




OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible

This is an author's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/> 25507

**To cite this version:**

Lescarret, Anne-Laure . *Relation entre le microbiote ruminal et le parasitisme gastro-intestinal chez 2 lignées divergentes de moutons résistante et sensible aux strongles digestifs*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 116 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: [tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr](mailto:tech-oatao@listes-diff.inp-toulouse.fr)

# RELATION ENTRE LE MICROBIOTE RUMINAL ET LE PARASITISME GASTRO-INTESTINAL CHEZ 2 LIGNEES DIVERGENTES DE MOUTONS RESISTANTE ET SENSIBLE AUX STRONGLES DIGESTIFS

---

THESE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**LESCARRET Anne-Laure**

Née, le 10/02/1993 à MARSEILLE (13)

---

**Directeur de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER**

**JURY**

PRESIDENT :

**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Annabelle MEYNADIER**

**M. Philippe JACQUIET**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directrice** : **Madame Isabelle CHMITELIN**

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*

Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
 Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
 M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
 M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
 M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
 M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
 Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
 Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*  
 M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
 M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*

#### MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
 Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
 Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
 Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*  
 M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
 M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
 Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
 Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
 Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
 M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*  
 Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
 Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*  
 Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
 M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*  
 M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
 Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
 Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*  
 M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
 Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
 Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
 M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales règlementées*  
 Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### MAITRES DE CONFERENCES CONTRACTUELS

Mme **BORDE DORE Laura**, *Médecine interne des équidés*  
 M. **GIANSETTO Thomas**, *Chirurgie*  
 M. **JOLIVET Franck**, *Médecine interne*  
 Mme **LECRU Line**, *Dermatologie*  
 M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*  
 Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophthalmologie*

#### ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **BLONDEL Margaux**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
 M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie-Imagerie médicale*  
 M. **COMBARROS-GARCIA Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*  
 M. **GAIDE Nicolas**, *Histologie, Anatomie Pathologique*  
 M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*  
 M. **LESUEUR Jérémy**, *Gestion de la santé des ruminants – Médecine collective de précision*

## REMERCIEMENTS

*A mon Jury de thèse,*

**A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN**

Professeur des Universités de la Faculté de Pharmacie de Ranguel, et praticien hospitalier en Parasitologie – Zoologie

Pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse,

*Hommages respectueux*

**A Madame le Docteur Annabelle MEYNADIER**

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE en Alimentation

Pour m'avoir proposé et encadré ce travail, pour votre patience, votre gentillesse, et votre soutien,

*Sincères remerciements*

**A Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE en Parasitologie et Maladies Parasitaires – Zoologie

Pour m'avoir fait l'honneur de prendre part au jury de cette thèse,

*Sincères remerciements*



# Table des matières

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>10</b>
1. LISTE DES FIGURES	10
2. LISTE DES TABLEAUX	12
3. LISTE DES ABREVIATIONS	14
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>15</b>
1. LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX EN ELEVAGE OVIN : IMPORTANCE ECONOMIQUE ET ETIOLOGIE	19
1.1. Impact économique	19
1.2. Les strongles gastro-intestinaux des ovins	19
1.2.1. Des vers de la famille des Nématodes	19
1.2.2. Généralités sur les strongles gastro-intestinaux des ovins	20
1.2.2.1. Généralités sur <i>Haemonchus contortus</i>	22
1.2.2.2. Généralités sur <i>Trichostrongylus colubiformis</i>	22
1.3. Cycles évolutifs d' <i>Haemonchus contortus</i> et de <i>Trichostrongylus colubiformis</i> , et modes d'infestation	23
1.3.1. Infestation de l'hôte et description générale du cycle	23
1.3.2. Phase exogène du cycle : de l'œuf à la larve infestante L3	24
1.3.3. Phase endogène du cycle : de l'ingestion de la larve L3 à la ponte des œufs	25
1.3.4. Le phénomène d'hypobiose	26
1.3.5. La survie des larves L3 dans le milieu extérieur	27
1.4. Epidémiologie des strongyloses digestives ovines	27
1.4.1. Une distribution hétérogène des parasites au sein d'un troupeau	27
1.4.2. La résistance de l'hôte	28
1.4.3. Facteurs épidémiologiques liés au mode d'élevage	29
1.4.4. Facteurs épidémiologiques liés aux facteurs climatiques	29
1.5. Physiopathologie des strongles gastro-intestinaux des moutons	30
1.5.1. Conséquences liées à la présence des vers	30
1.5.2. La réponse immunitaire des moutons face aux strongles	31
1.5.3. Manifestations cliniques des strongyloses	31
1.5.4. Diagnostic des strongyloses gastro-intestinales	33
1.5.4.1. Dépistage clinique et épidémiologique	33
1.5.4.2. Diagnostic de laboratoire	34
2. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX	38
2.1. Outils de lutte chimique : les strongicides utilisables chez les ovins en France	38
2.1.1. Les différents strongicides et leur mode d'action	38
2.1.1.1. Les Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles	38
2.1.1.2. Les Imidazothiazoles	39
2.1.1.3. Les Lactones macrocycliques	41
2.1.1.4. Les Salicylanilides	43



2.1.2.	Pratiques d'utilisation des strongicides et limites .....	44
2.2.	Résistance aux strongicides .....	45
2.2.1.	Définition, origine et danger.....	45
2.2.2.	Ecotoxicologie des anthelminthiques .....	45
2.3.	Solutions alternatives aux strongicides .....	46
2.3.1.	Eliminer les conduites à risque.....	46
2.3.2.	Eliminer les strongles gastro-intestinaux.....	47
2.3.3.	Gérer les sources de contamination .....	48
2.3.4.	Augmenter la résistance de l'hôte .....	49
3.	LE MICROBIOTE RUMINAL DES OVINS : ROLE PHYSIOLOGIQUE ET TECHNIQUES D'ETUDE	51
3.1.	Définition .....	51
3.2.	Rôles physiologiques du microbiote chez les ruminants .....	52
3.3.	Techniques d'étude du microbiote ruminal (Calenge et al. 2014).....	54
3.3.1.	Analyser la diversité bactérienne du microbiote.....	55
3.3.2.	Etudier le microbiote fonctionnel .....	56
1.	PRESENTATION DE L'ETUDE	59
2.	MATERIELS ET METHODES	60
2.1.	Animaux et agents pathogènes .....	60
2.2.	Plan expérimental et prélèvements.....	62
2.3.	Evaluation du parasitisme des agneaux .....	65
2.4.	Evaluation du GMQ (Gain Moyen Quotidien).....	65
2.5.	Extraction et séquençage de l'ADN bactérien.....	65
2.6.	Obtention des OTUs, les étapes FROGS.....	66
2.6.1.	Le « Pre-process » .....	67
2.6.2.	« Clustering », ou clusterisation .....	67
2.6.3.	« Chimera », ou suppression des chimères .....	68
2.6.4.	Application de filtres .....	68
2.6.5.	Affiliation des clusters à des OTUs .....	68
2.7.	Analyse statistique .....	69
2.7.1.	Résistance au parasitisme .....	69
2.7.2.	Diversité du microbiote en fonction de la lignée (R ou S).....	69
2.7.2.1.	L' $\alpha$ -diversité du microbiote en fonction de la lignée .....	69
2.7.2.2.	La $\beta$ -diversité du microbiote entre les lignées R et S.....	70
3.	RESULTATS	71
3.1.	Résultats du process FROGS .....	71
3.2.	Etude de la résistance au parasitisme .....	75
3.3.	Etude de la diversité du microbiote bactérien .....	77
3.3.1.	Etude de la diversité du microbiote en fonction de la lignée .....	77
3.3.2.	Etude de la diversité en fonction du jour .....	80
3.3.3.	Etude de la diversité du microbiote en fonction de la période.....	81
3.3.3.1.	Influence de l'âge .....	84
3.3.3.2.	Influence du Poids .....	84
3.3.3.3.	Influence de l'alimentation .....	84

3.4.	Etude de la variabilité de la communauté bactérienne entre les individus .....	86
3.4.1.	Sans facteur discriminant .....	86
3.4.2.	Avec facteur discriminant : la Période.....	88
3.4.3.	Recherche de co-évolution entre certains paramètres zootechniques et des OTUs .....	89
4.	DISCUSSION .....	93
4.1.	Effet des lignées sur les parasites et sur le microbiote ruminal .....	93
4.2.	Influence de la période sur la résistance aux parasites et la composition bactérienne du rumen .....	93
4.3.	Influence de l'alimentation sur la diversité bactérienne .....	94
4.4.	Identification des OTUs corrélés à la communauté bactérienne du rumen .....	97
4.5.	Identification des OTUs corrélés à des facteurs zootechniques .....	98
4.5.1.	OTU lié au comptage des coccidies .....	98
4.5.2.	OTUs liés au poids .....	99
4.5.3.	OTUs liés au comptage des œufs de strongle (OPG) .....	99
4.6.	Microbiote ruminal et microbiote abomasal.....	100
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>104</b>
<b>ANNEXE 1 : MODE OPERATOIRE D'EXTRACTION DU MICROBIOTE.....</b>		<b>112</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### 1. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle monoxène des strongles gastro-intestinaux des ovins (d'après P. Jacquet, Parasitologie ENVT 2014) .....	23
Figure 2 : Influence de la température sur le développement des espèces de SGI majeures, de l'œuf non embryonné au stade infestant L3 (O'Connor et al 2006) .....	25
Figure 3 : Epidémiologie d' <i>H. contortus</i> chez des moutons au pâturage (d'après Abbott et al 2012).....	30
Figure 4 : Méthode de réalisation des coproscopies de mélange, selon la technique de Mac Master modifiée (d'après Bonnefont, Canellas 2014) .....	35
Figure 5 : Composition des microbiotes digestifs de différents herbivores (Calenge et al. 2014).....	52
Figure 6 : Plan expérimental et calendrier des interventions du projet .....	64
Figure 7 : Etapes du pipeline FROGS pour nettoyer un séquençage et obtenir des OTUs (Escudié et al. 2017).....	66
Figure 8 : Erreurs au cours des étapes du process de séquençage et correction par le pre-process (Escudié et al. 2017).....	67
Figure 9 : Schématisation de la conservation des séquences à 3 erreurs de bases près, lors du Clustering (Escudié et al. 2017) .....	67
Figure 10 : Schéma explicatif de l'obtention d'une chimère (Escudié et al. 2017) .....	68
Figure 11 : Evolution du nombre de séquences au cours des différentes étapes de nettoyage du pré-process .....	71
Figure 12 : Diagrammes d'évolution du nombre de séquences et de clusters avant et après l'application des filtres. ....	72
Figure 13 : Multi-affiliation des OTUs et des séquences en fonction du rang taxonomique... 73	
Figure 14 : Diagramme en « Sunburst » représentant la diversité taxonomique des 311 échantillons.....	74
Figure 15 : Boxplots représentant la distribution de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal (en nombre d'OTUs observés) en fonction de la lignée d'agneaux (R ou S) .....	78

Figure 16 : Graphique en nuage de points représentant la $\beta$ -diversité des échantillons en fonction de la lignée .....	79
Figure 17 : $\alpha$ -diversité du microbiote en fonction du début (Jdeb) et de la fin (J30) des challenges parasitaires.....	80
Figure 18 : $\beta$ -diversité du microbiote en fonction du début (Jdeb) et de la fin (J30) des challenges parasitaires.....	81
Figure 19 : Boxplots de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal des agneaux en fonction des périodes de challenge parasite P1 et P2 .....	82
Figure 20 : Graphique en nuage de points représentant la $\beta$ -diversité du microbiote ruminal en fonction des périodes de challenge parasite P1 et P2.....	83
Figure 21 : Composition du microbiote ruminal des agneaux en fonction du type d'alimentation (100% concentrés ou concentrés+fourrages).....	85
Figure 22 : Variabilité bactérienne de nos échantillons expliquée par la lignée R ou S (s-PCA) .....	86
Figure 23 : Variabilité des échantillons expliquée pour 10% par la période P1 ou P2.....	88
Figure 24 : Network des corrélations existantes entre les paramètres zootechniques POIDS OPG et COC, et certains clusters .....	90
Figure 25 : Composition du microbiote ruminal des agneaux en fonction du type d'alimentation (DAC ou DAF) (d'après De Almeida 2017) .....	95

## 2. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des strongles gastro-intestinaux des ovins, localisation, morphologie, nutrition et importance en France (d'après Chartier 2000; Bowman 1999; JACQUIET 2014) .....	21
Tableau 2 : Relation niveau d'infestation - excrétion fécale en OPG pour les strongyloses digestives.....	36
Tableau 3 : Spectres d'action, posologies et restriction d'utilisation des Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles disponibles en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014).....	39
Tableau 4 : Spectre d'action, posologie et restriction d'utilisation de l'Imidazothiazole disponible en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014) .....	40
Tableau 5 : Spectres d'action, posologies et restriction d'utilisation des lactones macrocycliques disponibles en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014).....	42
Tableau 6 : Spectres d'action, posologies et restriction d'utilisation des Salicylanilides disponibles en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014).....	44
Tableau 7 : Les méthodes à haut débit disponibles pour décrire la composition du microbiote et ses fonctions (adapté de Calenge et al. 2014) .....	55
Tableau 8 : Détail de la ration complète distribuée aux agneaux lors de la deuxième infestation, ad libitum sur tapis .....	60
Tableau 9 : Détails des concentrés TESTAGE et ENTRETIEN, respectivement distribués à tous les animaux lors de la première puis de la deuxième infestation aux strongles gastro-intestinaux. ....	61
Tableau 10 : Résultats statistiques de l'influence de plusieurs paramètres sur les valeurs en OPG des agneaux, selon la méthode ANOVA.....	75
Tableau 11 : Importance du parasitisme moyen des agneaux au début et à la fin de chaque période, exprimé en OPG .....	76
Tableau 12 : Importance de l'excrétion parasitaire (en OPG) des agneaux au début et à la fin de chaque période, en fonction du parasite .....	76
Tableau 13 : Importance du parasitisme des lignées R et S à <i>H. contortus</i> et <i>T. colubriformis</i> à la fin de chaque période, exprimé en opg.....	77
Tableau 14 : Moyenne d'âge des agneaux au début et à la fin de chaque période parasitaire. 84	
Tableau 15 : Moyenne des poids des agneaux au début et à la fin de chaque période parasitaire .....	84

Tableau 16 : Abondances relatives moyennes de chaque phylum bactérien identifié dans le rumen, en fonction de la période.....	85
Tableau 17 : Clusters dont la valeur de corrélation avec la composante 1 de la sPCA est supérieure à 0,2 .....	87
Tableau 18 : Clusters dont la valeur de corrélation avec la variabilité des individus en fonction de la période d'infestation est supérieure à 0,2 .....	89
Tableau 19 : Clusters co-évoluant avec les facteurs COC, OPG et POIDS.....	91

### 3. LISTE DES ABREVIATIONS

ACP (ou PCA) : Analyse en Composante Principale (Principal Component Analysis)

AFD : Analyse Factorielle Discriminante

AGV : Acides Gras Volatils

ANOVA : ANalysis Of Variance

ARN : Acide RiboNucléique

COC : COmptage Coccidies

ENVT : Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

FEC : Fecal Eggs Count

FROGS : Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution

GEMANEMA : Genetic Markers of Nematodes Management

GMQ : Gain Moyen Quotidien

Hc : *Haemonchus contortus*

IM : Intra-Musculaire

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

ISP : Infectiologie en Santé Publique

OMS : Organisme Mondial de la Santé

OPG : Œufs Par Gramme

OTU : Operational Taxonomy Unit

PB : paire de bases

PBT : Persistante, Bioaccumulable et Toxique (substance)

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLS-DA : Partial Least Squares Discriminant Analysis

SC : Sous-Cutané

SGI : Strongles Gastro-Intestinaux

TA : Temps d'Attente

Tc : *Trychostrongylus colubriformis*

UMR : Unité Mixte de Recherche

VO : Voie Orale

## INTRODUCTION

Un parasite est un petit organisme vivant aux dépens, sur, ou à l'intérieur d'un plus grand organisme appelé l'hôte. Parmi les parasites internes présents chez les moutons, on retrouve les strongles gastro-intestinaux, des vers parasites du système digestif.

A l'échelle de l'animal, ces vers sont à l'origine de signes cliniques importants et sont susceptibles d'entraîner la mort dans les cas les plus graves, causant, de ce fait, une baisse de productivité qui impacte tout l'élevage. Ces conséquences économiques non négligeables ont motivé, dès les années 1950, le développement dans le monde entier de moyens de lutte chimique : les anthelminthiques.

L'utilisation de ces molécules de synthèse a permis d'endiguer la prolifération et les répercussions économiques de ces parasites au sein de la filière ovine. Mais leur usage abusif et systématique a été tel qu'il a entraîné la sélection de vers ayant acquis des capacités de résistance à ces traitements, d'abord en Australie et en Nouvelle-Zélande, puis dans tous les pays producteurs, dont la France. Au fil des générations, ces vers résistants ont donné naissance à des populations résistantes, et la lutte chimique contre les strongles est devenue moins efficace.

Pour pallier à cette perte d'efficacité des traitements chimiques, la mise en place d'une utilisation raisonnée, associée à des méthodes alternatives, a été nécessaire. Le constat que certains individus étaient moins sensibles que d'autres à la présence de ces vers dans leur système digestif a amené à proposer une sélection des moutons génétiquement résistants aux strongles.

