Ingénieur Agronome et Mohamed Essaid ATIF, Technicien Supérieur Agronome pour leur aide inestimable, leurs encouragements et leur sympathie. En arrivant à l'institut le premier jour, Je cherchais de l'aide pour la réalisation de mon travail, et finalement c'est des amis que j'ai trouvé alors merci à vous deux.*

- ❖ *Je remercie également Ali MERAKCHI, Messaoud BOULARABI, et Messaoud ABRAOUI... animaliers au sein de l'ITELV, pour leur collaboration active tout au long de mon travail.*

- ❖ *Je ne saurais oublier Mme Baya DJELLOUT du Laboratoire de Biochimie de l'ENSV, pour sa grande disponibilité et l'aide fournie lors de la réalisation des dosages, ainsi que Dr Mohamed KHETTOU, de la société Lallemand Nutrition Animale (France), Dr DJEMILI et Dr Ahcène ALKEMA, de la société VETAM, pour la fourniture gracieuse de la levure probiotique testée dans notre essai.*

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	01
------------------------------------	----

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les probiotiques.....	03
I.1. historique.....	03
I.1.1 Evolution de la réglementation.....	04
I.2. Les micro-organismes probiotiques.....	07
II. Etude de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	09
II.1. Définition.....	09
II.2. Structure et métabolisme de <i>S.cerevisiae</i>	10
II.3. Devenir de <i>S.cerevisiae</i> dans le tube digestif.....	11
III. Effets et modes d'action de la levure.....	12
III.1. Chez le monogastrique.....	12
III.1.1. Effets sur les propriétés fonctionnelles de la muqueuse.....	12
III.1.1.1. Effets sur les jonctions serrées et l'intégrité morphologique de la muqueuse intestinale.....	12
III.1.1.2. Effets sur la production de mucines.....	13
III.1.1.3. Effets sur la translocation bactérienne.....	13
III.1.2. Effets anti-toxiniques.....	13
III.1.3. Effets sur le système immunitaire.....	14
III.1.4. Effets anti sécrétoires.....	15
III.1.5. Induction des enzymes intestinales.....	15
III.1.6. Propriétés anti-adhésives.....	16
III.1.7. Antagonisme vis-à-vis des bactéries pathogènes.....	17
III.2. Chez les ruminants.....	17
III.2.1. Effets de la supplémentation en levure sur la production animale.....	17
III.2.1.1. Chez la vache laitière.....	18
III.2.1.2. Chez les bovins à l'engrais.....	19
III.2.2. Effets de la supplémentation en levures sur les paramètres métaboliques et le statut immunitaire.....	25
IV. Modes d'action possibles par lesquels la supplémentation en levure améliore la production animale.....	25
IV.1. Via les effets sur les fermentations du rumen.....	25
IV.1.1. Désoxygénation du milieu.....	25
IV.1.2. Modulation du pH du rumen.....	26
IV.1.3. Augmentation de la production d'acides gras volatils.....	27
IV.1.4. Modification des proportions des acides gras volatils produits.....	28
IV.2. Via les changements dans la digestibilité de la ration.....	28
IV.2.1. Amélioration de la digestibilité ruminale.....	28
IV.2.2. Le taux de digestion.....	28
IV.3. Via les effets sur la population microbienne du rumen.....	29
IV.3.1. Augmentation du nombre total de bactéries.....	29
IV.3.2. Augmentation de la production des protéines d'origine microbiennes.....	29
IV.3.3. Amélioration de l'efficacité microbienne.....	30
IV.3.4. Augmentation du nombre de protozoaires du rumen.....	30

MATERIELS ET METHODES

I. Objectif de l'étude.....	33
II. Lieu de l'étude.....	33
III. Période de l'étude.....	33
IV. Période pré-expérimentale.....	33

IV.1. Commémoratifs de l'élevage.....	33
IV.2. Répartition des animaux au sein de l'élevage.....	34
IV.3. Bilan initial.....	34
IV.4. Sélection des animaux et constitution des lots.....	35
IV.5. Homogénéisation des animaux.....	35
V. Période expérimentale.....	38
V.1. Schéma expérimental.....	38
V.2. Alimentation.....	38
V.2.1. Composition de la ration de base.....	38
V.2.2. Modalités de supplémentation en levure probiotique.....	40
V.2.3. Abreuvement.....	41
V.3. Bâtiments d'élevage.....	41
V.3.1. Bâtiment B1.....	41
V.3.2. Bâtiment B2.....	42
VI. Mesures réalisées.....	43
VI.1. Mesures des performances zootechniques.....	43
VI.1.1. L'ingéré alimentaire.....	43
VI.1.2. Mesures du poids.....	43
VI.2. Mesures des paramètres sanguins.....	44
VI.2.1. Prises de sang.....	44
VI.2.2. Dosage du glucose plasmatique.....	44
VI.2.3. Dosage du cholestérol plasmatique.....	45
VI.2.4. Dosage des triglycérides plasmatiques.....	46
VI.2.5. Dosage des protéines totales.....	47
VI.2.6. Dosage de la créatinine plasmatique.....	48
VI.2.7. Dosage de l'urée plasmatique.....	49
VI.3. Evaluation du statut immunitaire des veaux.....	49
VI.3.1. Mesure du taux d'hématocrite.....	50
VI.3.2. Dosage de l'hémoglobine.....	50
VI.3.3. Numération des globules blancs.....	51
VI.3.4. Formule leucocytaire.....	51
VII. Méthodes statistiques.....	52

RESULTATS

I. Caractéristiques initiales des animaux expérimentaux.....	54
II. Effets de la levure sur la croissance des veaux.....	56
III. Effets de la levure sur les paramètres métaboliques.....	59
III.1. Effets sur la glycémie.....	59
III.2. Effets sur le cholestérol.....	61
III.3. Effets de la levure sur les triglycérides.....	63
III.4. Effets sur les protéines totales.....	66
III.5. Effets sur l'urémie.....	68
III.6. Effets sur la créatinémie.....	70
IV. Effets de la levure sur le système immunitaire.....	73
IV.1. Effets sur les globules blancs.....	73
IV.2. Effets sur les lymphocytes.....	74
IV.3. Effets sur les monocytes.....	75
IV.4. Effets sur les neutrophiles.....	76
IV.5. Effets sur les globules rouges.....	79
IV.6. Effets sur l'hémoglobine.....	80
IV.7. Effets sur l'hématocrite.....	81
DISCUSSION GENERALE	82

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	90
--	----

Liste des abréviations

ACAC: *Acetoacetate*

AGV: *Acides Gras Volatils*

BHBA: Acide β Hydroxy Butyrate

GB: Globules Blancs

GR: Globules Rouges

GMQ : Gain Moyen Quotidien

IgG: Immunoglobulines G

I κ B: Inhibitor of Kappa B

MAD: Matières Azotées Digestibles

MS: Matière sèche

NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

PT: Protéines Totales

S.bouardii : *Saccharomyces bouardii*

S.cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

SAIF: *Saccharomyces Anti-inflammatory Factor*

SARA: Sub-Acute Ruminal Acidosis

UF : Unités Fourragères

Liste des figures

Figure 1 : Bourgeonnement de *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 2 : Modèle de l'interaction des cellules de levures avec les microorganismes du rumen

Figure 3 : Représentation schématiques des modes d'action possibles par lesquels la supplémentation en levure stimulerait la production des ruminants

Figure 4 : Aménagement du bâtiment B1

Figure 5 : Aménagement du bâtiment B2

Figure 6 : Evolution du poids vif des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période d'essai (J₀-J₆₀)

Figure 7 : Gain moyen quotidien des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période d'essai (J₀-J₆₀)

Figure 8 : Evolution de la glycémie (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Figure 9 : Evolution de la cholestérolémie (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Figure 10 : Evolution des teneurs plasmatiques en triglycérides (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Figure 11 : Evolution des teneurs plasmatiques en protéines totales (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Figure 12 : Evolution de l'urémie (mg/dl) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Figure 13 : Evolution de la créatinémie (mg/dl) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Figure 14 : Evolution des teneurs sanguines en globules blancs (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

Figure 15 : Evolution des teneurs sanguines en lymphocytes (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

Figure 16 : Evolution des teneurs sanguines en monocytes (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀).

Figure 17 : Evolution des teneurs sanguines en neutrophiles (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀).

Figure 18 : Evolution des teneurs sanguines en globules rouges (10⁶/mm³) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

Figure 19 : Evolution de l'hémoglobémie des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

Figure 20 : Evolution de l'hématocrite (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les micro-organismes considérés comme probiotiques.

Tableau 2 : Classification de *Saccharomyces cerevisiae*.

Tableau 3 : Effets de la supplémentation alimentaire en *S.cerevisiae* sur la matière sèche ingérée, le poids vif et le gain moyen quotidien des pré-ruminants et veaux pré- sevrés.

Tableau 4 : Effets de la supplémentation alimentaire en *Saccharomyces cerevisiae* sur les paramètres sanguins des veaux.

Tableau 5 : Caractéristiques des veaux placés dans le bâtiment B1 au démarrage de l'essai (j_0) (Avant le début de la supplémentation).

Tableau 6 : Caractéristiques des veaux placés dans le bâtiment B2 au démarrage de l'essai (j_0) (Avant le début de la supplémentation).

Tableau 7 : Composition et caractéristiques de la ration de base.

Tableau 8 : Valeurs énergétiques de la ration distribuée aux animaux.

Tableau 9 : Caractéristiques (moyennes \pm SE) des 2 lots expérimentaux au démarrage de l'essai (J_0 : début de la supplémentation).

Tableau 10 : Analyse de variance à 3 facteurs pour l'âge et le poids vif des animaux au démarrage de l'essai (J_0 : début de la supplémentation).

Tableau 11 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur le poids vif et le gain moyen quotidien des veaux mâles et femelles.

Tableau 12 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la glycémie des veaux mâles et femelle.

Tableau 13 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la cholestérolémie des veaux mâles et femelles.

Tableau 14 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur les teneurs plasmatiques en triglycérides des veaux mâles et femelles.

Tableau 15 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur les teneurs plasmatiques des protéines totales des veaux mâles et femelles.

Tableau 16 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur l'urémie des veaux mâles et femelles.

Tableau 17 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la créatinémie des veaux mâles et femelles

Tableau 18 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la teneur en globules blancs des veaux mâles et femelles

Tableau 19 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la teneur en globules rouges des veaux mâles et femelles.

Tableau 20 : Valeurs usuelles de quelques paramètres biochimiques du veau.

Tableau 21 : Valeurs usuelles de quelques paramètres hématologiques du veau.



A l'instar des pays européens, l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance est bannie en Algérie. Les raisons qui ont mené à une telle décision sont, entre autres l'existence de résistances aux antibiotiques, observées chez certaines bactéries, lorsque ces dernières sont en contact prolongé avec une faible dose d'antibiotiques, et le transfert possible de cette résistance à des bactéries qui infectent l'humain. Il y a donc un besoin criant de trouver des alternatives à l'utilisation des antibiotiques comme promoteur de croissance. Ces derniers ont par ailleurs démontré un haut niveau d'efficacité puisque dans une publication récente, Al-Dobaid et Moussa (2009) rapportent que l'institut Américain de santé animale estime que l'abolition de l'usage d'antibiotiques comme facteur de croissance chez les bovins nécessiterait une augmentation de 23 millions de têtes afin de maintenir le niveau de production obtenu par les pratiques courantes. Pour cette raison, les scientifiques ont évalué d'autres alternatives de contrôle des populations microbiennes spécifiques, afin de moduler les fermentations ruminales. La recherche s'est donc tournée vers le développement de nouvelles perspectives, dont l'utilisation des probiotiques. Ces derniers se définissent comme étant des microorganismes vivants qui ajoutés à la diète de l'animal apportent des effets bénéfiques, en favorisant un meilleur équilibre microbien au niveau ruminal ou intestinal. Les deux types de microorganismes les plus utilisés en production bovine sont les bactéries et les levures (Chiquette., 2009c). Il a été rapporté que la supplémentation alimentaire en levures vivantes *Saccharomyces cerevisiae* améliore la santé et la productivité des ruminants. Contrairement aux agents anti microbiens, les levures vivantes offrent donc une alternative naturelle à la manipulation des performances animales.

Les levures vivantes sont les plus fréquemment utilisées en nutrition des ruminants comme additifs pour accroître l'efficacité alimentaire et les performances et, dans le même temps, prévenir les troubles de santé. Elles sont particulièrement utiles chez les ruminants hautement productifs, dont l'équilibre de la microflore digestive peut être altéré par les rations à haute valeur énergétique. La plupart des travaux portant sur les levures ont été conduits chez les vaches laitières, avec des résultats parfois très différents d'un essai à l'autre (Desnoyers *et al.*, 2008). Le veau de boucherie étant une production à plus faible volume comparée aux productions des vaches laitières, et des monogastriques (porcs, volailles,) peu de données relatives aux effets de la levure probiotique sur les nouveau-nés ou les pré-ruminants sont disponibles.



En Algérie, des travaux ont été effectués sur les vaches laitières (Boudjenah., 2008) et les ovins mais à notre connaissance, aucun essai n'a porté sur la supplémentation des veaux nouveau-nés ou des pré-ruminants en levure probiotique. Cela a motivé le choix de notre étude, dont le but est de préciser, dans nos conditions locales, l'impact de la supplémentation en levure probiotique, *Saccharomyces cerevisiae*, sur la croissance et le statut sanitaire des veaux.

Dans le travail qui suit, nous aborderons, dans une première partie bibliographique, les différents modes d'action des levures probiotiques sur l'écosystème du rumen, et leurs effets sur les performances animales en insistant sur la levure vivante *Saccharomyces cerevisiae*, objet de notre travail expérimental. La seconde partie de ce mémoire sera consacrée à notre expérimentation menée dans une station d'élevage locale. Nous y étudieront l'effet de la supplémentation en *S. cerevisiae* sur les paramètres zootechniques, le profil métabolique et le statut immunitaire des veaux. Les méthodologies et protocoles utilisés seront d'abord globalement décrits, puis les résultats seront présentés et discutés. Enfin, la conclusion générale et les perspectives qui en découlent seront présentées.



I. GENERALITES SUR LES PROBIOTIQUES

I.1. Historique

La définition du mot **probiotique**, qui signifie en grec « pour la vie », a connu plusieurs formulations, en fonction de l'évolution des données scientifiques et des domaines d'application.

Ce sont les travaux d'Elie Metchnikoff (professeur à l'institut Pasteur, lauréat du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1908) au tout début du XX^{ème} siècle, qui sont à l'origine de ce concept. Il partit de l'idée que la longévité de certaines populations provenait de l'habitude qu'elles avaient d'ingérer des produits laitiers fermentés. Il suggère alors que « la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps, et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles » (Metchnikoff 1907 cité par Farineau, 2001). La composition de notre alimentation peut donc influencer notre santé et notre longévité.

A la même époque, Henry Tissier, pédiatre français, observe que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries « bifides » étaient au contraire abondantes chez les enfants sains. Selon lui, ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine.

Ce sont Metchnikoff et Tissier qui ont été les premiers à avancer dans leurs travaux des propositions scientifiques au sujet de l'utilisation probiotique des bactéries, même si le mot « probiotique » n'a été forgé que bien plus tard (Farineau, 2001).

Le terme probiotique fut d'abord introduit, par contraste aux antibiotiques, et utilisé pour désigner des « substances secrétées par des microorganismes, ou extraites de tissus et qui sont capables de stimuler la croissance microbiennes » (Lilly et Stillwell, 1965). Une seconde définition a été proposée par Parker (1974) « organismes et substances qui contribuent à la balance intestinale » mais celle-ci n'excluaient pas les antibiotiques. La définition la plus largement acceptée sera finalement celle proposée par Fuller (1989) et selon laquelle un probiotique est « un complément nutritionnel microbien vivant, qui a un effet positif sur l'animal hôte en améliorant son équilibre intestinal ». Une définition très semblable à



également été proposée par Havennar et Huis In't Veld (1992) « culture viable composée d'une ou d'un mélange de bactéries qui, lorsqu'elle est appliquée à l'animal ou à l'homme, exerce un effet bénéfique, en améliorant les propriétés de la flore indigène » (Salminen, 1999).

La définition du terme probiotique a subi de nombreuses modifications, finalement l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la FAO (Food and Agriculture Organization) se sont entendus sur la définition suivante : « les probiotiques sont des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé de l'hôte » (OMS/FAO, 2002).

Les observations de Metchnikoff et de Tissier étaient si attrayantes qu'une exploitation commerciale a immédiatement suivi leurs travaux scientifiques. Malheureusement, les résultats n'ont pas toujours été positifs et la grande partie des observations étaient anecdotiques. Le concept probiotique a donc été considéré comme scientifiquement non démontré et n'a guère suscité d'intérêt pendant des décennies, mis à part quelques recherches concernant l'alimentation des animaux, afin de trouver des substituts sains des anabolisants (Farineau, 2001).

Toutefois au cours des vingt dernières années, la recherche dans le domaine probiotique a fait des progrès considérables, en ce qui concerne la sélection et la caractérisation des cultures probiotiques spécifiques, et la justification des allégations santé liées à leur consommation.

I.1.1. Evolution de la réglementation

Les probiotiques ont été commercialisés et utilisés dans les fermes à partir des années 1960. Leur utilisation a été encouragée par le comité SWANN en 1969 qui recommandait de restreindre l'usage des antibiotiques en alimentation animale à la seule fin thérapeutique (leur utilisation comme « facteur de croissance » étant associée à l'augmentation des résistances bactériennes) ; et par la nécessité de faire face aux conséquences d'une production animale toujours plus intense et stressante pour les animaux (économie d'échelle, augmentation de la taille des élevages, concentration des animaux, sevrage précoce,...) . Entre les années 1970 et 1990, les microorganismes probiotiques revendiquaient des propriétés zootechniques, amélioration du gain de poids, du coefficient de digestibilité, et également des effets sanitaires



(diminution des diarrhées, de la morbidité, ...). Mais cette période est également marquée par l'absence de cadre réglementaire, contribuant à réduire la confiance des utilisateurs, et dès de le début des années 1990, un déclin de l'utilisation des probiotiques sur le marché Européen est observé. Cette première vague d'utilisation des probiotiques en alimentation animale jusqu'en 1993 a été définie par Bernardeau et Vernoux (2009) comme « la première génération des probiotiques », caractérisée par une efficacité supposée et un cadre réglementaire peu adapté. L'absence d'efficacité (Simon et al, 2001), de compréhension du mécanisme d'action et le manque de données scientifiques ont amené les professionnels de la production animale (vétérinaires, nutritionnistes, éleveurs) à considérer le concept **probiotique** avec grand scepticisme (Bernardeau et Vernoux, 2009).

C'est le formidable essor de l'utilisation des probiotiques en alimentation humaine, et les avancées scientifiques en matière d'écologie digestive et d'interactions microbiennes qui vont relancer l'utilisation des microorganismes en alimentation animale (Caramia, 2004). Stimulées également par la nécessité de pallier à l'interdiction des antibiotiques comme facteurs de croissance, décrétée en 2006 en Europe, les études scientifiques sur les probiotiques sont mieux établies, réalisées en double aveugle, contrôlées, plus fiables, et la directive Européenne de 1993 remet les microorganismes probiotiques à l'honneur, en les incluant dans la réglementation de additifs pour l'alimentation animale. Parallèlement, les productions animales connaissent entre 1980 et 2000, une série de crises qui va remodeler complètement le paysage réglementaire, aussi bien au niveau institutionnel (création de l'AFSSA : Agence Française de Santé et Sécurité Alimentaire en France en 1998, et de l'EFSA : European Food Safety Agency au niveau Européen en 2002), que législatif (refonte complète de la réglementation de l'utilisation des additifs en alimentation animale – Dir. 70/524/EC et clarification de l'utilisation des microorganismes comme additifs Reg.1831/2003/EC). Cette nouvelle réglementation très rigoureuse exige de la part des industriels, des données scientifiques et technologiques incluant la démonstration de l'innocuité des microorganismes (pour l'animal, le travailleur, le consommateur et l'environnement) et la preuve de leur efficacité en accord avec les revendications zootechniques et/ou digestives (Mantovani *et al*, 2006).



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

- **Identité et qualité** : caractéristiques de la souche (taxonomie, métabolisme, propriétés), processus de fabrication, stabilité du probiotique (seul ou en mélange), méthode d'analyse ;
- **Sécurité** : pour l'espèce cible (innocuité à 10 fois la dose recommandée), pour le manipulateur, le consommateur (absence d'antibiorésistance, génotoxicité, mutagenicité) et pour l'environnement ;
- **Efficacité** : à démontrer pour l'espèce cible par un minimum de trois études significatives dans deux lieux différents. Le volet d'efficacité décrit l'espèce cible, les conditions (âge, stade physiologique, type de production), les doses d'utilisation, les performances revendiquées ainsi que les mécanismes d'action possibles.

Les allégations possibles pour des probiotiques peuvent concerner des effets sur les performances animales, la production animale, le bien-être animal ou sur l'environnement.

La difficulté scientifique, la charge financière et la complexité des dossiers d'autorisation ont définitivement mis un terme à l'utilisation abusive et non fondée des probiotiques en alimentation animale. Apparaissent alors sur le marché, des probiotiques plus sûrs, plus efficaces et plus transparents que Bernardeau et Vernoux (2009) caractérisent de « probiotiques de deuxième génération »

La communauté scientifique s'est accordée sur plusieurs critères permettant de classer un microorganisme comme probiotique potentiel. De ce fait pour qu'un microorganisme soit considéré comme probiotique, il faut qu'il remplisse les critères suivants (Massias, 2008) :

- Etre inoffensif pour son hôte ;
- Etre résistant aux attaques des sucs gastriques, des acides biliaires et des enzymes pancréatiques ;
- Avoir des effets bénéfiques avérés pour la santé de l'hôte (compétition avec les pathogènes, aide au transit, immunomodulation, activité antiallergique,...);



- Accessoirement présenter des avantages technologiques comme une facilité de production (stabilité de la souche, production à grande échelle et résistance au dioxygène).

I.2. Les micro-organismes probiotiques

Les micro-organismes probiotiques utilisés dans les aliments des animaux d'élevage, sont essentiellement des bactéries Gram⁺ du groupe des bactéries lactiques, et du genre *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pedicoccus* et *Bacillus*. D'autres probiotiques sont des champignons microscopiques, comme des levures appartenant au genre *Saccharomyces*, avec essentiellement *S. cerevisiae* et *S. boulardii* (voir tableau 1) (Veissier *et al.*, 2003).

Ces microorganismes sont administrés seuls ou en mélange pour une action synergique. Ils peuvent être également associés à des prébiotiques (ingrédients alimentaires stimulants sélectivement certaines bactéries du colon, améliorant ainsi la santé de l'hôte).

Les levures sont connues et utilisées depuis des siècles par l'homme, et représentent le groupe de micro-organismes le plus exploité commercialement. Dans cette étude, nous nous intéresserons exclusivement à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, objet de notre étude expérimentale.

**Tableau 1** : Les microorganismes considérés comme probiotiques

(Adapté de Boudjenah, 2008)

Microorganismes probiotiques				
Lactobacillus	Bifidobacterium	Autres bactéries lactiques	Autres bactéries	Levures et moisissures
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.adolescentis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus spp</i>	<i>Saccharomyces.boulardii</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.animalis</i>	<i>faecalis</i>	<i>E.coli strain Nissle</i>	<i>Saccharomyces.cerevisiae</i>
<i>L.johnsonii</i>	<i>B.bifidum</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Candida pintolopessi</i>
<i>L.paracasei</i>	<i>B.breve</i>	<i>faecium</i>	<i>freudenreichii</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>L.plantarum</i>	<i>B.infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>L.reuteri</i>	<i>B.lactis</i>	<i>Leuconstoc</i>		
<i>L.rhamnosus</i>	<i>B.longum</i>	<i>mesenteoides</i>		
<i>L.salivarius</i>	<i>B.termophilum</i>	<i>Pediococcus</i>		
<i>L.farciminis</i>		<i>acidilactici</i>		
<i>L.brevis</i>		<i>Sporolactobacillus</i>		
<i>L.curvatus</i>		<i>inulinus</i>		
<i>L.gasseri</i>		<i>Streptococcus</i>		
<i>L.fermentum</i>		<i>thermophilus</i>		
<i>L.crispatus</i>		<i>Streptococcus</i>		
<i>L.amylovirus</i>		<i>diacetylactis</i>		
<i>L.cellobius</i>		<i>Streptococcus</i>		
		<i>intermedius</i>		



II. ETUDE DE LA LEVURE *Saccharomyces cerevisiae*

II.1. Définition

La levure *Saccharomyces cerevisiae* sert depuis des millénaires dans la fabrication du pain, et plusieurs de ses souches sont également utilisées pour celle du kéfir, du yaourt, du vin et de la bière. Son utilisation dans ces différents domaines lui a valu les noms de « levure boulangère » ou « levure de bière ». Son mode de reproduction lui a également conféré le nom de « levure bourgeonnante » (budding yeast). Sa classification est donnée dans le tableau suivant.

Tableau 2 : Classification de *Saccharomyces cerevisia*
(Adapté de Kurtzman et Fell, 1998)

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Hemiascomycetes
Ordre	Saccharomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Genre	Saccharomyces

En pharmacie et en chimie, quantités de substances (vitamines, enzymes) sont extraites de cet organisme. De plus, grâce au génie génétique, certains médicaments sont désormais produits à partir de levures manipulées.

Outre son intérêt industriel, *Saccharomyces cerevisiae* est un formidable modèle pour les scientifiques : ce champignon unicellulaire est un organisme eucaryote, semblable aux cellules des organismes supérieurs. Aussi facilement manipulable qu'une bactérie, la levure est un modèle simplifié des cellules qui composent l'être humain (Boudjenah, 2008).



II.2. Structure et métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae est un micro-organisme eucaryote unicellulaire, que l'on retrouve sous la forme d'une petite cellule arrondie, de quelques microns de diamètre (environ 4 μ). Elle se multiplie par bourgeonnement qui aboutit à la formation de deux cellules de tailles inégales.

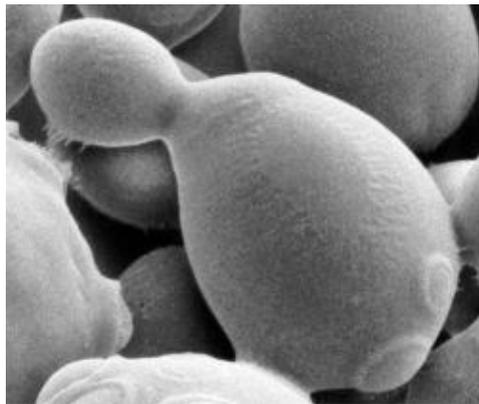


Figure 1: Bourgeonnement de *Saccharomyces cerevisiae* (source Internet 1)

La levure a un cycle biologique particulier. Elle est capable de se multiplier sous deux formes : une forme haploïde et une autre diploïde (Dickinson et al, 2004). Son génome, premier génome eucaryote à avoir été séquencé dans sa totalité, est composé de 16 chromosomes et comprends 6275 gènes (Goffeau *et al*, 1996).

Saccharomyces cerevisiae est un organisme aéro-anaérobie qui peut produire de l'énergie de deux façons différentes, selon le milieu dans lequel il se trouve :

- ✓ La respiration : en présence d'oxygène, il y a transformation du glucose en gaz carbonique ;
- ✓ La fermentation alcoolique : en absence d'oxygène.

Saccharomyces cerevisiae possède une croissance rapide, puisqu'elle est capable de se diviser toutes les deux heures lorsqu'elle se trouve dans des conditions optimales de température (28-30°C) et de pH (4.5 et 6.5) ; toutefois, cette levure a la faculté de croître dans un milieu très



acide, avec un pH voisin de 1,5. Cette croissance nécessite une source de carbone, une source d'azote organique ou non, diverses vitamines et des sels minéraux (Boudjenah, 2008).

II.3. Devenir de *S. cerevisiae* dans le tube digestif

Afin de déterminer le devenir de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de son transit dans le tube digestif, des essais ont été réalisés sur des souris axéniques et des souris normales (Ducluzeau *et al.*, 1982).