C'est en partie pour étoffer la compréhension de ces mécanismes de résistance et rechercher de nouveaux marqueurs associés à celle-ci, que des chercheurs se sont intéressés au microbiote ruminal de 2 lignées divergentes de moutons sélectionnés sur leur sensibilité aux nématodes. Le microbiote ruminal est un ensemble de micro-organismes commensaux vivant dans le rumen des moutons, participant à la nutrition de l'hôte, mais dont tous les rôles ne sont pas encore connus.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons tout particulièrement à deux espèces de strongles gastro-intestinaux du mouton, *Haemonchus contortus* et



*Trichostrongylus colubriformis*, et à une lignée de moutons de la race Romane, génétiquement sélectionnée pour sa résistance à *H. contortus*.

Existe-il une relation entre le microbiote ruminal de ces moutons et leur résistance à ces parasites ?

Dans notre première partie, nous établirons un état des lieux des connaissances sur ces parasites et des moyens de lutte existants pour les combattre, avant de nous intéresser au microbiote ruminal et ses interactions avec son hôte. Dans notre seconde partie, nous présenterons l'étude expérimentale menée dans l'optique de répondre à la problématique soulevée précédemment, et nos résultats.

# PARTIE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



# **1. LES STRONGLES GASTRO-INTESTINAUX EN ELEVAGE OVIN : IMPORTANCE ECONOMIQUE ET ETIOLOGIE**

## **1.1. Impact économique**

Les pertes financières et agricoles causées par le parasitisme ont une incidence importante sur la viabilité des élevages. Par exemple, les pertes annuelles dues au parasitisme en élevage ovin en Australie ont été estimées à plusieurs millions de dollars, comprenant les coûts des traitements mais également les pertes en production de viande, de laine, et celles dues à une mortalité non négligeable (Mcleod 1995). Une étude a montré l'influence du parasitisme sur l'appétit et le métabolisme des moutons. Il entraîne une baisse de leur gain moyen quotidien (GMQ), et ainsi une perte économique à la vente de la carcasse, de moins bonne qualité et moins lourde (Louie et al 2007).

Nous allons nous intéresser à une catégorie de parasites particulièrement présents en élevage ovin : les strongles gastro-intestinaux (SGI).

En élevage, le parasitisme et tout particulièrement les strongyloses gastro-intestinales sont reconnues comme une des premières maladies à impact économique fort, car entraînant d'importantes pertes de production, en qualité comme en quantité, partout dans le monde.

## **1.2. Les strongles gastro-intestinaux des ovins**

Les strongles gastro-intestinaux (SGI) des ruminants sont des vers parasites, de la famille des **Nématodes** (vers ronds) de l'ordre des Strongylida, qui se développent dans la paroi et dans la lumière de la caillette, ou des intestins, des Ruminants (Chartier 2000).

### **1.2.1. Des vers de la famille des Nématodes**

Les Nématodes font partie de l'embranchement des Helminthes avec les Cestodes (vers plats segmentés) et les Trématodes (vers plats non segmentés, tube digestif à 1 orifice).

Les Nématodes sont des vers cylindriques, non segmentés, pseudo-coelomates. Ils ont un tube digestif complet (2 orifices), ils ont des sexes séparés (dimorphisme sexuel prononcé), et se multiplient par reproduction sexuée uniquement.

Plus de 16 000 espèces sont décrites, dont la plupart à vie libre (saprophytes du sol), et les autres sont des parasites de plantes et d'animaux.

Leurs cycles biologiques sont monoxènes (le parasite n'a besoin que d'un hôte) ou hétéroxènes (le parasite a besoin de plusieurs hôtes successifs pour compléter son cycle).

### **1.2.2. Généralités sur les strongles gastro-intestinaux des ovins**

Ces vers sont responsables de maladies digestives d'origine parasitaire que l'on appelle les **strongyloses gastro-intestinales**. Ces maladies sont quasi exclusivement contractées au pâturage et sont à l'origine de troubles gastro-entériques (diarrhée), d'anémie, et d'amaigrissement. On parle de syndrome « Gastro-entérites parasitaires », que l'on décrira plus précisément dans la partie 1.5.

Nous nous intéressons ici seulement aux strongles digestifs parasites des ovins, présentés dans le tableau 1 suivant.

**Tableau 1 : Liste des strongles gastro-intestinaux des ovins, localisation, morphologie, nutrition et importance en France (d'après Chartier 2000; Bowman 1999; JACQUIET 2014)**

Localisation	Espèce	Morphologie Longueur	Nutrition	Importance (France)
Caillette	<i>Haemonchus contortus</i>	15 à 30 mm Visible à l'œil nu	Hématophage	++++ Là où il existe et quand conditions favorables
	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	8 à 12 mm brun	Larves histophages Adultes hématophages	+++
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Très petit, très fin 4 à 6 mm	Hématophage	++
Intestin grêle	<i>Cooperia curticei</i>	7 à 9 mm	Chymivore	+ à ++
	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Très petit, très fin 4 à 6 mm	Chymivore	+++
	<i>Nematodirus battus, N. filicollis</i>	Très fin 10 à 30 mm	Chymivore	+++ (agneau)
Gros intestin	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	12 à 22 mm Visible à l'œil nu	Chymivore	+/0
	<i>Chabertia ovina</i>	13 à 20 mm Visible à l'œil nu	Histophage	+

Les nématodes gastro-intestinaux des ovins sont présents dans le monde entier, mais selon les grandes zones climatiques, on observe une prédominance d'espèces variables.

En zones tempérées, les élevages de petits ruminants au pâturage sont majoritairement infestés par *Teladorsagia circumcincta* (espèce abomasale) et *Trichostrongylus colubriformis* (espèce intestinale) (O'Connor et al 2006). *Haemonchus contortus*, une autre espèce de l'abomasum, est moins fréquent dans les élevages des zones tempérées, car il tolère mal les basses températures et la sécheresse (O'Connor et al 2006).

En zones tropicales et sub-tropicales, *H. contortus* est très largement réparti et très pathogène, car son développement est optimal dans un climat chaud et humide. Il en est de même pour *T. colubriformis* (Chartier 2000).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons tout particulièrement à *Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubiformis*, car ce sont les espèces les plus problématiques en élevage ovin dans le monde.

#### *1.2.2.1. Généralités sur Haemonchus contortus*

*H. contortus* est un parasite de la caillette, il mesure jusqu'à 3 cm à l'âge adulte et est donc visible à l'œil nu lors d'autopsies. Le stade larvaire L4 et l'adulte sont tous deux hématophages, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent du sang de leur hôte. Au plus gros de l'infestation, la population présente chez un hôte peut lui soustraire un cinquième de son volume en globules rouges circulants par jour. Cette perte, difficilement compensable par l'hôte, va être à l'origine d'une anémie chronique, exacerbée chez des individus stressés ou mal nourris. Les fèces sont riches en œufs, 10 000 œufs par gramme (OPG) ou plus, car c'est une espèce très prolifique (Bowman 1999).

#### *1.2.2.2. Généralités sur Trichostrongylus colubiformis*

*T. colubiformis* par contre, est un parasite du duodenum, très petit (moins de 7 mm de long), et très fin, ressemblant à un cheveu (Bowman 1999). Le stade larvaire L3 peut survivre à l'hiver dans la pâture, et va infester les moutons lors de leur sortie d'étable au printemps. Cette espèce est chymivore, c'est-à-dire qu'elle se nourrit de chyme, substance liquide composée d'aliments en cours de digestion. L'infection est souvent asymptomatique, mais s'il est présent en très grand nombre (plus de 10 000), ce parasite peut entraîner une diarrhée aqueuse prolongée et débilitante, en particulier chez des individus stressés ou mal nourris. Le comptage des œufs dans les fèces dépasse rarement 5000 OPG car c'est un tout petit ver peu prolifique, et les fèces sont largement diluées par de l'eau (Bowman 1999).

### 1.3. Cycles évolutifs d'*Haemonchus contortus* et de *Trichostrongylus colubriformis*, et modes d'infestation

Comme ceux de tous les Nématodes gastro-intestinaux, les cycles évolutifs d'*H. contortus* et *T. colubriformis* sont **monoxènes**, c'est-à-dire que le parasite n'a qu'**un seul hôte**. Il se déroule en deux phases : une phase libre dans le milieu extérieur, la **phase exogène**, et une phase parasitaire chez l'hôte, la **phase endogène**, comme schématisé dans la figure 1.

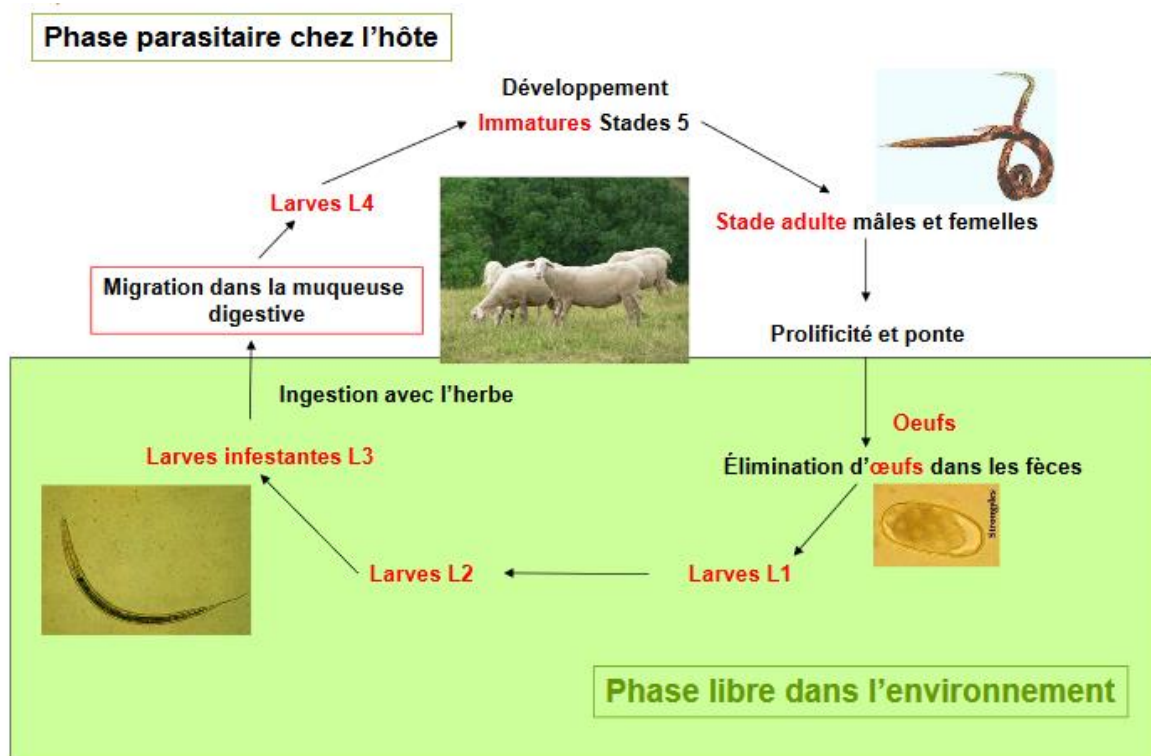


Figure 1 : Cycle monoxène des strongles gastro-intestinaux des ovins (d'après P. Jacquet, Parasitologie ENVT 2014)

#### 1.3.1. Infestation de l'hôte et description générale du cycle

L'infestation de l'hôte se fait par l'ingestion de larves infestantes (stade L3) présentes dans le pâturage.

Après l'ingestion, la larve migre dans la muqueuse digestive où elle mue de L3 à L4. L4 ressort dans la lumière de l'organe et donne un adulte immature (stade très fugace) puis devient un adulte mâle ou femelle.



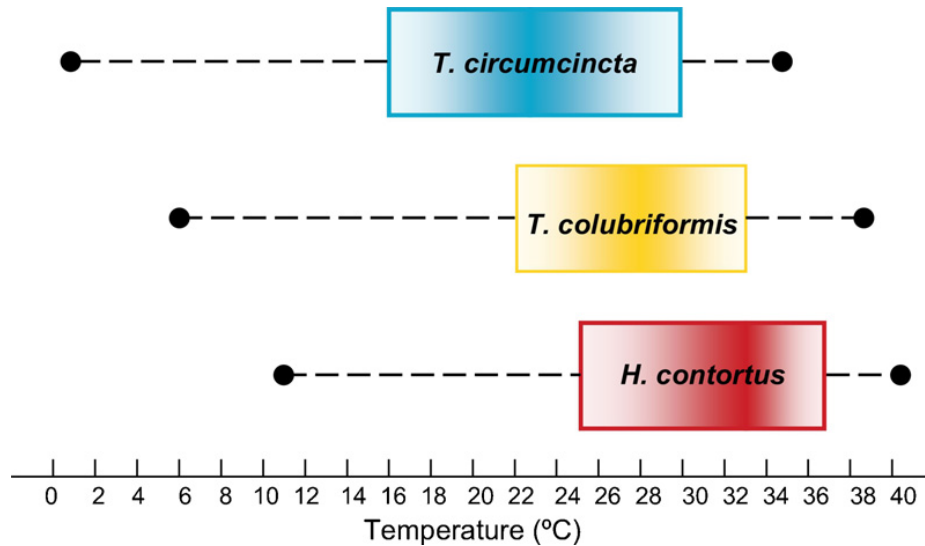
La durée entre l'ingestion et la ponte des premiers œufs est d'environ 3 semaines, c'est la période pré-patente. Entre la ponte et l'obtention de la larve infestante L3, il faut minimum 1 semaine, voire plus si il fait froid (4 semaines).

Tout le développement de l'œuf à L3 se fait dans les fèces.

### **1.3.2. Phase exogène du cycle : de l'œuf à la larve infestante L3**

L'œuf non embryonné, pondu par la femelle et éliminé par l'hôte dans les matières fécales, éclot en 12 à 24 heures selon les conditions climatiques, lorsque l'humidité et la température sont favorables (O'Connor et al 2006). La larve L1 se nourrit de microparticules et microorganismes présents dans les fèces et accumule des réserves pour muer en stade L2, 30 à 60 heures après l'éclosion. La larve L2, très active, se nourrit et accumule également des réserves. Elle mue de L2 à L3, 4 à 5 jours après l'éclosion. L3 reste à l'intérieur de la gaine de L2, elle ne se nourrit pas, mais utilise ses réserves glycogéniques et lipidiques pour se déplacer. Elle effectue une migration horizontale de quelques dizaines de cm pour s'éloigner des fèces et se retrouver ainsi hors de ce qu'on appelle l'anneau de répugnance. C'est la zone autour d'une défécation dans laquelle l'herbe ne sera pas ingérée par l'animal. La larve L3 effectue ensuite une migration verticale sur les brins d'herbes jusqu'à quelques cm du sol, en s'aidant du film de rosée. Ses chances d'être ingérée par l'hôte sont ainsi optimisées. C'est le stade de survie sur le pâturage.

Les matières fécales constituent un environnement saturé en humidité, propice au développement des œufs en stades L1 puis L2, mais soumis à des variations de température. Les conditions de température propices au développement des œufs ont été précisées par O'Connor et son équipe en 2006 pour trois espèces majeures (figure 2). Ainsi, on peut lire qu'une température comprise entre 18 et 30°C est en général propice au développement des stades larvaires de ces espèces de SGI. On note également qu'en dessous de 10°C, *H. contortus* ne peut pas se développer.



**Figure 2 : Influence de la température sur le développement des espèces de SGI majeures, de l'œuf non embryonné au stade infestant L3 (O'Connor et al 2006)**

Les boîtes représentent les optimums de température permettant le développement des œufs, et les lignes en pointillés représentent les températures auxquelles un œuf ne peut pas se développer mais peut survivre.

Le mode de survie de L3 sur les cinq à six premiers centimètres des brins d'herbe du pâturage explique l'impact néfaste du surpâturage des parcelles par les animaux. Le fait que les animaux soient obligés de se nourrir plus près du sol et des fèces augmente leur risque d'ingérer des larves infestantes.

Il y a une relation très forte entre l'intensité des infestations et la conduite de pâturage. C'est une des pistes pour essayer de limiter le risque d'ingestion des larves, dont nous reparlerons dans la partie 2.3 lorsque nous aborderons les moyens de lutte alternatifs contre ces parasites.

### **1.3.3. Phase endogène du cycle : de l'ingestion de la larve L3 à la ponte des œufs**

Comme nous l'avons écrit précédemment, l'ingestion de la larve infestante s'effectue par l'ingestion d'herbe. Suite à cette ingestion, la larve se déplace au sein des organes digestifs jusqu'à atteindre son organe cible. Dans l'organe qui le précède, la larve infestante

L3 se débarrasse de l'exuvie (la gaine de L2) (Hertzberg et al. 2002). Puis elle atteint la muqueuse digestive de son organe cible, dans laquelle a lieu une première mue, qui donne le stade larvaire L4. Puis une seconde mue s'effectue dans la lumière de l'organe cible, donnant un stade immature L5.

L'organe cible d'*H. contortus* est la caillette du mouton. Sa larve L3 se dégage dans le rumen. La larve L3 de *T. colubriformis* quant à elle, se dégage dans la caillette puis s'installe dans le duodénum.

Ce stade immature va acquérir la maturité sexuelle 1 à 2 jours après la contamination de l'hôte, lorsque les conditions extérieures sont favorables (cf 1.3.4). Puis se déroulent l'accouplement et la ponte.

*H. contortus* est une espèce très prolifique, qui peut se reproduire à raison de 5000 œufs par jour et par femelle. Le potentiel de contamination du pâturage est donc très important, surtout si les conditions de température et d'humidité sont favorables.

D'autres espèces sont moyennement prolifiques comme *Cooperia sp* et *Ostertagia sp*. Et d'autres encore le sont très peu, comme *Nematodirus sp* et *Trichostrongylus sp*, qui pondent environ une centaine d'œufs par jour et par femelle.

#### 1.3.4. Le phénomène d'hypobiose

Si les conditions climatiques ne sont pas favorables, on peut avoir une inhibition de l'évolution du stade larvaire chez l'hôte : c'est le **phénomène d'hypobiose** (Zajac 2006), une mise en état de vie ralentie physiologique. Ce sont les conditions climatiques qui prévalaient au moment du développement des formes libres (de l'œuf à L3) qui semblent conditionner le déclenchement de ce phénomène (Chartier 2000).

On a interruption du développement au stade L4 (le plus souvent) dans les glandes de la caillette, pendant plusieurs mois. Ce phénomène est saisonnier, il a lieu en hiver dans nos régions et concerne surtout *Ostertagia sp*, *Teladorsagia sp* et *H. contortus*.

Cela se traduit en Europe du Nord par des populations composées uniquement de stades L4 inhibés en hiver. Au printemps, lorsque les conditions climatiques sont de nouveau favorables au développement des stades libres, la situation bascule : c'est la **levée d'hypobiose**. En général cela se produit en douceur, sans dommage pour l'hôte, mais peut se traduire parfois par une maladie liée à une **levée d'hypobiose concomitante** : des dizaines de

milliers de larves se réveillent en même temps, ce qui peut être brutal pour l'organisme (cf partie 1.5.3).

### 1.3.5. La survie des larves L3 dans le milieu extérieur

La matière fécale est soumise à des facteurs environnementaux qui conditionnent la survie des larves : l'humidité, la température et l'oxygénation (Morgan et Van Dijk 2012).

- **L'humidité** : c'est le facteur essentiel car, même si les fèces peuvent sécher à l'extérieur, ils restent humides à l'intérieur, ce qui permet la survie des larves. Cette humidité va également dépendre de la pluviométrie, et du couvert végétal sur lequel la défécation se trouve. La mousse par exemple favorise une bonne conservation de l'humidité. Ainsi, la sécheresse est le facteur environnemental principal de mortalité des larves.
- **La température** : quand il fait très froid, cela peut freiner l'évolution des larves infestantes mais on a des variations selon les espèces. En effet, comme évoqué dans la partie 1.3.2, *H. contortus* se développe bien à 18°C mais peu en dessous de cette température, alors que d'autres espèces sont plus adaptées aux basses températures (8-10°C).
- **L'oxygénation** : le piétinement des fèces par les animaux favorise leur oxygénation, Les insectes bousiers jouent également un rôle dans l'oxygénation des fèces, par étalement et dispersion de ces dernières.

Lorsque les conditions climatiques sont réunies, certaines larves L3 peuvent donc survivre à l'hiver dans le milieu extérieur, puis être ingérées au printemps suivant. On appelle cette catégorie de larves, les **larves « transhivernantes »**.

## 1.4. Epidémiologie des strongyloses digestives ovines

### 1.4.1. Une distribution hétérogène des parasites au sein d'un troupeau

La répartition des parasites au sein de la population ovine n'est pas homogène. En effet, une petite proportion des moutons héberge une grande proportion des parasites du troupeau. En général 20% des hôtes hébergent 80% de la population totale des strongles digestifs du

troupeau, on parle de **distribution surdispersée** (Shaw et Dobson 1995). Cette distribution a deux origines :

- l'ingestion des larves qui se fait au hasard (« hot spot » de larves sur les pâtures).
- l'hétérogénéité de la résistance de l'hôte aux infestations, qui dépend de plusieurs facteurs dont l'âge, le statut physiologique, mais aussi le fond génétique.

#### 1.4.2. La résistance de l'hôte

La **résistance** d'un individu infesté est définie par sa capacité à réguler sa population de nématodes. Cela s'exprime par une réduction du développement de larves infestantes, un ralentissement de la croissance des nématodes, une réduction de la fertilité des vers femelles, et possiblement une expulsion de vers adultes (Stear et Wakelin 1998).

Le concept de résistance est à distinguer de celui de **résilience** qui est la capacité de l'animal à maintenir un niveau de production normal en dépit de la présence des vers. Par exemple, un individu infesté par *H. contortus*, un ver hématophage, va puiser dans ses réserves pour ajuster son nombre de globules rouges.

La résistance de l'hôte varie selon son **espèce**, par exemple les moutons sont en général plus résistants que les chèvres ; selon sa **race**, par exemple les races tropicales Barbados, Blackbelly et Ste-Croix présentent des aptitudes particulières à la résistance (Chartier 2000); et selon son **âge**. En effet, les jeunes animaux, au système immunitaire naïf, sont particulièrement sensibles au parasitisme et présentent des signes cliniques plus forts que les adultes, chez qui une certaine résistance semble s'installer au fil des infestations (Chartier 2000).

Le **stade physiologique** aussi influe sur la résistance de l'hôte. Cette dernière est remise en cause autour de la parturition, période pendant laquelle la brebis présente une baisse de son immunité, ce qui entraîne une augmentation de l'intensité d'excrétion des œufs. C'est le « periparturient rise » (O'Sullivan et Donald 1972). Si l'agnelage a lieu à l'extérieur, les œufs évoluent en larves infestantes et parasitent les agneaux nouveau-nés naïfs.

D'un individu à l'autre, la résistance n'est également pas la même. Il existe un aspect génétique à cette résistance, utilisé pour sélectionner des moutons plus résistants aux strongles. Cette notion est abordée plus en détail dans la partie 2.3.4.

### **1.4.3. Facteurs épidémiologiques liés au mode d'élevage**

Comme nous l'avons expliqué dans la partie 1.3, la contamination des individus se fait au pâturage, par ingestion d'herbe. Donc la gestion du pâturage est un facteur important de l'épidémiologie des strongyloses, et certaines pratiques sont considérées à risque, comme le sur-pâturage par exemple, dont nous parlerons plus en détail lorsque nous aborderons les conduites à risque et les mesures alternatives pour lutter contre ces parasites, dans la partie 2.3.

### **1.4.4. Facteurs épidémiologiques liés aux facteurs climatiques**

Sur un pâturage donné, et au cours d'une année, se succèdent différentes générations de larves. L'importance en nombre de chacune d'elles est en partie influencée par les conditions climatiques.

En sortie d'hiver, début de printemps, la génération présente est celle des larves L3 transhivernantes qui ont survécus à l'hiver. Leur nombre est influencé par la rigueur plus ou moins importante de l'hiver. En effet si la température est trop basse, les larves meurent, mais si l'hiver est clément, elles survivent (cf partie 1.3.5).

Vers le mois d'avril, les moutons sont mis à l'herbe sur ces pâtures contaminées la saison d'avant. Parmi eux, il y a des agneaux qui pâturent pour la première fois, naïfs vis-à-vis du parasite et donc très réceptifs, qui vont excréter énormément d'œufs (cf partie 1.4.2.).

Vers les mois de Mai-Juin, une nouvelle génération apparait alors, suite à l'ingestion des larves L3 transhivernantes. S'ensuivent des cycles de contamination du pâturage et d'infestation, entraînant un risque parasitaire majeur vers les mois de Juillet-Août. On parle de pic larvaire.

Ce risque est majoré lors d'étés chauds et humides, conditions idéales au développement des larves de SGI, comme précisé dans la partie 1.3.5.

L'automne est également une période clé, car c'est à ce moment que vont s'accumuler les larves dans les pâturages suite au pic larvaire de fin d'été, alors que les moutons continuent à pâture.

La figure 3 présente un exemple d'évolution du nombre d'œufs excrétés et de larves L3 d'*H. contortus* sur une pâture, au cours d'une année (Abbott et al 2012). Ce schéma peut être modifié selon certaines conduites d'élevage, comme la période d'agnelage (ici en hiver).

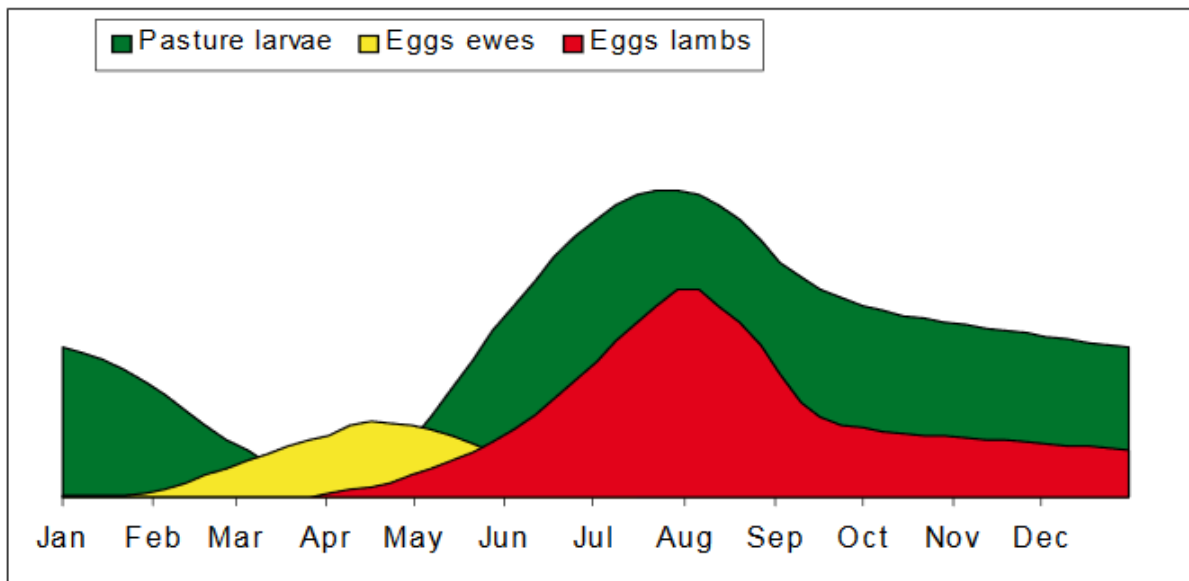


Figure 3 : Epidémiologie d'*H. contortus* chez des moutons au pâturage (d'après Abbott et al 2012)

Après avoir vu les modes de développement et de vie des strongles gastro-intestinaux, nous allons nous intéresser à leurs conséquences sur la physiologie de l'hôte.

## **1.5. Physiopathologie des strongles gastro-intestinaux des moutons**

### **1.5.1. Conséquences liées à la présence des vers**

La présence des vers a un certain nombre de conséquences pour l'hôte. Au sein du système digestif, ils vont avoir des actions traumatiques, chimiques, spoliatrices et antigéniques (Bowman 1999; Besier et al. 2016).

Tout d'abord, il y a des lésions de la muqueuse des organes digestifs cibles :

- Dans l'intestin on observe une abrasion des villosités de la muqueuse intestinale, à l'origine d'une perte d'efficacité d'absorption des nutriments,
- Dans la caillette, la destruction de cellules de la muqueuse qui règlent le pH, entraîne une augmentation du pH de la caillette et des phénomènes sécrétoires anormaux.

Ensuite, la motricité digestive est altérée, ce qui entraîne une diminution du temps de contact entre les aliments et la muqueuse. Ce sont des lésions de gastro-entérite souvent chronique.

Ces conséquences provoquent une maldigestion-malabsorption, à l'origine d'une baisse de production, par manque de nutriments absorbés.

Pour pallier à ces lésions cellulaires, l'hôte détourne une partie de ses ressources en protéines et énergie pour les réparer. Cette modification du métabolisme contribue également à la baisse de production.

Enfin, la présence des vers provoque des modifications dans le métabolisme de certaines hormones gastro-intestinales comme la cholécystokinine, ce qui diminue l'appétit et donc l'ingestion. Ceci altère encore une fois la production, par manque de ressources.

A tout ceci s'ajoute également le caractère spoliateur de certains SGI. *H. contortus* par exemple est hématophage, il se nourrit donc du sang de son hôte, entraînant un déficit en globules rouges, mais également en fer, d'où la difficulté à long terme pour l'individu de corriger cette anémie.

### **1.5.2. La réponse immunitaire des moutons face aux strongles**

La première ligne de défense est l'immunité innée avec les cellules épithéliales qui font « barrière ». Puis il y a une réponse immune adaptative de type Th2 (production d'anticorps) : il y a recrutement de cellules inflammatoires (éosinophiles et mastocytes), et production d'anticorps circulants (IgG et IgA) par les plasmocytes dans le mucus des animaux parasités (Hendawy 2018). Cette réponse permet de limiter petit à petit la ponte, le développement et l'installation des larves (Jacquiet 2006).

### **1.5.3. Manifestations cliniques des strongyloses**

Le tableau clinique d'animaux infestés par des SGI est dominé par deux syndromes : un syndrome digestif, plus ou moins associé à un syndrome anémique si un parasite hématophage est présent. Ces manifestations peuvent être aiguës ou chroniques, selon l'âge de l'individu, la sévérité de l'infestation et l(es) espèce(s) parasite(s) impliquée(s).



Les jeunes agneaux sont souvent sujets à des manifestations aiguës car subissent une infestation massive et inédite pour leur système immunitaire. Ils présentent alors souvent un abattement important, une diarrhée intermittente de consistance plus ou moins liquide, un amaigrissement rapide et une déshydratation. Ce tableau clinique peut entraîner la mort d'un individu très jeune ou faible.

Une levée d'hypobiose concomitante et massive, de larves L4 enkystées chez des brebis parasitées l'année d'avant, peut entraîner les mêmes symptômes et les mêmes risques de mortalité lors de la mise à l'herbe au printemps (Abbott et al. 2012).

Les strongyloses intestinales dues *T. colubriformis* sont caractérisées par un syndrome digestif entéritique : on observe une diarrhée importante et liquide, accompagnée d'un appétit irrégulier, une perte de poids et, dans les cas les plus graves, la mort (Kyriazakis et al. 1996; Abbott et al. 2012).

Lors d'infestation par *H. contortus*, un syndrome anémique prédomine dans le tableau clinique. L'anémie due à une perte de sang entraîne un éclaircissement des muqueuses qui deviennent pâles, voire couleur porcelaine. Ce phénomène est facilement observable au niveau des conjonctives oculaires. Cette perte sanguine entraîne également une baisse du nombre de globules rouges, une hypoalbuminémie et une hypoprotéinémie à l'analyse sanguine (Besier et al. 2016).

Un signe caractéristique est le signe de la bouteille, dû à l'hypoprotéinémie et observé dans la région de l'auge. Ce signe apparaît lors d'atteinte grave, et est accompagné d'un état cachexique, parfois suivi de la mort de l'animal (Chartier 2000; Abbott, Taylor et al 2012).

Un syndrome digestif est rarement observé lors d'infestation exclusive à *H. contortus*.

Une infestation sévère peut entraîner la mort de l'animal, surtout s'il est jeune ou débilité.

Lorsque les animaux sont exposés tous les jours à de faibles doses de parasites, ils présentent une atteinte chronique et sub-clinique, dominée par une baisse de production pas toujours décelable par l'éleveur. Le syndrome anémique en cas d'Haemonchose se met en place lentement et tardivement.

## 1.5.4. Diagnostic des strongyloses gastro-intestinales

### 1.5.4.1. Dépistage clinique et épidémiologique

Comme vu précédemment, les strongyloses gastro-intestinales sont des maladies saisonnières, le plus souvent acquises au pâturage, affectant plus les agneaux et les jeunes brebis, favorisées par des conditions climatiques telles qu'un hiver doux ou un été chaud et humide (cf parties 1.3 et 1.4).

De plus, ces maladies peuvent entraîner des manifestations cliniques telles qu'un mauvais état général, une perte d'appétit, des troubles digestifs, ou une anémie (cf partie 1.5.3).

Lorsque ces caractéristiques épidémiologiques et cliniques sont présentes, une strongylose gastro-intestinale peut en être responsable.

Mais ces signes ne sont pas pathognomoniques, et peuvent être dus à d'autres maladies, entraînant également un syndrome diarrhéique (comme par exemple une coccidiose intestinale, une entérite bactérienne (ex : Salmonellose), ou virale (ex : BVD), etc), ou un syndrome anémique (comme par exemple une Fasciolose, une Babésiose, etc), sans oublier la sous-alimentation, qui peut provoquer les mêmes symptômes par manque de ressources alimentaires.

Une suspicion clinique et épidémiologique doit donc être confirmée par des examens complémentaires.

Le seul examen clinique permettant un diagnostic de certitude est l'**autopsie**, dans le cas des strongles visibles à l'œil nu comme *H. contortus*, ou causant des lésions caractéristiques comme des nodules dans la caillette lors d'Ostertagiose par exemple.

En cas d'Haemonchose, en plus de signes évidents d'anémie comme la couleur des muqueuses oculaires, plus ou moins associé à un état de maigreur ou cachexie de la carcasse, on peut observer de grands vers de couleur rouge, d'environ 15 à 30 mm de long, présents sur la muqueuse de la caillette.

En cas de Trichostrongylose, les vers ne sont pas visibles à l'œil nu, mais on peut trouver des lésions d'entérite qui, associées aux signes cliniques pré-mortem, peuvent être évocateurs de cette maladie, sans pour autant la confirmer sans examen supplémentaire.

D'autres examens complémentaires sont possibles, du vivant de l'animal, pour diagnostiquer une strongylose.

#### *1.5.4.2. Diagnostic de laboratoire*

Les examens de laboratoire sont un outil indispensable à la gestion des strongyloses gastro-intestinales, car ils permettent de caractériser qualitativement et quantitativement le ou les parasites présents, mais aussi de vérifier l'efficacité des moyens de lutte mis en place (dont nous développerons les aspects dans la partie 2).