Il apparaît qu'à l'inverse des souris axéniques, chez lesquels *S. cerevisiae* se multiplie normalement dans le tube digestif, les souris normales ont vu une élimination massive de la levure du fait de la présence d'une flore digestive habituelle qui empêche son installation.

Contrairement aux bactéries probiotiques, dont les effets sont conditionnés par l'attachement du micro-organisme à la muqueuse intestinale de l'hôte (Ouwehand *et al.*, 1999), la levure ne colonise pas le tractus digestif et une bonne partie est retrouvée vivante dans les fèces des animaux. En effet, les travaux de Fiems *et al* (1993), réalisés sur le mouton, et ceux de Durant-Chaucheyras *et al* (1998) sur l'agneau, ont montré que la présence de *S. cerevisiae* dans le tube digestif est temporaire. Si leur apport n'est pas renouvelé, les levures vivantes commencent à être excrétées environ 8h après leur distribution et ne sont plus détectées 102h après l'arrêt de la supplémentation.

Il a été démontré également que 17 à 34% des levures restent vivantes pendant leur traversée du tube digestif, ce qui suggère que leurs effets pourraient ne pas se limiter au rumen mais s'exercer également au niveau des compartiments post-ruminaux (Durant-Chaucheyras *et al.*, 1998).

Les effets les plus importants des probiotiques ont été rapportés lorsque ceux-ci ont été incorporés à l'alimentation à des périodes particulièrement stressantes pour l'animal et sa microflore intestinale : au sevrage, au début de la période de lactation, ainsi qu'après le passage d'un régime alimentaire riche en fourrages à une alimentation riche en glucides rapidement fermentescibles.



III. EFFETS ET MODES D’ACTION DE LA LEVURE

Les mécanismes d’action des probiotiques sur l’hôte sont complexes, souvent multiples et dépendent de la souche considérée. Les effets des probiotiques sont classiquement attribués à une modulation directe ou indirecte de la flore endogène ou du système immunitaire local (Rambaud, 1993). Ceci suggère qu’un contact direct de ces probiotiques avec les différents constituants de la barrière intestinale, tels que la microflore endogène, le mucus intestinal, les cellules épithéliales et les immunocytes est nécessaire (Ait Belgnaoui, 2006).

Globalement, le mode d’action de la levure probiotique dans le tube digestif varie avec l’espèce animale. Chez le monogastrique, la levure agit comme agent protecteur vis-à-vis de certains organismes pathogènes alors que chez le ruminant, l’effet bénéfique semble plutôt être lié à une interaction avec la flore ruminale.

III.1. Chez les monogastriques

III.1.1. Effets sur les propriétés fonctionnelles de la muqueuse intestinale

En agissant sur la fonction de barrière de la muqueuse intestinale, en stimulant la production de mucines, les levures probiotiques limitent la translocation des bactéries vers les organes extra-intestinaux (Daudelin, 2009).

III.1.1.1. Effets sur les jonctions serrées et l’intégrité morphologique de la muqueuse intestinale

En tapissant la muqueuse intestinale, les levures peuvent interagir avec celle-ci et même en influencer la structure. Il a été démontré, dans un modèle d’infection *in vitro* à *Escherichia coli* entéropathogène (EPEC), que la présence de *Saccharomyces boulardii* préserve la distribution des protéines structurales des jonctions serrées ZO-1 des cellules T84 (Czerucka *et al.*, 2002). Il a également été observé que la grandeur des villosités, ainsi que la profondeur des cryptes étaient augmentées chez les porcelets traités à *Saccharomyces boulardii* (Taras *et al.*, 2006).



III.1.1.2. Effets sur la production de mucines

Certains probiotiques ont la capacité d'induire l'expression de molécules ayant une activité non spécifique sur les pathogènes. Les mucines font partie de ce type de molécules. Dans une étude réalisée *in vivo*, Bontempo *et al.* (2006) ont montré que le groupe d'animaux qui recevait *S. boulardii* dans sa ration avait une couche de muqueuse dans l'iléon moins épaisse en comparaison avec le groupe témoin. Une couche épaisse de mucus pourrait limiter la diffusion des nutriments à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales, réduisant ainsi l'absorption de ceux-ci. Chez le lot supplémenté en levure, la couche plus mince de mucus pourrait donc contribuer à une meilleure efficacité d'absorption (Daudelin, 2009).

III.1.1.3. Effets sur la translocation bactérienne

Une étude effectuée chez des porcelets sevrés, infectés expérimentalement avec *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC) a démontré que l'administration de *Saccharomyces boulardii* diminue la translocation de bactéries entériques, en comparaison avec le groupe contrôle (Lessard *et al.* 2009). Les probiotiques contribueraient à stimuler les cellules immunitaires présentes au niveau de la muqueuse intestinale, ce qui participerait à augmenter la fonction de barrière de celle-ci et ainsi diminuer la translocation bactérienne (Daudelin, 2009).

III.1.2. Effets antitoxiniques

Les bactéries pathogènes pour l'intestin exercent souvent leur pathogénicité par l'intermédiaire de toxines. Parmi les principaux exemples, citons les infections à *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, la toxine cholérique, les entérotoxines de *E. coli*, *Vibrio cholerae* ainsi que et les toxines de *Clostridium difficile*. Généralement, après liaison à des récepteurs spécifiques, situés sur la surface des cellules épithéliales de l'intestin, les toxines déclenchent des réactions en cascade qui aboutissent finalement à des diarrhées, des inflammations et parfois même à des nécroses. De nombreuses études ont démontré que *Saccharomyces cerevisiae* était en mesure de réduire, ou même de neutraliser plusieurs de ces effets toxiques (Peterson, 2002).

L'effet anti-toxinique de *Saccharomyces cerevisiae* ne serait pas lié à la diminution de la population de bactéries pathogènes, mais plutôt à la réduction de la quantité de toxines libérées et à une compétition au niveau des sites de fixation (Rodriguez *et al.* 1996).



Parmi les mécanismes d'actions suggérés des levures de l'espèce *Cerevisiae*, il y a la sécrétion d'une sérine, protéase qui aurait pour effet d'hydrolyser des toxines résistantes à la trypsine digestive, telles que la toxine A produite par *C. difficile* (Castagliuolo *et al.* 1999). Dans ses travaux, Pothoulakis *et al.* (1993) émet l'hypothèse que l'inhibition de la liaison de la toxine A de *C. difficile* à ses récepteurs situés sur la bordure en brosse des cellules, serait due au fait que *Saccharomyces cerevisiae* supprimerait les récepteurs à la toxine par l'intermédiaire de la sécrétion d'une protéase.

Saccharomyces cerevisiae est actuellement utilisée en production animale, mais également en médecine humaine dans le traitement des infections nosocomiales causées par *C. difficile*.

III.1.3. Effets sur le système immunitaire

Le rôle des polysaccharides dans le développement des réponses immunitaires des mammifères est désormais reconnu. Ainsi, les β -D-glucane et la fraction glucidique des mannoprotéines, les α -D-mannanes, extraits des parois cellulaires des levures *Saccharomyces cerevisiae*, sont capables d'interagir avec les macrophages et les neutrophiles et d'influencer la réponse immunitaire innée (Tzianabos, 2000).

Des additifs alimentaires à base de mannanes et de glucanes sont commercialisés. La composition et la pureté de ses extraits ne sont généralement pas communiquées, ce qui pourrait expliquer la grande variation des niveaux d'incorporation de ces préparations dans les essais réalisés (Oswald, 2009).

Il a récemment été découvert que *Saccharomyces cerevisiae* sécrète un facteur soluble anti inflammatoire du nom de SAIF (*Saccharomyces* Anti-Inflammatory Factor). Ce facteur inhibe la dégradation de I κ B (Inhibitor of Kappa B), causant ainsi une séquestration accrue de NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) dans le cytoplasme (Sougioultzis *et al.* 2006). Cette protéine est un activateur de transcription pour plusieurs types de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire. En effet, NF- κ B est responsable de la transcription de plusieurs gènes dont ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines ; de plus, il régule l'expression de molécules d'adhésions sur les leucocytes et sur les cellules endothéliales, permettant la migration des leucocytes de la circulation jusqu'au site d'infection (Daudelin, 2009).



Les effets stimulants de la levure *S.cerevisiae* sur le système du complément ont été mis en évidence *in vitro* grâce aux travaux de Nicod-Bertin et Panouse-Perrin (1985). Ceux-ci ont été en mesure de démontrer, lors d'expériences menées à partir de complément isolé de sérum humain frais, que *Saccharomyces boulardii* est un puissant activateur du complément via les voies d'activation classique et alternative du complément, par l'intermédiaire de la libération des C2, C3, C3a et C5a biologiquement actives. Aucune réponse humorale spécifique ou non spécifique n'est induite dans le système immunitaire général chez des sujets sains, après administration de *Saccharomyces boulardii* (Jahn et Zeitz, 1991; Machado Caetano *et al.* 1986).

Les expériences menées par Buts *et al.* (1990) et Czerucka et Rampal (2002) sur l'animal ont révélé une augmentation des concentrations totales d'IgA, et des composants sécrétoires dans le liquide duodéal après administration de *Saccharomyces boulardii*, ce qui indique une stimulation du système immunitaire intestinal (Peterson, 2002).

Dans une étude effectuée chez le porcelet sevré, il a été observé que l'administration de la levure améliore la performance et augmente la quantité de macrophages dans la muqueuse de l'iléon en comparaison avec le groupe témoin (Bontempo *et al.*, 2006).

III.1.4. Effets anti sécrétoires

Des travaux menés par Krammer et Karbach (1993) sur des préparations d'intestin de rat ont permis d'étudier l'action directe de *Saccharomyces boulardii* sur le transport intestinal des électrolytes. L'addition de *Saccharomyces boulardii* améliore de façon notable le transport trans-épithélial du chlore dans le jéjunum et dans le côlon descendant chez le rat et déclenche son absorption, ce qui permet d'expliquer un de ses effets anti-diarrhéiques.

III.1.5. Induction des enzymes intestinales

L'administration orale de *Saccharomyces cerevisiae* chez de jeunes rats et des volontaires humains sains provoque une augmentation notable de l'activité des disaccharidases (lactase, sucrase et maltase) de la bordure en brosse de l'épithélium de l'intestin. Cette propriété est utilisée pour restaurer les activités disaccharidases intestinales affectées dans certains types de diarrhées (Buts *et al.*, 1986).



Lors d'un autre essai mené chez 12 volontaires, l'administration orale de *Saccharomyces boulardii* pendant trois semaines a été associée à un accroissement significatif de l'activité des lactases, α -glucosidase et phosphatases alcalines de la bordure en brosse des cellules (Jahn *et al.*, 1996). Ces résultats ont été confirmés par Zaouche *et al.* (2000) qui montrent une augmentation significative de l'activité enzymatique de la bordure en brosse après administration de levure à des rats ayant subi une résection intestinale de l'intestin grêle.

L'une des hypothèses émises pour expliquer l'augmentation de l'activité enzymatique au niveau de la bordure en brosse des cellules entérocytaires serait la libération endoluminale des polyamines (putrescine, spermine, spermidine) par *Saccharomyces cerevisiae*, comme cela a déjà été démontré dans un modèle murin (Buts *et al.* 1994). Il est possible que les polyamines stimulent la maturation des entérocytes et améliorent ainsi l'expression enzymatique (Buts *et al.* 1994). Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude conduite par Buts *et al.* (1999) chez des rats recevant 1mg/g de PV/j de *S.boulardii* durant une semaine suivant un entérectomie proximale. L'apport de la levure après reséction iléale a entraîné une augmentation de l'activité des disaccharidases. Cette stimulation enzymatique était associée à une augmentation significative de la concentration des polyamines.

III.1.6. Propriétés anti-adhésives

Pour de nombreux agents pathogènes, l'adhésion aux entérocytes est la condition nécessaire au développement de leur pathogénicité dans l'intestin. Certaines souches d'*E.coli* et de *Salmonella* possèdent à leur surface des adhésines, capables de fixer les résidus de mannose se trouvant sur les membranes des cellules épithéliales. La paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* se caractérise également par une forte concentration en glucane et en manane. De ce fait, de telles bactéries sont capables de s'agglutiner aux levures par liaison avec la couche superficielle de la membrane de celles-ci.

La fixation des bactéries pathogènes à la membrane cellulaire de la levure induit ainsi un effet protecteur, puisque le complexe levures/bactéries pathogènes est rapidement éliminé du tractus digestif (Auclair, 2001). Par ailleurs, l'adhésion est une étape cruciale pour l'expression de l'effet cytopathogénique, dès lors, l'effet bénéfique de *Saccharomyces cerevisiae* pourrait s'expliquer par la compétition existant entre la levure et les pathogènes pour la liaison aux cellules épithéliales (Boudjenah, 2008).



III.1.7. Antagonisme vis-à-vis des bactéries pathogènes

Il a été démontré que *Saccharomyces cerevisiae* possède une action antagoniste vis-à-vis des micro-organismes pathogènes. Cette propriété a été largement exploitée en médecine humaine dans la prévention des diarrhées d'origine médicamenteuse (pénicilline, céphalosporines, clindamycine).

Plusieurs recherches portant sur l'efficacité de *Saccharomyces boulardii* ont démontré que cette levure inhibe la croissance *in vivo* comme *in vitro* de plusieurs bactéries et levures. Cette influence a été mise en évidence avec *Candida albicans*, *Candida kruzei* et *Candida pseudotropicalis* (Ducluzeau et Bensaada, 1982). Il a été rapporté *in vitro* que la levure synthétise des substances agissant comme bactéricides, et induit donc par la même occasion une inhibition de la croissance des pathogènes. (Peterson, 2002). Cet effet antagoniste disparaît cependant lorsque les cellules *Saccharomyces cerevisiae* sont tuées par la chaleur.

III.2. Chez les ruminants

III.2.1. Effets de la supplémentation en levure sur la production animale

La production des bovins laitiers s'exprime en général en termes de production laitière journalière, d'énergie déviée vers la production d'un litre de lait ou d'efficacité alimentaire. La production des bovins de boucherie est évaluée par la mesure des paramètres de croissances tels que le gain de poids quotidien, le poids final à l'abattage, ou le taux de conversion alimentaire. De nombreux travaux scientifiques conduits ces dernières années ont démontré que la supplémentation des animaux en levure, entraîne une augmentation des productions laitière et viandeuse. Cependant, ces résultats ne sont pas sans appel puisque certains travaux font état de l'effet négligeable de la levure, aussi bien sur la production laitière, que sur les paramètres de croissance.

De nombreuses études portant sur la réponse des ruminants, notamment les vaches laitières, à une supplémentation en levure *Saccharomyces cerevisiae* fournissent des résultats très variables. Williams and Newbold (1990), Lesmeister *et al.* (2004) et Stella *et al.* (2007). signalent une augmentation de la consommation alimentaire, du gain de poids ainsi qu'une meilleure utilisation de l'aliment alors que les travaux de Erasmus *et al.* (2005), Agarwal *et*



al. (2002), Mahender *et al.* (2005), Kim *et al.* (2006), Kawa *et al.* (2007) et Tripathi *et al.* (2008) ne révèlent aucune différence, voire une diminution, du taux de croissance et de l'efficacité alimentaire par rapport aux lots témoins. Cette grande variabilité dans la réponse des ruminants à l'utilisation de levures comme supplément alimentaire pourrait être liée à la composition de la ration, à la souche de levure utilisée, au niveau d'incorporation de la levure (dose dépendante) ou encore aux animaux utilisés (Tripathi *et al.* 2009).

Dans ce qui suit, nous ferons le point sur les effets de la supplémentation en levure *S. cerevisiae* sur les performances de production, décrits dans la littérature chez les ruminants en insistant sur les jeunes veaux et bovins à l'engrais, objet de notre partie expérimentale.

III.2.1.1. Chez la vache laitière

L'incorporation de *Saccharomyces cerevisiae* à la ration de la vache laitière, à tous les stades physiologiques, a été largement étudiée. De nombreux effets positifs sur le statut sanitaire et les paramètres de production ont été rapportés, mais les réponses des animaux à la supplémentation en levures sont parfois variables et les résultats observés peuvent être très différents et contradictoires.

Dans une méta-analyse, Dawson (2000) passe en revue vingt-deux essais réalisés sur plus de 9039 vaches laitières et rapporte ainsi une augmentation de la production laitière allant de 2% à 30% avec une moyenne de 7,3%. De plus il y aurait une modification dans la composition du lait, avec une augmentation de la teneur en matières grasses et en protéines (Besong *et al.* 1996).

Les travaux de Piva *et al.* (1993) révèlent que l'apport de levures à des vaches multipares en milieu de lactation, durant 4 semaines augmente de 15% le taux butyreux du lait. Putnam *et al.* (1997) signalent une hausse de 6% du taux butyreux lorsque la supplémentation est faite en début de lactation. Cependant d'autres indiquent qu'aucun effet sur la composition du lait n'est observé (Kung *et al.* 1997 ; Schingoethe 2004).

La supplémentation en levures semble augmenter la production laitière (Robinson 2002 ; Abd el Ghani 2004 ; Stella *et al.* 2007) et influencer plusieurs paramètres ruminiaux tels que le pH, les acides gras volatils (AGV), et la digestibilité des nutriments au niveau du tractus digestif (Erasmus *et al.* 1992 ; Robinson *et al.* 2002).



De récents travaux ont démontré que *Saccharomyces cerevisiae* stabilise le pH du rumen diminuant ainsi les risques d'acidose (Chaucheyras-Durand *et al.* 2008 ; Marden *et al.* 2008). L'addition de levure s'est cependant révélée incapable de prévenir les épisodes d'acidose aigue lorsque les animaux étaient nourris avec des aliments riches en glucides rapidement fermentescibles (Aslan *et al.* 1995; Dawson and Hopkins 1991; Jouany 2001).

Des travaux réalisés *in vivo* sur des vaches laitières, en début de lactation, dont la ration était composée de 60% d'ensilage de maïs et de 40% de concentré ont montré que l'addition de 0,5g de *Saccharomyces cerevisiae* quotidiennement à la ration des vaches, n'entraîne pas de modifications significatives dans la digestibilité de la matière organique, le pH ruminal, la concentration en AGV ou encore le nombre de protozoaires du rumen (Doreau *et al.* 1998).

L'effet de la levure sur consommation de la matière sèche a également été étudié. Dann *et al.* (2000) montrent une augmentation de 20% de la matière sèche ingérée, une amélioration de 4% du poids vif, ainsi qu'une réduction de la perte de poids après le vêlage ; la production laitière n'est pas significativement augmentée, mais le pic de lactation est avancé pour les femelles supplémentées. Ces résultats contredisent en partie ceux de Robinson (1997) qui ne rapporte aucune augmentation de la matière sèche ingérée, cependant la production laitière tend à être augmentée, et la perte de poids en post-partum amoindrie.

En bref, les effets de la supplémentation en levures *Saccharomyces cerevisiae* sur les performances des vaches laitières ont été largement étudiés mais les résultats obtenus sont parfois divergeant. Ces variations dans la réponse sont souvent liées à des conditions de réalisation différentes, telles que la nature et la composition de la ration, le moment et la durée de supplémentation, l'état physiologique des vaches ...etc. Tous ces paramètres devront être pris en considération lors de l'évaluation de l'intérêt de supplémentation des animaux en levures probiotiques.

III.2.1.2. Chez les bovins à l'engrais

À la naissance, l'intestin du jeune veau est très peu colonisé par les micro-organismes et c'est au contact de sa mère et de son environnement, qu'il va acquérir successivement plusieurs centaines d'espèces bactériennes. Certaines sont bénéfiques pour l'animal alors que d'autres lui sont nocives et occasionnent des désordres digestifs tels que des diarrhées qui vont nuire à



sa santé et à sa croissance. Le début de la vie, et les périodes de changements de diètes constituent des événements stressants, au cours desquels, il a été observé que les populations de bactéries bénéfiques diminuent au profit des bactéries pathogènes créant ainsi un déséquilibre au niveau de la flore. Dans ces conditions, un apport en probiotiques favorise la santé de l'animal en créant des conditions défavorables à l'établissement des bactéries pathogènes. Ainsi, l'administration de levure induit : une réduction du nombre de jours où les veaux souffrent de diarrhée ; une augmentation du gain de poids et une baisse des coûts associés à la santé (Chiquette 2009c).

A notre connaissance, les effets de l'utilisation des levures chez les pré-ruminants et les veaux pré-sevrés ont suscité peu d'études. Les données bibliographiques disponibles sont résumées dans le tableau 3 (Voir page 21).

Dans un essai conduit par Pinos-Rodriguez *et al.* (2007) sur des veaux âgés de 4j, la supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae* durant 56 jours, n'a eu aucun effet ni sur le poids final des veaux, ni sur le gain moyen quotidien, ni sur l'efficacité alimentaire. La matière sèche ingérée était cependant augmentée dès le début de l'essai chez les veaux supplémentés par rapport aux témoins. Aucune différence significative dans la fréquence d'apparition des diarrhées ou des pneumonies n'a été observée entre les deux lots, mais les veaux supplémentés ont été moins infectés que les témoins. Les valeurs du pH, des AGV totaux et le ratio acetate/propionate n'ont pas été modifiés par le traitement.

De même, les travaux de Hucko *et al.* (2009) montrent que la supplémentation en culture de levures *Saccharomyces cerevisiae* de veaux pré-sevrés, n'entraîne aucun changement dans les paramètres de production (gain de poids quotidien, poids final, matière sèche ingérée, efficacité alimentaire). La valeur du pH n'est pas modifiée. Cependant, il y a une diminution de la concentration des AGV ainsi qu'une augmentation du ratio acetate/propionate. De plus l'activité des bactéries cellulolytiques est supérieure chez le lot supplémenté.

Dans son essai, Laborde (2008) ne rapporte aucun effet significatif suite à l'addition d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* à la ration de veaux, sur la consommation moyenne quotidienne de l'aliment de démarrage, la consommation d'eau ou le poids corporel, même si les veaux supplémentés ont présenté des poids plus élevés que les témoins entre 42 et 56j. De même, les mensurations des veaux n'ont pas été affectées. La consistance des fèces était

Tableau 3 : Effets de la supplémentation alimentaire en *S.cerevisiae* sur la matière sèche ingérée, le poids vif et le gain moyen quotidien des pré-ruminants et veaux pré-sevrés (synthèse de plusieurs auteurs)

Animaux (Moyenne d'âge)	Durée de supplémentation	Variations des paramètres par rapport aux témoins			Références bibliographiques
		PV	GMQ	MSI	
24 veaux (4j)	56 jours	NS	NS	↗ (p < 0,05)	Pinos-Rodriguez <i>et al</i> (2007)
45 veaux mâles (4j)	52 jours	NS	NS	NS	Hucko <i>et al</i> (2009)
48 veaux (4j)	16 semaines	NS	ND	NS	Laborde (2008)
101 veaux	57 jours	ND	NS	NS	Cole <i>et al</i> (1992)
512 veaux (2±1j)	58 jours	NS	NS	NS	Magalhaes <i>et al</i> (2008)
40 veaux (10j)	12 semaines	ND	↗ (p < 0,05)	↗ (p < 0,001)	Di Francia <i>et al</i> (1997)
20 veaux (5j)	60 jours	NS	NS	NS	Kaldmae <i>et al</i> (2007)
52 veaux (5±2j)	84j	↗ (P < 0,05)	↗ (P < 0,05)	↗ (P < 0,05)	Gavlao <i>et al</i> (2005)
30 veaux mâles (4±0,6 mois)	294 jours	NS	NS	↘ (P < 0,05)	Titi <i>et al</i> (2008)
75 veaux (2±1j)	42 jours	↗ (P < 0,03)	↗ (P < 0,05)	↗ (P < 0,05)	Lesmeister <i>et al</i> (2004)
42 veaux (1j)	84j	NS	NS	NS	Quigley <i>et al</i> (1992)

meilleure chez les veaux supplémentés. Aucun effet sur les paramètres ruminiaux mesurés (pH, concentration de NH₃, de l'acide β hydroxy butyrate BHBA, AGV totaux) n'est rapporté.

Les travaux de Cole *et al* (1992) montrent que la durée de traitement des veaux infectés par le virus de la rhinotracheite infectieuse bovine et supplémentés en levures *Saccharomyces cerevisiae* était plus courte que pour les veaux témoins. De plus, les veaux supplémentés ont une consommation de matière sèche plus élevée (plus 8,2%) et une moindre perte de poids par rapport aux témoins.

Dans un essai réalisé en 2008, Magalhaes *et al* évaluent l'effet de la levure sur les performances de croissance, les paramètres sanitaires et le statut immunitaires des veaux pré-sevrés (2 ±1j d'âge). Aucune différence dans la consommation de matière sèche, le gain de poids quotidien ou le poids final n'a été observée suite à l'addition d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* à 2% de matière sèche. L'addition de levures n'a pas empêché la survenue de diarrhées, mais a réduit leur durée et sévérité ainsi que le taux de mortalité après le 13^{ème} jour de vie. La morbidité a également été significativement réduite. De plus, la levure a amélioré la consistance des fèces. La supplémentation en culture de levures n'a pas eu d'effets sur la réponse humorale, puisqu'aucune différence n'a été observée entre les deux lots, mais l'activité des polynucléaires neutrophiles a été légèrement augmentée, en présence d'une souche pathogène d'*E.coli* chez les veaux supplémentés par rapport aux témoins. Aucun effet sur l'incidence des maladies respiratoires n'a été noté. Ces auteurs concluent que la culture de levure améliore la santé du tractus digestif, réduisant ainsi la durée des traitements, et par conséquent, les coûts inhérents aux traitements.

Les travaux de Di Francia *et al* (2007) montrent que l'utilisation d'un mélange de *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus oryzae* n'a aucun effet sur la consommation de l'aliment de démarrage mais entraîne une augmentation de la consommation volontaire de foin à partir de la 9^{ème} semaine et jusqu'à la fin de la supplémentation. De même, le gain de poids moyen est plus élevé chez les veaux ayant libre accès au foin. La digestibilité des veaux supplémentés est supérieure à celle des témoins. La consistance des fèces est également améliorée.

D'après l'essai de Kaldmae *et al* (2007), l'addition d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* à la ration de démarrage des veaux, n'a pas amélioré de façon significative la matière sèche ingérée, le gain de poids avant sevrage ou l'efficacité alimentaire. Mais par la suite, une légère amélioration du gain de poids a été observé dans le groupe recevant la culture de levure. La supplémentation en culture de levures améliorerait donc progressivement le développement du rumen à partir du deuxième mois de vie.

Dans leur essai, Gavlaio *et al* (2005) tentent de mettre en évidence l'effet de l'addition de *Saccharomyces cerevisiae* à la ration des veaux pré-sevrés, chez lesquels l'immunité passive est défaillante. L'addition de levures vivantes au concentré de démarrage des veaux entraîne une augmentation de la consommation alimentaire et du gain de poids corporel, particulièrement avant le sevrage. L'efficacité alimentaire n'est cependant pas améliorée. La levure n'a eu aucun effet sur la consistance des fèces mais a réduit la durée des diarrhées.

Dans un travail effectué sur des veaux à l'engrais, Titi *et al* (2008) mettent en évidence l'effet de l'addition d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* à l'aliment de veaux mâles sevrés, sur les performances de croissance, les caractéristiques de carcasses et la qualité de la viande. L'utilisation de la culture de levures sur une période de dix mois, n'a pas entraîné de différences significatives dans le gain de poids moyen quotidien, ou le poids final entre les deux lots, même si les valeurs étaient légèrement supérieures pour le lot supplémenté. La matière sèche ingérée (moyenne et totale) était quant à elle plus faible pour le lot supplémenté par rapport au lot témoin. Aucune différence entre les deux lots, dans les caractéristiques de la carcasse (poids, teneur en graisse, épaisseur du muscle, couleur) n'a été observée après abattage. Il en était de même pour les qualités organoleptiques de la viande.

Ces travaux rejoignent ceux de Mir et Mir (1994) qui n'ont rapporté aucun changement significatif dans les caractéristiques de carcasses de bouvillons, nourris avec différents types d'aliments (ensilage de maïs, ensilage de luzerne, rations riches en céréales) et supplémentés durant deux années en levures *Saccharomyces cerevisiae*.