#### **L'analyse coproscopique, ou coproscopie**

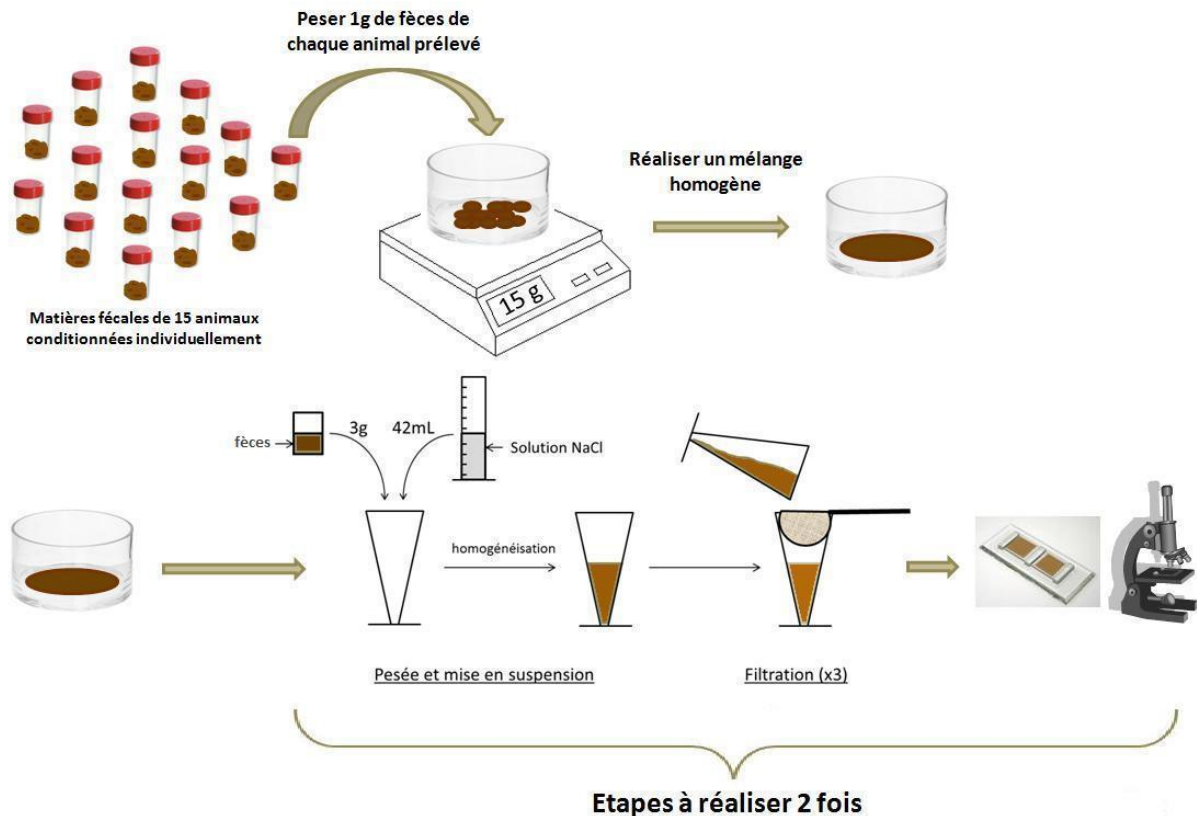
La coproscopie est une analyse macroscopique ou microscopique de matières fécales dans le but de mettre en évidence des éléments parasitaires (œufs ou stades larvaires selon le parasite), de façon qualitative et quantitative.

Elle permet ainsi d'objectiver la présence d'œufs de SGI dans les fèces des animaux. Cependant, seul l'œuf de *Nematodirus* est reconnaissable par sa taille. Les autres œufs de strongles digestifs sont trop similaires pour permettre l'identification de l'espèce présente (Hendrix et Robinson 2012). C'est donc une coproscopie quantitative qui est réalisée dans le cadre des SGI.

Il a été montré que le comptage des œufs dans les matières fécales était corrélé à la charge parasitaire intestinale du mouton (Cabaret et al 1998). Cette analyse, simple à réaliser, et nécessitant peu de matériel, est donc intéressante pour évaluer le risque parasitaire.

Le plus souvent, on réalise une coproscopie de mélange en prélevant 5 à 10 individus, si possible homogènes en âge et état physiologique. Cela est plus représentatif de l'état de santé du troupeau, moins dispendieux pour l'éleveur que de faire 10 analyses individuelles, et les résultats sont corrélés à ceux obtenus avec des coproscopies individuelles (Bonfont et Canellas 2014).

La technique la plus souvent utilisée est celle de Mac Master modifiée par Raynaud (Raynaud et al. 1979), illustrée dans la figure 4. C'est une méthode d'enrichissement par flottaison dont le principe est de concentrer les éléments parasitaires à la surface par dilution du prélèvement fécal dans une solution de densité plus élevée. Une lecture quantitative est ensuite réalisée sur une lame de Mac-Master.



**Figure 4 : Méthode de réalisation des coproscopies de mélange, selon la technique de Mac Master modifiée (d'après Bonnefont, Canellas 2014)**

Afin d'évaluer plus précisément le risque parasitaire, des seuils de nombre d'œufs par gramme (OPG) comptés lors d'une coproscopie ont été retenus et corrélés à des niveaux d'infestation parasitaire (Brard, Chartier 1997), et sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Relation niveau d'infestation - excrétion fécale en OPG pour les strongyloses digestives**

<b>Intensité d'excrétion fécale d'œufs de SGI (OPG)</b>	<b>Niveau d'infestation parasitaire par les SGI</b>
<b>&lt; 500</b>	Faible
<b>500 - 1000</b>	Modéré
<b>1000 - 2000</b>	Elevé
<b>&gt; 2000</b>	Très élevé

Cependant, ces seuils sont à nuancer, car l'excrétion fécale est liée au potentiel de ponte du parasite présent, à la sensibilité de l'animal à ce parasite, et à son immunisation, comme évoqué dans les parties 1.2.2, 1.4.2 et 1.5.2. Cet outil semble donc plutôt justifié chez de jeunes individus (Lequeux et Chauvin 2018).

En général, un seuil faible n'entraîne pas de mise en place de traitement, à la différence d'un seuil élevé ou très élevé. Lors d'un seuil d'infestation modéré, la décision de traitement va être influencée par des facteurs épidémiologiques, cliniques, et économiques.

### **Dosage du pepsinogène sanguin**

Le pepsinogène est une pro-enzyme sécrétée par les cellules du fundus de la caillette, dont l'activation est inhibée par l'augmentation de pH provoquée par la présence de SGI dans la caillette (cf 1.5.1). Le pepsinogène sanguin est donc un marqueur indirect de l'intensité des lésions de l'épithélium de la caillette. Il permet ainsi une évaluation indirecte du parasitisme de la caillette.

Cependant, beaucoup de paramètres interfèrent dans cette corrélation, comme par exemple l'âge de l'individu, son niveau d'immunisation, ou son alimentation (Roerber et al 2013). Cette technique est peu utilisée par les vétérinaires, surtout en élevage ovin.

D'autres techniques de laboratoire existent pour évaluer la charge parasitaire en SGI, comme la coproculture (mise en culture d'œufs pour identifier les larves) ou le comptage de larves L3 sur les pâtures, mais ces techniques ne sont jamais utilisées sur le terrain.

Maintenant que nous avons décrit l'épidémiologie et la pathogénie des strongles gastro-intestinaux, nous allons voir les moyens de lutte qui ont été développés depuis les années 1950 pour les combattre.

## **2. MOYENS DE LUTTE CONTRE LES STRONGLES GASTRO- INTESTINAUX**

Pour lutter contre les strongles gastro-intestinaux (SGI), le moyen traditionnel est chimique. Il consiste en l'administration de traitements vermifuges aux animaux de façon thérapeutique, métaphylaxique ou prophylaxique selon la stratégie adoptée par l'éleveur.

### **2.1. Outils de lutte chimique : les strongicides utilisables chez les ovins en France**

Les strongicides sont un ensemble de molécules à activité vermifuge ciblant les SGI, et sont regroupées en cinq familles pharmacologiques :

- Les Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles
- Les Imidazothiazoles
- Les Lactones macrocycliques : avec deux sous-familles : les avermectines et les mylbémécines
- Les Salicylanilides
- Les AADs (dérivés amino amino-acétonitrile)

Les trois premières familles sont les plus utilisées et les plus présentes sur le marché pharmaceutique.

La dernière famille est seulement représentée par une molécule : le Monépanel, actuellement indisponible en France. Nous ne décrivons donc pas le mode d'action de cette molécule.

#### **2.1.1. Les différents strongicides et leur mode d'action**

##### *2.1.1.1. Les Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles*

Les Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles inhibent la polymérisation de la bêta-tubuline en microtubules et altèrent ainsi le microsquelette parasite. Ces strongicides sont rapidement éliminés par l'organisme, il n'y a donc pas de rémanence de ces produits.

Il existe des bolus, qui peuvent être à libération continue ou séquentielle.

Les Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles disponibles en élevage ovin en France sont décrites dans le tableau 3. Les restrictions d'utilisation majeures concernent les femelles laitières et sont précisées dans la dernière colonne. En effet, beaucoup de molécules sont interdites chez cette catégorie d'animaux (noté NON), ou autorisées (noté OUI) mais soumises à des temps d'attente (TA).

**Tableau 3 : Spectres d'action, posologies et restriction d'utilisation des Benzimidazoles et Pro-benzimidazoles disponibles en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014)**

Molécule (Spécialité)	SGI Adulte, L4, œufs • +/- hypobiose	Strongles pulmonaires	Moniezia expansa	Faciola hepatica adulte	Dicrocoelium lanceolatum adulte	Utilisable chez les femelles laitières +/- TA lait
Fenbendazole (ex :Panacur®)	• 5 mg/kg VO					OUI
	• 10 mg/kg VO					8,5j
Oxfendazole (ex :Synanthic®)	• 5 mg/kg VO					OUI 8j
Albendazole (ex :Valbazen®)	3,8 mg/kg VO					NON
	7,5 mg/kg VO					
	15 mg/kg VO					
Mébendazole (ex :+ Closantel : Supaverm®)	• 15 mg/kg (+ 10 mg/kg) VO					NON
Nétobimin (ex :Hapadex®)	• 7,5 mg/kg VO					OUI
	• 20 mg/kg VO					10 traites

TA : temps d'attente ; SGI : strongles gastro-intestinaux ; VO : voie orale

L'efficacité sur les Larves inhibées L4 est de 50 à 70%.

#### 2.1.1.2. Les Imidazothiazoles

Cette famille est représentée par une seule molécule : le Lévamisole. C'est un agoniste nicotinique qui paralyse les vers sans les lyser. Ce strongicide est rapidement éliminé par l'organisme, il n'y a donc pas de rémanence.



Il existe des bolus de Lévamisolé (Chronomintic®). Ils contiennent une dose curative et une dose larvicide, qui diffusent pendant 90 jours dans l'organisme.

L'un des avantages de cette molécule est sa marge de sécurité, mais l'activité est limitée aux SGI adultes, il n'y a pas d'activité sur les larves inhibées L4.

Les modalités d'utilisation et le spectre d'action de cette molécule sont décrits dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Spectre d'action, posologie et restriction d'utilisation de l'Imidazothiazole disponible en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014)**

Molécule (Spécialité)	<b>SGI Adulte</b>	Strongles pulmonaires	Moniezia expansa	Faciola hepatica adulte	Dicrocoelium lanceolatum adulte	Utilisable chez les femelles laitières +/- TA lait
Lévamisole (ex :Lévisole injectable®, Lévamisole 3,75%®)	7,5 mg/kg IM ou VO					NON

*TA : temps d'attente ; SGI : strongles gastro-intestinaux ; VO : voie orale ; IM : intra-musculaire*

### 2.1.1.3. Les Lactones macrocycliques

Cette famille regroupe les Avermectines (ivermectine, doramectine, éprinomectine) et les Milbémycines (moxidectine). Ces quatre molécules sont qualifiées d'endectocides : elles sont très efficaces contre les nématodes des ovins (sur les adultes et les larves, dont les L4 en hypobiose) mais également contre certains parasites externes des moutons, comme des agents de gales (*Psoroptes ovis* et *Sarcoptes scabiei*), les poux *Melophagus ovinus*, et les larves des mouches *Hypoderma sp* et *Oestrus ovis*. Mais elles n'ont aucune action sur les cestodes et les trématodes (Roos et al. 1993). Selon la voie d'administration que l'on choisit, l'efficacité d'action sur ces parasites externes peut varier. Par exemple, l'ivermectine en Pour-on a une action sur les poux piqueurs et broyeurs, alors que l'ivermectine en injection aura une activité uniquement sur les poux piqueurs.

Le mode d'action des endectocides n'est pas très clair. Ce que l'on sait, c'est qu'ils se fixent sur les récepteurs au glutamate des canaux chlore des synapses neuromusculaires des nématodes. Cela provoque entre autre une paralysie des muscles du pharynx, entraînant la mort du nématode.

Ce sont des molécules lipophiles. Elles se fixent sur les tissus graisseux avec un relargage progressif, ce qui explique leur rémanence. Cette rémanence varie de 2 à 17 semaines selon la molécule utilisée et le parasite.

Comme pour les Imidazothiazoles, elles offrent une bonne sécurité d'emploi.

Les endectocides sont interdits chez les femelles en lactation, sauf l'éprinomectine (Eprinex Pour-on®, qui impose un temps d'attente, ou Eprecis® en injectable, qui n'a pas de temps d'attente).

Le tableau 5 résume les molécules disponibles en élevage ovin.

**Tableau 5 : Spectres d'action, posologies et restriction d'utilisation des lactones macrocycliques disponibles en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014)**

Molécule (Spécialité)	SGI Adulte	Strongles pulmonaires	<i>Oestrus ovis</i> +/- • <i>Hypoderma</i> sp.	<i>F.hepatoca</i> et <i>D. lanceolatum</i>	<i>Moniezia expansa</i>	<i>Psoroptes ovis</i> +/- • <i>Sarcoptes scabiei</i>	<i>Melophagus ovinus</i>	Utilisable chez les femelles laitières +/- TA lait
Ivermectine (ex :Ivomec®)	0,2 mg/kg VO, SC					• 0,2 mg/kg Pour-on, SC		NON
Eprinomectine (ex :Eprinex®, Eprecis®)	0,5 mg/kg Pour-on							OUI 7j
	0,5 mg/kg injection							
Doramectine (ex :Dectomax®)	0,2 mg/kg IM					0,2 mg/kg IM		NON
Moxidectine (ex :Cydectine 0,1%, Cydectine 1%®, Cydectine LA 2%®)	0,2 mg/kg VO							NON
	0,2 mg/kg SC							
	1 mg/kg SC							

*TA : temps d'attente ; SGI : strongles gastro-intestinaux ; VO : voie orale ; IM : intra-musculaire ; SC : sous-cutané*

Les endectocides ont eu un énorme succès auprès des vétérinaires et des éleveurs car :

- premièrement, les quatre molécules sont disponibles en Pour On, ce qui facilite la voie d'administration.
- deuxièmement, leur succès vient principalement de leur rémanence. Comme on a pu le voir précédemment, les autres familles ne présentent pas ou peu de rémanence contrairement aux endectocides. Or une bonne rémanence est intéressante lorsque l'on fait évoluer des animaux sur des parcelles que l'on sait infestées. Tout le temps que l'animal sera sous la protection de la rémanence du produit, toutes les larves seront détruites.

Si l'on prend le cas de la Cydectine® par exemple, il existe pour les moutons une forme de moxidectine longue action contre *H. contortus*. Cette longue action est permise grâce au mélange de la Moxidectine à un excipient qui va permettre un relargage lent du principe actif.

On réalise une injection en SC sous l'oreille de Cydectine® et le principe actif va diffuser lentement jour après jour pendant 111 jours. Cela signifie que pendant 4 mois, les larves ingérées par l'animal seront détruites. De plus, après les 111 jours, si l'animal ingère des larves, il leur faudra 30 jours pour émettre des œufs. Ce qui signifie qu'en réalité, après l'injection l'animal est immunisé 141 jours, soit plus de 4 mois.

#### 2.1.1.4. *Les Salicylanilides*

Cette famille de strongicides a pour mode d'action d'inhiber la phosphorylation oxydative au niveau des mitochondries, ce qui prive le parasite d'énergie. Ces strongicides ont la particularité de se fixer sur l'albumine plasmatique. Par conséquent, la rémanence de ces produits est de l'ordre de 4 à 6 semaines selon le parasite.

Comme ils se fixent sur l'albumine plasmatique, leur activité strongicide est limitée aux strongles hématophages uniquement. De ce fait, ils auront également une action sur *Fasciola sp.* et sur *Oestrus ovis*.

Pour compléter leur action, on les utilise le plus souvent en complément d'une Benzimidazole. C'est le cas par exemple du Supaverm® (Closantel + Mébendazole) qui est une combinaison des deux familles de molécules pour pouvoir agir sur les strongles hématophages et non hématophages. Ces spécialités ne sont pas renseignées dans le tableau 6 suivant.

Le tableau 6 présente les deux molécules de cette famille disponibles en élevage ovin.

**Tableau 6 : Spectres d'action, posologies et restriction d'utilisation des Salicylanilides disponibles en élevage ovin (d'après JACQUIET 2014)**

Molécule (Spécialité)	<b>SGI hématophages Adulte, L4 et hypobiose</b>	Strongles pulmonaires	Moniezia expansa	Faciola hepatica adultes et larves	Dicrocoelium lanceolatum adulte	Utilisable chez femelles laitières +/- TA lait
Closantel (ex :Flukiver®, Seponver®)	5 mg/kg SC, 10 mg.kg VO					NON
Nitroxynil (ex:Dovenix®)	10 mg/kg SC					NON

*TA : temps d'attente ; SGI : strongles gastro-intestinaux ; VO : voie orale ; SC : sous-cutané*

### 2.1.2. Pratiques d'utilisation des strongicides et limites

Traditionnellement, la lutte contre les SGI est menée grâce à une utilisation répétée tout au long de l'année des strongicides présentés précédemment. Différentes stratégies sont choisies selon le mode d'élevage pratiqué par l'éleveur, et le contexte épidémiologique dans lequel s'inscrit son cheptel.

Le plus souvent, tous les animaux sont traités simultanément à deux moments clés de l'année : la mise à l'herbe au printemps et la rentrée en bergerie en début d'hiver. Les restrictions d'usage de certaines molécules et le spectre élargi de certaines autres ont poussé les éleveurs à choisir une molécule qu'ils trouvaient efficace et pratique, à la réutiliser à chaque traitement, et ce pendant plusieurs années. Ces pratiques ont petit à petit fait apparaître des résistances chez les SGI, rendant ces molécules de moins en moins efficaces.

## 2.2. Résistance aux strongicides

### 2.2.1. Définition, origine et danger

Définition de résistance par l’OMS : Une population chimio-résistante est une population de parasites (soit certains représentants de l’espèce) ayant génétiquement acquis la capacité de résister à des concentrations d’antiparasitaires habituellement létales pour des individus de cette espèce.

Une utilisation d’antiparasitaire irraisonnée (automatique, sans stratégie, sans alternance médicamenteuse) a sélectionné des individus parasites non tués par la molécule utilisée. Ce phénomène est observé en France et dans tous les pays producteurs (Geurden et al. 2014; Jacquiet et al. 2014).

C’est un phénomène évolutif qui résulte d’une sélection génétique. Des individus résistants, préexistants et peu nombreux sont favorisés par une pression de sélection : l’utilisation des anthelminthiques. Plus la pression de sélection est forte plus ce phénomène va être rapide. Le parasite peut exprimer une chimiorésistance vis-à-vis d’une molécule, d’une famille de molécules, voire de plusieurs familles (Chartier et al. 2018; Ravinet et al. 2017).

C’est un processus lent, sur plusieurs dizaines d’années, mais une fois qu’il est enclenché, la réversion de la résistance est peu probable et compliquée. Il ne suffit pas d’arrêter l’utilisation d’une molécule.

### 2.2.2. Ecotoxicologie des anthelminthiques

Il existe plus de 300 espèces d’insectes qui vivent au contact des matières fécales des ruminants (Coléoptères et Diptères) ainsi que les vers de terre et Nématodes du sol. Leur rôle est de dégrader les fèces : ils recyclent la matière organique (dilacération, aération et enfouissement): c’est appelé la **pédofaune**. Cette pédofaune coprophage est à la fois source de biodiversité et nécessaire au recyclage de la matière organique sur un pâturage.

Les effets néfastes des traitements antiparasitaires sur la pédofaune (quand ils sont avérés) sont liés à plusieurs facteurs, dont l’activité intrinsèque de la molécule. Par exemple, les endectocides ont un spectre d’activité très large, qui agit sur les Nématodes et

Arthropodes, mais ils ont également un effet délétère sur les Diptères, les Coléoptères et les Abeilles, insectes non cibles du traitement (McKellar 1997; Pioz et Vidau 2018).

Les molécules actives ou leurs métabolites sont principalement rejetés dans l'environnement par l'urine et les fèces des animaux traités, et selon la rémanence de la molécule chez l'hôte, celle-ci peut être rejetée quotidiennement pendant des jours voire des semaines. D'autres sont persistantes dans l'environnement car leur dégradation est lente, influencée par des facteurs externes comme la pluie, le piétinement ou le rayonnement UV.

Toutes ces substances sont regroupées sous l'appellation de « **substances persistantes, bioaccumulables et toxiques (PBT)** » et leur usage est désormais règlementé ou en cours de l'être (Lumaret et Kadiri 2018).

Pour limiter l'apparition de résistances aux anthelminthiques (et ainsi préserver leur efficacité) et l'impact environnemental des traitements chimiques, des alternatives ont été développées pour lutter contre les strongles gastro-intestinaux autrement (Hoste et al 2003).

### **2.3. Solutions alternatives aux strongicides**

Pour lutter contre les résistances, on peut travailler sur plusieurs axes : modifier les pratiques d'élevage pour **éliminer les conduites à risque, éliminer les strongles gastro-intestinaux** et **supprimer les sources de contamination**, et/ou tenter **d'augmenter la résistance des individus**.

#### **2.3.1. Eliminer les conduites à risque**

Une des conduites les plus à risque est le **surpâturage**, comme évoqué dans les parties 1.3.3 et 1.4.3. En effet, le surpâturage augmente le risque d'ingestion de larves car, au fur et à mesure du pâturage, la quantité d'herbe s'amenuise et les animaux vont manger de plus en plus près des défécations et de plus en plus près du sol (là où se trouvent les larves). Il faut donc éviter la conduite sur pâture unique et favoriser la **rotation de pâture**.

De même, il est risqué de faire pâturer de jeunes animaux encore naïfs sur une parcelle infestée, car nous avons vu dans la partie 1.4.2 que les jeunes avaient un fort taux d'excrétion d'œufs, ils favorisent donc la dissémination du parasite sur la parcelle. Il faut donc leur éviter une parcelle récemment contaminée par un autre lot, ou contaminée la saison d'avant et encore riche en larves L3 transhivernantes, suite à un hiver doux par exemple (cf 1.4.4).

On limite ce risque en mettant les jeunes en contact avec des adultes (vache et broutard en élevage allaitant par exemple). Ce mode de conduite est un facteur limitant du parasitisme car les larves ingérées par les mères résistantes ne seront pas ingérées par les jeunes. De ce fait, les parasites feront moins d'œufs et les jeunes auront moins de risques d'être infestés.

Enfin, la **transhumance** peut être une conduite à risque, car les pâtures d'estive sont partagées par différents troupeaux. Cependant, les pâturages d'estives ne sont pas utilisés pendant 8 mois par an, c'est un peu long pour les larves, qui ne résistent pas. Il y a donc une rupture de contamination. Si les animaux ne sont pas infectés à la montée en estive, il n'y a que très peu de risques qu'ils se contaminent sur ces pâtures. Par contre si on amène un animal contaminé sur cette pâture, on peut avoir une contamination des autres animaux par contamination du pâturage (Cabaret et Nicourt 2018).

### 2.3.2. Eliminer les strongles gastro-intestinaux

Pour éliminer les strongles gastro-intestinaux, on peut penser à rationaliser l'utilisation des médicaments anthelminthiques afin de diminuer les sélections de souches résistantes, mais on peut aussi penser à modifier l'alimentation de l'hôte.

En effet il a été prouvé que l'alimentation pouvait avoir une influence sur le développement des parasites et sur la résistance de l'hôte (Coop et Kyriazakis 2001). Par exemple, l'usage d'alicaments a été développé : il s'agit de **fourrages bioactifs** qui contiennent des **tannins** aux propriétés anthelminthiques (Hoste et al. 2006; 2008). Ces plantes contiennent des métabolites secondaires dont les effets bénéfiques sont supérieurs à leurs apports nutritionnels directs : on dit qu'ils sont **nutraceutiques** (Hoste et al. 2015).



Les tannins sont des polyphénols hydrosolubles qui peuvent précipiter les protéines d'une solution aqueuse. En fonction de leur structure, ils peuvent être séparés en deux catégories :

- les tannins hydrolysables (esters d'acide gallique ou ellagique facilement hydrolysables)
- et les tannins condensés (polyphénols de haut poids moléculaire, souvent polymères ou oligomères d'unités monomériques de flavan-3-ols) (Hoste et al. 2006)

Le sainfoin est un bon exemple de fourrage bioactif : les tannins qu'il contient empêchent le dégagement des larves L3 de nématodes dans le rumen, et empêchent ainsi le développement d'œufs en larve L3 (Brunet et Hoste 2006). Des fabricants d'aliments se sont donc mis à fabriquer des bouchons de sainfoin.

Une légumineuse est également étudiée pour ses propriétés anthelminthiques : le lupin doux. Sa faible teneur en alcaloïdes n'est pas toxique pour l'animal, mais une étude a montré sa toxicité *in vitro* sur *H. contortus* : les stades larves sont paralysés et leur développement est inhibé (Bouquet 2016).

### 2.3.3. Gérer les sources de contamination

On peut tout d'abord tarir les sources de contamination par une **gestion agronomique des pâtures** : par exemple, des éleveurs mélangent bovins et ovins, ce qui diminue la pression parasitaire pour une espèce donnée. En effet, les larves parasites des bovins ingérées par les ovins sont en quelque sorte « perdues » pour le parasite, puisqu'elles ne pourront pas se développer chez le mouton, qui n'est pas l'hôte adapté. Inversement, les larves de parasites de moutons ingérées par les bovins ne survivront pas. La cohabitation d'espèces est donc une solution intéressante pour diminuer la pression parasitaire d'une pâture (Hoste et al 2003). Cela permet de réduire le risque parasitaire par la réduction de la densité larvaire.

On peut également utiliser la mortalité naturelle des larves, qui sont peu résistantes dans le milieu extérieur. Pour cela il faut mettre en place une **rotation de pâture**, afin d'introduire des animaux sur des parcelles naturellement assainies par une période de repos (Torres-Acosta et Hoste 2008).

De même, une alternance pour une même parcelle entre fauche et pâturage (utilisation d'une parcelle pour la fauche au printemps puis pour le pâturage à l'été) peut être une stratégie à envisager. Les larves infestantes ne voient pas d'animaux au printemps, ce qui complique leur survie. Mais, attention, il n'y a pas forcément d'assainissement complet de la parcelle.

Par ailleurs, certaines recherches sur des larves infestantes de strongles gastro-intestinaux ont montré qu'il existe des **champignons prédateurs de ces larves**, dont le développement se retrouve bloqué lorsqu'ils entrent en contact. Le mycélium produit des pièges pour capturer puis tuer les larves (Larsen et al. 1998). L'espèce la plus étudiée est *Duddingtonia flagrans*, dont les bénéfices n'ont pas encore été complètement établis in-vivo.

#### **2.3.4. Augmenter la résistance de l'hôte**

##### **- Grâce à la vaccination**

A ce jour, un seul vaccin a été commercialisé, seulement en Nouvelle-Zélande et en Australie, qui protège exclusivement les moutons contre l'Haemonchose. Il s'agit du vaccin BarberVax®, qui entraîne une mortalité importante des vers et une baisse de fécondité des vers femelles.

##### **- Grâce à la sélection génétique d'animaux naturellement résistants**

La résistance d'un individu infesté est définie par sa capacité à réguler sa population de nématodes. Cela s'exprime par une réduction du développement de larves infestantes, un ralentissement de la croissance des nématodes, une réduction de la fertilité des vers femelles et possiblement une expulsion de vers adultes (Hoste et al. 2006). Cette résistance est principalement évaluée par le FEC (fecal eggs counts : intensité de l'excrétion fécale en œufs par gramme (OPG)), finement corrélée à la charge parasitaire des jeunes ovins. Ce caractère semble héritable (Douch et al. 1995; Douch et Windon 1996).

On essaie donc, dans les centres de recherche, de sélectionner des béliers pour lesquels les taux d'excrétion sont faibles, afin de transmettre ce caractère génétique à la descendance (Jacquiet 2012; Moreno-Romieux 2016). C'est ainsi qu'a été obtenue la lignée de moutons de race Romane sur laquelle nous avons travaillé (cf partie expérimentale).

Un autre type de sélection est envisageable, en s'intéressant à la résilience de l'hôte infesté, c'est-à-dire sa capacité à résister aux conséquences physiopathologiques négatives dues à la présence du parasite. Pour évaluer cette résilience, il faut donc s'intéresser à des marqueurs de productivité comme le GMQ ou les index laitiers (production totale, taux protéique et butyreux) (Torres-Acosta et Hoste 2008).

En effet, on veut éviter de faire une sélection génomique, basée sur des critères de résistance, qui irait à l'encontre des critères de productivité. L'objectif d'une sélection est d'obtenir des moutons résistants, pour réduire l'impact économique du parasitisme sur la filière. Il faut donc qu'ils restent productifs, pour ne pas créer une autre source de pertes économiques.

Ainsi, faire évoluer les pratiques des éleveurs et des vétérinaires, en matière de lutte contre les strongles gastro-intestinaux, semble être indispensable pour endiguer le phénomène de résistance aux anthelminthiques. Sélectionner des moutons résistants à ces parasites, et notamment aux parasites résistants aux traitements, semble être le deuxième levier d'action majeur pour améliorer cette lutte.

Nous allons maintenant présenter le microbiote ruminal, et les quelques connaissances établies à ce jour sur ses relations avec les parasites digestifs.

### 3. LE MICROBIOTE RUMINAL DES OVINS : ROLE PHYSIOLOGIQUE ET TECHNIQUES D'ETUDE

#### 3.1. Définition

Chez les Mammifères, des enzymes synthétisées par leur tube digestif permettent la digestion des protéines, des lipides et d'autres composants présents dans la nourriture, mais elles ne permettent pas la digestion de la plupart des polysaccharides végétaux, tels que la cellulose par exemple.

Au cours de l'évolution, les herbivores ont développé une relation symbiotique avec des microorganismes possédant les enzymes nécessaires à la digestion de ces constituants végétaux (Hobson et Stewart 2012).

Ces microorganismes commensaux sont répartis tout le long du système digestif, avec une grande variabilité qualitative et quantitative selon la section digestive de l'espèce animale considérée, et constituent ce que l'on appelle le **microbiote digestif**.

Par exemple, chez les Ruminants, des herbivores polygastriques, le microbiote est majoritairement présent dans le rumen, alors que chez les herbivores monogastriques, c'est le gros intestin, et en particulier le caecum chez les lapins, qui concentre le plus de microorganismes symbiotiques.

Le microbiote digestif est composé de bactéries, d'archées et d'eucaryotes (champignons, levures) en proportion variable (Calenge et al. 2014), comme le montre la figure 5 ci-dessous.

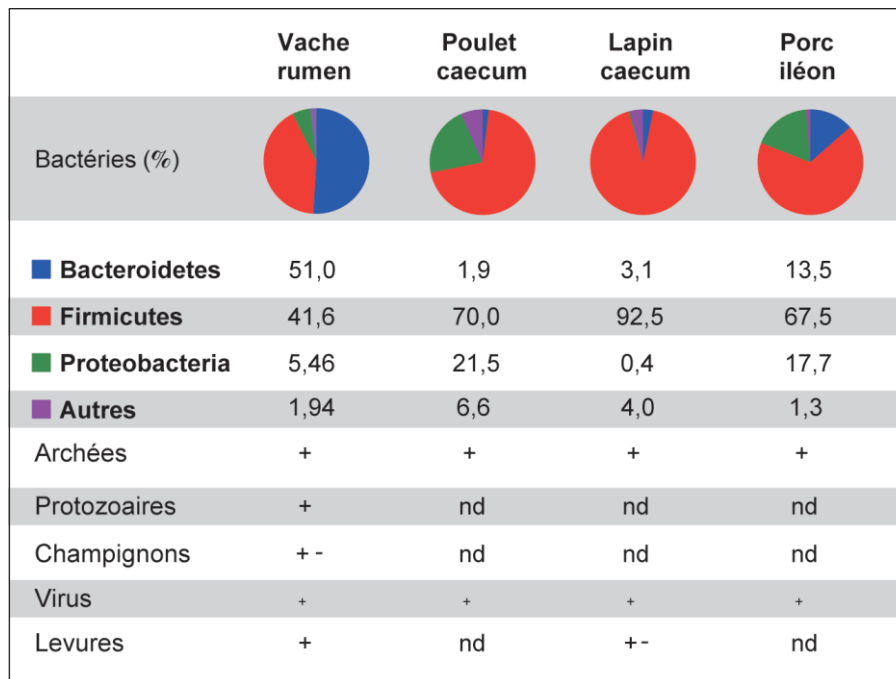


Figure 5 : Composition des microbiotes digestifs de différents herbivores (Calenge et al. 2014)

Il a été montré sur la souris (Benson et al. 2010) que le microbiote digestif était un écosystème polygénique complexe, influencé par des combinaisons entre facteurs environnementaux et génétiques de l'hôte. Chez l'Homme, le rôle de la génétique de l'hôte dans le contrôle de la composition du microbiote intestinal a été établi (Khachatryan et al. 2008). Chez les animaux de production monogastriques, le rôle du génome de l'hôte dans la structure du microbiote intestinal a été mis en évidence chez des poulets sélectionnés pour leur poids (Meng et al. 2014). Chez les ruminants, aucun lien direct n'a été démontré actuellement, néanmoins des études montrent par exemple que la composition de la communauté bactérienne du rumen dépend de la race (King et al. 2011; Rooke et al. 2014).

### **3.2. Rôles physiologiques du microbiote chez les ruminants**

Le microbiote ruminal affecte à la fois l'efficacité alimentaire, la qualité de la production des ruminants (Guan et al. 2008), et même la production de méthane (Morgavi et al. 2010).

Par ailleurs, la sélection génomique sur l'efficacité alimentaire est étudiée par de nombreux chercheurs sur des bovins de boucherie (Pryce et al. 2014), avec une potentielle sélection parallèle sur la production de méthane (Hegarty et al. 2007).

D'où l'idée qu'un moyen d'améliorer l'efficacité alimentaire de la production de ruminants est la **sélection génomique d'un hologénome** efficace (le génome d'un hôte et le métagénome de son microbiote symbiotique) (Rosenberg et Zilber-Rosenberg 2011).