Enfin, Lesmeister *et al* (2004) ont évalué l'impact de l'addition d'une culture de *Saccharomyces cerevisiae* à différents pourcentages de matière sèche (1% ou 2% MS) de l'aliment démarrage de veaux nouveaux nés sur les performances zootechniques. Après 42 jours de supplémentation, les résultats montrent que la culture de levures à 2% de la MS.

Tableau 4 : Effets de la supplémentation alimentaire en *Saccharomyces cerevisiae* sur les paramètres sanguins des veaux (synthèse de plusieurs auteurs).

Animaux (moyennes d'âge)	Durée de la supplémentation	Variation des paramètres sanguins par rapport aux témoins	Auteurs
512 veaux (2±1j)	58j	→Glycémie →PT →BHB →IgG	Magalhaes <i>et al</i> (2008)
75 veaux (2±1j)	42j	→PT →BHB	Lesmeister <i>et al</i> (2004)
52 veaux (5±2j)	84j	↗ Glycémie (P=0,005) →BHB	Galvao <i>et al</i> (2005)
9 veaux (12 semaines)	14j	→Glycémie ↗ BHB (P<0,01) ↗ ACAC (P<0,05) ↘ Urée (NS)	Quigley <i>et al</i> (1992)
42 veaux (1j)	84j	→Glycémie → Urée	Quigley <i>et al</i> (1992)
101 veaux	57j	↗ Urée (P<0,05)	Cole <i>et al</i> (1992)

PT : protéines totales ; **BHB** : β hydroxybutyrate ; **ACAC** : acétoacétate ;

IgG : Immunoglobuline G ; **NS** : effet non significatif

semble être celle qui exerce le plus d'effets significatifs sur les paramètres mesurés. En effet, ces auteurs constatent une augmentation significative de la matière sèche ingérée (+10%), du gain moyen quotidien (+16%) ainsi que de l'indice de conversion (+11%).

La culture de levure a amélioré également le développement du rumen, avec une augmentation de la longueur et de la largeur des papilles ruminales (+ 25% et +15% respectivement).

III.2.2. Effets de la supplémentation en levures sur les paramètres métaboliques et le statut immunitaire

Notre recherche bibliographique n'a pas permis de mettre en évidence beaucoup de travaux portant sur l'impact de la supplémentation alimentaire en levures probiotiques sur les paramètres sanguins des ruminants ; la plupart ayant été réalisés chez la vache laitière, les données disponibles chez le veau sont très minces. Les quelques données bibliographiques disponibles sont résumées dans le tableau 4.

Comme pour les paramètres zootechniques, l'effet de *Saccharomyces cerevisiae* sur les paramètres sanguins est très variable entre les études, probablement en raison de la variabilité des doses de levures utilisées ou encore des caractéristiques des rations distribuées, comme suggéré par Galip (2006).

IV. MODES D'ACTION POSSIBLES PAR LESQUELS LA SUPPLEMENTATION EN LEVURES AMELIORE LA PRODUCTION ANIMALE

IV.1. Via les effets sur les fermentations du rumen

IV.1.1. Désoxygénation du milieu

La majorité des espèces bactériennes responsables de la fermentation des aliments au niveau du rumen sont strictement anaérobies. L'oxygène est régulièrement introduit dans le rumen à l'occasion de la prise d'aliment et d'eau, augmentant ainsi le potentiel redox du rumen, à l'origine de l'inhibition des bactéries anaérobies (Williams et Newbold, 1990). Certains chercheurs ont suggéré que, l'effet stimulant de la levure sur les fermentations du rumen,

pouvait être dû au fait que, les levures métabolisent rapidement l'oxygène introduit dans le rumen. Ceci réduit le potentiel redox, créant un milieu de croissance favorable aux bactéries anaérobies (Wallace, 1994 ; Miller-Webster *et al.*, 2002). Ces bactéries, une fois stimulées, sont à l'origine de la fermentation des aliments au niveau du rumen.

IV.1.2. Modulation du pH du rumen

Dans les nouveaux systèmes d'élevage des animaux, notamment ceux à hauts potentiels de production, les aliments sont riches en sources de carbone rapidement dégradables. Ces aliments fermentent rapidement dans le rumen, et peuvent entraîner une accumulation de produits de la fermentation tels que le lactate, à l'origine d'une baisse du pH. En effet, la concentration en acide lactique est un facteur déterminant majeur du pH ruminal. La diminution du pH est responsable de l'inhibition de la croissance de nombreuses espèces bactériennes bénéfiques du rumen, mais elle est également fortement inhibitrice des micro-organismes responsables de la digestion des fibres dans le rumen (Holder 2007).

Plusieurs études font état d'une diminution totale du pic de la production de lactate en réponse à une supplémentation en levure (Williams *et al.* 1991. Erasmus *et al.* 1992 ; Mir and Mir 1994 et Lila *et al.* 2004). Il a également été démontré *in vitro* que l'apport de levures stimule la croissance de la majorité des bactéries qui utilisent le lactate (Callaway and Martin 1997) conduisant ainsi à une élévation du pH du rumen constatée au cours de plusieurs expériences (Beauchemain *et al.* 2003 ; Sauvart *et al.* 2004). La diminution de la concentration de l'acide lactique et l'augmentation du pH qui en résulte conduirait à la stimulation des espèces bactériennes sensibles à l'acidité, responsables de la fermentation ruminale de composants alimentaires importants (Holder 2007).

L'acidose ruminale (aigüe ou subaigüe) continue d'être une pathologie digestive très fréquemment observée dans les élevages intensifs. Celle-ci n'est pas seulement responsable d'une baisse du niveau de production des animaux, mais elle est également à l'origine de troubles de la santé tels que des ballonnements, des abcès du foie, ou des fourbures. Des études conduites *in vitro* (Nisbet et Martin, 1991 ; Chaucheyras *et al.* 1997 ; Rossi *et al.* 2004) ont montré que les levures vivantes pouvaient influencer sur l'équilibre des bactéries qui métabolisent le lactate, en limitant sa production par *Streptococcus bovis* ou encore, en

stimulant sa consommation par *Megasphaera elsdenii* ou *Selenomonas ruminantium* (Chaucheyras-durand et durand, 2008).

Il a également été démontré *in vitro* que les levures fournissent des acides aminés, des acides organiques et des vitamines du groupe B, tous essentiels à la croissance des bactéries utilisatrices de lactate et des bactéries cellulolytiques (Chiquette 2009a).

Dans le cas de l'acidose subaigüe (Sub-Acute Ruminant Acidosis : SARA), le mécanisme par lequel les levures maintiennent le pH du rumen n'est pas encore bien étudié mais certaines hypothèses sont émises. Ainsi, chez les animaux supplémentés en levures, la fermentation des aliments serait orientée vers la production de cellules bactériennes à la place des acides gras volatils normalement produits, ce qui limiterait la baisse du Ph (Chiquette 2009a).

Brossard *et al.* (2006) rapportent, suite à des essais menés *in vivo* sur des moutons, qu'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* pourrait prévenir la diminution du pH du rumen en stimulant certaines populations de protozoaires ciliés (*Entodiniomorphs* par exemple) qui consommeraient rapidement l'amidon, entrant ainsi en compétition avec les bactéries amylolytiques productrices de lactate. Ces résultats viennent appuyer les observations faites par Mathieu *et al.* (1996), lors d'utilisation de levures chez des moutons défaunés, qui n'avait pas entraînée d'augmentation du pH ruminal, suggérant le rôle possible des protozoaires dans l'effet de la levure sur le pH.

IV.1.3. Augmentation de la production d'acides gras volatils

De nombreux travaux réalisés *in vitro* (Miller-Webster et al., 2002 ; Lila et al., 2004) font état d'une augmentation des acides gras volatils (AGV) produits par fermentation de substrats supplémentés en levures probiotiques. Les AGV représentent la principale source d'énergie des ruminants. De ce fait, une augmentation de leur concentration au niveau du rumen pourrait améliorer la production animale. Ceci a été démontré *in vitro*, aussi bien sur des cultures bactériennes pures, que sur des cultures fermentées au niveau du rumen (Holder, 2007).

IV.1.4. Modification des proportions des acides gras volatils produits

Des chercheurs rapportent que l'utilisation de levures entraîne une diminution dans le rapport acetate/propionate. Celle-ci pourrait stimuler la production animale ; le propionate ayant une enthalpie supérieure, il fournirait plus d'énergie à l'animal que l'acétate ; (Holder, 2007).

Ces observations ont été enregistrées aussi bien *in vitro* (Dawson *et al.* 1990 ; Williams *et al.* 1991 ; Miller-Webster *et al.* 2002 ; Lila *et al.* 2004) que *in vivo* (Williams *et al.* 1991).

IV.2. Via les changements dans la digestibilité de la ration

IV.2.1. Amélioration de la digestion ruminale

Lila *et al.* (2004) rapportent une augmentation de la digestibilité de la matière sèche et des fibres suite à une supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae*. L'amélioration de la digestibilité des aliments conduit à une meilleure disponibilité des nutriments, et de ce fait à une meilleure production animale. Ces observations contredisent les travaux de Putnam *et al.* (1997) qui n'ont montré aucun changement dans la digestibilité de la ration, suite à l'addition de levures.

IV.2.2. Le taux de digestion

De nombreux rapports indiquent que l'utilisation des levures chez les ruminants, augmente le taux de digestion des fibres (Williams *et al.* 1991 ; Newbold *et al.* 1995 ; Lila *et al.* 2004). La littérature s'accorde en général pour dire que l'effet de la levure sur la digestion, et particulièrement sur la digestion des fibres, est plus marqué sur le taux que sur l'étendue de la digestion. L'augmentation du taux de digestion de la ration conduit à une plus grande quantité de nutriments disponibles pour la production. De plus, le taux de remplissage du rumen augmente, ce qui conduit à son tour à une augmentation de la matière sèche ingérée (Wallace 1994).

De nombreux travaux ont mis en évidence cette augmentation de la matière sèche ingérée suite à l'utilisation de levures probiotiques (Williams *et al.* 1991 ; Erasmus *et al.* 1992 ; Putnam *et al.* 1997) alors que d'autres ne rapportent aucun effet de la levure sur ce paramètre (Erdman *et al.* 1989 ; Kung *et al.* 1997).

IV.3. Via les effets sur la population microbienne du rumen

IV.3.1. Augmentation du nombre total de bactéries

L'augmentation du nombre total des bactéries cultivables dans le rumen à été démontrée dans de nombreux essais (Durand-Chaucheyras *et al.* 1997 ; Lila *et al.* 2004 ; Sauvant *et al.* 2004). Il apparait même être l'effet le plus fréquemment signalé suite à une supplémentation des ruminants en levures.

De nombreuses études rapportent une augmentation du nombre de bactéries anaérobies et de bactéries cellulolytiques *in vitro* (Newbold *et al.* 1996 ; Newbold *et al.* 1998). Ces bactéries sont principalement responsables de la fermentation dans le rumen. Par conséquent, une augmentation de leur concentration pourrait améliorer le taux de digestion, rendant ainsi disponible plus de nutriments pour l'animal.

Des travaux réalisés sur le jeune ruminant (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2001) ont permis de montrer que la colonisation du rumen par la microflore était plus précoce chez les animaux supplémentés en levures, et que l'activité des bactéries cellulolytiques était aussi plus importante par rapport aux animaux témoins.

IV.3.2. Augmentation de la production des protéines d'origine microbiennes

L'augmentation de la concentration des bactéries présentes au niveau du rumen entraîne une augmentation de la quantité des protéines microbiennes disponibles au niveau du rumen et de l'apport en acides aminés dans l'intestin grêle (Newbold *et al.* 1995 ; Beauchemain *et al.* 2003). Cet effet de la levure sur le flux d'azote n'a cependant pas été observé dans tous les essais.

L'effet de la complémentation alimentaire en levures sur le flux de protéines microbiennes et d'acides aminés arrivant à l'intestin grêle semble être dépendant du régime alimentaire. Des travaux menés chez la chèvre montrent que l'addition de levures à un régime pauvre en protéines permet de restaurer le taux butyreux du lait qui devient équivalent à celui obtenu chez les témoins recevant un régime à teneur adéquate en protéines (Giger-Reverdin *et al.* 1996).

IV.3.3. Amélioration de l'efficacité microbienne

L'efficacité microbienne est évaluée en grammes de protéines microbiennes produites par kilogramme de matière organique fermentée. Olsen *et al.* (1994) ont rapporté une augmentation de l'efficacité de production des protéines microbiennes. Cette augmentation résulterait d'une plus grande quantité de protéines disponibles pour la production par unité d'aliment ingéré. Cependant, cette efficacité microbienne n'a pas été constatée dans tous les travaux (Miller-Webster *et al.* 2002).

IV.3.4. Augmentation du nombre de protozoaires du rumen

Les travaux de Galip (2006) chez le bélier, et de Miranda *et al.* (1996) chez la chèvre ont montré une augmentation du nombre total des protozoaires du rumen, lorsque les animaux recevaient régulièrement *Saccharomyces cerevisiae*.

En 2006, Jouany propose un modèle qui explique, pour la première fois, la plupart des effets positifs attribués à la supplémentation des animaux en levures. Le modèle repose sur le fait que les levures sont des micro-organismes aérobies, qui une fois au niveau du rumen, se développent grâce à l'oxygène piégé dans la fraction solide du contenu ruminal (chez l'ovin, environ 16 litres d'O₂ peut entrer dans le rumen au moment de la prise d'aliments et d'eau). Par conséquent, les cellules des levures sont étroitement associées aux particules solides d'aliments, autour desquelles un microenvironnement est créé (voir figure 2). Une diminution du potentiel redox a été observée par Jouany (1999) dans le rumen des animaux traités. Ce micro-environnement, essentiellement anaérobie, stimule la croissance des bactéries anaérobies et leur attachement aux particules de fibres (Roger *et al.* 1990) et augmente le taux initial de digestion de la cellulose. Ceci peut expliquer l'augmentation de la consommation de l'aliment observée lors d'une supplémentation en levures.

L'existence d'une grande variabilité dans les propriétés de désoxygénation des levures devrait être un facteur important à considérer lors du choix des levures à usage probiotique. L'étude effectuée par Newbold (1996) vient appuyer ces conclusions, puisqu'aucun effet sur la croissance bactérienne n'a été observé lorsqu'une souche mutante de *Saccharomyces cerevisiae* déficiente respiratoire a été utilisée.

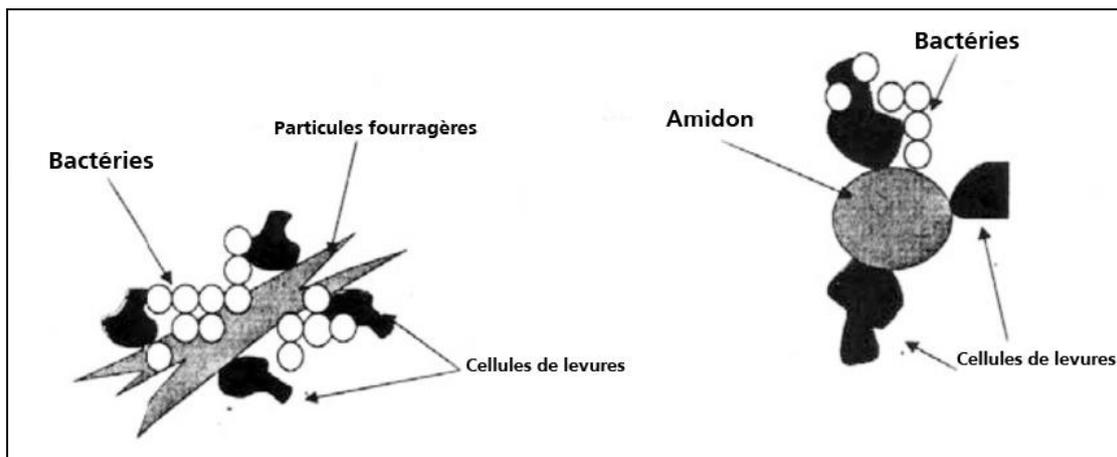
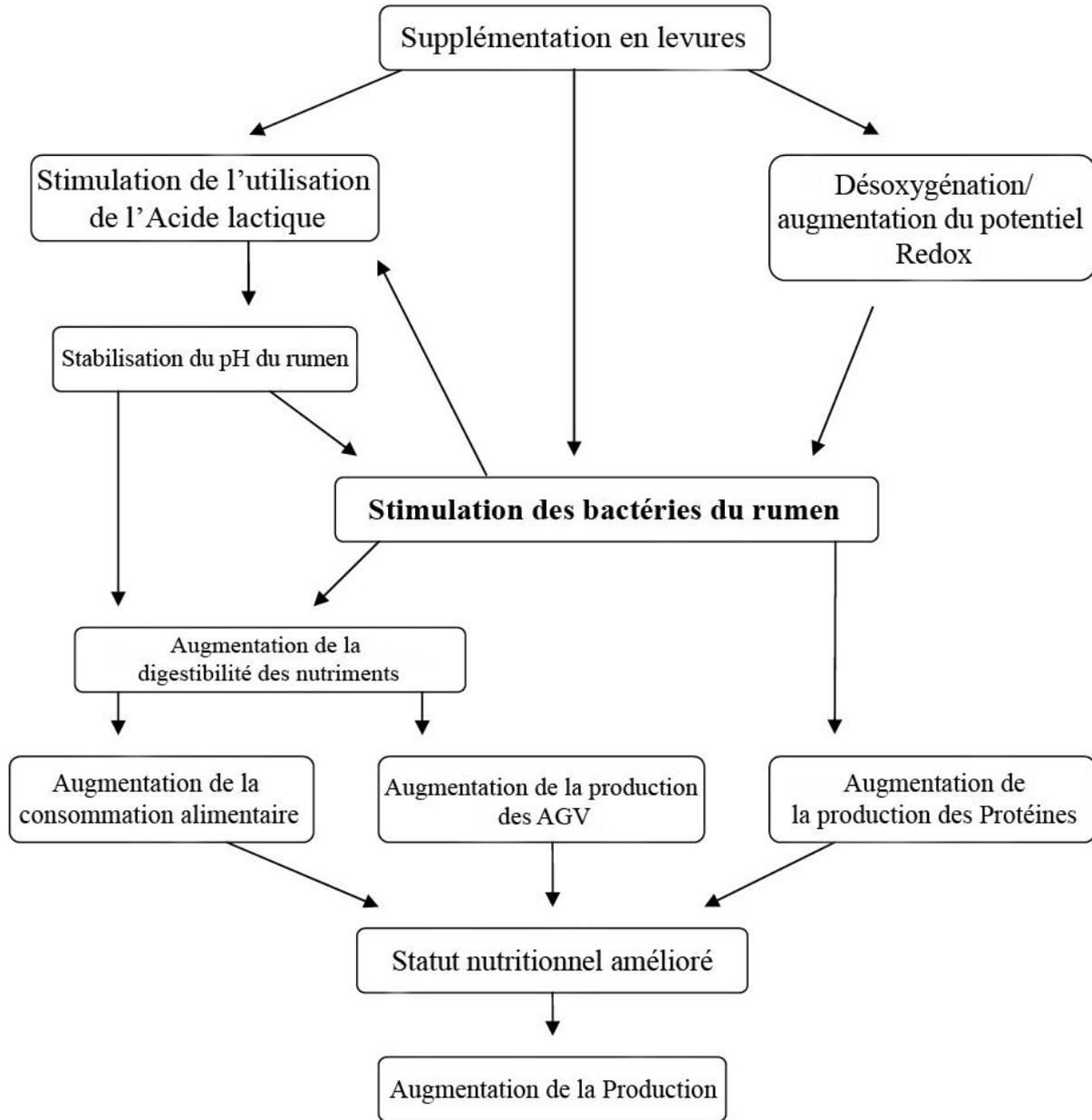


Figure 2 : Modèle de l'interaction des cellules de levures avec les microorganismes du rumen
(Adapté de Jouany 2006)

31

La conversion du propionate au lactate, et inversement, est une fonction qui dépend de la pression partielle de l'oxygène au niveau du rumen. En effet, lorsque la pression partielle de l'O₂ est faible, la conversion du lactate en propionate est favorisée, alors qu'une pression partielle en O₂ élevée favorise la conversion du propionate en lactate. Ceci explique pourquoi les levures en diminuant la pression partielle de l'O₂ au niveau du rumen, favorisent une voie de fermentation moins acide d'où leur effet dans la stabilisation du pH du rumen. Cette dernière est également favorable aux organismes cellulolytiques qui sont sensibles à l'acidité.

Ce microenvironnement créé autour des levures permet également d'expliquer comment, même en faible quantité et avec une durée de vie relativement courte, les levures sont capables de fournir des facteurs de croissance tels que des acides organiques, des vitamines du groupe B et des acides aminés aux bactéries du rumen de proximité (Chiquette 2009a).



32

Figure 3 : Représentation schématiques des modes d'action possibles par lesquels la supplémentation en levure stimulerait la production des ruminants

(Adaptée de Wallace 1994 et Dawson *et al.* 1995)

I. OBJECTIF DE L'ETUDE

Le but de notre essai est d'étudier, dans les conditions locales, l'effet de l'incorporation du probiotique *Saccharomyces cerevisiae* dans l'aliment sur les performances zootechniques, certains paramètres métaboliques et le statut sanitaire des veaux.

II. LIEU DE L'ETUDE

Notre travail a été réalisé à la station expérimentale RUMINANT de l'Institut Technique des Elevages de Baba-Ali (ITELV).

III. PERIODE D'ETUDE

La période expérimentale s'est étalée sur 2 mois allant du 30 mai 2009 au 30 juillet 2009. Elle était précédée par une période de 15 jours, correspondant à la phase d'adaptation des veaux à leur habitat.

IV. PERIODE PRE EXPERIMENTALE

D'une durée de 45 jours (du 15 avril 2009 au 29 mai 2009), cette étape était nécessaire à la sélection et à l'homogénéisation des veaux qui feront partie de l'essai.

IV.1. Commémoratifs de l'élevage

Au moment de l'étude, la station expérimentale RUMINANTS de l'ITELV comprenait un effectif global de 65 veaux, de race PrimHolstein, Pie noire, Pie rouge, Brune des alpes, ainsi que des veaux de race locale.

Chaque veau est identifié à la naissance grâce à une boucle plastique apposée à l'oreille, comportant un numéro à cinq chiffres et dispose d'une fiche signalétique regroupant toutes les informations propres à l'animal : numéro d'identification, race, date de naissance, poids à la naissance, numéro et race de la mère, ainsi que des remarques sur d'éventuels problèmes rencontrés au moment du part (souffrances fœtales, diarrhées néonatales...).



Dès la naissance, les veaux sont soumis à des contrôles vétérinaires réguliers. Les observations (quantité de lait bue, maladies, traitements éventuels, poids) sont notées sur des feuilles de suivis cliniques. Les animaux font l'objet de vermifugations et de vitaminothérapies systématiques.

IV.2. Répartition des animaux au sein de l'élevage

A la naissance, les veaux sont généralement laissés sous mère pendant trois jours, période indispensable à la prise du colostrum maternel. Ils sont par la suite placés à la nurserie jusqu'à l'âge de 6 mois. La nurserie dispose de box individuels paillés (1,5 x 92cm) qui hébergent les veaux âgés de 3 jours à 3 mois, ainsi que des box collectifs paillés (3,35 x 3m) dans lesquels les veaux sont placés à partir de 3 mois, à raison de 4 à 5 veaux par box, et ce jusqu'à l'âge de 6 mois.

A six mois, les veaux sont déplacés vers un autre bâtiment appelé « Etable Jeunes Bovins » où ils résident dans des box individuels paillés (1,90 x 1,20m) et disposent également d'une aire d'exercice.

Le devenir des animaux à ce moment dépend de leur sexe. En effet, les mâles sont engraisés et vendus aux enchères, alors que les femelles sont gardées au sein de l'institut et destinées à la reproduction.

IV.3. Bilan initial

Afin de sélectionner les animaux qui feront partie de notre expérimentation, nous avons commencé par déterminer le nombre total de veaux présents au niveau l'institut, et ce en date du 15 avril 2009. Pour les 65 veaux disponibles à cette période, nous avons collecté toutes les informations utiles à savoir : la date de naissance, le poids, et le sexe. Une pesée de l'ensemble des veaux a été effectuée puis les animaux ont été classés d'abord par sexe puis par âge et poids croissants (pour chaque sexe). Les animaux trop âgés ou ayant des poids extrêmes, ainsi que les veaux de race locale (faiblement représentés), ceux malades ou présentant des anomalies pouvant interférer dans notre essai, ont été écartés.

IV.4. Sélection des animaux et constitution des lots

Sur l'effectif total de 65 veaux, 36 ont été retenus pour cet essai : 18 mâles et 18 femelles. Ces animaux ont été ensuite répartis en deux lots homogènes (n=18) en prenant comme critères de tri, et par ordre de priorité : le sexe, l'âge et le poids.

En pratique, les veaux ont été dans un premier temps répartis selon le critère « sexe » en mâles et femelles. Au sein de chaque groupe, les veaux ont été classés en deux sous lots d'âges et de poids les plus proches possibles, puis affectés de façon aléatoire à l'un des deux lots expérimentaux : témoin ou supplémenté en levures. Les caractéristiques des veaux sélectionnés pour les deux lots expérimentaux sont présentées dans le tableau 8 (voir chapitre résultats).

IV.5. Homogénéisation des animaux

Avant le début de la supplémentation, tous les veaux sélectionnés sont placés dans les étables disponibles qui leur serviront de logements pour toute la durée de l'essai. Ils y sont maintenus entravés dans des box individuels, afin de maîtriser les quantités ingérées.

Pour des raisons logistiques (nombre de box disponibles), tous les animaux de l'essai (36 veaux) n'ont pas été placés dans le même bâtiment d'élevage. Cependant, afin que les résultats ne soient pas biaisés par un « effet bâtiment », les animaux des deux lots (témoins et supplémentés) ont été répartis de façon homogène entre les deux bâtiments, d'un point de vue, poids, âge et sexe ratio de chaque traitement. Les caractéristiques individuelles des veaux placés dans les deux bâtiments d'élevage sont présentées dans les tableaux suivants (Tableaux 5 et 6). Les poids et âges moyens de chaque lot au sein de chaque bâtiment sont présentés dans la partie Résultats (page 54).

Tableau 5 : Caractéristiques des veaux placés dans le bâtiment B1 au démarrage de L'essai (j_0) (Avant le début de la supplémentation)

N° d'identification	Sexe	Age (j_0)	Poids (j_0)	Bâtiment
29008	F	83	78,4	B1
28027	F	197	169,2	B1
28023	F	215	195,4	B1
28031	F	165	144,4	B1
28026	F	199	158,8	B1
28021	F	251	196,4	B1
29009	F	80	83	B1
29003	F	137	154,4	B1
29502	M	136	141	B1
28524	M	166	161	B1
28520	M	178	175	B1
29508	M	62	94	B1
28518	M	206	162,4	B1
28526	M	157	141,2	B1
28523	M	172	160	B1
29506	M	87	120	B1

Tableau 6 : Caractéristiques des veaux placés dans le bâtiment B2 au démarrage de l'essai (j_0) (Avant le début de la supplémentation)

N° d'identification	Sexe	Age	Poids	Bâtiment
29004	F	118	143,2	B2
29002	F	138	110,4	B2
29001	F	179	149	B2
28024	F	206	181	B2
28033	F	154	151	B2
28029	F	183	150,4	B2
29006	F	102	128	B2
28028	F	186	156,2	B2
28030	F	172	153,6	B2
28032	F	163	152,2	B2
29503	M	123	145,2	B2
28525	M	160	139,6	B2
28522	M	175	178	B2
29501	M	146	141,6	B2
29505	M	107	111	B2
29507	M	77	117,4	B2
29504	M	121	147	B2
28527	M	156	138	B2
28521	M	177	161,6	B2
28519	M	196	168,8	B2

V. PERIODE EXPERIMENTALE

V.1. Schéma expérimental

Afin d'étudier l'effet de la supplémentation de l'aliment du veau en levures, deux traitements expérimentaux ont été comparé :

- Un Lot « **Témoin** » : veaux recevant un aliment sans aucun additif ;
- Un lot « **Supplémenté** » : veaux recevant le même aliment que les animaux du lot témoin, mais supplémenté avec la levure probiotique *saccharomyces cerevisiae*.

La durée de la supplémentation était de 60 jours. Le poids vif a été enregistré chaque semaine. Les paramètres métaboliques sanguins ont été évalués à trois moments précis :

- J0 au début de la supplémentation ;
- J 30 en milieu de supplémentation ;
- J 60 en fin de supplémentation.

V.2. Alimentation

V.2.1. Composition de la ration de base

Tous les animaux sont nourris avec le même aliment concentré de base (concentré jeunes bovins JB, SARL Ain-Bessem ALIMENT) en quantités égales, supplémenté (lot levure) ou non (lot témoin) en probiotique *S.cerevisiae*.

La quantité de fourrages distribuée (foin d'orge) est également identique pour les deux lots. La distribution quotidienne de l'aliment se fait de manière manuelle, deux fois par jour, et toujours à la même heure (7H et 15H). La composition et les caractéristiques de l'aliment de base sont décrites dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Composition et caractéristiques de la ration de base

Aliment concentré	Taux %	UF	MAD (g/kg)
Maïs	56	0,616	36,4
Son	20	0,144	22
T. de soja	20	0,21	87,4
Calcaire	2		
Phosphate bicalcique	0,5		
Sels	0,5		
CMV bovins	1		
AD ₃ E	traces		
Total	100	0,97	145,8

Fourrage	MS %	UF	MAD (g/kg)
Foin d'orge	97,4	0,49	43,02

UF : unités fourragères, MAD : matières azotées digestibles, MS : matières sèches.

La ration distribuée a été calculé en tenant compte des besoins des animaux (entretien et croissance). Cependant, les quantités de fourrage ont été réajustées en cours d'essai, pour satisfaire au mieux aux besoins croissants des animaux. Ainsi, au démarrage de l'essai, chaque veau a reçu une ration composée de 5kg de foin et de 2kg d'aliment concentré, servi en deux repas. Les trois dernières semaines, la quantité de foin a été augmentée à 6kg environ, toujours servis en deux repas.

Les valeurs énergétiques (calculées) de la ration distribuée aux animaux sont présentées dans le tableau suivant (tableau 8).

**Tableau 8** : Valeurs énergétiques de la ration distribuée aux animaux

Aliment	MS (%)	UF	MAD (g/kg)	Brute (kg)	MS (%)	UF	MAD (g/kg)
J ₀ - J ₄₀							
Foin d'orge	94,7	0,49	43,02	5	4,73	2,32	203,70
Concentré	96	0,97	145,8	2	1,92	1,86	280
				Total	6,65	4,18	483,7
J ₄₀ - J ₆₀							
Foin d'orge	94,7	0,49	43,02	6	5,70	2,80	244,4
Concentré	96	0,97	145,8	2	1,92	1,86	280
				Total	7,62	4,66	524,4

UF: unités fourragères, MAD : matières azotées digestibles, MS : matières sèches.

V.2.1. Modalités de supplémentation en levure probiotique

Le probiotique utilisé est la souche de levures spécifique du ruminant *Saccharomyces cerevisiae* CNCM-I1077 (Collection Nationale de Culture de Microorganismes, Institut Pasteur, Paris) qui est commercialisée sous le nom de LEVUCCELL® SN 20 par Lallemand Nutrition Animale, France.



Il s'agit d'un concentré de levure sèche active dont la concentration est de 20.10^9 UFC/g de *Saccharomyces cerevisiae*. La dose recommandé par le fabricant est de 2.10^{10} UFC/tête/jour soit, en pratique 10g/tête/jour.

Afin de s'assurer de la prise complète de la dose préconisée, par animal supplémenté et par jour, la levure est distribuée par top feeding, c-à-d que le concentré alimentaire du lot supplémenté est saupoudré tous les jours, de manière individuelle, par les 10g de levure.

V.2.2. Abreuvement

Durant tout l'essai, l'eau a été distribuée ad libitum dans des bassines individuelles en plastiques, régulièrement nettoyées et remplies. En effet, la structure des bâtiments ne permettait pas aux animaux l'accès aux abreuvoirs automatiques.

V.3. Bâtiments d'élevage

Comme mentionné précédemment, les animaux ont été répartis sur deux bâtiments d'élevage :

V.3.1. Le bâtiment B1

Il s'agit d'un bâtiment couvert, d'une longueur de 30m et d'une largeur de 5m. Il est pourvu de box individuels, de part et d'autres desquels se trouvent des couloirs de travail, facilitant la distribution des aliments dans les auges, et permettant la manipulation des animaux en toute sécurité (voir figure 4).

Ce bâtiment communique par une ouverture avec une autre surface, découverte qui sert aux animaux d'aire d'exercice, et qui permet à l'air et au soleil de pénétrer dans le bâtiment. Celle-ci n'a pas été utilisée, les animaux ayant étaient maintenus entravés durant toute la période de notre essai.

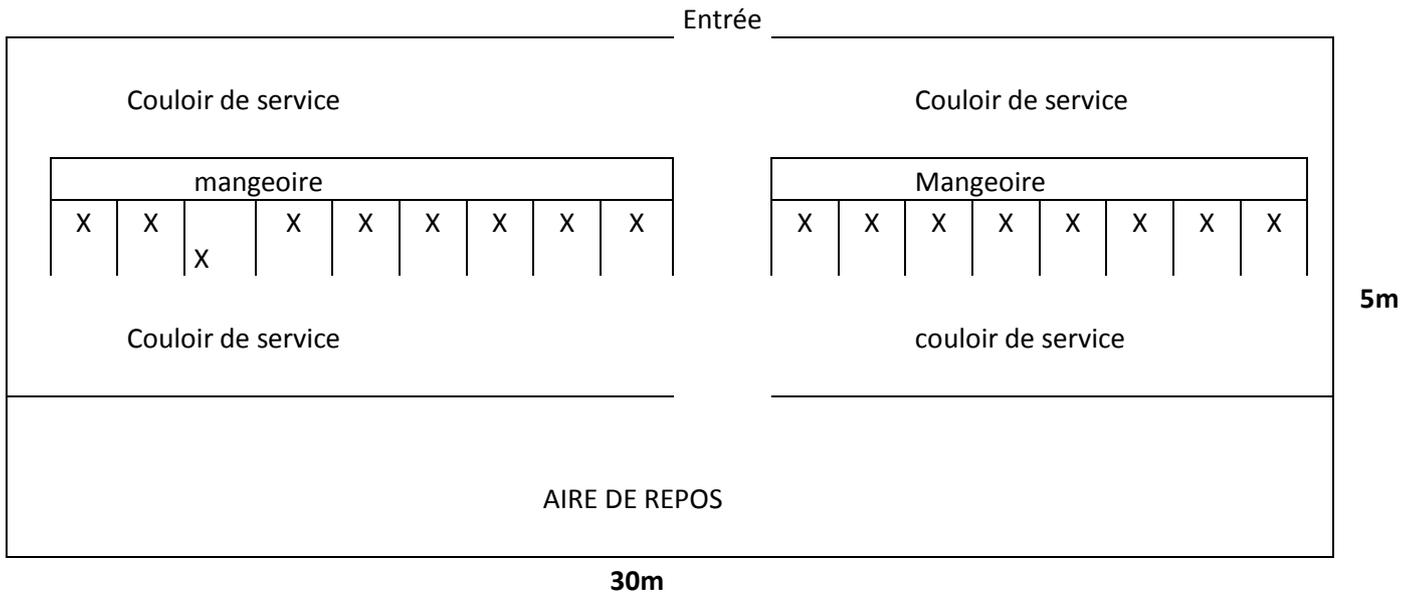


Figure 04 : Aménagement du bâtiment B1

V.3.2. Le bâtiment B2

D'une superficie de 23x8m, ce bâtiment également couvert, comprend des box individuels ainsi que des box collectifs, plus grands. L'aération et l'éclairage de l'étable sont assurés grâce aux fenêtres situées sur les façades du bâtiment. (Voir figure 05).

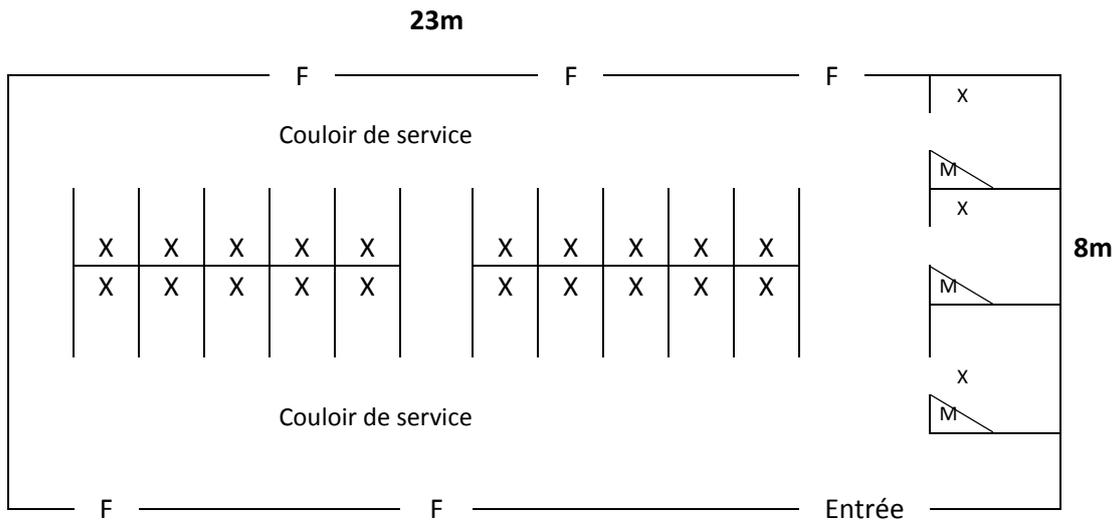


Figure 05 : Aménagement du bâtiment B2

VI. MESURES REALISEES

VI.1. Mesure des performances zootechniques

VI.1.1. L'ingéré alimentaire

La consommation des aliments (concentrés et fourrages) est évaluée par la mesure de la quantité distribuée, puis de la quantité retrouvée dans les mangeoires (refus).

$$\text{Quantité ingérée (kg)} = \text{quantité distribuée (kg)} - \text{Refus (kg)}$$

En pratique, la disposition des box le long d'une mangeoire commune ne nous a pas permis de calculer avec précision, les quantités de fourrage ingérées par chaque animal. Cependant, durant toute la période d'essai, la totalité des rations distribuées était consommées. En ce qui concerne l'aliment concentré, les modalités de sa distribution font que nous pouvons déterminer avec exactitude la quantité ingérée par chaque animal, et la encore aucun refus n'est noté.

VI.1.2. Mesure du poids

Le poids vif des veaux à été déterminé à plusieurs moments de l'essai :

- J-15 au début de la phase d'adaptation ;
- J0 au premier jour de la supplémentation ;
- Chaque semaine pendant toute la durée de l'essai.

La pesée est effectuée à chaque fois par le même opérateur, à l'aide d'un même pèse bétails présent au niveau des étables.

VI.2. Mesure des paramètres sanguins

VI.2.1. Prises de sang

Les prélèvements de sang ont été réalisés sur les 36 veaux, à trois moments précis :

- J0 (début de la supplémentation) ;
- J30 (milieu de l'expérimentation) ;
- J60 (fin de l'expérimentation).

Les prélèvements de sang sont réalisés à chaque fois le matin, sur des animaux à jeun, avant la distribution de la ration. Le sang est collecté dans des tubes EDTA sous vides, par ponction de la veine jugulaire. Le volume de sang prélevé est environ 10ml.

Immédiatement après la collecte du sang, les échantillons sont transportés dans une glacière au laboratoire de biochimie de l'ENSV, centrifugés à 3000 tours/mn pendant 10mn puis ; à l'aide d'une pipette, le plasma est séparé du culot et réparti dans 2 tubes Ependorff préalablement étiquetés (date du prélèvement et numéro d'identification du veau). Les prélèvements sont conservés au congélateur à -20° C jusqu'aux analyses ultérieures.

Les paramètres métaboliques mesurés dans cet essai sont les suivants :

- La teneur plasmatique en glucose ;
- La teneur plasmatique en cholestérol ;
- La teneur plasmatique en triglycérides ;
- La teneur plasmatique en urée ;
- La teneur plasmatique en créatinine ;
- La teneur plasmatique en protéines totales.

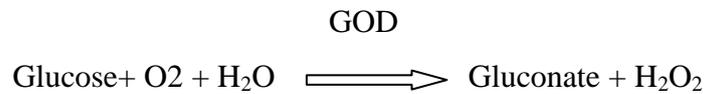
Toutes les analyses des paramètres biochimiques ont été réalisées au niveau du laboratoire de biochimie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire.

VI.2.2. Dosage du glucose plasmatique

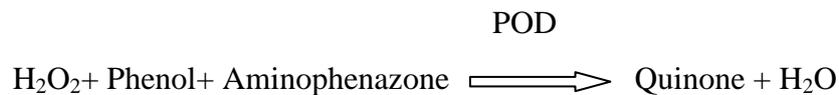
La mesure de la glycémie se fait à l'aide d'un kit de dosage commercial (Glucose/GOD-POD, SPINREACT, SA, Espagne) (fiche technique en annexe).



Principe : Le glucose présent au niveau de l'échantillon est oxydé par la glucose oxydase (GOD) en gluconate selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène formé, réagit en présence de la peroxydase (POD) avec un chromogène pour former un produit coloré :



L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration du glucose dans le milieu.

Le calcul de la concentration de l'échantillon en glucose se fait de la manière suivante :

$$\frac{A \text{ Echantillon}}{A \text{ Standard}} \times C \text{ Standard} = C \text{ Echantillon (mg/dl)}$$

A : Absorbance à la longueur d'onde de 505nm

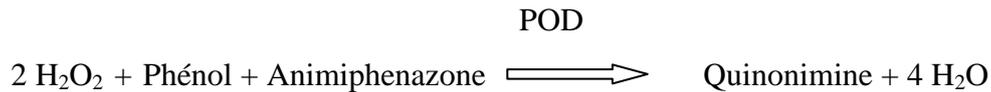
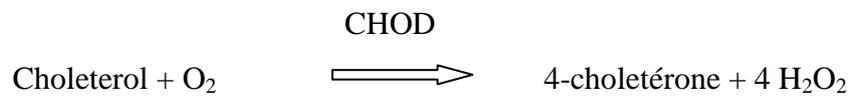
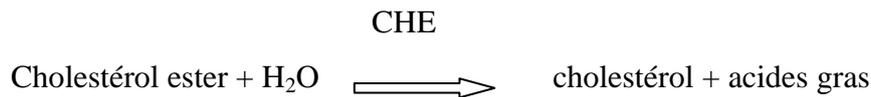
C : concentration du standard = 100mg/dl

Facteur de conversion : mg/dl x 0.0555 = mmol/l

VI.2.3. Dosage du cholestérol plasmatique

Le dosage du cholestérol plasmatique est réalisé à l'aide d'un kit de dosage commercial (Cholesterol/CHOD-POD. Enzymatic colorimetric, SPINREACT, SA, Espagne) (fiche technique en annexe).

Principe : le cholestérol présent au niveau de l'échantillon génère un complexe coloré selon les réactions ci-dessous :



La concentration plasmatique du cholestérol est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{A \text{ Echantillon}}{A \text{ Standard}} \times C \text{ Standard} = C \text{ Echantillon (mg/dl)}$$

A : Absorbance à la longueur d'onde de 505 mn

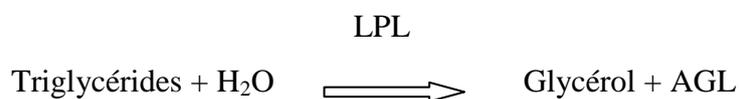
C : Concentration du standard = 200 mg/dl

Facteur de conversion : mg/dl x 0.0258 = mmol/l

VI.2.4. Dosage des triglycérides plasmatiques

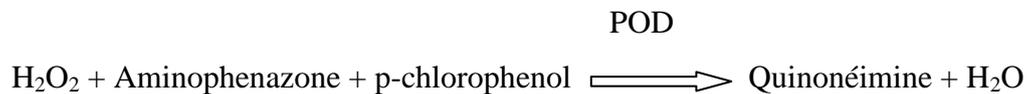
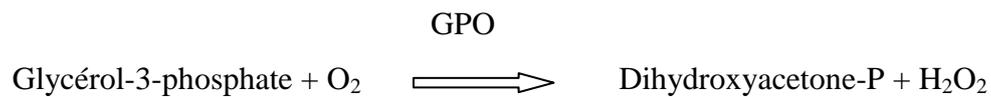
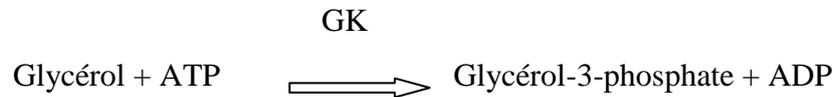
Le dosage des triglycérides est effectué à l'aide d'un kit de dosage commercial (Triglycérides/GPO-POD. Enzymatic colorimetric, SPINREACT, SA, Espagne) (fiche technique en annexe).

Principe : les triglycérides présents au niveau de l'échantillon sont hydrolysés, en présence d'une lipoprotéine lipase (LPL), en glycérol et acides gras libres (AGL).





Le glycérol libéré réagit avec la glycérol kinase (GK), et leur produit réagit lui-même avec la glycérol-3-phosphate oxydase, libérant ainsi le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 dont la concentration est mesurée.



La concentration plasmatique des triglycérides est calculée comme suit :

$$\frac{A \text{ Echantillon}}{A \text{ Standard}} \times C \text{ Standard} = C \text{ Echantillon (mg/dl)}$$

A : Absorbance à la longueur d'onde de 505 mn

C : Concentration du standard = 200 mg/dl

Facteur de conversion : mg/dl x 0.0113 = mmol/l

VI.2.5. Dosage des protéines totales

Le dosage de la teneur plasmatique en protéines totales est réalisé à l'aide d'un kit de dosage commercial (Total protein/Biuret. Colorimetric, SPINREACT, SA, Espagne) (fiche technique en annexe).



Principe : En milieu alcalin, les protéines présentes au niveau de l'échantillon réagissent avec des ions cuivre pour former un complexe coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration des protéines totales présentes au niveau de l'échantillon.

La concentration de l'échantillon en protéines se mesure par la formule suivante :

$$\frac{A \text{ Echantillon}}{A \text{ Standard}} \times C \text{ Standard} = C \text{ Echantillon (g/ dl)}$$

A : Absorbance à la longueur d'onde de 540 mn

C : Concentration du standard = 7 g/dl

VI.2.6. Dosage de la créatinine plasmatique

Le dosage de la créatinine plasmatique est réalisé à l'aide d'un kit de dosage commercial (Créatinine/Jaffé. Colorimetric- Kinetic, SPINREACT, SA, Espagne) (fiche technique en annexe).

Principe : la créatinine présente au niveau de l'échantillon réagit par des picrates de sodium pour former un complexe rouge.

L'intervalle de temps choisi entre les deux dosages permet d'éviter les interférences qu'il pourrait y avoir avec les autres constituants de l'échantillon.

Le calcul de la concentration de l'échantillon en créatinine se fait par la formule suivante :

$$\frac{\Delta A \text{ Echantillon}}{\Delta A \text{ Standard}} \times C \text{ Standard} = C \text{ Echantillon (mg/dl)}$$

$\Delta A = A_2 - A_1$

Facteur de conversion : mg/dl x 88.4 = $\mu\text{mol/l}$

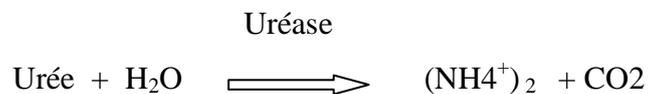
A : Absorbance à la longueur d'onde de 492 mn C : Concentration du standard = 2 mg/dl

VI.2.7. Dosage de l'urée plasmatique

Ce dosage est effectué à l'aide d'un kit de dosage commercial (Urea/Berthelot, SPINREACT, SA, Espagne) (fiche technique en annexe).

Principe : l'urée présente au niveau de l'échantillon est hydrolysée en ammoniaque (NH_4^+) et en CO_2 . Les ions NH_4 réagissent avec le salicylate et le NaCLO pour former de l'indophenol vert.

L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.



La concentration de l'urée est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{A \text{ Echantillon}}{A \text{ Standard}} \times C \text{ Standard} = C \text{ Echantillon (mg/dl)}$$

A : Absorbance à la longueur d'onde de 580 nm

C : Concentration du standard = 50 mg/dl

Facteur de conversion : mg/dl x 0.1665 = mmol/l

VI.3. Evaluation du statut immunitaire des veaux

Afin d'évaluer l'effet de la levure probiotique sur le statut immunitaire des veaux, des prélèvements de sang ont été réalisés sur 20 veaux choisis parmi les 36 faisant partie de



l'essai. La sélection des animaux s'est faite de façon aléatoire, et les prélèvements ont été effectués à deux moments de l'essai :

- J0 (début de la supplémentation) ;
- J60 (fin de la supplémentation).

De même que pour le dosage des paramètres métaboliques sanguins, les prélèvements de sang sont réalisés le matin avant la distribution de la ration. La prise de sang est effectuée au niveau de la veine jugulaire, et le sang est collecté dans des tubes EDTA. Les analyses sont faites immédiatement sur sang frais. Le statut immunitaire des veaux a été effectué au niveau du laboratoire d'immunologie de l'Hôpital MUSTAPHA PACHA.

VI.3.1. Mesure du taux d'hématocrite

Dans un tube capillaire rempli de sang centrifugé (15 000 t/minute pendant 5 minutes, micro-centrifugeuse à hématocrite–JOUAN), la hauteur de la colonne d'hématies et la hauteur totale du sang contenu dans le tube sont mesurées à l'aide d'une règle de lecture.

L'hématocrite correspond au rapport du volume des érythrocytes sur le volume sanguin total et s'exprime en %.

VI.3.2. Dosage de l'hémoglobine

L'hémoglobine est mesurée à l'aide d'un kit selon la méthode colorimétrique de DRABKIN (cyan méthémoglobine).

Le dosage quantitatif de l'hémoglobine (Hb) dans le sang total est effectué après une réaction de 3 minutes à température ambiante. La lecture se fait à l'aide d'un spectrophotomètre (LKB Novastec), à la longueur d'onde de 540nm.

Le taux d'Hémoglobine est calculé comme suit:

$$\text{Teneur d'hémoglobine (g/dl)} = \text{DO}_{540\text{nm}} \times 36,77$$

DO: Densité optique

VI.3.3. Numération des globules blancs

La méthode de comptage des globules blancs se fait à l'aide d'une pipette de dilution graduée pour leucocytes (pipette de THOMAS). Le sang est dilué au 1/20^{ème} avec du liquide de Türk. La lecture de la solution est réalisée en cellule de MALASSEZ. Le comptage se fait à l'aide d'un microscope optique (Bentley Observer 50) avec l'objectif 40, sur un nombre N de leucocytes dans 5 bandes horizontales.

Le nombre de leucocytes par mm³ de sang est calculé comme suit :

$$\text{Nombre de leucocytes /mm}^3 \text{ de sang} = N \times 2 \times 20 \text{ leucocytes /mm}^3$$

VI.3.4. Formule leucocytaire

Pour déterminer la formule leucocytaire, une coloration MGG (May-Grünewald Giemsa est effectuée. En pratique, les frottis réalisés sont fixés au méthanol pendant 5 min puis au May Grünewald pur pendant 3 min. Une quantité d'eau équivalente à celle du colorant utilisé est alors ajoutée.

Après 2 minutes d'attente, la lame est rincée avec de l'eau tamponnée. Du Giemsa dilué au 1/10^{ème} avec de l'eau physiologique (préparé extemporanément), est ajouté à raison de 3 ml pour chaque lame. Après un temps d'attente de 20min, la lame est rincée 2 à 3 fois à l'eau jusqu'à ce que la différenciation soit complète. Après séchage, les lames sont examinées au microscope (Bentley Observer 50) à l'objectif 100, avec utilisation de l'huile d'immersion. La zone du frottis où les leucocytes et les hématies sont répartis régulièrement et bien distincts, est recherchée. Le comptage se fait par rapport à 100 cellules leucocytaires à l'aide d'un leucodiff à 5 touches. Les résultats sont exprimés en % et en valeur absolue.

VII. METHODES STATISTIQUES

Les différents résultats sont décrits par la moyenne et l'erreur standard (SE) qui est calculée à partir de la déviation standard (SD) selon la formule : $SE = SD / n^{0,5}$ où n est la taille de l'effectif.

L'homogénéité de la variance entre traitements est vérifiée par le test de Bartlett, qui s'est avéré non significatif. Les résultats sont alors soumis à une analyse de variance à 3 facteurs (ANOVA 3), à savoir :

- ✓ L'aliment distribué (témoin ou supplémenté en levure) ;
- ✓ Le sexe de l'animal (mâles ou femelles) ;
- ✓ Le bâtiment.

L'ANOVA 3 ne montre pas d'effet significatif du facteur « bâtiment », quelque soit le paramètre considéré (voir tableau 08). De ce fait, les moyennes sont soumises à une analyse de variance à 2 facteurs (ANOVA 2) afin de déterminer l'effet de la supplémentation, et du sexe sur les paramètres mesurés. Les différences entre traitements sont comparées à l'aide du test PLSD Fischer. Le seuil de signification choisi est de 5% ($P < 0,05$).

Néanmoins, lorsque les valeurs de P sont inférieures à 0,15, les différences sont considérées comme une tendance statistique.

Toutes ces analyses statistiques sont réalisées à l'aide du programme Statview (Abacus Concepts, 1996, Inc., Berkeley, CA 94704-1014, USA)

Tableau 9 : Caractéristiques (moyennes \pm SE) des 2 lots expérimentaux au démarrage de l'essai (J_0 : début de la supplémentation)

Aliment	Témoin				Supplémenté			
	Mâles		Femelles		Mâles		Femelles	
	B1	B2	B1	B2	B1	B2	B1	B2
Effectif (n =)	4	5	4	5	4	5	4	5
Age (j)	155 \pm 25	145 \pm 21	167 \pm 37	161 \pm 15	135 \pm 26	142 \pm 12	165 \pm 29	159 \pm 15
Poids vif (kg)	146 \pm 10	147 \pm 9	148 \pm 24	148 \pm 5	143 \pm 18	143 \pm 11	147 \pm 25	147 \pm 11

Tableau 10 : Analyse de variance à 3 facteurs pour l'âge et le poids vif des animaux au démarrage de l'essai (J_0 : début de la supplémentation)

Effets	Aliment (F1)	Sexe (F2)	Bâtiment (F3)	F1*F2	F1*F3	F2*F3	F1*F2*F3
Age (j)	0,675	0,262	0,817	0,766	0,800	0,899	0,790
Poids vif (kg)	0,826	0,777	0,981	0,920	0,996	0,981	0,991

I. CARACTERISTIQUES INITIALES DES ANIMAUX EXPERIMENTAUX

Comme décrit dans le chapitre « matériels et méthodes » (voir page 33) deux lots expérimentaux homogènes pour les critères sexe, âge et poids, ont été constitués (n=18), puis répartis sur deux bâtiments. Un lot « témoin » (T) recevant une ration de base, et un lot « supplémenté en levure » (L) recevant le même aliment de base, supplémenté en levure *Saccharomyces cerevisiae* à raison de 10g/animal/jour, et cela durant 60j. Ces deux lots comportaient 9 mâles et 9 femelles chacun.