D'autre part, le microbiote intestinal joue un rôle dans la santé, en particulier dans le déclenchement d'une réponse immunitaire (Hooper et al 2012). Par conséquent, le microbiote intestinal pourrait au moins en partie expliquer la sensibilité individuelle à des pathogènes chez les monogastriques. Un tel lien n'a pas encore été mis en évidence pour le microbiote ruminal. Néanmoins, si ce lien existe, on peut s'attendre à des différences importantes, car le rumen est par bien des aspects très différent de l'intestin. En effet, le rumen est un pré-estomac présent uniquement chez les Herbivores, et permettant la digestion des plantes par fermentation. L'intestin, en aval de l'estomac, assure quant à lui l'absorption des nutriments et le transit du chyme alimentaire jusqu'au côlon. Histologie et conditions physico-chimiques y sont donc très différentes.

Le rôle du microbiote ruminal dans la susceptibilité à une infestation de nématodes n'est pas documenté. Une publication utilisant un modèle murin a montré un lien entre les bactéries commensales et la sensibilité à l'helminthe : *Lactobacillus* a promu la sensibilité à *Heligmosomoides polygyrus*, qui en retour a promu le développement de la population de *Lactobacillus* (Reynolds et al. 2014).

Quoiqu'il en soit, une infestation de nématodes entraîne une modification de la population des bactéries intestinales chez l'homme (Lee et al. 2014) et le porc (Li et al. 2012).

Chez les ruminants, une étude (Li et al. 2011) a exploré chez les bovins la modification du microbiote présent dans l'abomasum, très probablement originaire du rumen, induites par une infestation d'*Ostertagia ostertagi* (Nématode gastro-intestinal de la caillette). Ils ont trouvé un impact minimal du ver sur le microbiote abomasal, mais une modification significative de son activité. Le microbiote ruminal pourrait être lié à la sensibilité des ruminants aux nématodes de 2 manières : en fournissant des nutriments aux parasites (AGV, par exemple) ou en fragilisant directement (dégradation) ou indirectement (modification des paramètres physicochimiques liés aux fermentations, par exemple le pH) la gaine de la L4 lorsqu'elle traverse le rumen, ce qui perturberait le dégainage dans la caillette.

Les parasites pourraient également agir sur le microbiote lors de leur passage dans le rumen (Midha et al 2017).

Une étude a également établi qu'il existait une différence de proportions des populations bactériennes du rumen entre des moutons sensibles et des moutons résistants à *H. contortus*, sélectionnés sur leurs taux d'OPG (Tirabassi et al. 2016).

En conclusion, nous ne connaissons pas encore tous les rôles du microbiote ruminal sur la physiologie de son hôte, mais ils sont probablement multiples et complexes, et méritent d'être caractérisés plus finement.

Plusieurs techniques de laboratoire ont été développées pour permettre d'étudier le microbiote ruminal.

### **3.3. Techniques d'étude du microbiote ruminal (Calenge et al. 2014)**

Le microbiote digestif est composé à 80% de bactéries non cultivables, leur caractérisation était donc très compliquée, jusqu'à l'apparition des techniques de biologie moléculaire, puis de séquençage à haut débit.

Pour décrire le microbiote, il faut pouvoir caractériser la diversité et les proportions des groupes phylogénétiques identifiés.

Le tableau 7 présente les techniques actuellement utilisées.

**Tableau 7 : Les méthodes à haut débit disponibles pour décrire la composition du microbiote et ses fonctions (adapté de Calenge et al. 2014)**

Objectif général	Technique	Méthode	Prérequis	Intérêt
Analyse de la diversité bactérienne	Séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S	Analyse par phylogénie		Détermination d'unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) Applicable à toute espèce d'hôte sans prérequis
	Analyse de l'ensemble des gènes du contenu digestif par métagénomique non ciblée	Séquençage de fragments d'ADN	Constitution d'un catalogue de gènes par espèce animale	Détermination des équilibres entre groupes bactériens
Etude de l'activité du microbiote	Méta-transcriptomique (ARN)	Séquençage des ARN		Analyse de diversité basée sur les gènes actifs (exprimés) Détermination du répertoire de gènes exprimés
	Méta-protéomique (protéines)	Spectrométrie de masse		Identification de protéines (enzymes)
	Méta-métabolomique (métabolites)	Spectroscopie haute résolution		Identification des métabolites du dialogue microbien chez l'hôte

### 3.3.1. Analyser la diversité bactérienne du microbiote

Pour analyser la diversité bactérienne du microbiote, il est possible de

- **Séquencer la partie variable de l'ARN ribosomal 16S.** Il s'agit d'une analyse phylogénétique des communautés bactériennes applicable à toute espèce hôte. L'ARN ribosomal 16S est présent chez toutes les bactéries, en particulier une



partie conservée dans le génome de chacune : la partie V3-V4. En sélectionnant les séquences porteuses de cette portion, on sélectionne ainsi les séquences bactériennes. Puis en s'intéressant à une zone variable de cet ARN, on peut identifier jusqu'aux genres des bactéries présentes, mais plus rarement jusqu'à l'espèce ou la souche. C'est une analyse taxonomique qui ne s'intéresse pas à la fonction de ces parties.

- Analyser l'ensemble des gènes du contenu digestif par **métagénomique non ciblée**. Cette méthode est beaucoup plus complète car elle permet de caractériser la diversité et la fréquence de l'ensemble des gènes du microbiote, et donc les fonctions potentiellement présentes. Elle nécessite cependant de réaliser au préalable un catalogue de gènes de référence de l'espèce hôte considérée. Actuellement, le catalogue des gènes du rumen recense moins de 50% des gènes isolés.

Le microbiote est donc soumis à un séquençage à haut débit complet, qui permet d'obtenir des séquences qui vont ensuite être comparées au catalogue de référence pour identifier et quantifier la fréquence des gènes.

Cependant, cette technique ne cible pas seulement les gènes bactériens, mais l'ensemble des gènes du contenu digestif. Parmi les gènes bactériens, il y aura donc aussi des gènes d'autres micro-organismes commensaux et des gènes végétaux, ce qui nécessite un important travail de tri. On ne sait pas non plus si ce gène est exprimé et associé à une fonction.

Ces deux méthodes s'intéressent à la diversité du génome bactérien du microbiote, sans pouvoir préciser si les gènes identifiés sont exprimés ou non. Pour répondre à cette question, il faut utiliser d'autres méthodes.

### **3.3.2. Etudier le microbiote fonctionnel**

Pour étudier le microbiote fonctionnel, il est possible d'étudier seulement les séquences de gènes transcrites et donc fonctionnelles, c'est la **méta-transcriptomique**. En effet, d'après une étude (Turnbaugh et al. 2009), plusieurs bactéries peuvent avoir la même fonction, et il serait donc plus pertinent d'étudier les fonctions du microbiote plutôt que sa composition (Bäckhed et al. 2012). Ainsi, cette technique a permis de prouver chez l'Homme,

une homogénéité du génome actif plus grande, que l'analyse du génome complet du microbiote ne le suggérait (Gosalbes et al. 2011).

Il est également possible d'étudier la composition et l'activité du microbiote digestif en s'intéressant à son influence sur le profil métabolique de son hôte, définie par les interactions hôte-microbiote. C'est la **métabolomique**. Cette démarche n'est pas encore aboutie chez l'Homme. De même pour la **méta-protéomique**, qui consiste en l'identification de protéines d'intérêt (surtout des enzymes) pour caractériser la communication hôte-microbiote.

Ces techniques se complètent et apportent des informations différentes. Elles permettent ainsi de caractériser de mieux en mieux le microbiote ruminal, au fil des expériences réalisées.

Nous allons maintenant présenter l'étude expérimentale que nous avons menée.

## PARTIE 2 : ETUDE EXPERIMENTALE

## 1. PRESENTATION DE L'ETUDE

La sélection de moutons plus résistants à l'infestation parasitaire compte parmi les nouvelles stratégies de gestions raisonnées et durables des SGI les plus prometteuses. En effet, 30% de la variabilité observée dans la résistance des individus aux strongles est sous contrôle génétique héritable, ouvrant la voie à des programmes de sélection d'ovins plus résistants.

Par ailleurs, des études d'association statistique entre le génotype à un grand nombre de marqueurs génétiques d'une part, et le niveau de résistance à l'infestation par *H. contortus* d'autre part, ont localisé les régions du génome impliquées dans ce caractère.

Ainsi 1000 marqueurs génétiques prédictifs du statut de résistance à l'infestation ont été identifiés, offrant ainsi un outil de sélection rapide des ovins par génotypage.

Cet outil reste néanmoins à être validé dans des conditions contrôlées afin de s'assurer 1) de l'efficacité de la sélection sur la base de ces marqueurs génétiques, 2) de la conservation de la résistance entre espèces parasitaires d'intérêt agronomique, 3) de l'absence d'impacts délétères sur les performances des animaux sélectionnés.

Le projet GEMANEMA (Functional validation of genetic markers of resistance to nematodes in sheep for an integrated management of parasitic nematodes gemanema) qui fait collaborer l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et l'ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) tente de répondre à ces questions.

Cette thèse, inscrite dans ce projet, a pour objectif d'explorer l'influence de la génétique de l'hôte sur son microbiote, et une éventuelle relation entre les parasites de la caillette et du duodénum et le microbiote ruminal.

L'essai s'est déroulé au sein de l'UE de l'INRA de la Sapinière (Osmoy 18).

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. Animaux et agents pathogènes

Pour répondre à cette problématique, des infestations expérimentales d'ovins ont été réalisées sur deux lignées divergentes : 40 agneaux de génotype résistant (R) à *Haemonchus contortus*, et 40 agneaux de génotype sensible (S).

Ces agneaux mâles et femelles de race Romane ont été infestés à l'âge de 3 mois, âge auquel le système immunitaire est suffisamment permissif pour que les vers s'installent correctement. La moitié de l'effectif (20S et 20R) a été infestée avec un ver parasite de la caillette (*H. contortus*), l'autre moitié avec un ver parasite du duodenum (*T. colubriformis*).

Les quatre lots d'agneaux ainsi constitués ont été logés en stabulation libre sur aire paillée.

Les agneaux ont subi deux challenges parasitaires successifs, séparés d'un wash-out de 14 jours. Les rations données aux agneaux sont détaillées dans le tableau 8.

Lors de la première infestation, ils ont été nourris au DAC avec une ration composée à 100% d'un concentré « croissance » (composition Tableau 9). Lors de la seconde infestation, ils ont été nourris *ad libitum* sur tapis avec une ration complète composée de foin, d'enrubanné, et d'un concentré « entretien » (composition Tableau 9), selon les proportions du tableau 8.

**Tableau 8 : Détail de la ration complète distribuée aux agneaux lors de la deuxième infestation, ad libitum sur tapis**

	MS (kg)	UFL	PDIN (g/kg)	PDIE (g/kg)
Foin	0,85	0,58	47	62
Enrubanné	0,50	0,80	85	81
Concentré	0,85	0,85	113	96,3
<b>RATION</b>	<b>1,2</b>	<b>1,03</b>	<b>106</b>	<b>107</b>
→ 2,2 kg MB				

**Tableau 9 : Détails des concentrés TESTAGE et ENTRETIEN, respectivement distribués à tous les animaux lors de la première puis de la deuxième infestation aux strongles gastro-intestinaux.**

Composition		Concentré	Concentré
		CROISSANCE	ENTRETIEN
ADJUVANT OVICHOR		0.60	
BLE 14			11.40
ORGE 14		5.00	
MAIS		7.00	
DRECHE DE MAIS		2.58	5.54
ELVI		6.00	8.00
ISSUES DE CEREALES		1.42	10.00
REMOULAGE BANC		20.00	20.00
PULPE BETTERAVE		25.00	
TOURTEAU COLZA EXP.		1.21	
TOURTEAU COLZA		9.79	7.72
TOURTEAU PALMISTE EXP		10.00	9.06
LUZERN 17 deshylap		6.96	
CARBONATE Ca Sern.		1.06	2.72
SEL vrac		0.23	
BICARBONATE Na		2.00	
SON FIN			25.00
SUP 30 AGNEAU		0.50	0.50
K.Mix EMROD		0.15	0.05
K MIX D LIVER		0.50	
Total		100.00	100.00

Minéraux et vitamines

Analyse			
PB	%	15.70	17.00
MG	%	2.89	3.77
CB	%	12.00	8.71
UFL	/kg	0.86	0.85
UFV	/kg	0.84	0.82
Amidon	%	15.07	21.02
Sucres	%	3.89	

PDIN	g/kg	110.95	113.00
PDIE	g/kg	112.00	96.63
PDIA	g/kg	67.09	51.12
Calcium	%	1.30	1.50
Phosphore	%	0.40	0.58
Sodium	%	0.88	0.29
Magnésium	%	0.28	
Vitamine A	UI/kg	8000.00	8000.00
Vitamine D3	UI/kg	2000.00	2000.00
Vitamine E	mg/kg	25.00	25.00

Ce changement alimentaire s'explique par une volonté de l'équipe de recherche de respecter leur plan alimentaire habituel d'engraissement d'agneaux, pour pouvoir tester leur résistance aux parasites en conditions réelles d'élevage.

Ainsi, ils commencent par manger beaucoup de concentrés en sortie de sevrage pour développer leur masse musculaire, puis la densité énergétique de la ration est diminuée par l'introduction de fourrages pour finir leur croissance et limiter leur prise de masse grasseuse.

## **2.2. Plan expérimental et prélèvements**

L'expérience s'est déroulée sur un total de 74 jours, répartis en deux infestations de 30 jours chacune, avec une pause de 14 jours entre les deux. Au cours de l'expérience, un suivi régulier des paramètres sanguins et des œufs de parasites excrétés dans les matières fécales a été réalisé sur chaque animal, ainsi qu'une caractérisation des populations bactériennes ruminales.

Pour chaque infestation, le calendrier expérimental a été le même. Avant l'inoculation, à J0 (ou Jdeb), les contenus ruminal et rectal ont été prélevés, les animaux ont été pesés, et une prise de sang a été réalisée. Puis les animaux ont été inoculés avec soit 10 000 larves L3 d'*H. contortus* (20 agneaux S et 20 agneaux R), soit 10 000 larves L3 de *T. colubriformis* (20 S et 20 R) (larves fournies respectivement par le Professeur en Parasitologie P. Jacquet de l'ENVT, et par l'UMR ISP Tours (Infectiologie en Santé Publique, Tours)).

A J14, les 40 animaux infestés par *T. colubriformis* ont été pesés, pour suivre leur GMQ, et une prise de sang a été réalisée pour doser les protéines sériques.

A J24, un prélèvement rectal a été réalisé sur ces mêmes animaux. Sur les 40 infestés par *H. contortus* ont été prélevés du sang et du contenu rectal.

A J30, du contenu ruminal, du sang et des fèces ont été prélevés à tous les animaux, puis ils ont été pesés, et enfin ils ont été traités avec un anthelminthique.

Dans ce travail nous avons étudié les paramètres zootechniques et parasitaires, ainsi que le microbiote ruminal de Jdeb et J30. Les autres prélèvements ont fait l'objet d'une étude séparée dont les résultats sont en cours de publication.



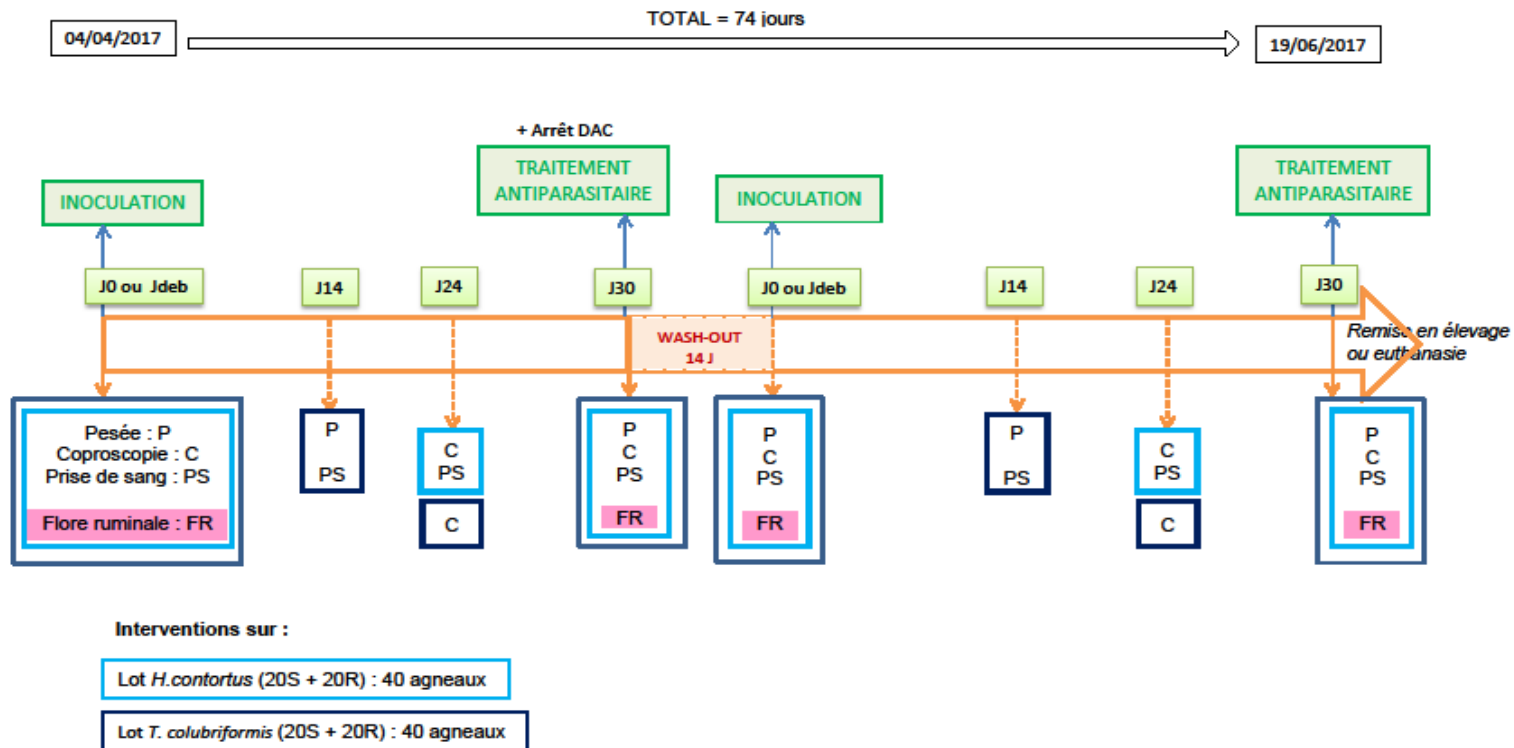


Figure 6 : Plan expérimental et calendrier des interventions du projet

### **2.3. Evaluation du parasitisme des agneaux**

Cette évaluation a été réalisée par des prélèvements rectaux et des analyses coproscopiques sur chaque animal de chaque lot. Elle a été réalisée au service de Parasitologie de l'ENVT, qui nous a fourni les résultats pour Jdeb et J30.