Au début de l'essai (J_0), les animaux (tout sexe confondu) avaient un âge moyen de 157 ± 25 j pour le lot T et de 150 ± 21 j pour le lot L, et un poids moyen de $147,2 \pm 8,2$ kg pour le lot T et de $144,9 \pm 10,5$ kg pour le lot L. Ces variations entre les deux groupes (n = 18) ne sont pas statistiquement différentes : $P > 0,05$. De même, les moyennes d'âge et de poids ne sont pas différentes entre les deux bâtiments (tableau 9)

Tableau 11: Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur le poids vif et le gain moyen quotidien des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyen)

Aliment	Témoïn		Supplémenté en levure		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Poids vif (kg)								
à J0	146,3	148,1	142,9	146,9	9,3	0,813	0,763	0,913
à J15	154,5	156,5	153,7	157,3	10,1	0,999	0,787	0,934
à J21	158,4	160,7	158,5	162,0	10,1	0,948	0,778	0,954
à J35	170,0	168,47	169,9	174,2	10,2	0,786	0,894	0,782
à J42	174,8	173,2	176,4	180,3	10,2	0,679	0,913	0,795
à J50	179,7	177,6	182,1	185,5	10,2	0,623	0,950	0,795
à J60	189,9	185,3	193,2	196,0	9,5	0,485	0,925	0,708
Gain moyen quotidien (kg/j)								
GMQ (j ₀ -j ₆₀)	0,73 ^b	0,62 ^c	0,84 ^a	0,82 ^a	0,0	<0,0001	0,0061	0,0484

II. EFFETS DE LA LEVURE SUR LA CROISSANCE DES VEAUX

Les poids vifs et gains moyens quotidiens des veaux complémentés ou non en levure probiotique, mesurés au cours de l'essai, sont présentés dans le tableau 10 et illustrés dans les figures 6 et 7.

L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs) ne révèle pas d'effet significatif de l'aliment, ou du sexe, sur les poids vifs des animaux, enregistrés au cours de la période de supplémentation (de J₀ à J₆₀).

En effet, les variations de poids vifs ne dépassent pas les 0,2% après 15 et 21j de supplémentation, et ce quelque soit le sexe. Au-delà (de J₃₅ à J₆₀), les poids vifs augmentent de 4,5% chez les femelles et 1% chez les mâles, nourris avec l'aliment complémenté en *Saccharomyces cerevisiae* (P>0,45).

Si l'on considère l'effet de la supplémentation en levure sur le gain moyen quotidien entre J₀ et J₆₀, l'analyse statistique montre un effet hautement significatif du régime (P < 0,0001) et du sexe (P<0,01) sur ce paramètre. L'interaction de ces deux facteurs est également significative (P < 0,05). Ainsi, l'apport de levure dans l'aliment améliore la croissance de 15% (P < 0,001) et de 32% (P < 0,0001), respectivement chez les mâles et les femelles, comparativement à leurs témoins. Notons que l'écart de GMQ entre mâles et femelles passe de 18% chez les témoins, à 2% chez les lots nourris avec l'aliment contenant la levure.

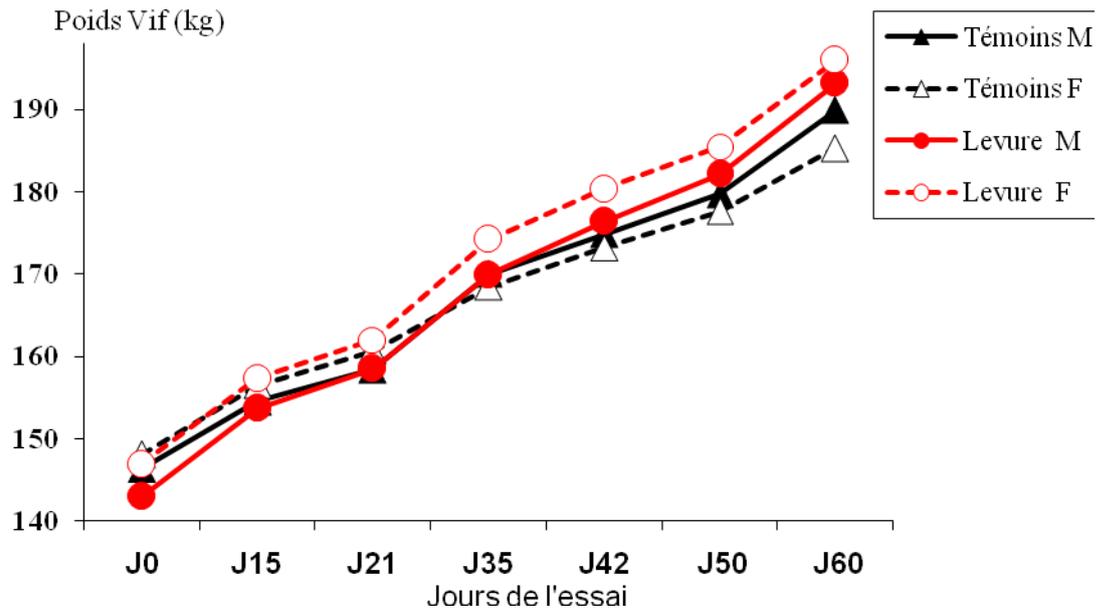


Figure 6 : Evolution du poids vif des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période d'essai (J₀-J₆₀)

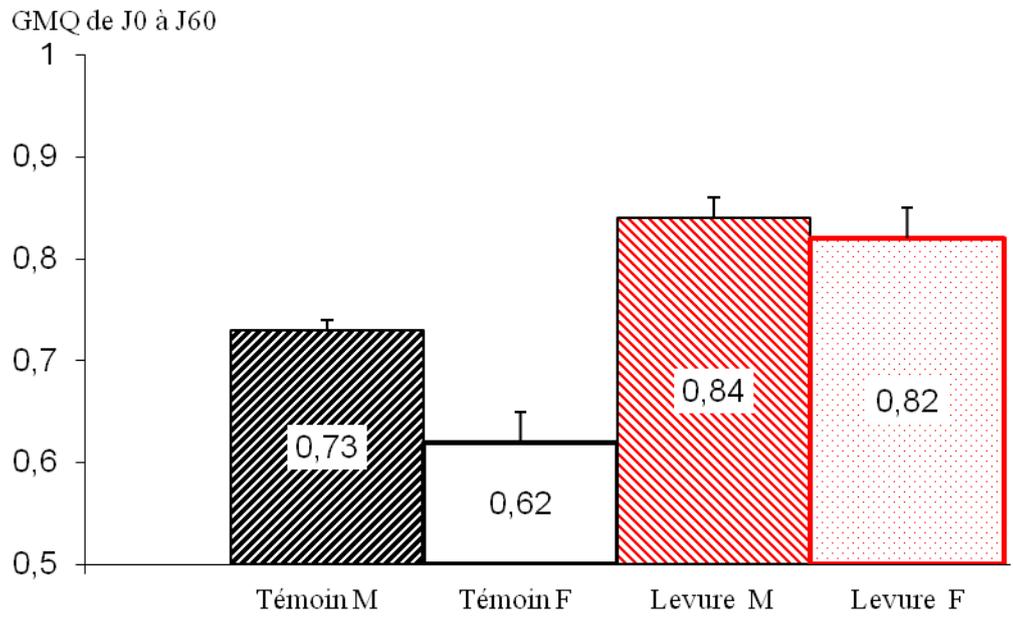


Figure 7 : Gain moyen quotidien des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période d'essai (J₀-J₆₀)

Tableau 12: Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la glycémie des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoïn		Supplémenté en levure		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Glycémie (g/l)								
à J0	0,752	0,743	0,705	0,742	0,023	0,323	0,568	0,336
à J30	0,758	0,722	0,739	0,737	0,020	0,937	0,366	0,424
à J60	0,370 ^b	0,397 ^{ab}	0,411 ^a	0,405 ^a	0,011	0,025	0,289	0,119

III. EFFETS DE LA LEVURE SUR LES PARAMETRES METABOLIQUES

III.1. Effets sur la glycémie

L'effet de la complémentation alimentaire en levure *Saccharomyces cerevisiae* sur les valeurs moyennes de glycémie des veaux est présenté dans le tableau 1 et la figure 8.

L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif du régime ou du sexe sur la glycémie des veaux, mesurée à J0 et à J30. En revanche, à J60, l'effet de l'aliment devient significatif ($P < 0,05$).

Ainsi, nous pouvons observer que les teneurs plasmatiques en glucose sont très proches pour l'ensemble des animaux à J0 et après un mois de supplémentation en levure ($0,74 \pm 0,02$). Par contre, à la fin de l'essai (J60), la glycémie des mâles du lot L est supérieure à celle des mâles du lot T (+ 11% ; $P < 0,01$) ; celle des femelles reste presque inchangée (+2% ; $P = 0,60$).

Soulignons qu'au sein du lot témoin, les mâles tendent à avoir une glycémie plus faible que celle des femelles (- 7% ; $P = 0,06$) alors que les animaux supplémentés en levure ont des glycémies comparables (écart non significatif de 1,5% entre mâles et femelles).

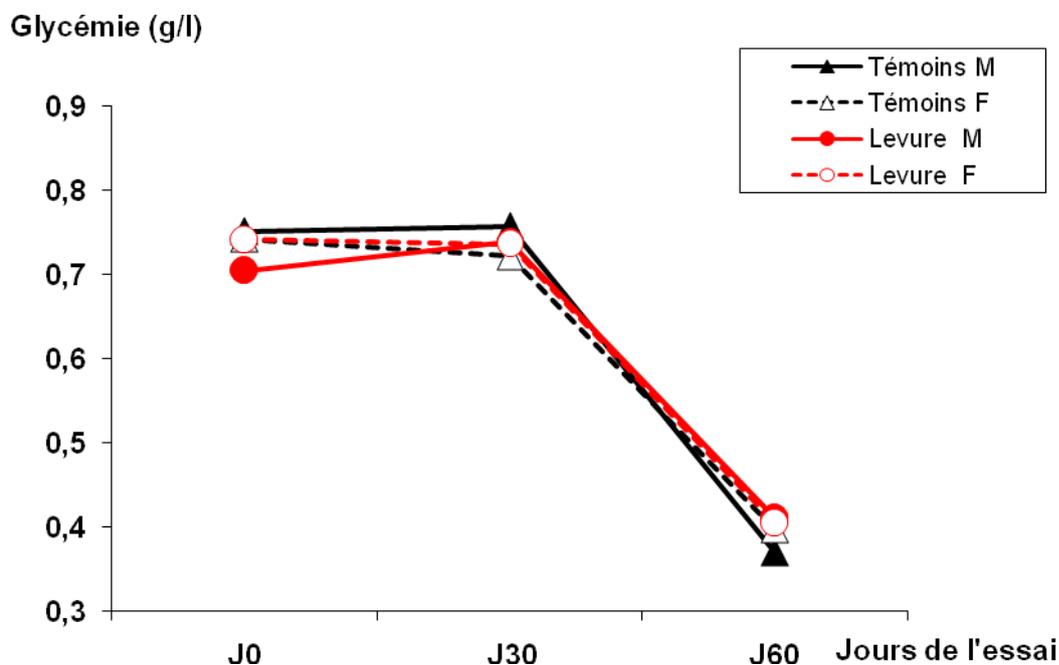


Figure 8 : Evolution de la glycémie (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période d'essai (J₀ - J₆₀)

Tableau 13: Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la cholestérolémie des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoin		Supplémenté en levure		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Cholestérol (g/l)								
à J0	0,682	0,661	0,653	0,63	0,020	0,1577	0,2924	0,9654
à J30	0,651	0,722	0,699	0,715	0,026	0,4496	0,1157	0,3033
à J60	0,487 ^b	0,518 ^{ab}	0,577 ^a	0,499 ^{ab}	0,025	0,2087	0,4063	0,0601

III.2. Effet sur le cholestérol

Les résultats relatifs à la cholestérolémie des veaux témoins et supplémentés en levure sont présentés dans le tableau 12 et la figure 9.

Aucun effet significatif de l'aliment ou du sexe, ni de l'interaction des deux, sur la teneur plasmatique en cholestérol n'est observé à J0, à J30 et à J60.

Nous pouvons remarquer qu'à j₀, les teneurs sériques du cholestérol des veaux témoins et supplémentés sont comparables : $0,66 \pm 0,02$

La cholestérolémie des mâles supplémentés en levure augmente de 7% ($P = 0,20$) par rapport aux témoins, après 30 jours de supplémentation, et de 18,5% ($P < 0,05$) à la fin de l'essai. Cette augmentation n'est pas retrouvée chez les femelles supplémentées en levure : écart moyen de - 2,5%, entre J30 et J60, par rapport aux témoins.

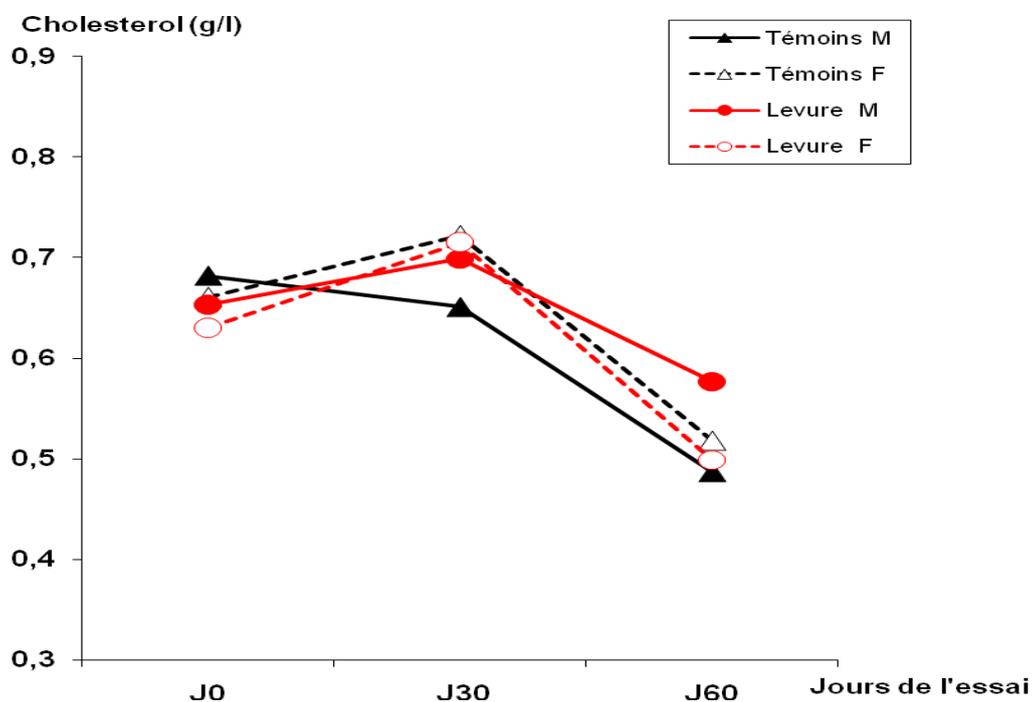


Figure 9 : Evolution de la cholestérolémie (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période d'essai (J₀-J₆₀).

Tableau 14 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur les teneurs plasmatiques en triglycérides des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoin		Supplémenté		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Triglycérides (g/l)								
à J0	0,178 ^c	0,235 ^a	0,213 ^{ab}	0,203 ^b	0,008	0,885	0,0065	0,0002
à J30	0,323	0,319	0,318	0,314	0,012	0,6653	0,7537	0,9909
à J60	0,254 ^b	0,273 ^{ab}	0,298 ^a	0,261 ^b	0,010	0,1209	0,408	0,0118

D'après nos résultats, les cholestérolémies enregistrées dans le lot témoin semblent plus faibles chez les mâles que chez les femelles (- 10% ; P = 0,07) à J30 et à J60 (- 6% ; P = 0,44). A l'inverse, dans le lot levure, l'écart de cholestérolémie entre mâles et femelles est faible à J30 (- 2% ; P = 0,69) et devient plus important à J60 (+ 16% ; P = 0,05).

III.3. Effets sur les triglycérides

Les concentrations plasmatiques en triglycérides (TG) mesurées chez les deux lots au cours de l'essai sont présentées dans le tableau 13 et la figure 10.

D'après l'analyse statistique, l'effet de l'aliment sur le taux plasmatique des triglycérides n'est pas significatif à J0 et à J30, mais tend à l'être à J60. Concernant le facteur sexe, son effet est significatif à J0 mais ne l'est plus à J30 et à J60.

Les valeurs initiales de TG des animaux du lot levure, sont significativement différentes (P < 0,01) de celles des témoins, aussi bien chez les mâles (+ 20% ;) que chez les femelles (- 14%). Après un mois de supplémentation en levure, ces écarts entre lots se réduisent (- 2% en moyenne ; P = 0,76). A la fin de l'essai, le taux plasmatique de TG est significativement plus élevé chez les mâles (+ 17% ; P < 0,01), mais pas chez les femelles (-4% ; P = 0,45).

Au sein du lot T, les valeurs plasmatiques de TG sont significativement plus faibles chez les femelles par rapport aux mâles au démarrage de l'essai. Cette différence n'est plus observée à J30 (+ 1% ; P = 0,83) et à J60 (- 7% ; P = 0,20).

Dans le lot L, les taux plasmatiques de TG sont comparables entre les mâles et les femelles à J0 et à J30 (écart non significatif de 3% ; P > 0,5). En revanche à J60, ces taux deviennent significativement plus importants chez les mâles par rapport aux femelles (+ 14% ; P < 0,05).

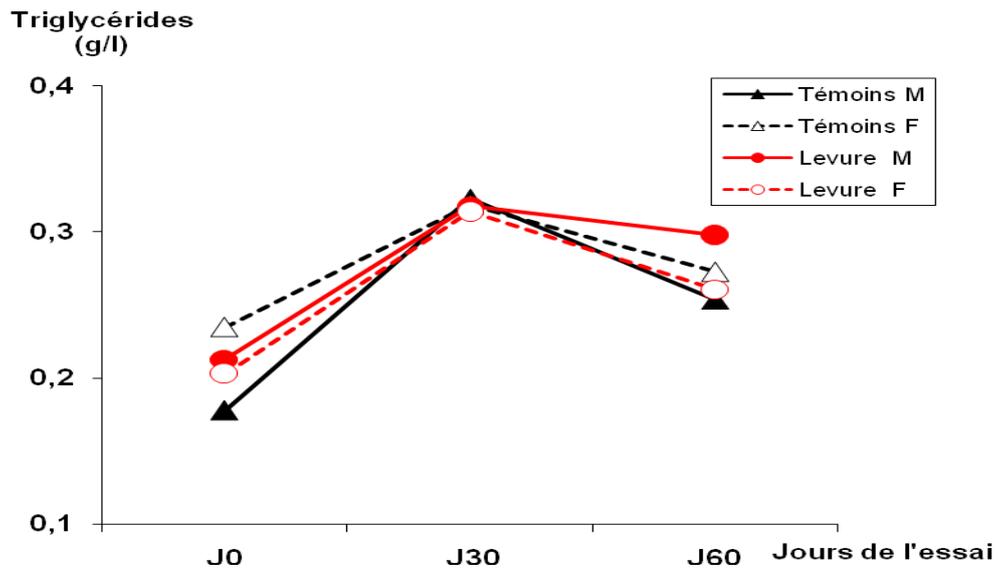


Figure 10 : Evolution des teneurs plasmatiques en triglycérides (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Tableau 15: Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur les teneurs plasmatiques en protéines totales des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoïn		Supplémenté		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Protéines totales (g/l)								
à J0	60,04	60,33	59,53	61,24	1,77	0,9106	0,5842	0,6956
à J30	64,54	69,25	65,29	66,76	1,84	0,648	0,11	0,3939
à J60	63,12	65,87	62,64	63,56	1,84	0,4579	0,3285	0,6246

III.4. Effets sur les protéines totales

Les concentrations plasmatiques de protéines totales (PT), mesurées en début (j₀), en milieu (j₃₀) et en fin (j₆₀) d'essai chez les veaux supplémentés, ou non en levure probiotiques, sont rapportées dans le tableau 14 et la figure 11.

L'ANOVA ne montre aucun effet significatif du régime ou du sexe sur ce paramètre, quelque soit le moment où le dosage est effectué. En effet, au démarrage de la supplémentation, les valeurs plasmatiques de PT sont quasi-identiques chez tous les animaux ($60,38 \pm 1,77$). Les écarts observés après 30 et 60 jours de supplémentation en levure ne sont pas significatifs, quelque soit le sexe (différence moyenne de 2%).

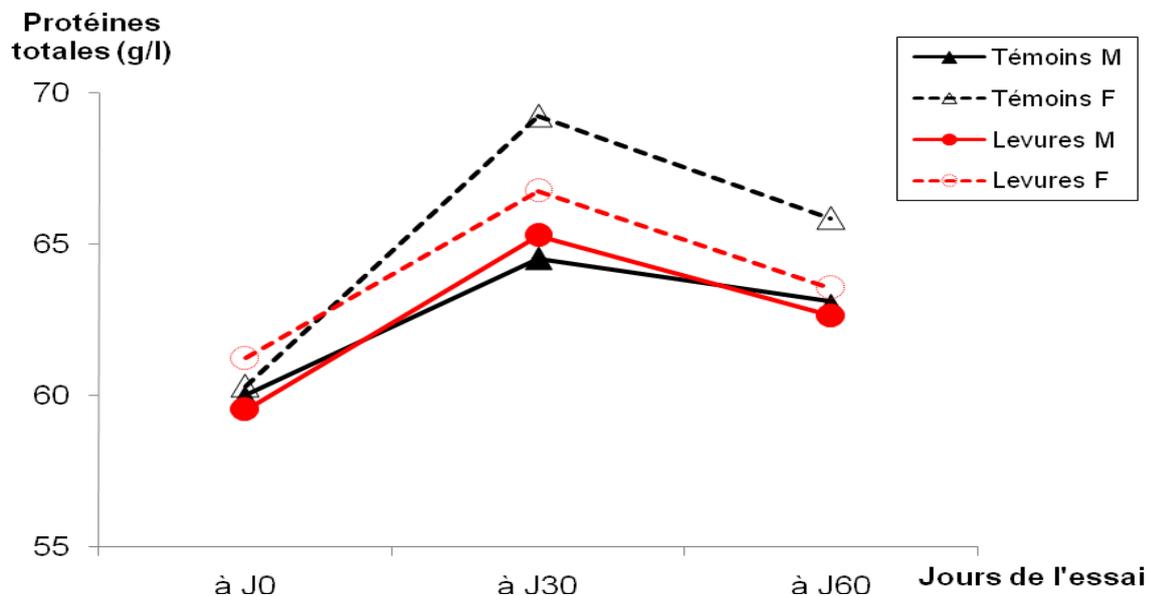


Figure 11 : Evolution des teneurs plasmatiques en protéines totales (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Tableau 16: Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur l'urémie des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoïn		Supplémenté		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Urémie (mg/dl)								
à J0	0,200	0,203	0,194	0,206	0,206	0,835	0,3621	0,5524
à J30	0,190 ^{ab}	0,204 ^a	0,192 ^{ab}	0,177 ^b	0,177	0,108	0,9395	0,0632
à J60	0,142 ^a	0,13 ^b	0,139 ^{ab}	0,138 ^{ab}	0,138	0,484	0,1171	0,1246

III.5. Effets sur l'urémie

Les résultats concernant les teneurs plasmatiques de l'urée des veaux supplémentés, ou non en levure probiotique sont présentés dans le tableau 15 et la figure 12.

Aucun effet significatif de la levure ou du sexe sur les valeurs sanguines de l'urée n'est mis en évidence par l'analyse ANOVA. Notons cependant des tendances à la signification pour le facteur aliment à J30, et pour le facteur sexe à J60.

Au démarrage de l'essai (J₀), les valeurs d'urémie sont comparables entre les lots T et L (0,20 ± 0,01). Par la suite, l'apport de levure durant 30 jours n'a pas modifié ce paramètre chez les mâles (0,191 ± 0,006 en moyenne), mais l'a significativement réduit chez les femelles (-13% ; P < 0,05). Cette diminution d'urémie n'est plus observée à la fin de l'essai (écart non significatif de 6% par rapport aux femelles témoins ; - 2% pour les mâles).

Concernant les écarts d'urémie entre sexe au sein des deux lots, nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différences significatives à J0 et à J30. Par contre à la fin de l'essai, nous notons un écart significatif de l'urémie entre les femelles et les mâles témoins (+ 9% ; P < 0,05) ; cette différence n'est pas observée dans le lot supplémenté en levure.

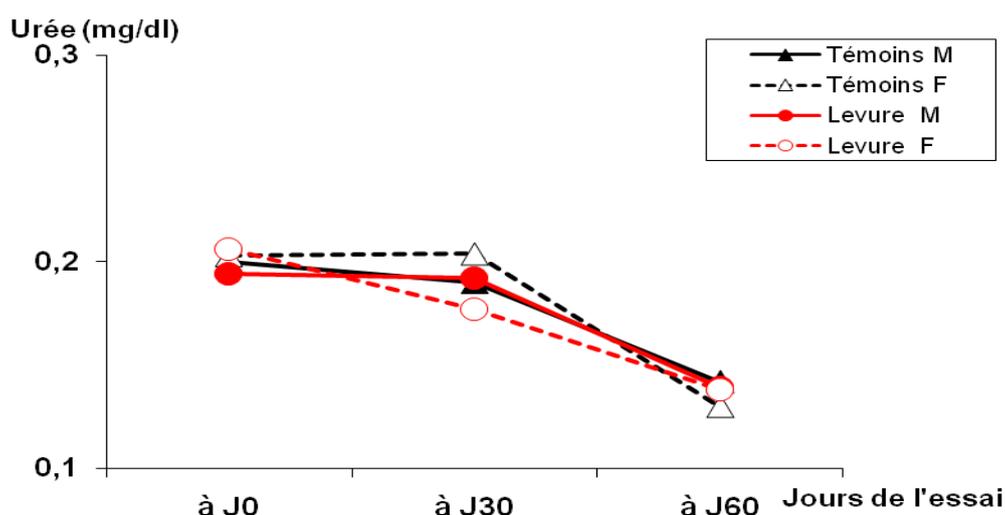


Figure 12 : Evolution de l'urémie (mg/dl) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Tableau 17 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la créatinémie des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 9 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoin		Supplémenté		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Créatinémie (mg/dl)								
à J0	7,715	7,77	7,383	7,028	0,362	0,1587	0,6884	0,5854
à J30	11,545 ^c	13,498 ^a	12,072 ^{bc}	12,714 ^{ab}	0,402	0,7523	0,003	0,1147
à J60	7,859 ^b	8,447 ^b	10,703 ^a	7,945 ^b	0,389	0,0053	0,0092	0,0002

III .6. Effets sur la créatinémie

Les valeurs relatives à la créatinémie des veaux témoins et supplémentés en levure probiotique sont présentées dans le tableau 16 et la figure 13.

L'analyse de variance ne révèle pas d'effet significatif de l'aliment ou du sexe sur le taux plasmatique de la créatinine au démarrage de l'essai. A J30, seul le facteur sexe à un effet significatif, alors qu'à J60 nous notons un effet significatif des deux facteurs sur ce paramètre.

Ainsi, à J0, les taux plasmatiques de créatinine sont en moyenne de $7,47 \pm 0,36$ mg/dl entre les différents lots. Ces taux ne sont pas significativement modifiés après 30 jours de supplémentation en levure. En revanche, ils sont significativement augmentés chez les mâles à la fin de l'essai (+36% par rapport aux mâles témoins ; $P < 0,0001$). Cette augmentation n'est pas enregistrée chez les femelles (-6% par rapport aux femelles témoins ; $P = 0,37$).

En comparant les réponses des mâles et femelles au sein de chaque lot, nous pouvons constater qu'à J30, l'écart significatif de la créatinémie entre les mâles et femelles témoins (-14% ; $P < 0,01$) n'est pas observé au sein du groupe supplémenté (variation non significative de 5%). A l'inverse, à J60, les mâles supplémentés en levure présentent des teneurs plasmatiques en créatinine significativement plus élevées que celles des femelles du même lot (+35% ; $P < 0,0001$) alors qu'aucune variation significative n'est notée entre les mâles et les femelles témoins (différence de 7% ; $P = 0,30$).

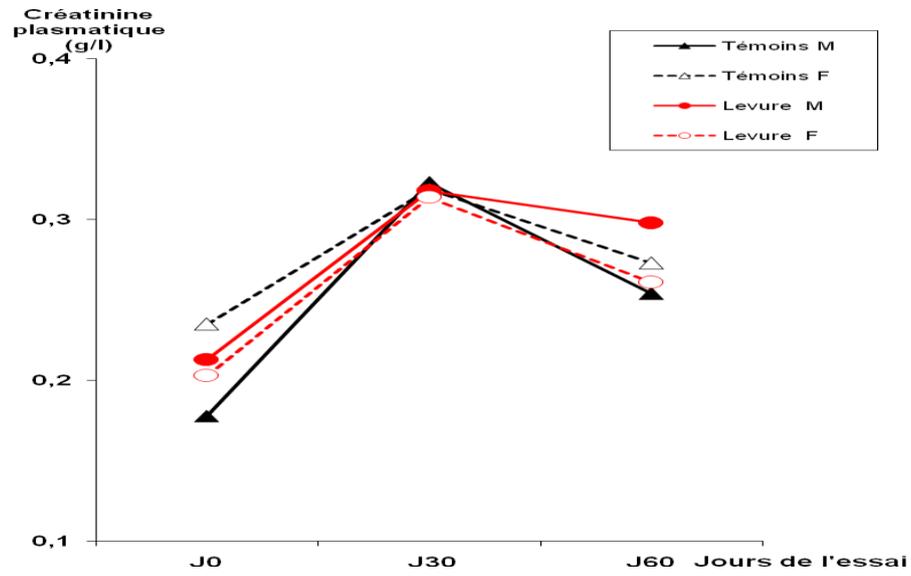


Figure 13 : Evolution de la créatinémie (mg/dl) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* durant la période de l'essai (J₀-J₆₀).

Tableau 18 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la teneur en globules blancs des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 5 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment	Témoin		Supplémenté		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Globules blancs (10 ³ /mm ³)								
à J0	7,98	7,33	8,08	7,14	0,39	0,917	0,065	0,728
à J60	7,66	9,60	8,51	8,07	0,52	0,548	0,189	0,046
Lymphocyte(%)								
à J0	57,60	54,68	61,28	57,38	2,28	0,211	0,183	0,844
à J60	55,12	59,39	60,00	60,50	9,23	0,233	0,339	0,447
Monocytes (%)								
à J0	16,12	16,15	15,30	16,78	0,81	0,912	0,385	0,404
à J60	16,22	15,95	15,90	16,17	0,97	0,966	0,997	0,801
Neutrophiles (%)								
à J0	25,88	28,66	25,42	26,54	1,81	0,489	0,300	0,655
à J60	30,30	24,79	24,50	23,25	2,07	0,114	0,143	0,347

IV. EFFETS DE LA LEVURE SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

IV.1. Effets sur les globules blancs

Les résultats relatifs à la teneur du sang en globules blancs (GB) mesurés chez les veaux témoins et supplémentés en levure, sont présentés dans le tableau 17 et la figure 14.

D'après l'analyse statistique, l'effet de l'aliment sur la teneur du sang en globules blancs n'est pas significatif ni à J_0 ni à J_{60} . En ce qui concerne le facteur sexe, son effet sur ce paramètre tend à être significatif au démarrage de l'essai ($P = 0,07$) mais cette tendance disparaît à J_{60} . Une interaction significative des deux facteurs est également observée à J_{60} ($P = 0,046$).

Ainsi, nous pouvons remarquer qu'à J_0 , les teneurs sanguines en globules blancs des lots expérimentaux ne sont pas statistiquement différents : écart de 1% en moyenne entre les lots T et L ($P > 0,75$). Après deux mois de supplémentation en levure, cet écart entre lots s'accroît. Ainsi chez les mâles supplémentés, les teneurs sanguines en GB semblent supérieures à celles des mâles témoins (+11% ; $P = 0,29$), alors que chez les femelles supplémentées, celles-ci tendent à être plus faibles par rapport aux témoins (-16% ; $P = 0,07$).

Si l'on compare les valeurs mesurées de GB chez les mâles et les femelles au sein de chaque lot, nous pouvons constater, qu'à J_0 , les mâles présentent des teneurs supérieures en GB comparativement à celles des femelles : +13% dans le lot L ($P = 0,12$) et +9% dans le lot T ($P = 0,27$). A l'inverse, à J_{60} les mâles supplémentés en levure ont des valeurs comparables à celles des femelles, alors que les mâles témoins présentent des teneurs en GB significativement plus faibles que celles des femelles (-20% ; $P < 0,05$).

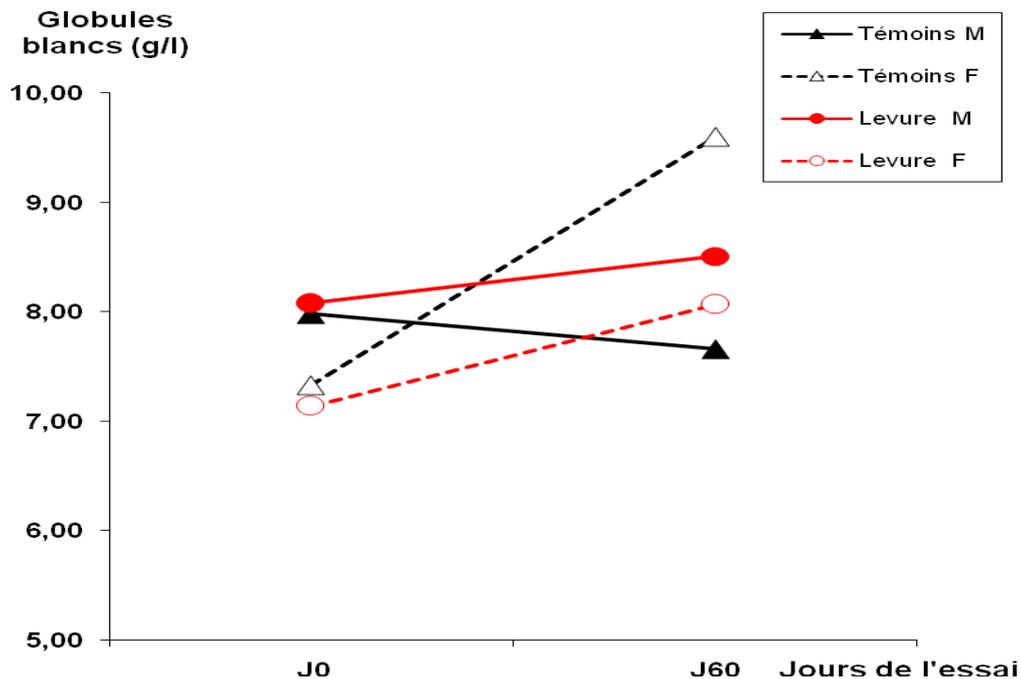


Figure 14 : Evolution des teneurs sanguines en globules blancs (g/l) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

IV.2.Effets sur les lymphocytes

L'effet de la complémentation alimentaire en levure *Saccharomyces cerevisiae*, sur la teneur sanguine en lymphocytes est présenté dans le tableau 17 et la figure 15.

Aucun effet significatif du régime ou du sexe, et aucune interaction des deux n'est observé, sur le pourcentage de lymphocytes sanguins, ni au début ni à la fin de l'essai.

En effet, à J₀ des écarts non significatifs sont relevés entre les différents lots (variation moyenne de 5,5%). Après deux mois de supplémentation en levure, la teneur sanguine en lymphocytes chez les mâles tend à être plus élevée que celle mesurée chez les mâles témoin (+9% ; P = 0,17). Cette tendance n'est pas retrouvée chez les femelles supplémentées comparées aux femelles témoins (+2% ; P = 0,75).

Par ailleurs, notons que, dans le groupe témoin, l'écart entre le pourcentage de lymphocytes sanguins des mâles et celui des femelles est de 5% ($P = 0,41$) à J_0 et de -7% ($P = 0,23$) à J_{60} . En revanche, dans le groupe supplémenté en levure, la faible variation observée à J_0 en faveur des mâles (+7% ; $P = 0,28$) disparaît à J_{60} (écart de 1% entre mâles et femelles ; $P = 0,89$).

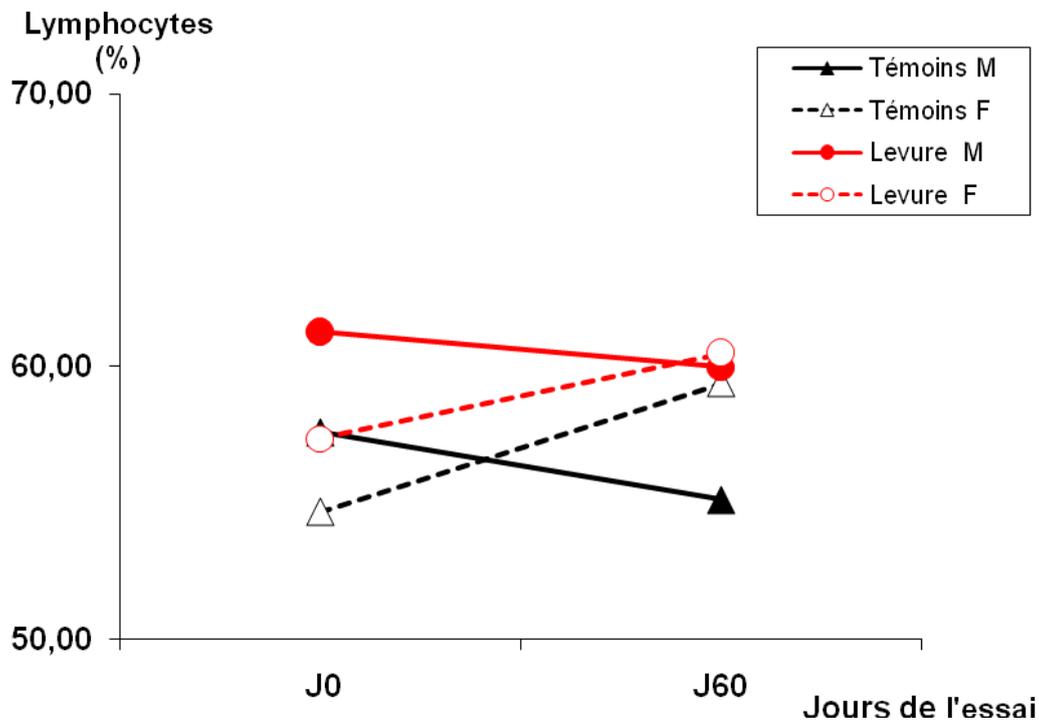


Figure 15 : Evolution des teneurs sanguines en lymphocytes (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J_0) et la fin de l'essai (J_{60})

IV.3. Effet sur les monocytes

Les valeurs relatives à la teneur du sang en monocytes, suite à la supplémentation alimentaire en levure sont présentées dans le tableau 17 et la figure 16.

L'analyse de variance ne révèle aucun effet significatif de l'aliment ou du sexe sur le pourcentage de monocytes sanguins.

En effet, au démarrage de l'essai, les valeurs des monocytes sanguins sont quasi-identiques chez tous les animaux (en moyenne $16,09 \pm 0,81\%$). Après 60 jours de supplémentation en levure, les écarts observés ne sont pas significatifs, et ce quelque soit le sexe ou l'aliment.

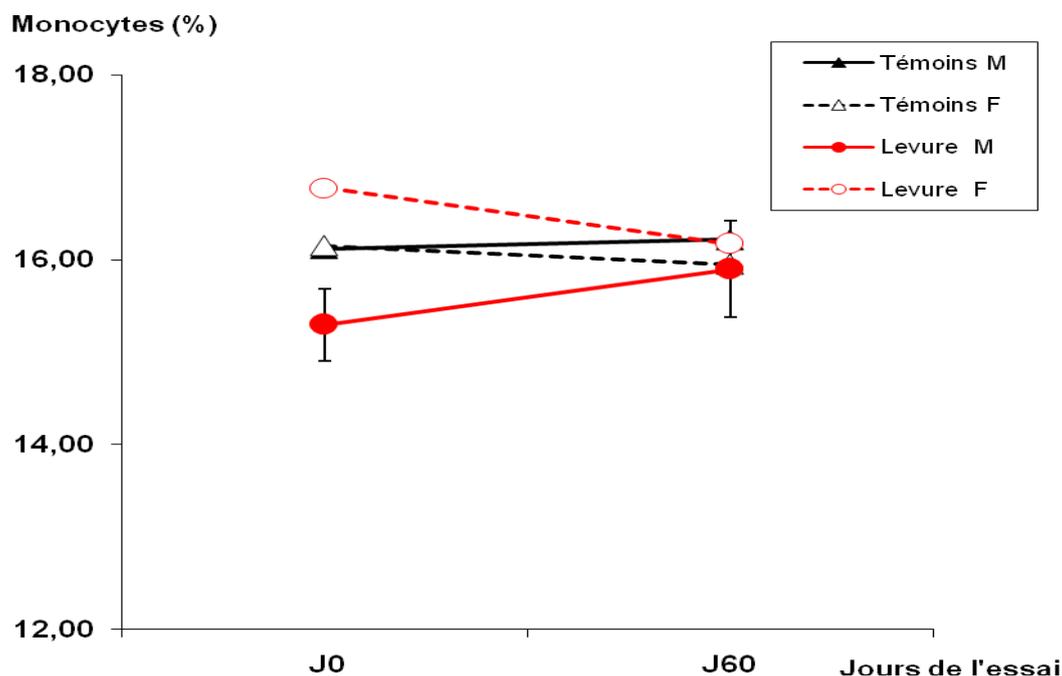


Figure 16 : Evolution des teneurs sanguines en monocytes (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

IV.4. Effets sur les neutrophiles

Les pourcentages de neutrophiles sanguins, mesurés chez les animaux des deux lots au cours de l'essai sont présentées dans le tableau 17 et la figure 17.

L'ANOVA ne montre pas d'effet significatif du régime ou du sexe sur le pourcentage de neutrophiles des veaux, mesurés à J₀. En revanche à J₆₀, l'effet de l'aliment tend à être significatif (P = 0,11) ; il en est de même pour l'effet sur sexe (P = 0,14).

Les valeurs initiales des neutrophiles sanguins ne sont pas significativement différentes entre les lots L et T, aussi bien chez les veaux mâles (-2% ; P = 0,86), que chez les femelles (-7% ; P = 0,42).

A J₆₀, l'apport de levure tend à réduire le pourcentage de neutrophiles chez les mâles (-19% ; P = 0,09) alors qu'il ne modifie pas celui des femelles (-6% par rapport aux témoins ; P = 0,62).

Au démarrage de l'essai, au sein de chaque groupe expérimental, les mâles et femelles ont des teneurs en neutrophiles comparables (écart non significatif de 7% en moyenne). A la fin de l'essai, aucun écart significatif n'est observé entre les deux sexes dans le groupe supplémenté en levure, alors que chez les témoins, les mâles présentent des pourcentages en neutrophiles légèrement supérieures à ceux des femelles (+22% ; P = 0,09).

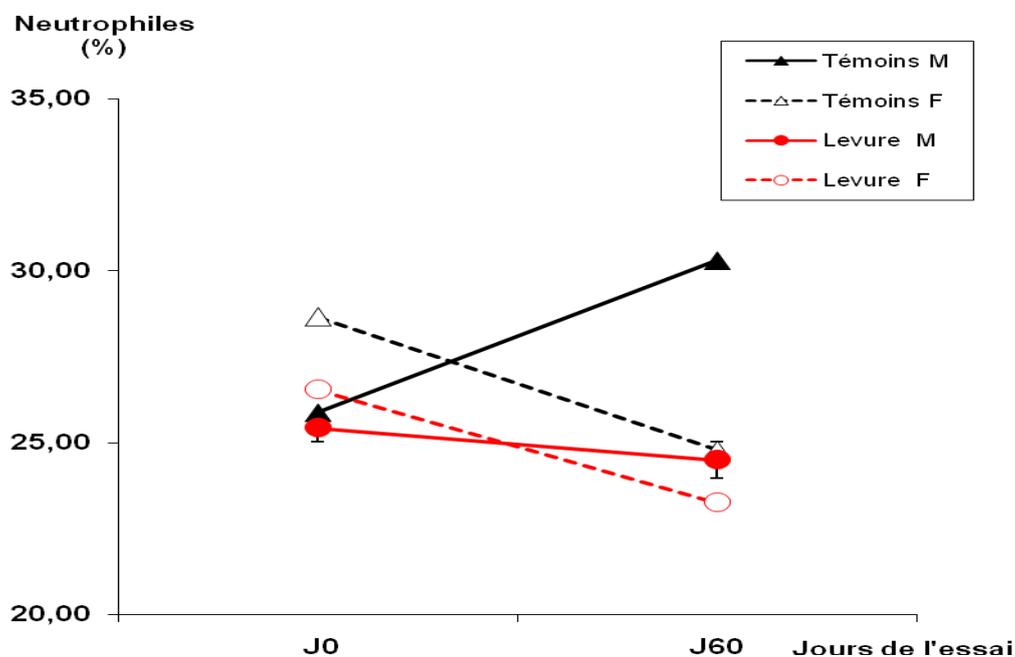


Figure 17 : Evolution des teneurs sanguines en neutrophiles (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

Tableau 19 : Effet de la supplémentation alimentaire en levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae* sur la teneur en globules rouges des veaux mâles et femelles (moyennes ; n= 5 ; SEM : erreur standard moyenne)

Aliment Sexe	Témoin		Supplémenté		SEM	ANOVA 2		
	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles		Aliment	Sexe	Interaction
Globules rouges (10 ⁶ /mm ³)								
à J0	4,03	3,93	3,92	4,05	0,22	0,990	0,941	0,610
à J60	4,38	4,00	4,25	4,07	0,19	0,904	0,167	0,611
Hémoglobine (g/l)								
à J0	10,32	9,88	9,74	10,38	0,40	0,929	0,817	0,208
à J60	10,72	11,58	10,97	9,91	0,56	0,233	0,861	0,112
Hématocrite (%)								
à J0	21,75	23,49	21,17	23,32	0,66	0,631	0,022	0,797
à J60	22,12	25,68	23,74	22,44	0,75	0,356	0,203	0,114

IV.5. Effets sur les globules rouges

Les résultats relatifs au taux de globules rouges (GR) des veaux témoins et supplémentés en levure sont présentés dans le tableau 18 et illustrés par la figure 18.

L'analyse statistique ne révèle aucun effet significatif de l'aliment sur la teneur sanguine en globules rouges à J₀ et à J₆₀. De même, il n'y a pas d'effet significatif du facteur sexe au démarrage de l'essai, alors qu'une légère tendance statistique est notée à J₆₀ (P = 0,17).

Ainsi, nous pouvons constater qu'au début de l'essai, les teneurs du sang en globules rouges des veaux témoins et supplémentés en levure sont comparables ($3,98 \pm 0,22$ g/dl). Après deux mois de supplémentation, les différences observées ne sont pas significatives, et les taux sanguins de globules rouges restent très proches ($4,18 \pm 0,19$ g/dl).

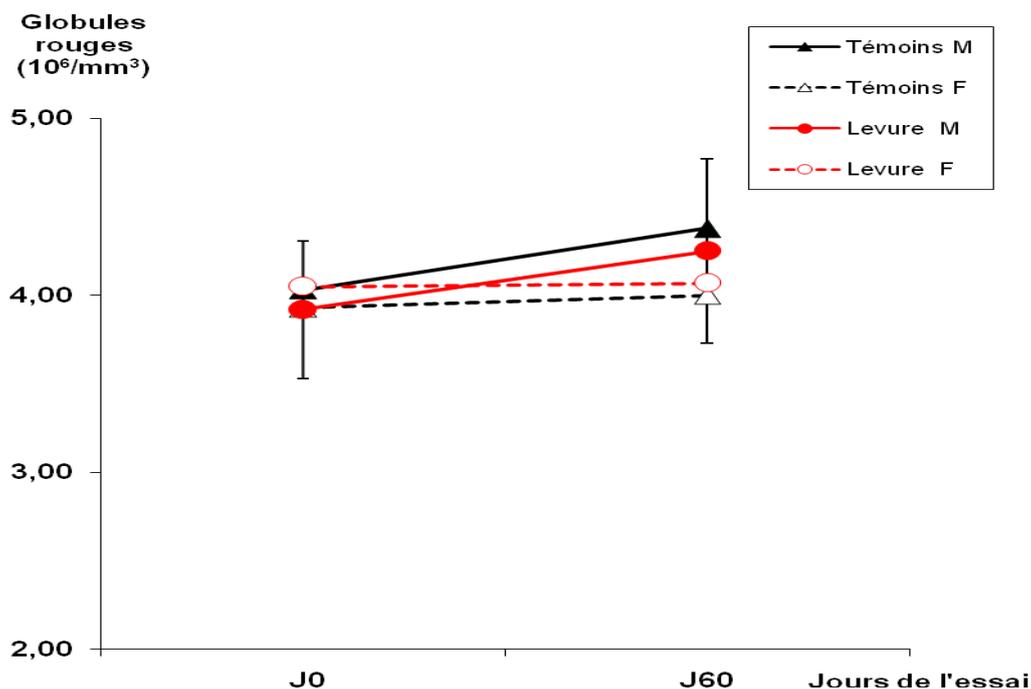


Figure 18 : Evolution des teneurs sanguines en globules rouges ($10^6/\text{mm}^3$) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

IV.6. Effets sur l'hémoglobine

Le tableau 18 et la figure 19 présentent les résultats concernant l'effet de la supplémentation alimentaire en *Saccharomyces cerevisiae* sur l'hémoglobininémie des veaux.

L'analyse de variance ne montre aucun effet significatif de l'aliment ou du sexe sur la teneur sanguine en hémoglobine, que ce soit à J₀ ou à J₆₀. En effet, les valeurs d'hémoglobininémie sont statistiquement comparables quelque soit le sexe ou le régime (en moyenne 10,08 ± 0,40 g/dl). A J₆₀, l'apport de levure tend à réduire le taux d'hémoglobine chez les femelles (-14% ; P = 0,06) mais pas chez les mâles (-3% ; P = 0,65).

Quelque soit l'aliment distribué, les écarts observés entre les teneurs d'hémoglobine chez les mâles et les femelles ne sont pas statistiquement significatifs : +11% et -7%, respectivement chez les mâles supplémentés et chez les mâles témoins, par rapport aux femelles du même lot.

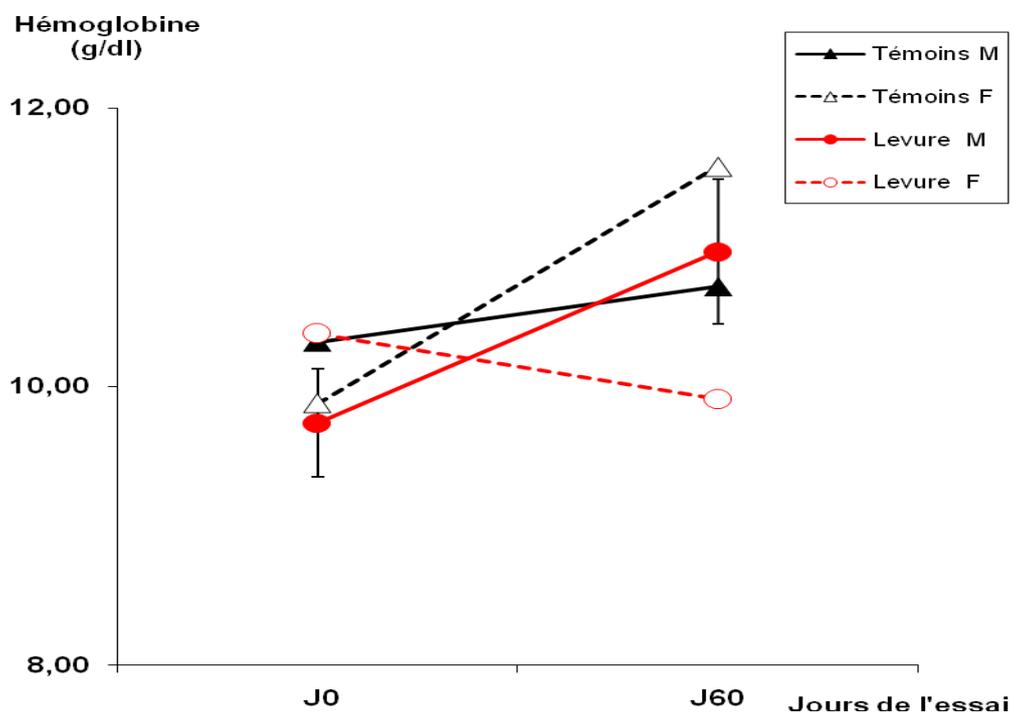


Figure 19 : Evolution de l'hémoglobininémie (g/dl) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀)

IV.7. Effets sur l'hématocrite

Les valeurs d'hématocrite mesurées en début et en fin d'essai chez les veaux témoins et supplémentés en levure probiotique sont présentées dans le tableau 18 et la figure 20.

L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif de l'aliment sur ce paramètre ni en début, ni en fin d'essai. L'effet du facteur sexe se révèle significatif à J0 ($P < 0,05$) mais pas à J60.

Par ailleurs, nos données montrent, qu'en début de supplémentation, les valeurs initiales d'hématocrite sont quasi-identiques entre les animaux des lots T et L, quelque soit le sexe (écart non significatif de 1,7% en moyenne). A la fin de l'essai, l'apport de levure n'a pas significativement augmenté l'hématocrite chez les mâles (+7% ; $P = 0,20$), alors qu'il l'a significativement réduite chez les femelles supplémentées (-13% ; $P < 0,05$). Si l'on compare les valeurs d'hématocrite entre mâles et femelles, il apparaît que ces dernières présentent des teneurs initiales supérieures à celles des mâles (+8% en moyenne) aussi bien dans le lot témoin ($P = 0,12$) que dans le lot levure ($P = 0,06$). A la fin de l'expérimentation, les teneurs d'hématocrite des mâles et des femelles supplémentés en levure deviennent comparables (écart non significatif de 6% ; $P = 0,30$), alors que dans le lot témoin, les femelles ont des valeurs d'hématocrite significativement supérieures à celles des mâles du même lot (-14% ; $P < 0,01$).

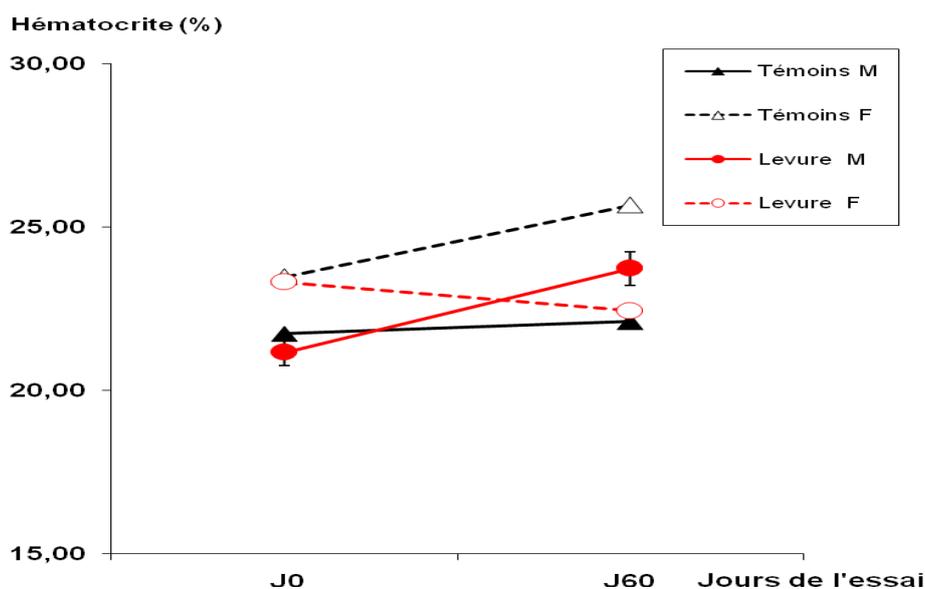


Figure 20 : Evolution de l'hématocrite (%) des veaux témoins et supplémentés en levure *Saccharomyces cerevisiae* au démarrage (J₀) et la fin de l'essai (J₆₀).



Notre expérimentation a évalué l'intérêt de l'utilisation de la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae*, sur les performances de croissance et l'état sanitaire des veaux élevés dans nos conditions locales.

Supplémentation en levure chez le veau :

Modalités du plan expérimental

La levure utilisée dans cet essai est un probiotique autorisé par la DSV (Directions des Services Vétérinaires, Algérie). Il s'agit d'un concentré de levure sèche, active, spécifiquement développée pour la nutrition des ruminants et correspondant à la souche *Saccharomyces cerevisiae* CNCM 1-1077 de l'institut Pasteur de Paris (France).