### **2.4. Evaluation du GMQ (Gain Moyen Quotidien)**

Le GMQ à J30 de tous les agneaux a été calculé en divisant le gain de poids total entre J0 et J30 par le nombre de jours de cette période (30 jours). Ce GMQ représente un paramètre de résilience des agneaux de chaque lignée au parasite, au même titre que l'hématocrite, le dosage des protéines sériques et du pepsinogène, qui ne sont pas rapportés dans la présente étude.

### **2.5. Extraction et séquençage de l'ADN bactérien**

Les prélèvements des contenus ruminiaux ont été réalisés à l'aide d'une pompe à vide à piston WOB-L® de modèle 2522C-02 (230V /50Hz).

Ils ont été réalisés sur les 80 agneaux à 4 moments : J0 et J30, soit le début et la fin du premier challenge, puis J0 et J30, soit le début et la fin du deuxième challenge.

Tous les échantillons ont été congelés à -20°C directement après l'aliquotage, puis transportés à l'INRA de Toulouse et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

L'extraction de l'ADN des échantillons de jus de rumen a été réalisée grâce au Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe 96 Kit (Annexe 3). Un séquençage ciblé MiSeq de l'ARN ribosomal 16S (cf partie 3.3.1 de la partie bibliographique) après PCR a ensuite permis d'obtenir pour chaque échantillon un pool de séquences d'ADN bactérien.

L'analyse bio-informatique a ensuite été réalisée par le pipeline FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution) qui a procédé à un nettoyage et à un regroupement des séquences identiques à 3 erreurs près, dont l'affiliation a été réalisée à l'aide de la base Silva 132 (Escudie et al. 2017).

## 2.6. Obtention des OTUs, les étapes FROGS

Comme mentionné précédemment, les fragments d'ADN obtenus après séquençage ont été traités par le pipeline FROGS de la plateforme de bio-informatique Galaxy, pour obtenir des OTUs.

Pour rappel, un OTU est un « Operational Taxonomy Unit », un regroupement de séquences similaires qui peuvent être traitées comme une seule espèce.

Le traitement du pool de séquences par FROGS est composé de différentes étapes, comme illustré dans la figure 7, pour nettoyer et affilier les séquences à des OTUs.

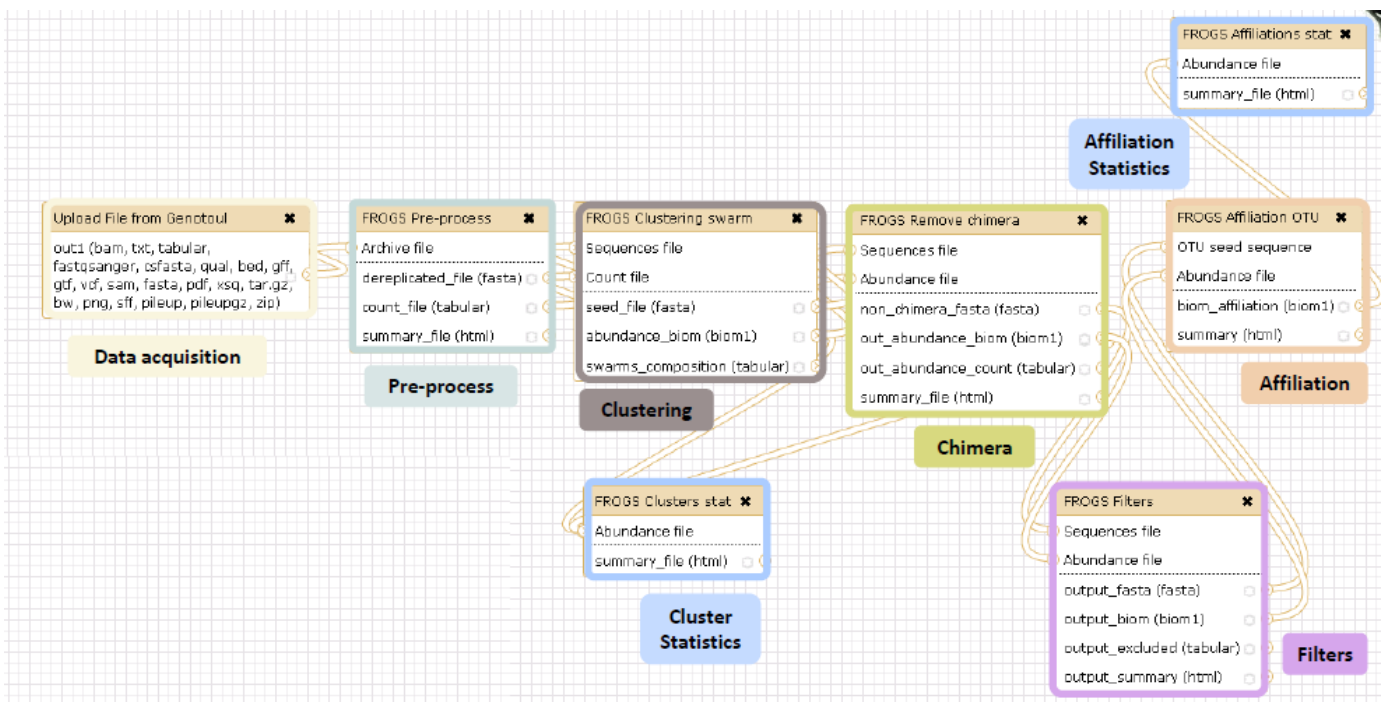


Figure 7 : Etapes du pipeline FROGS pour nettoyer un séquençage et obtenir des OTUs (Escudié et al. 2017)

### 2.6.1. Le « Pre-process »

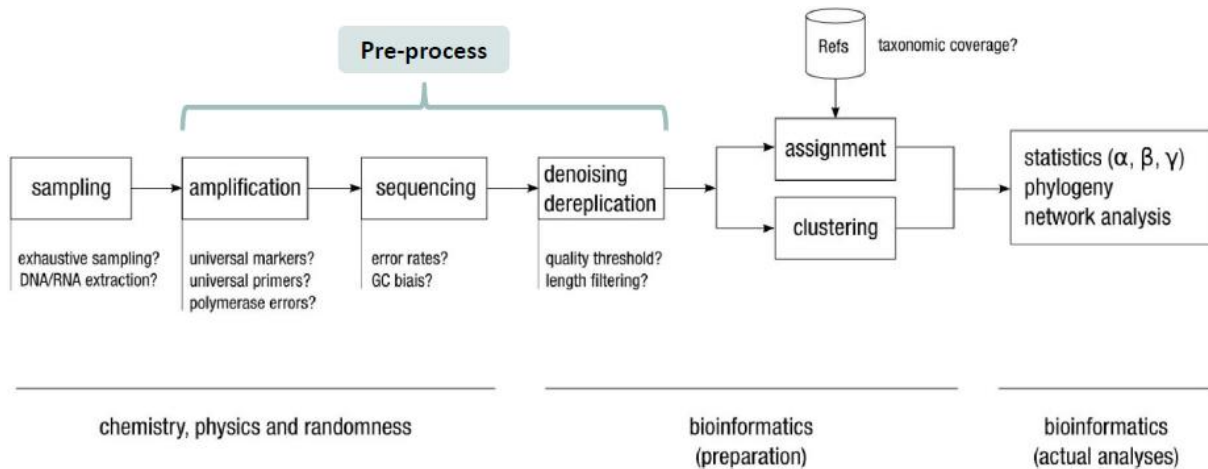


Figure 8 : Erreurs au cours des étapes du process de séquençage et correction par le pre-process (Escudié et al. 2017)

Cette étape (schématisée sur la figure 8) permet de supprimer les séquences de longueurs anormales (les longueurs attendues sont entre 280 et 500 paires de bases (pb)), les séquences avec des bases ambiguës (N), et les séquences avec de mauvaises amorces.

### 2.6.2. « Clustering », ou clusterisation

Le but de cette étape est de prendre en compte les erreurs de polymérisation et de séquençage lors de la PCR pour retrouver les séquences identiques.

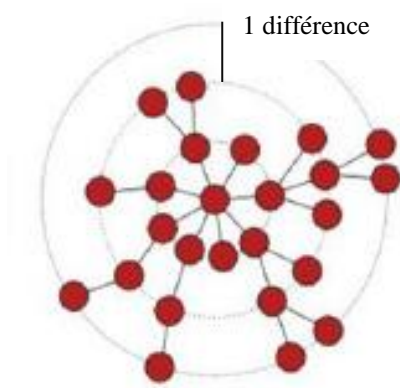


Figure 9 : Schématisation de la conservation des séquences à 3 erreurs de bases près, lors du Clustering (Escudié et al. 2017)

La clusterisation consiste donc à regrouper toutes les séquences identiques, en considérant de possibles erreurs de PCR. Ceci forme un cluster, que l'on affiliera ensuite dans la base Silva 132.

Sur la figure 9 ci-contre, chaque point rouge représente un pool de séquences identiques. A chaque différence de base acceptée, des séquences différentes d'une seule base sont identifiées et regroupées autour du pool initial (chaque cercle correspond donc à une différence

de base). Nous avons choisi d'accepter 3 erreurs de bases, nous avons donc 3 cercles.

### 2.6.3. « Chimera », ou suppression des chimères

*aborted amplification*



*next cycle's "primer"*



*chimeric sequence*



Comme l'illustre la figure 10, les chimères générées par PCR sont créées quand un amplicon avorté agit comme une amorce pour un modèle hétérologue. La chimère ainsi obtenue est à peu près de la même longueur que l'amplicon non chimérique, et contient les séquences amorces forward (for.) et reverse (rev.) à chaque extrémité. Ce sont des artefacts de la polymérisation.

Les chimères peuvent représenter entre 5 et 45% des lectures (Schloss et al. 2011).

Figure 10 : Schéma explicatif de l'obtention d'une chimère (Escudé et al. 2017)

### 2.6.4. Application de filtres

L'application de filtres avant l'étape d'affiliation permet de supprimer les clusters trop peu représentés et non redondants. Cela rend l'étape d'affiliation plus simple.

Nous avons utilisé deux filtres différents.

Tout d'abord le **filtre Bokulich** (Bokulich et al. 2013), un filtre très stringent qui supprime les faux positifs dus à des erreurs dans l'analyse, en particulier de lecture du séquenceur. Il supprime donc les clusters représentant moins de 0,005% des séquences totales.

Le deuxième filtre appliqué supprime les séquences non partagées par les 4 échantillons d'un même animal.

### 2.6.5. Affiliation des clusters à des OTUs

A partir de la base Silva 132, les clusters sont identifiés et affiliés à des unités taxonomiques. On parle alors d'OTUs.

## 2.7. Analyse statistique

### 2.7.1. Résistance au parasitisme

Pour cela, nous avons effectué une étude statistique selon la formule ci-dessous, en prenant comme variable le nombre d'OPG des agneaux, obtenus après examens coproscopiques à Jdeb et J30 de chaque période.

Variable = moyenne + effet Période + effet Jour + effet Parasite + effet Lot + effet Lignée + effet Sexe + effet Père niché dans lignée + interaction Jour x Parasite + interaction Période x Parasite +  $\varepsilon$

Puis nous avons réalisé une analyse de variance (ANOVA) pour étudier l'importance de chacun des effets.

### 2.7.2. Diversité du microbiote en fonction de la lignée (R ou S)

En statistiques, la notion de diversité caractérise la structure d'une communauté, en prenant en compte l'abondance relative de chaque espèce.

On distingue deux types de diversités :

- L' **$\alpha$ -diversité**, qui représente la diversité au sein d'une communauté
- La  **$\beta$ -diversité**, qui représente la diversité d'une communauté par rapport à une autre (ou dans notre cas, d'un échantillon par rapport à un autre)

#### *2.7.2.1. L' $\alpha$ -diversité du microbiote en fonction de la lignée*

L' $\alpha$ -diversité représente la richesse d'une communauté, c'est-à-dire le nombre d'espèces composant cette communauté.

Cette diversité peut être estimée avec différents index résumant une information globale :

- L'observation brute du nombre d'espèces est estimée par l'index « **Observed** ». Il s'agit réellement de la richesse en espèces différentes de la communauté.

- L'index de « **Chao** » représente la richesse à laquelle est ajouté un nombre estimé d'espèces non observées. Cette estimation n'est pas interprétable dans notre cas, à cause de l'utilisation de filtres, qui introduisent un biais.
- L'index de « **Shannon** » traite l'uniformité de la distribution de l'abondance des espèces.

Cela permet de corriger la richesse d'observation en la pondérant par l'abondance de chaque OTU. Cela privilégie les OTUs minoritaires.

- L' « **Inverse-Simpson** » représente l'inverse de la probabilité d'avoir deux séquences choisies au hasard appartenant au même OTU, donc la probabilité que ces deux séquences n'appartiennent pas au même OTU. Cette analyse privilégie une répartition équitable des OTU abondants.

#### 2.7.2.2. *La $\beta$ -diversité du microbiote entre les lignées R et S*

Il s'agit ici d'étudier la diversité entre nos échantillons.

Cette diversité peut être étudiée avec différentes représentations graphiques :

- « Jaccard » représente la fraction des **espèces** spécifiques à un échantillon. Cette représentation étudie la diversité des échantillons selon un facteur de présence ou absence des OTUs.
- « Bray-Curtis » représente la fraction de la **communauté** spécifique à un échantillon. Cette représentation pondère la diversité des échantillons en fonction de leur abondance.
- « Unifrac » représente la fraction de **l'arbre** phylogénétique spécifique à un échantillon
- « weigthed-Unifrac » représente la fraction de la **diversité** spécifique à un échantillon

Les deux derniers pondèrent donc la diversité des échantillons en fonction de leur proximité phylogénétique. Hors, dans le rumen, deux bactéries peuvent être phylogénétiquement proches et avoir des fonctions très différentes. Comme notre intérêt porte sur le rôle des bactéries du microbiote, il n'était pas pertinent d'utiliser ces deux dernières représentations.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Résultats du process FROGS

**Au début du process**, nous avons 312 pools de séquences pour 78 agneaux suivis 4 fois chacun avant (Jdeb) et après (J30) chacune des 2 infestations.

**Après le pre-process**, nous passons de 8 408 248 à 7 292 346 séquences, donc 86.7% des séquences sont conservées.

La figure 11 nous montre l'évolution du nombre de séquences à chaque étape du nettoyage du pre-process.

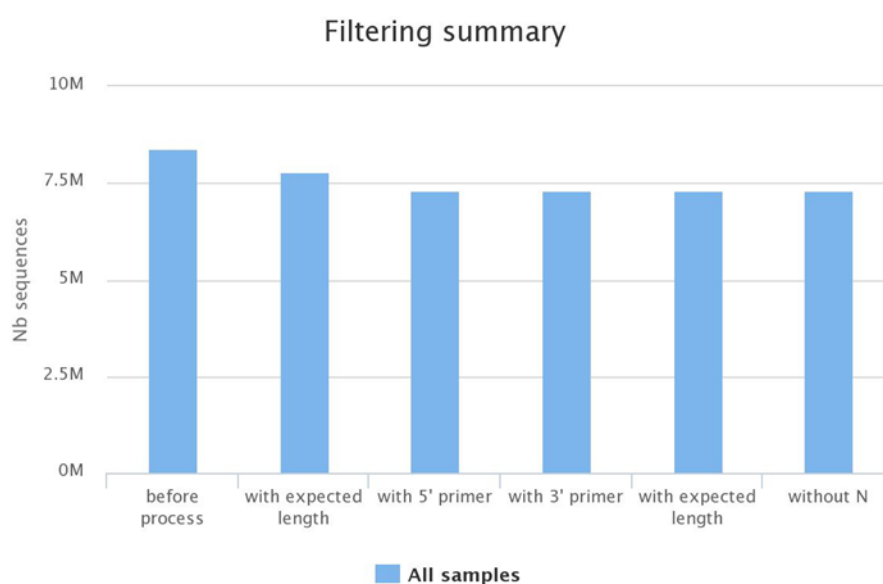


Figure 11 : Evolution du nombre de séquences au cours des différentes étapes de nettoyage du pré-process

Selon les échantillons (n=311), le nombre de séquences à la sortie du pre-process varie entre 7475 et 64608 (en moyenne, il y a 23 450 séquences par échantillon). Donc on note une forte hétérogénéité du nombre de séquences et 2 échantillons avec moins de 10 000 séquences :

- 76053 le 0205 avec 7 475 séquences
- 76080 le 0205 avec 9 503 séquences



L'échantillon 76014 du 15/06 ne présente plus que 5 séquences après ce process, il a donc été supprimé de la suite de l'étude, et doit être refait.