La dose utilisée (10g/animal/jour) est celle recommandée par le fabricant. Elle à été distribuée quotidiennement, par « top-feeding » pour garantir la prise complète de la dose, et ce pendant 60 jours. Cette durée s'inscrit dans la moyenne des périodes déjà testées par d'autres auteurs (Cole *et al.* 1992 ; Kaldmae *et al.* 2007 ; Pinos-Rodriguez *et al.* 2007 ; Magalhaes *et al.* 2008 ; Hucko *et al.* 2009). Des périodes plus courtes : 42j (Lesmeister *et al.* 2004) ou plus longues : 84j (Di Francia *et al.* 1997 ; Galvao *et al.* 2005 ; Quigley *et al.* 1992), 112j (Laborde, 2008) ou 294j (Titi *et al.* 1998) ont été également expérimentées (voir tableau 3 page 21).

Dans cet essai, la taille des lots expérimentaux était de 18 animaux, avec un sexe ratio identique (9 mâles et 9 femelles par groupe) et des âges et poids vifs initiaux comparables (± 44 j et 146 ± 27 kg respectivement). La taille de l'effectif a été imposée par le nombre de box individuels disponibles au sein de la ferme expérimentale de l'TELV. Ainsi, sur les 65 veaux mis à notre disposition, nous avons d'emblée écarté ceux dont les âges dépassaient les 255 jours au début de l'essai, ceux ayant un état sanitaire insatisfaisant et ceux de race locale, en minorité numérique.

Les études disponibles portant sur les veaux ne sont pas très nombreuses, et les critères d'inclusion (âge, poids et taille de l'effectif) sont variables. C'est ainsi que l'on retrouve des



essais portant sur des veaux nouveaux nés [2 ± 1 j d'âge (Seymour *et al.* 1995 ; Lesmeister *et al.* 2004 ; Magalhães *et al.* 2008) ; de 3 à 5j d'âge (Quigley *et al.* 1992 ; Galvão *et al.* 2005 ; Kaldmäe *et al.* 2007 ; Pinos-Rodríguez 2008)], de jeunes veaux de 12 semaines (Quigley *et al.* 1992)], mais aussi des bovins à l'engrais (LAN , 2003).

En ce qui concerne la taille des effectifs, là encore les données disponibles sont variables. En effet, certains ont utilisé des effectifs très importants [512 veaux (Magalhães *et al.* 2008), 255 (LAN, 2003)] alors que pour la plupart, le nombre d'animaux allait de 20 à 80, avec une moyenne de 40 têtes. De ce fait, l'effectif utilisé dans la présente étude (36 animaux) s'inscrit dans la moyenne retrouvée dans la littérature.

Supplémentation en levure chez le veau :

Pas d'effet sur l'ingéré

L'impact de la supplémentation en levure sur la quantité de matière sèche ingérée est variable selon les études. Dans nos conditions expérimentales, les modalités de distribution du fourrage (voir matériels et méthodes page 43) ne nous ont pas permis de chiffrer avec précision, la quantité de matière sèche réellement ingérée, par chaque animal. Cependant, tout au long de la période d'essai, la totalité de l'aliment présenté aux animaux était consommée. La consommation était au départ de 5kg/j (quantité permettant théoriquement de couvrir les besoins des animaux), mais vers la fin de notre expérimentation, elle a été augmentée à environ 6kg/j, et ce pour les deux lots expérimentaux (absence de refus). Ceci nous laisse supposer que l'incorporation de la levure à la ration des veaux pendant deux mois, n'a pas modifié la quantité de matière sèche ingérée.

Des résultats similaires ont été rapportés chez des veaux, supplémentés pour une même durée par Kaldmae *et al* (2007) ; Magalhaes *et al* (2008) ; Hucko *et al* (2009). Il en est de même pour Quigley *et al* (1992) et Laborde (2008) qui ne rapportent aucune augmentation de la matière sèche ingérée avec des périodes de supplémentation en levure plus prolongées : 84j et 112j respectivement. Seymour *et al* (1995) observent même une baisse de l'ingéré des veaux non sevrés, supplémentés en levure de bière durant 90 jours.



A l'inverse, d'autres études signalent une augmentation de la matière sèche ingérée induite par l'apport alimentaire de levure. Ainsi, Pinos-Rodriguez *et al* (2007) rapportent une augmentation significative ($P < 0,05$) de la consommation de matière sèche de veaux âgés de 3 jours, supplémentés en levure CNCM I-1077 (SC) jusqu'à l'âge de 60j.

Cette augmentation est également retrouvée dans d'autres essais : Cole *et al* (1992), Di Francia *et al* (1997) et Titi *et al* (2008) après 57j, 84j et 294j de supplémentation respectivement.

Ces différences de réponse à l'utilisation des probiotiques seraient liées à la variabilité des types et doses de levures utilisées (Lesmeister *et al* 2004 ; Galvao *et al* 2005), à la composition des rations distribuées (Wagner *et al* 1990) et aux animaux testés (race, âges) (Seymour *et al* 1995)

Supplémentation en levure chez le veau :

Effets positif sur la croissance

Dans notre essai, la complémentation en levure a permis d'améliorer la croissance des veaux et ce quelque soit le sexe. En effet, des augmentations significatives de près de 24% ($P < 0,01\%$) ont été enregistrées au niveau des gains moyens quotidiens (GMQ) des animaux après deux mois de supplémentation. Notons que cette augmentation est plus prononcée chez les femelles supplémentées (+32%, $P < 0,0001$) par rapport aux mâles du même lot (+15%, $P < 0,001$). A la fin de l'essai, les poids vifs des veaux recevant la levure étaient légèrement supérieurs à ceux des témoins, particulièrement chez les femelles : +6% contre +2% chez les mâles ($P > 0,05$).

Cette amélioration de la croissance est supérieure à celle retrouvée dans d'autres études (LAN, 2003) : +7 à 10% de gain de poids (g/j) pour des durées de supplémentation allant de 54j à 90j ; +16% après 150j de supplémentation chez des bovins Charolais. A l'inverse, aucun effet améliorateur de la croissance n'est induit par l'addition de levure durant des périodes comparables (de 42 à 60j) dans les essais de Quigley *et al* (1992) ; Kaldmae *et al* (2007) ; Pinos-Rodriguez *et al* (2007) ; Magalahas *et al* (2008) et Hucko *et al* (2009). De la même manière, Titi *et al* (2008) ne rapportent pas d'augmentation significative



de la croissance des veaux après 294j de supplémentation en *Saccharomyces cerevisiae*. La réponse des veaux, à une supplémentation alimentaire en levure semble varier avec la composition de la ration (Wagner *et al* 1990), le taux d'incorporation de la levure (Lesmeister *et al* 2004), ainsi que la souche de levure et la méthode de supplémentation (Galvao *et al* 2005).

Dans nos conditions, l'augmentation du GMQ est deux fois plus importante chez les femelles que chez les mâles. A notre connaissance, cet effet sexe-dépendant de la levure sur la croissance n'a pas été précédemment mentionné dans la littérature. En effet, dans toutes les études disponibles portant sur l'impact de la levure sur la croissance, les résultats obtenus ne discriminent pas la réponse des mâles de celle des femelles (Laborde 2008 ; Pinos-Rodriguez *et al* 2007 ; Galvao 2005 ; Leismeister 2004)

Nos résultats montrent que l'addition de levure a permis d'améliorer significativement la croissance des veaux, sans modifier leur ingéré. Ceci reflète une meilleure valorisation de la ration permise par le probiotique, comme l'indique la littérature (Chaucheyras-Durand *et al* 2006). Selon ces auteurs, les levures permettent une optimisation du fonctionnement du rumen grâce à l'interaction avec la flore microbienne.

Supplémentation en levure chez le veau :

Effets sur les paramètres biochimiques

Dans notre essai, nous avons exploré l'impact de la supplémentation alimentaire en *Saccharomyces cerevisiae* sur quelques paramètres biochimiques du sang reflétant le statut nutritionnel des animaux.

Les valeurs usuelles des différents paramètres biochimiques sanguins varient d'un auteur à l'autre (Tasker 1978 ; Vagneur 1992 ; Varriale 1999 ; Cuvelier *et al.* 2005 ; Plet 2007). Le plus souvent, ces valeurs sont connues pour les animaux adultes, et de rares données concernant les jeunes sont disponibles (Doornenbal *et al.* 1988 ; Jain 1993 ; Smith 1996 ; Navetat *et al.* 2007). Pour interpréter nos résultats, les valeurs retenues comme références sont celles présentées dans le tableau ci-dessous.



Tableau 20 : Valeurs usuelles de quelques paramètres biochimiques du veau
(Synthèse de plusieurs auteurs)

Teneurs plasmatiques (g/l)	Intervalle des valeurs usuelles ¹
Glucose	0,55-0,95
Protéines totales	60-76
Urée	0,1-0,25
Créatinine	0,012- 0,019

¹ Valeurs usuelles pour des animaux de même tranche d'âge

Dans notre essai, les valeurs de glycémie mesurées à l'état initial sont comparables entre les deux lots ($0,74 \pm 0,02$ g/l) et ce quelque soit le sexe considéré. Elles se retrouvent en majorité dans les plages de valeurs normales de glycémies des veaux rapportées dans la littérature (0,55 à 0,95g/l, Navetat *et al.* 2007). Après un mois de supplémentation en levure, les teneurs plasmatiques en glucose restent quasi-inchangées. En revanche, à la fin de l'essai, les glycémies baissent pour l'ensemble des lots : $0,41 \pm 0,01$ g/l en moyenne pour le lot supplémenté et $0,38 \pm 0,01$ g/l en moyenne pour le lot témoin. Cette baisse de glycémie pourrait être liée à la chaleur ambiante enregistrée en fin d'essai (température ambiante moyenne de 30°C au mois de juillet 2009).

Si l'on considère les glycémies enregistrées après deux mois de supplémentation en levure, il apparait que cette dernière augmente significativement les taux circulants de glucose surtout chez les mâles (+ 11%, $P < 0,01$). Klips *et al.* (2005) rapportent aussi une élévation significative de la glycémie des veaux suite à l'addition de *S. cerevisiae*, concomitante à celle de la consommation alimentaire. Des résultats similaires sont également rapportés chez la vache supplémentée en levure par plusieurs auteurs : Piva *et al.* (1993) : +6% ($P < 0,18$) ; Nocek et Kautz (2006) : +15% ($P < 0,05$) ; Boudjenah (2008) : +9% ($P < 0,19$).

Par contre dans d'autres essais menés chez le veau (Quigley *et al.* 1992 ; Magalhaes *et al.* 2008) ou la vache laitière (Putnam *et al.* 1997), aucune modification de la glycémie n'est relevée lors d'ajout de levure dans l'aliment. La glycémie serait même réduite (-39%), mais de manière non significative chez le bélier fistulé (Galip *et al.* 2006).



La disparité de ces résultats pourrait s'expliquer par la nature de la ration distribuée, la durée de la supplémentation en levure et peut être, l'orientation métabolique différente selon les productions (viande, lait) (Boudjenah 2008).

Dans nos conditions expérimentales, les teneurs plasmatiques de cholestérol mesurées chez les veaux mâles supplémentés sont significativement augmentées à la fin de l'essai. Cette augmentation n'est pas observée chez les femelles du même lot.

Le peu d'études disponibles, menées chez la vache laitière (Piva *et al.* 1993; Boudjenah., 2008) ou chez le bélier (Galip *et al.* 2006) n'indiquent pas de variations notables de la cholestérolémie après complémentation en levure probiotique.

Par ailleurs, nous constatons une augmentation significative des valeurs plasmatiques de triglycérides induite par l'apport de levure pendant deux mois chez les mâles. Aucune étude à notre connaissance, n'a évalué l'impact de la supplémentation en levure sur les TG plasmatiques chez le veau. En revanche, les rares études existantes mentionnent plutôt une réduction significative de ce paramètre métabolique chez la vache en péripartum (Boudjenah, 2008) et chez le bélier (Galip *et al.* 2006) Les mécanismes impliqués dans ces variations demeurent inconnus.

L'absence de données chez le veau ne nous a pas permis de comparer les teneurs plasmatiques en cholestérol et en triglycérides, enregistrées au démarrage de notre essai (J_0), avec celles usuellement retrouvées chez le veau. Il semble cependant, que les valeurs du cholestérol soient légèrement inférieures à celles enregistrées chez vaches laitières (0,8-2,0 g/l) alors que les triglycérides se retrouvent dans les plages de valeurs décrites, toujours chez la vache (0,08-0,23 g/l) (Plet 2007).

Dans la présente étude, l'incorporation de la levure à la ration des veaux n'a pas fait varier les teneurs plasmatiques en protéines totales ou en urée mesurées à la fin de l'essai. De même, Quigley *et al.* (1992) ne rapportent aucun effet de la culture de levure sur l'urémie des veaux lorsqu'elle est mesurée immédiatement avant, ou 4H après le repas, ainsi que Lesmeister *et al.* (2004) concernant la protéinémie des veaux supplémentés. En revanche, une augmentation



des protéines totales plasmatiques et de l'urémie sont induites par la supplémentation alimentaire en *S.cerevisiae* chez la vache laitière (Abo *et al.* 1998 ; Iwanska *et al.* 1999 ; Boudjenah 2008) et chez le bélier (Galip *et al.* 2006). Notons qu'au démarrage de l'essai (J₀), les teneurs plasmatiques en protéines totales (60g/l ±1) et en urée (0,19g/l ±0,01) étaient très proches des valeurs de références du veau (cf tableau 20).

Par ailleurs, nous constatons, dans nos conditions, une augmentation significative de la créatinémie après 60j d'apport de levure chez les veaux mâles (+36%, P<0,001). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Galip *et al.* (2006).

Il a été trouvé que les levures probiotiques stimulent chez la vache l'activité microbienne et augmentent l'utilisation de l'azote par la flore ruminale (Wallace, 1991). La concentration d'urée dans le sang est intimement associée à l'efficacité avec laquelle la protéine alimentaire est utilisée. Roseler *et al.* (1993) suggèrent que les teneurs plasmatiques en azote uréique seraient un indicateur de la dégradabilité des protéines dans le rumen et de l'apport protéique post-ruminal. Dans notre essai, l'efficacité de l'utilisation de l'azote alimentaire chez les veaux n'est pas modifiée par l'apport de levure. Aucune hypothèse ne peut être avancée pour expliquer ce résultat en raison de l'absence de données bibliographiques chez le veau.

Supplémentation en levure chez le veau :

Effets sur les paramètres hématologiques

Comme pour les paramètres biochimiques, les données concernant les paramètres hématologiques chez le veau sont peu nombreuses, et différent d'un auteur à l'autre (Jain, 1986 ; Jain., 1993 ; Radostits, 2007). De manière générale, les paramètres hématologiques physiologiques d'un bovin doivent toujours être interprétés avec précaution. En effet, ils sont facilement influencés par des critères d'ordre physiologique ou liés à la technique de laboratoire. Ainsi, l'activité musculaire, l'alimentation et l'abreuvement, la gestation et la parturition, l'altitude et l'âge de l'animal prélevé sont autant de facteurs influençant l'hémogramme des bovins (Jain 1986 ; Poirecuite 1979). Les valeurs retenues dans notre essai comme valeurs de références, sont présentées dans le tableau 21.



Tableau 21: Valeurs usuelles de quelques paramètres hématologiques du veau
(Synthèse de plusieurs auteurs)

Paramètre étudié	Intervalle des valeurs usuelles ¹
Globules rouges ($10^6/\text{mm}^3$)	8,5-10,5
Hémoglobines (g/dl)	9,7-12,7
Hématocrites (%)	32,1- 35
Globules blancs ($10^3/\text{mm}^3$)	6-12
Lymphocytes (%)	45-75
Monocytes (%)	4-9
Neutrophiles (%)	15-45

¹ Valeurs usuelles pour des animaux de même tranche d'âge

Dans la présente étude, la supplémentation alimentaire en levure n'a pas modifié les paramètres hématologiques des veaux mâles supplémentés, en termes de taux de globules rouges, d'hémoglobine ou d'hématocrite. Ces deux derniers paramètres diminuent en revanche chez la femelle. Les deux seules études disponibles, à notre connaissance, ne mentionnent pas de variations significatives de l'hématocrite ou de l'hémoglobine chez le veau (Lesmeister *et al* 2004) ou chez le bélier (Galip *et al* 2006) supplémentés en levure. Néanmoins chez ce dernier, l'hémoglobinémie semble être plus faibles par rapport aux témoins (Galip *et al* 2006).

Concernant les teneurs plasmatiques en globules blancs, aucune variation significative n'a été enregistrée chez les veaux supplémentés, mis à part une légère diminution des lymphocytes chez les femelles (- 16%, P=0,07) et des neutrophiles chez les mâles (-19%, P=0,09). De la même manière, Galip *et al* (2004) indiquent l'absence d'effets significatifs de la supplémentation en levure sur le nombre de globules blancs (leucocytes, neutrophiles, lymphocytes).



Notre essai a permis de préciser, dans nos conditions locales, l'intérêt de l'incorporation de la levure probiotique *Sacchromyces cerevisiae* dans l'aliment du veau, en vue d'optimiser sa croissance et son état sanitaire.

La supplémentation alimentaire en levure, durant deux mois, n'a pas modifié la quantité de matière sèche ingérée mais a significativement amélioré la croissance des veaux, traduisant ainsi une meilleure efficacité de transformation de l'aliment, induite par la levure. Notons, que dans nos conditions, l'amélioration de la croissance induite par la levure est moins marquée chez les mâles par rapport aux femelles.

En parallèle, chez les veaux mâles, l'apport de levure a induit des variations du profil métabolique, caractérisées par une augmentation significative des teneurs plasmatiques en glucose, cholestérol, triglycérides et créatinine, sans toutefois modifier les paramètres hématologiques (globules blancs, globules rouges). Ces résultats ne sont pas retrouvés chez les femelles supplémentées, chez lesquelles seule une baisse notable de l'hématocrite et de l'hémoglobine est enregistrée.

Au vu de nos données, l'usage de la levure semble intéressant dans nos conditions d'élevage. Néanmoins, la confirmation de ces résultats nécessite la réalisation d'essais ultérieurs sur des animaux plus jeunes ($3 \pm 1j$), en plus grand nombre (au-delà de 60 sujets) et avec des rations de composition différente. D'autres essais devraient également tester différentes doses de levure à incorporer. Enfin, l'effet sexe-dépendant de la levure sur la croissance et les paramètres sanguins (métaboliques et hématologiques) observé dans notre essai, mérite d'être approfondi.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Agarwal N., Kamra D.N., Chaudhary L.C., Agarwal I., Sahoo A., Pathak N.N (2002) Microbial status and rumen microbial enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 329–336.

Ait Belgnaoui A (2006) Influence d'un traitement probiotique (*Lactobacillus farciminis*) sur les altérations de la sensibilité viscérale liées au stress: rôle de la barrière épithéliale colique. Thèse de Docteur de l'École Nationale Polytechnique De Toulouse.

Auclair E (2001) Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. In: Bruau J (Ed). *Feed manufacturing in the mediteranean region. Improving Safety: from Feed to Food.* CIHEAM-IAMZ: 45-53.

B

Beauchemin KA., Yang WZ., Morgavi DP., Ghorbani GR., Kautz W., Leedle JA (2003) Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 81:1628-1640.

Bernardeau M., Vernoux J.P (2009) Utilisation des probiotiques en alimentation porcine et avicole. Mémoire de la faculté de Caen, Basse-Normandie.

Besong S., Jackson J.A., Hicks C.L., Hemken R.W (1996) Effects of a supplemental yeast product on feed intake, ruminal profiles, and yield composition, an organoleptics composition of milk from lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 79:1654-1668.

Bizot M (1955) Phénomènes d'antagonisme entre divers micro-organismes: levures et bactéries. *La Presse Médicale*, 63 :1251-1252.

Bontempo V., Di Giancamillo A., Savoini G., Dell'orto V., Domeneghini C (2006) Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. *Animal Feed and Science Technology*, 129: 224-236.

Boudjenah A (2008) Effet d'une supplémentation de l'aliment en levure *Saccharomyces cerevisiae* sur les paramètres zootechniques de la vache laitière en peripartum. Mémoire de Magistère en Sciences vétérinaires – Option « Zootechnie », Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, 161pages.

Brossard L., Martin C., Chaucheyras- Durand F., Michalet- Doreau B (2004) Effect of feed additive Levucell® SC (*Saccharomyces cerevisiae* I-1077) on the ruminal pH in latent acidotic sheep : role of experimental design. *Rencontres Recherches Ruminants*, 11: 342.

Brossard L., Chaucheyras-Durand F., Michalet-Doreau B., Martin C (2006) Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Animal Science*, 82:829-836.

Buts J.P., Bernasconi P., Van Craynest M.P., Maldague P. and De Meyer, R (1986). Response of human and rats small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatric Research*, 20(2): 192-196.

Buts J.P., Bernasconi P., Valrman J.P., Dive C (1990). Stimulation of secretory IgA and secretor component of immunoglobulins in small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. *Dig. Dis. Sci.*, 35: 251-256.



Buts J.P., De Keyser N., De Raedemaker L (1994) *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*, 36: 522-527.

Buts J.P (1999) *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *GUT* 45:89-96.

Buts JP (2009) Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Digestive Diseases Sciences*, 54: 15-18.

C

Callaway E.S., Martin S.A (1997) Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science*, 80: 2035-2044.

Castagliuolo I., Lacant T., Nikulassan S.T., Pothoulakis C (1996). *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat Ileum. *Infection and Immunity* 64(2): 5225-5232.

Chaucheyras-Durand F., Fonty G (2001) Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development*, 41: 57-68.

Chaucheyras-Durand F et Durand H (2008) Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial microbes*, 1: 3-9.

Chaucheyras-Durand F., Walker N.D., Bach A (2008) Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 5-26.

Chiquette J (2009a) The role of probiotics in promoting dairy production. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 21: 143-157.

Chiquette J (2009b) Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Animal Feed Science and Technology*, 153:278-291.

Chiquette J (2009c) Utilisation des probiotiques en production bovine. *Agri Réseau. Bovins de boucherie. Agriculture et Agroalimentaire Canada*.

Cole N.A., Purdy C.W., Hutcheson P.D (1992) Influence of yeast culture on feeder calves and lambs. *Journal of Animal Science*, 70: 1682-1690.

Cuvelier C., Cabaraux J.F., Dufasne I., Istasse L., Hornick J.L (2005) Transport sanguin et métabolisme hépatique des acides gras chez le ruminant. *Annales de Médecine Vétérinaire*.149, 117-131.

Czerucka D., Rampal P (2002) Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infect* 4: 733-739.

D

Dann HM., Drackley JK., McCoy GC., Hutjens MF., Garrett JE (2000) Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 83(1):123-7.

Daudelin J.F (2009) Détermination des effets de l'administration de probiotiques sur l'attachement d'*Escherichia coli* entérotoxigène F4 et l'expression de cytokines chez le



porcelet sevré. Mémoire de maîtrise ès Sciences de la Faculté de médecine vétérinaire de Montréal.

Dawson K.A (2000) Some milestones in our understanding of yeast culture supplementaion in ruminants and their implications in animal production system. Biotechnology in the feed industry. Ed. T.P. Lyons. And K. A. Jacques. Nottingham University Press, Nottingham 473-486.

Denev S.A., Peeva Tz., Radulova P., Stancheva N., Staykova G., Beev G., Todorova P., Tchobanova S (2007) Yeast culture in ruminant nutrition. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13: 357-374.

Desnoyers M., Giger-reverdin S., Bertin G., Duvaux-Ponter C., Sauvart D (2008) Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters of ruminants. Journal of Dairy Science, 92 :1620-1632.

Dickinson J.R., Schweizer M (2004) The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. CRC press, second edition. 439 pages.

Di Francia A., Masucci F., De Rosa G., Varricchio M.L., Proto V (2007) Effects of *Aspergillus oryzae* extract and a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. Animal Feed Science and Technology, 140:67-77.

Doornenbal H., Tong A.K.W., Murray N.L. (1988) Reference values of blood parameters in beef cattle of different ages and stages of lactation. Canadian Journal Of Veterinary Research, 52:99-105.

Doreau M., Jouany J P (1998). Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, 81: 3214-3221.

Ducluzeau R., Bensaada M (1982). Effets comparés de l'administration unique ou en continu de *Saccharomyces boulardii* sur l'établissement de diverses souches de *Candida* dans le tractus digestif de souris gnotoxeniques. Annales de. Microbiologie133B: 491-501.

Durant-Chaucheyras F., Fonty G., Bertin G., Théveniot M., Gouet P (1998). Fate of Levucell® SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. Reproduction Nutrition Development, 38: 275-280.

E

Erasmus L.J., BOTHA P.M., KISTNER A (1992) Effect of Yeast Culture Supplement on Production, Rumen Fermentation, and Duodenal Nitrogen Flow in Dairy Cows. Journal of Dairy Science, 75 :3056-3065.

Erasmus L.J., Robinson P.H., Ahmadi A., Hinders R., Garrett J.E (2005) Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. Animal Feed Science and Technology, 122: 219–239.

F

Farineau F.K (2001) Rapport de la consultation mixte FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries lactiques vivantes. Cordoba, Argentine, 1-4 octobre 2001.

Fiems L.O., Cottyn B.G., Dussert L., Vanacker J.M (1993) Effect of viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. Reproduction Nutrition Development, 33:43-49.



G

Galip N. (2006) Effect of supplemental yeast culture on ruminal protozoa and blood parameters in rams. *Revue de médecine vétérinaire*, 157, 11: 519-524.

Galvao K.N., Santos J.E.P., Coscioni A., Villasenor M., Sisco W.M., Berge A.C.B (2005) effect of feeding live yeast product to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction Nutrition Development*, 45:427-440.

Giger-Reverdin S., Bezault N., Sauvant D., and G. Bertin (1996). Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. *Animal Feed and Science Technology*. 63:149–162.

Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert, FHoheisel, J.D., Jacq C., Johnston, M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 563 - 567.

H

Holder V. (2007) The effects of specific *Saccharomyces cerevisiae* strains and monensin supplementation on rumen fermentation in vitro. Master of agricultural science. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Pretoria.

Hucko B., Bampidis V.A., Kodes A., Christodoulou V., Mudrik Z., Polakova K., Plachy V (2009) Rumen fermentation characteristics in pre-weaning calves receiving yeast culture supplements. *Journal of Animal Science*, 10 :435-442.

J

Jahn H.U., Zeitz, M (1991) Immunmodulatorische Wirkung von *Saccharomyces boulardii* beim Menschen. In: Seifert, J., Ottenjann, R., Zeitz, M., Bockemühl, J. (Hrsg.): *Ökosystem Darm III*, Springer-Verlag, 159-164.

Jahn H.J., Ullrich R., Schneider T., Liehr R.M., Schieferdecker H.L., Holst H., Zeitz M (1996) Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* 57:95 -104.

Jain N.C (1986) *Schalm's Veterinary Hematology*. 4th edition. Philadelphia, Lea et Febiger, 1221p.

Jain N.C (1993) *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia. Lea and Febiger, 417pages.

Jouany J P (2006). Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science* 96(3-4):250-264.

K

Kaldmäe H., Suurmets H., Järveots T., Suuroja T., Kärt O (2007) Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development and growth in calves. Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences of Estonian University of Life Sciences.

Kawas J R., García-Castillo R., Garza-Cazares F., Fimbres-Durazo H., Olivares-Sáenz E., Hernández-Vidal G., Lu C.D (2007) Effects of sodium bicarbonate and yeast on productive



performance and carcass characteristics of light-weight lambs fed finishing diets. *Small Ruminant Research*, 67: 157–163.

Khan M.A., Lee H.J., Lee W.S., Kim H.S., Park S.B., Baek K.S., Ha J.K., Choi Y.J (2008) Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminal parameters, rumen development, nutrient digestibilities and nitrogen utilization in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 91: 1140–1149.

Kung L., Kreck E.M., Tung R.S., Hession A.O., Sheperd A.C., Cohen M.A., Swain H.E., & Leedle J.A.Z (1997): effet of a leave yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80: 2045-2051.

Kim H.S., Ahn B.S., Chung S.G., Moon Y.H., Ha J.K., Seo I.J., Ahn B.H., Lee S.S (2006) Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. *Animal Feed Science and Technology*, 126: 23–29.

Kinal S., Korniewicz A., Rzasa A., Korniewicz D., Bialon K., Lubojemska B (2007) Effetc of *Saccharomyces cerevisiae* yeast metabolites on colostrums quality and passive immunity transfer in calves. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 51: 105-108.

Krammer M., Karbach U (1993) Antidiarrheal action of the yeast *Saccharomyces boulardii* in the rat small and large intestine by stimulating chloride absorption. *Z. Gastroenterol*, 4:73-77.

ℒ

Laborde J.M (2008) Effects of probiotics and yeast culture on rumen development and growth of dairy calves. A thesis submitted for the degree of Master of Science in the Interdepartmental program in Animal and Dairy Sciences. Graduate faculty of the Louisiana State university.

Lessard M., Dupuis M., Gagnon N., Nadeau E., Matte J.J., Goulet J., Fairbrother J.M., Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge, *Journal of Animal Science* (2009) 87:922-934.

Lesmeister K.E., Henrich A.J., Gabler M.T (2004) Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics and blood parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 87: 1832–1839.

Lila Z A., Mohammed N., Yasui T., Kurokawa Y., Kansa S., Itabashi H (2004) Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal micro-organism fermentation in vitro. *Journal of animal science*. 82:1847-1854.

ℳ

Machado Caetano J.A (1986) Immunopharmacological effect of *Saccharomyces boulardii* in healthy human volunteers. *International Journal of Immunopharmacology*, 8: 245-259.

Magalhaes V.J.A ., Susca F., Lima F.S., Branco A.F., Yoon I., Santos J.E.P(2008) Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 91:1497-1509.

Mahender M., Prasad V.L.K., Reddy G.V.N (2005) Effect of yeast culture based complete feed diets on the performance of lactating Murrah buffaloes. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 22:173–176.



Marden J.P., Julien C., Monteils V., Auclair E., Moncoulon R., Bayourthe C (2008) How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 3528-3535.

Massias B (2008) Développement et mise au point d'outils moléculaires pour l'identification des flores complexes bactériennes : application à l'étude des flores digestives des galliformes. Thèse de doctorat de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement. Agro Paris Tech, 148 pages.

Mathieu et al (1996) Mathieu, F., Jouany, J.P., Senaud, J., Bohatier, J., Bertin, G. and Mercier, M. (1996). The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development*. 36: 271-287

Miller-Webster T., Hoover W H., Holt M., Nocek J E (2002) Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. *Journal of dairy science*. 85: 2009-2014.

Mir S., Mir P.S (1994) Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets and on feed digestibility and in situ degradability. *Journal of Animal Science*, 72: 537-545.

Miranda R L A., Mendoza M G D., Barcena-Gama J R., Gonzalez M S S., Ferrara R., Ortega C M E., Cobos P M A.: Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 1996, 63:289-296.

N

Navetat H., Rizet C., Meyus A., Foucras G., Schelcher F (2007) La réhydratation du veau: présentation d'un système expert. *Bulletin académie vétérinaire.France*. Tome 160-N° 4.

Nicod-Bertin L., Panouse-Perrin J (19985) Propriétés activatrices de deux préparations de levures vis-à-vis du système complément humain. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon* 18, 345-365.

Nisbet D. J. and S. A. Martin.effect of a *saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *selenomonas ruminantium*. *Journal of Animal Science* 1991. 694628-4633

O

Oswald I.P., Gallois M (2009) Les additives immunomodulateurs dans l'alimentation du porc. *Journées Recherche Porcine*, 41: 79-88.

Ouweland A.C., Niemi P., Salminen S.J. (1999). The normal microflora does not affect the adhesion of probiotics bacteria *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 177: 35-38.



P

Peterson M (2002) Monographie *Saccharomyces boulardii*. Site internet du Natural Medicines Comprehensive Database. Page consultée le 19 Aout 2009. Adresse URL : <http://intranet.trsecure.com/%28S%28eugupgv0zpkmr55fy1tnj45%29%29/nd/Search.aspx?cs=&s=ND&pt=100&sh=0&id=332>

Pinos-Rodriguez J.M., Robinson P.H., Ortega M.E., Berry S.L., Mendoza G., Barcena R (2007) Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰⁷⁷ or *Saccharomyces boulardii*¹⁰⁷⁹. *Animal Feed Science and Technology*, 140: 223-232.

Piva G., Belladonna S., Fusconi G., Sicbaldi F (1993) Effects of yeast on dairy cows performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. *Journal of Dairy Science*, 76:2717-2722.

Plet J. (2007) Intérêt de données commémoratives, cliniques et biochimiques pour le diagnostic étiologique et le pronostic des maladies métaboliques bovines du peripartum à l'origine de décubitus. Etude de 91 cas cliniques. Thèse pour l'obtention du Grade de docteur vétérinaire de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes (France) N-2007-053. 134 pages

Pothoulakis C., Kelly C. P., Joshi M. A., Gao N., O'Keane C. J., Castagliuolo I., LaMont J. T.: *Saccharomyces boulardii* inhibits Clostridium difficile toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology* 104 (1993), 1108 -1115.

Putnam, D.E., C.G. Schwab, M.T. Socha, N.L. Whitehouse, N.A. Kierstead, & B.D. Garthwaite (1997) Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage nitrogen fraction and amino acid to the small intestine. *Journal of Dairy Science*, 80: 374-384.

Q

Quigley J.D., Wallis L.B., Dowlen H.H., & Heitman R.N(1992) Sodium Bicarbonate and Yeast Culture Effects on Ruminal Fermentation, Growth, and Intake in Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, Vol 75, No 12

R

Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C., Hinchcliff K.W (2007) *Veterinary Medicine*. 10th edition: pp 2047.

Robinson P.H (1997) Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on adaption of cows to diets postpartum. *Journal of Dairy Science*, 80:1119–1125.

Rodriguez AC., Nardi RM., Bambirra EA., Vieira EC., Nicoli JR ((1996) Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Bacteriology* 81(3):251-6.

Rossi F., Luccia AD., Vincenti D., Coconcelli, PS (2004) Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Animal Research* 53: 177-186.

S

Salminen S., Ouwehand A., Benno Y., Lee Y.K (1999) Probiotics: how they should be defined. *Trends n Food Science and Technology*, 10:107-110.



Sauvant D., Giger-Reverdin S., Schmidely (2004) Rumen acidosis: modeling the response to yeast culture. Nutritional biotechnology in the feed and food industry. Nottingham University Press, 221-229.

Schingoethe D.J., Linke K.N., Kalscheur K.F., Hippen A.N., Rennich D.R., & Yoon I (2004) Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer. Journal of Dairy Science, 87:4178-4181.

Schrezenmeir J., De Vrese M (2001) Probiotics, prebiotics and symbiotics- approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, 73:361S-4S.

Seymour W.M., Nocek J.E., Siciliano-Jones J (1995) Effects of a colostrum substitute and of dietary brewer's yeast on the health and performance of dairy calves. Journal of Dairy Science, 78:412-420.

Smith BP (1996) Large Animal Internal Medicine. 2nd edition. Saint-Louis: Mosby-Year Book. 2040 pages.

Sougioultzis S., Simeonidis S., Bhaskar K.R., Chen X., Anton P.M., Keates S., Pothoulakis C., Kelly C.P (2006) *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- κ B-mediated IL-8 gene expression, Biochemical and Biophysical Research Communications, 343:69-76.

Stella A.V., Paratte R., Valnegri L., Cigalino G., Soncini G., Chevaux E., Dell'Otro V., Savoini G (2007) Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites and faecal flora in early lactating dairy goats. Small Ruminant Research, 67: 7-13.

Surawicz C.M (2003) Probiotics antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhea in humans. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 17: 775-783.

T

Tasker J.B (1978) Reference values for clinical chemistry using the coulter chemistry system. Cornell Veterinary., 68 (4): 460 – 479.

Titi H.H., Abdullah A.Y., Lubbadah W.F., Obeidat B.S (2008) growth and carcass characteristics of male dairy calves on a yeast culture-supplemented diet. South African Journal of Animal Science, 38:3.

Tripathi M.K., Karim S.A., Chaturvedi O.H., Verma D.L (2008) Effect of different liquid cultures of live yeast strains on performance, rumen fermentation and microbial protein synthesis in lambs. Journal of Animal Physiology. Animal Nutrition, 92: 631-639.

Tripathi M.K., Karim S.A (2009) Effect of individual and mixed live yeast culture feeding on growth performance, nutrient utilization and microbial crude protein synthesis in lambs. Animal Feed Science and Technology, 10.1016.

Tzianabos A.O (2000) Polysaccharides immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. Clinical Microbiology Revue, 13:523.

V

Vagneur M (1992) Biochimie de la vache laitière appliquée à la nutrition, La dépêche vétérinaire, supplément technique 28.



Varrielle (1999) Les examens sanguins chez les bovins. Des clés pour utiliser la biochimie clinique. Point vétérinaire.30, n°202. 25-30.

Veissier I., Bertrand G., Toullec R (2003) Le veau de boucherie : concilier bien-être animal et production. INRA 2^{ème} édition, 224 pages.

W

Wallace RJ. (1994) Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. Journal of Animal Science 72, 2992-3003.

Williams P.E.V., Newbold, C.J(1990). Rumen probiosis: the effects of novel micro-organisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: Haresign Cole W., D.J.A. (Eds) Recent Advances in Animal Nutrition. Butterworths, London, UK, pp. 211–236.

Williams P E V., Tait C A G., Innes G M., Newbold C J (1991). Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milkyield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. Journal of Animal Science 69:3016–3026.

Z

Zaouche A (2000) Effects of oral *Saccharomyces boulardii* on bacterial overgrowth, translocation and intestinal adaptation after small-bowel resection in rats. Scand. J. Gastroenterology 2: 160 -165.

Source internet utilisée

Source 1 (Figure 1)

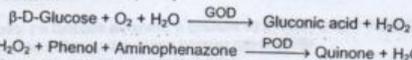
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/2004/Bossie/MFYG.html>

Quantitative determination of glucose IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Glucose oxidase (GOD) catalyses the oxidation of glucose to gluconic acid. The formed hydrogen peroxide (H₂O₂), is detected by a chromogenic oxygen acceptor, phenol-aminophenazone in the presence of peroxidase (POD):



The intensity of the color formed is proportional to the glucose concentration in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Glucose is a major source of energy for most cells of the body; insulin facilitates glucose entry into the cells. Diabetes is a disease manifested by hyperglycemia; patients with diabetes demonstrate an inability to produce insulin^{1,3,4}. Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1	TRIS pH 7.4	92 mmol/L
Buffer	Phenol	0.3 mmol/L
R 2	Glucose oxidase (GOD)	15000 U/L
Enzymes	Peroxidase (POD)	1000 U/L
	4 - Aminophenazone (4-AP)	2.6 mmol/L
GLUCOSE CAL	Glucose aqueous primary standard	100 mg/dL

PREPARATION

Working reagent (WR): Dissolve (→) the contents of one vial R 2 Enzymes in one bottle of R 1 Buffer. Cap and mix gently to dissolve contents. The reagent is stable 1 month after reconstitution in the refrigerator (2-8°C) or 7 days at room temperature (15-25°C).

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date. **GLUCOSE CAL** Once open is stable up to 1 month when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 505 nm ≥ 0.10.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma, free of hemolysis¹ and CSF. Serum should be removed from the clot as quickly as possible. Stability: Glucose is stable at 2-8°C for 3 days.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 505 nm (490-550)
Cuvette: 1 cm light path
Temperature: 37°C / 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard ^(Note 1,2) (µL)	--	10	--
Sample (µL)	--	--	10

- Mix and incubate for 10 min at 37°C or 15-20 min at room temperature (15-25°C).
- Read the absorbance (A) of the samples and standard, against the Blank. The colour is stable for at least 30 minutes.

CALCULATIONS

$$\frac{(A)\text{Sample}}{(A)\text{Standard}} \times 100 (\text{Standard conc.}) = \text{mg/dL glucose in the sample}$$

Conversion factor: mg/dL x 0.0555= mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems. Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

- Serum or plasma: 60 - 110 mg/dL ≅ 3.33 - 6.10 mmol/L
- CSF: 60 - 80% of the blood value

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 0.04 mg/dL to linearity limit of 500 mg/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	96.8	241	96.4	248
SD	0.81	1.43	1.55	3.73
CV (%)	0.83	0.59	1.58	1.50

Sensitivity: 1 mg/dL = 0.0036 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x). The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.99.

Regression equation: y= 1.0x + 0.12.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

Haemoglobin up to 4 g/L, bilirubin up to 20 mg/L, creatinine up to 100 mg/L and galactose up to 1g/L do not interfere.

A list of drugs and other interfering substances with glucose determination has been reported by Young et al.^{5,6}

NOTES

- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- Kaplan L.A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1032-1036.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PACKAGING

Ref:1001190	4 x 125 mL
Ref:1001191	4 x 250 mL
Ref:1001192	10 x 50 mL

Coolesterol

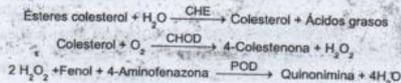
CHOD-POD. Enzimático colorimétrico

Determinación cuantitativa de coolesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

El coolesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de coolesterol presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

El coolesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el coolesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del coolesterol es uno de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de coolesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{3,6}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
Tampón	Fenol	26 mmol/L
R 2	Coolesterol esterasa (CHE)	300 U/L
Enzimas	Coolesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
	Peroxidasa (POD)	1250 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L
CHOLESTEROL CAL	Patrón primario acuoso de Coolesterol 200 mg/dL	

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 1 frasco de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad (RT): 4 meses en nevera (2-8°C) o 40 días 15-25°C.

Mantener protegido de la luz

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

CHOLESTEROL CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,1$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm (500-550).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma^{1,2}: Estabilidad de la muestra 7 días a 2-8°C y varios meses si se mantiene la muestra congelada (-20°C).

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 505 nm (500-550)
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (mg/dL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min. a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

CALCULOS

$$\frac{(A) \text{Muestra}}{(A) \text{Patrón}} \times 200 \text{ (Conc. Patrón)} = \text{mg/dL de coolesterol en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0258 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Evaluación del riesgo^{3,6}:

Menos de 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Moderado
240 o más	Alto

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,6 mg/dL hasta el límite de linealidad de 600 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	90,1	305	90,4	301
SD	0,64	3,30	1,12	2,30
CV (%)	0,71	1,08	1,24	0,76

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,002 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,995.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,004x - 0,931.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias de hemoglobina hasta 5 g/L y bilirrubina hasta 10 mg/dL^{1,2}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Coolesterol^{3,4}.

NOTAS

- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1194-1206 and 437.
- Meiattini F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24 (12): 2161-2165.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001090	10 x 50 mL
Ref: 1001091	10 x 20 mL
Ref: 1001092	4 x 125 mL
Ref: 1001093	4 x 250 mL



SPINREACT



TRIGLYCERIDES

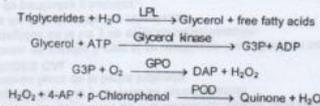
Triglycerides
GPO-POD. Enzymatic colorimetric

Quantitative determination of triglycerides IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Sample triglycerides incubated with lipoproteinlipase (LPL), liberate glycerol and free fatty acids. Glycerol is converted to glycerol-3-phosphate (G3P) and adenosine-5-diphosphate (ADP) by glycerol kinase and ATP. Glycerol-3-phosphate (G3P) is then converted by glycerol phosphate dehydrogenase (GPO) to dihydroxyacetone phosphate (DAP) and hydrogen peroxide (H₂O₂). In the last reaction, hydrogen peroxide (H₂O₂) reacts with 4-aminophenazone (4-AP) and p-chlorophenol in presence of peroxidase (POD) to give a red colored dye.



The intensity of the color formed is proportional to the triglycerides concentration in the sample.^{1,2,3}

CLINICAL SIGNIFICANCE

Triglycerides are fats that provide energy for the cell. Like cholesterol, they are delivered to the body's cells by lipoproteins in the blood. A diet with a lot of saturated fats or carbohydrates will raise the triglyceride levels. The increases in serum triglycerides are relatively non-specific. For example liver dysfunction resulting from hepatitis, extra hepatic biliary obstruction or cirrhosis, diabetes mellitus is associated with the increase.^{4,7}

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1	GOOD pH 7.5	50 mmol/L
Buffer	p-Chlorophenol	2 mmol/L
	Lipoprotein lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycerol kinase (GK)	500 U/L
R 2	Glycerol-3-oxidasa (GPO)	2500 U/L
Enzymes	Peroxidase (POD)	440 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Triglycerides aqueous primary standard	200 mg/dL

PREPARATION

Working reagent (WR): Dissolve (→) the contents of one vial R 2 Enzymes into one bottle of R 1 Buffer.

Ref: 1001310 Working reagent (WR): Dissolve (→) the contents of one vial R 2 Enzymes in 10 mL of R 1 Buffer.

Cap and mix gently to dissolve contents.

WR stability: 6 weeks at 2-8°C or 1 week at room temperature (15-25°C).

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

TRIGLYCERIDES CAL

Once open is stable up to 1 month when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 505 nm ≥ 0.14 .

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or heparinized or EDTA plasma¹. Stability of the sample: 5 days at 2-8°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
 - Wavelength: 505 nm (490-550)
 - Cuvette: 1 cm light path
 - Temperature: 37°C / 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.

3. Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard ^{1,2} (μL)	—	10	—
Sample (μL)	—	—	10

- Mix and incubate for 5 min. at 37°C or 10 min. at room temperature.
- Read the absorbance (A) of the samples and Standard, against the Blank. The colour is stable for at least 30 minutes.

CALCULATIONS

(A)Sample x 200 (Standard conc.) = mg/dL triglycerides in the sample
(A)Standard

Conversion factor: mg/dL x 0.0113 = mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

Men	40 – 160 mg/dL
Women	35 – 135 mg/dL

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 0.7 mg/dL to linearity limit of 1000 mg/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	118	216	119	215
SD	0.67	0.94	2.17	2.91
CV (%)	0.60	0.43	1.83	1.36

Sensitivity: 1 mg/dL = 0.0012 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.995.

Regression equation: y = 1.00x + 0.0743.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

No interferences were observed with bilirubin up to 170 μmol/L and hemoglobin up to 10 g/L⁷.

A list of drugs and other interfering substances with cholesterol determination has been reported by Young et al.^{4,5}

NOTES

- LCF (Lipid Clearing Factor) is integrated in the reagent.
- Calibration with the aqueous Standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

- Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19 (5): 476-482.
- Fossati P et al. Clin Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
- Kaplan A et al. Tryglycerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

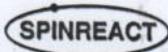
PACKAGING

Ref: 1001310	5 x 10 mL
Ref: 1001311	10 x 20 mL
Ref: 1001312	10 x 50 mL
Ref: 1001313	4 x 125 mL
Ref: 1001314	4 x 250 mL

BSIS31 Ed.2007



SPINREACT, S.A.U. Ctra. Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel. +34 972 69 00 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com



TOTAL PROTEIN

Total protein

Biuret. Colorimetric

Quantitative determination of total protein IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Proteins give an intensive violet-blue complex with copper salts in an alkaline medium. Iodide is included as an antioxidant. The intensity of the color formed is proportional to the total protein concentration in the sample^{1,4}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

The proteins are macromolecular organic compounds, widely distributed in the organism. They act like structural and transport elements. The proteins of the serum are divided into two fractions, albumin and globulins.

The determination of total proteins is useful in the detection of:

- High protein levels caused by hemoconcentration like in the dehydrations or increase in the concentration of specific proteins.
- Low protein level caused by hemodilution by an impaired synthesis or loss (as by hemorrhage) or excessive protein catabolism^{4,5}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R	Sodium potassium tartrate	15 mmol/L
	Sodium iodide	100 mmol/L
Biuret	Potassium iodide	5 mmol/L
	Copper (II) sulphate	19 mmol/L
T PROTEIN CAL	Bovine albumin primary standard	7 g/dL

PRECAUTIONS

Copper (II) sulphate: Environmentally dangerous (N); R52/53: Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

S60: This material and its container must be disposed of as hazardous waste. S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions/safety data sheets.

PREPARATION

The reagents are ready to use.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 540 nm \geq 0.22.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 540 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or heparinized plasma¹.

Stability of the sample: 1 month at refrigerator (2-8°C).

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 540 (530-550) nm
Cuvette: 1 cm. light path
Temperature: 37°C / 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Blank	Standard	Sample
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard ^(Note 1-2) (µL)	--	25	--
Sample (µL)	--	--	25

BSIS30-1 Ed.2007



SPINREACT, S.A.U. C/ra. Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (G) SPAIN
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com

- Mix and incubate 5 min at 37°C or 10 min at room temperature.
- Read the absorbance (A) of the samples and Standard, against the Blank. The colour is stable for at least 30 minutes.

CALCULATIONS

$$\frac{(A)_{\text{Sample}}}{(A)_{\text{Standard}}} \times 7 (\text{Standard conc.}) = \text{g/dL of total protein in the sample}$$

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

Adults: 6.6 - 8.3 g/dL

Newborn: 5.2 - 9.1 g/dL

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 0,20 g/dL to linearity limit of 15 g/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

Mean (g/dL)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	5.07	9.64	5.15	9.74
SD	0.04	0.08	0.06	0.14
CV (%)	0.88	0.90	1.23	1.43

Sensitivity: 1 g/dL = 0,07 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.9918.

Regression equation: $y = 1.0164x - 0.1264$.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

Hemoglobin and lipemia^{1,4}.

A list of drugs and other interfering substances with total protein determination has been reported by Young et. al^{2,3}.

NOTES

- T PROTEIN CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- Calibration with the aqueous standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

- Koller A. Total serum protein. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1316-1324 and 418.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz NW et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

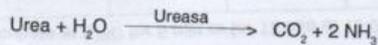
PACKAGING

Ref:1001291 Cont. 2 x 250 mL

Test enzimático - colorimétrico- Método "Berthelot".
Guardar en nevera a 2-8°C. Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Determinación enzimática-colorimétrica de la urea según la siguiente reacción:



En medio alcalino y en presencia de salicilato e hipoclorito de sodio, los iones amonio reaccionan produciendo un compuesto de color verde cuya absorbancia se mide a 580 nm.

CONTENIDO DEL EQUIPO

Reactivo 1	Tampón fosfatos pH 6.7	50 mmol/L
	EDTA	2 mmol/L
	Salicilato sódico	60 mmol/L
	Nitroprusiato sódico	3.2 mmol/L
Reactivo 2	Hipoclorito sódico	140 mmol/L
	Hidróxido sódico	150 mmol/L
Reactivo 3	Ureasa	30000 U/L
Standard	Sol. Urea	50 mg/dL

PREPARACIÓN Y ESTABILIDAD

Disolver un comprimido R.3 en un frasco de Tampón R.1. La estabilidad de esta solución es de : 4 semanas a 2-8°C ó 1 semana a 15-25°C.
El reactivo R.2 está listo para su uso.

MUESTRA

Suero, plasma heparinizado.
Orina : diluirla a 1:50 con agua destilada.

TECNICA

	Blanco	Standard	Muestra
R.1 + R.3	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Standard	--	10 µL	--
Muestra	--	--	10 µL

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 minutos a temperatura ambiente de 15-25°C.

Reactivo 2	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
------------	--------	--------	--------

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min a temperatura ambiente 15-25°C.
Leer frente al blanco de reactivos a 580 nm.
Coloración estable a temperatura ambiente 30 min.

Cálculo

$$\frac{\text{D.Opt. muestra}}{\text{D.Opt. standard}} \times \text{conc standard} = \text{conc muestra}$$

$$\text{mg/dL} \times 0.1665 = \text{mmol/L}$$

Linealidad

El método es lineal hasta valores de 200 mg/dL (33.33 mmol/L)

VALORES NORMALES

Suero :	15 - 45 mg/dL	(2.49 - 7.49 mmol/L)
Orina :	20 - 35 gr/24 horas	

NOTAS:

Usar preferentemente cubetas de plástico desechables.

Bibliografía

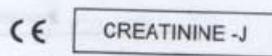
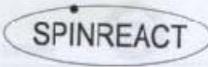
Berthelot, MPE. *Repert Chim. Appl.* 2884 (1859)
Balleter, WG. Bushman, C.J. Tidwell, P.W. *Anal. Cehm.* 33, 592 (1961).
Fawcett, J.K. and Scott, J.E., *J. Clin. Path.*, 13, 156 (1960)
Weatherburn, M.W., *Anal. Chem.*, 39, 971 (1967)

CONTROL DE CALIDAD

SPINTROL. Normal y patológico.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001331 4 x 150 mL
Ref: 1001329 10 x 50 mL



Creatinina

Jaffé. Colorimétrico - cinético

Determinación cuantitativa de creatinina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra ensayada.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La creatinina es el resultado de la degradación de la creatina, componente de los músculos y puede ser transformada en ATP, fuente de energía para las células. La producción de creatinina depende de la modificación de la masa muscular. Varía poco y los niveles suelen ser muy estables. Se elimina a través del riñón. En una insuficiencia renal progresiva hay una retención en sangre de urea, creatinina y ácido úrico. Niveles altos de creatinina son indicativos de patología renal. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Reactivo Picrico	Ácido picrico	17,5 mmol/L
R 2	Reactivo Alcalinizante	Hidróxido sódico	0,29 mol/L
CREATININE CAL	Patrón primario acuoso de Creatinina	2 mg/dL	

PRECAUCIONES

Hidróxido sódico: Irritante (Xn); R36/38: Irrita ojos y la piel. S26: En caso de contacto con los ojos lavar de inmediato con abundante agua y acudir al médico. S37/39: Usar guantes adecuados y proteger cara y ojos. S45: En caso de accidente o malestar, acudir inmediatamente al médico.

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT): Mezclar volúmenes iguales de R 1 Reactivo Picrico y de R 2 Reactivo Alcalinizante. Estabilidad del reactivo de trabajo: 10 días a 15-25°C.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

CREATININE CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 492 nm \geq 1,80.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 492 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

- Suero o plasma heparinizado.
- Estabilidad de la creatinina: al menos 24 horas a 2-8°C.
- Orina: Diluir la muestra al 1/50 con agua destilada. Mezclar. Multiplicar el resultado obtenido por 50 (factor de dilución)
- Estabilidad de la creatinina: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 492 nm (490-510)
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (Creatinina) (μ L)	--	100	--
Muestra (μ L)	--	--	100

- Mezclar y poner en marcha el cronómetro.
- Leer la absorbancia (A_1) al cabo de 30 segundos y al cabo de 90 segundos (A_2) de la adición de la muestra.
- Calcular: $\Delta A = A_2 - A_1$.

CÁLCULOS

$$\frac{\Delta A \text{ Muestra} - \Delta A \text{ Blanco}}{\Delta A \text{ Patrón} - \Delta A \text{ Blanco}} \times 2 \text{ (Conc. Patrón)} = \text{mg/dL de creatinina en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 88,4 = μ mol/L

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

- Suero o plasma:
- Hombres 0,7 - 1,4 mg/dL \equiv 61,8 - 123,7 μ mol/L
 - Mujeres 0,6 - 1,1 mg/dL \equiv 53,0 - 97,2 μ mol/L
- Orina: 15-25 mg/Kg/24 h
- Hombres 10 - 20 mg/Kg/24 h \equiv 88 - 177 μ mol/Kg/24 h
 - Mujeres 8 - 18 mg/Kg/24 h \equiv 71 - 177 μ mol/Kg/24 h
- Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,09 mg/dL hasta el límite de linealidad de 15 mg/dL. Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Medis (mg/dL)	1,06	3,58	1,03	3,31
SD	0,22	0,06	0,04	0,06
CV (%)	2,07	1,54	3,97	1,75

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = ΔA 0,09 A/min . mg/dL. Exactitud: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x). Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes: Coeficiente de correlación (r) 0,988 Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,975x + 0,047$ Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Hemoglobina (1 g/L), Bilirrubina (55 mg/dL), interfieren. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la creatinina.

NOTAS

- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Murray R.L. Creatinine. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1261-1266 and 418.
- Young D.S. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young D.S. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz H W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref. 1001111 Cont. 2 x 150 mL