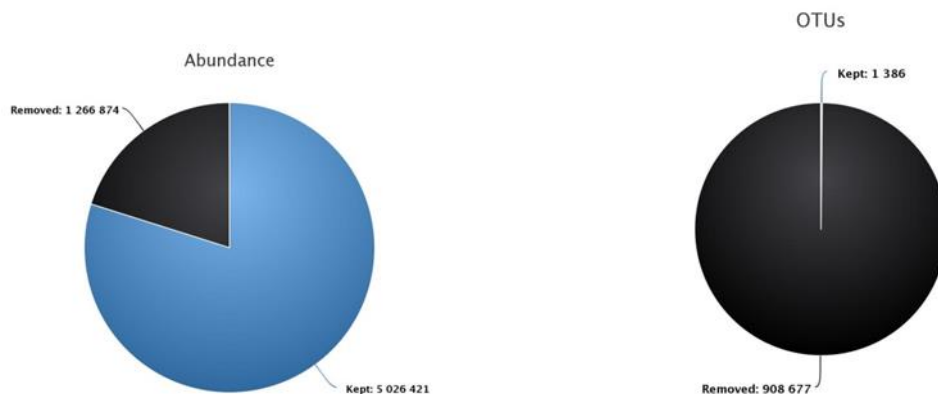
**Après le Clustering**, les 7 292 346 séquences sont regroupées en 1 455 905 clusters (dont une très grande majorité (92%) ne regroupe qu'une séquence).

**Après suppression des chimères** sont conservés 6 293 295 séquences et 910 063 clusters.

545 842 clusters ont été supprimés, ce qui correspond à 999 051 séquences. Nous avons donc un taux de conservation de 86,3% des séquences et 62,5 % des clusters.

**Après application des filtres** sont conservés 1 386 clusters représentant 5 026 421 séquences.

908 677 clusters ont été supprimés, ce qui correspond à 1 266 874 séquences. Nous avons donc un taux de conservation de 0,2% des clusters et de 79.9% des séquences.



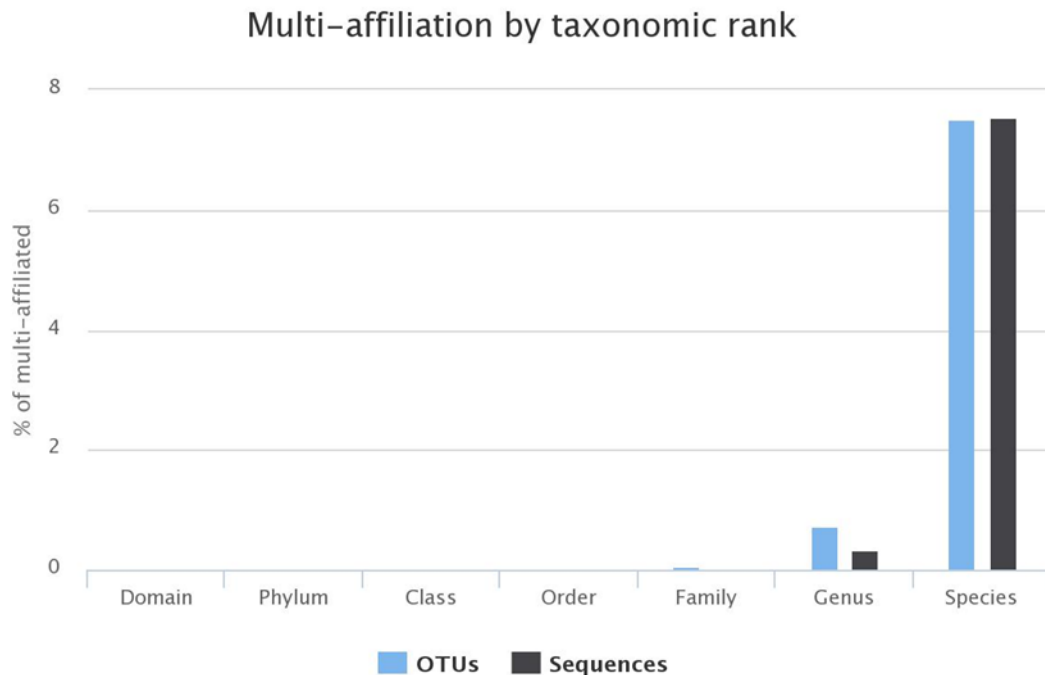
**Figure 12 : Diagrammes d'évolution du nombre de séquences et de clusters avant et après l'application des filtres.**

Sur la figure 12, on observe que l'on a supprimé 1 266 874 séquences (camembert de gauche), qui correspondaient à 908 677 des clusters (camembert de droite). La majorité des clusters éliminés n'étaient donc représentés que par une seule séquence. C'étaient des singletons, des artéfacts du séquençage, supprimés par le filtre Bokulich.

Après **affiliation** à partir de la base Silva 132, les 1386 clusters ont été identifiés. On parle maintenant d'OTUs.

Tous les clusters sont affiliés mais avec des multi-affiliations assez nombreuses au rang du genre mais surtout de l'espèce, comme le montre la figure 13.

Nous avons donc identifié 1386 OTUs différents dans nos 311 échantillons.



**Figure 13 : Multi-affiliation des OTUs et des séquences en fonction du rang taxonomique**

NB : hormis l'échantillon identifié au début (76014 du 15/06), tous les échantillons ont au moins 5380 séquences à l'issue de tout ce nettoyage.

La figure 14 permet une visualisation de la diversité taxonomique de nos échantillons. Les phyla Bacteroides (en bleu) et Firmicutes (en orange) semblent majoritaires.

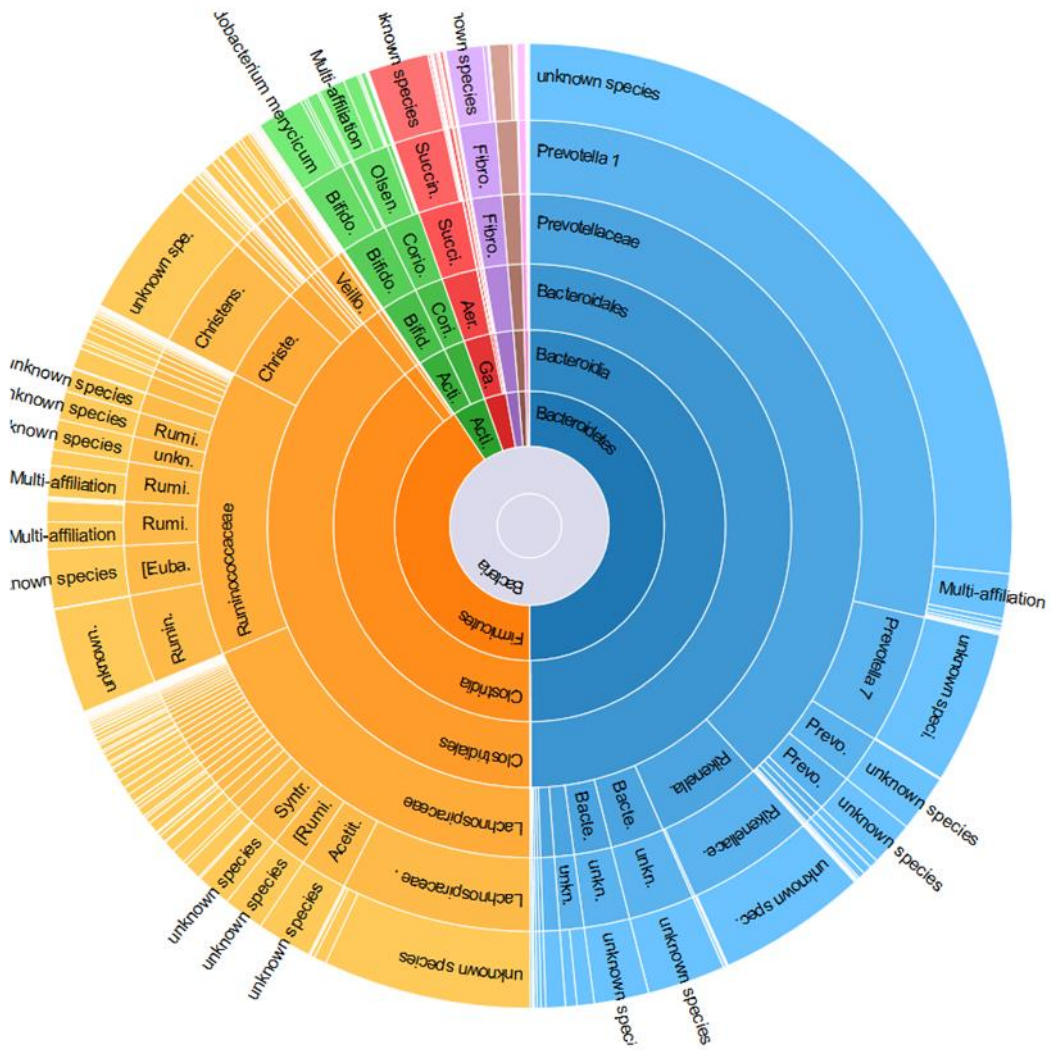


Figure 14 : Diagramme en « Sunburst » représentant la diversité taxonomique des 311 échantillons.

Une correction manuelle des multi-affiliations a ensuite été effectuée au niveau du genre. Néanmoins, même si nous avons réussi à affilier 100% des séquences nettoyées, la majorité des espèces bactériennes ne sont pas identifiées (« unknown species »).

### 3.2. Etude de la résistance au parasitisme

Nous avons effectué une étude statistique, en prenant comme variable le nombre d'OPG des agneaux, nombres obtenus après examens coproscopiques à Jdeb et J30 de chaque période.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau 10.

**Tableau 10 : Résultats statistiques de l'influence de plusieurs paramètres sur les valeurs en OPG des agneaux, selon la méthode ANOVA**

Effet	P-value
Période	**
Jour	***
Parasite	***
Lot	NS
Lignée	***
Sexe	NS
Père (lignée)	NS
Jour x Parasite	***
Période x Parasite	*

NS : non significatif ; \* : <0,05 ; \*\* : <0,01 ; \*\*\* : <0,001

- On observe tout d'abord un effet PERIODE important. Cela signifie que les comptages en OPG de P1 et P2 sont significativement différents.
- L'effet JOUR est également très important : pour chaque période, le nombre d'OPG évolue entre Jdeb et J30, les agneaux avaient 0 OPG au début de chaque challenge puis ont été parasités.

Les moyennes des comptages d'œufs dans les fèces des agneaux (en OPG) à Jdeb et J30 de chaque période sont présentées dans le tableau 11.

**Tableau 11 : Importance du parasitisme moyen des agneaux au début et à la fin de chaque période, exprimé en OPG**

	Jdeb P1	J30 P1	Jdeb P2	J30 P2
<b>Moyenne (OPG)</b>	0	1213 +/- 1839	0	2022 +/- 2764

Il y a beaucoup de variabilité individuelle dans l'intensité d'excrétion des œufs de parasites (écart-types importants), mais globalement l'excrétion pendant la seconde période semble plus importante que pendant la première.

- De même, on note un effet PARASITE très important, c'est-à-dire que les valeurs en OPG pour un parasite sont significativement différentes de celles obtenues pour l'autre. Ce phénomène s'observe dans le tableau 12, dans lequel sont comparées les valeurs en OPG moyennes pour chacun des deux groupe d'agneaux.
- L'interaction Parasite x Jour est significative.

Dans le tableau 12, on note toujours une grande variabilité individuelle dans l'intensité d'excrétion des œufs des parasites, mais on note également une différence significative d'intensité d'excrétion entre les agneaux parasités par *H. contortus* (Lot Hc), et ceux parasités par *T. colubriformis* (Lot Tc), cohérente avec leur prolificité de ponte connue.

**Tableau 12 : Importance de l'excrétion parasitaire (en OPG) des agneaux au début et à la fin de chaque période, en fonction du parasite**

Moyenne (OPG)	Jdeb P1	J30 P1	Jdeb P2	J30 P2
<b>Lot Hc</b>	0	2055 +/- 2313	0	3624 +/- 3243
<b>Lot Tc</b>	0	372 +/- 226	0	492 +/- 263

- L'interaction Parasite x Période est également significative. Pour les deux parasites, les agneaux ont des valeurs d'OPG supérieurs en période 2 qu'en période 1, mais *H. contortus* reste plus prolifique que *T. colubriformis*.
- Et enfin on remarque un effet LIGNEE : on a une diminution significative du nombre d'OPG chez la lignée R par rapport à la lignée S. Ceci est cohérent avec le fait que notre

lignée R est une lignée d'agneaux génétiquement sélectionnés pour être résistants à *H. contortus*. Ceci est confirmé par la comparaison des valeurs en OPG pour *H. contortus* des deux lignées à la fin de chaque période (P<0,001, tableau 13).

**Tableau 13 : Importance du parasitisme des lignées R et S à *H. contortus* et *T. colubriformis* à la fin de chaque période, exprimé en opg**

	J30 de	Moyenne (opg)	
		Lignée R	Lignée S
<b>Lot Hc</b>	P1	921 +/- 1444	3133 +/- 2493
	P2	1524 +/- 2035	5724 +/- 2858
<b>Lot Tc</b>	P1	390 +/- 252	353 +/- 201
	P2	400 +/- 274	589 +/- 218

Par contre, si on compare les moyennes en OPG du groupe Tc entre les périodes 1 et 2 de chaque lignée, on ne remarque pas de différence significative (P=0,16). La lignée R excrète en moyenne autant d'œufs que la lignée S.

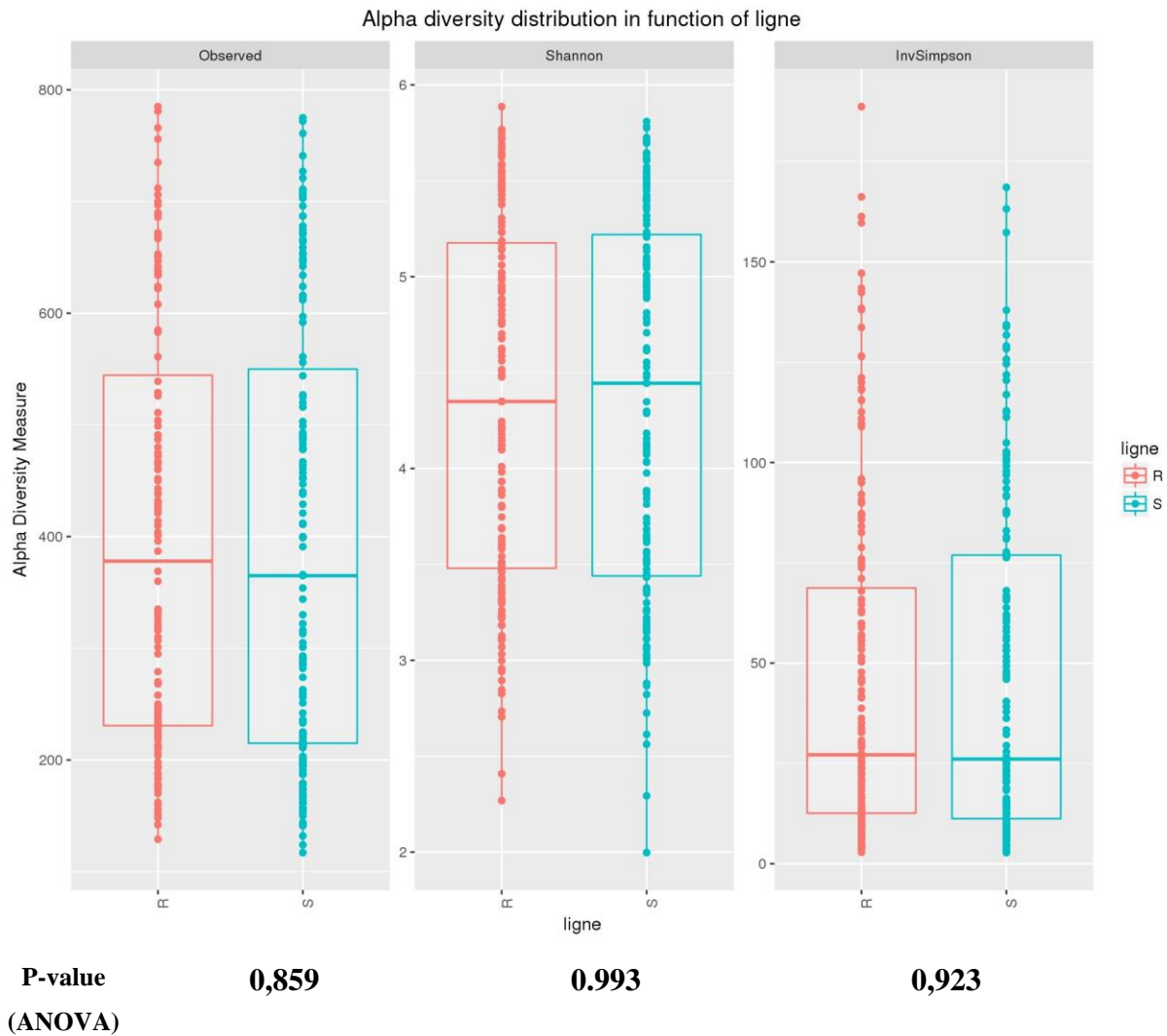
La lignée R est significativement plus résistante à l'infestation à *H. contortus* que la lignée S.

### **3.3. Etude de la diversité du microbiote bactérien**

#### **3.3.1. Etude de la diversité du microbiote en fonction de la lignée**

##### **$\alpha$ -diversité**

Les résultats des index « Observed », « Shannon » et « Inverse-Simpson » en fonction de la lignée R ou S sont représentés par des boxplots en figure 15.



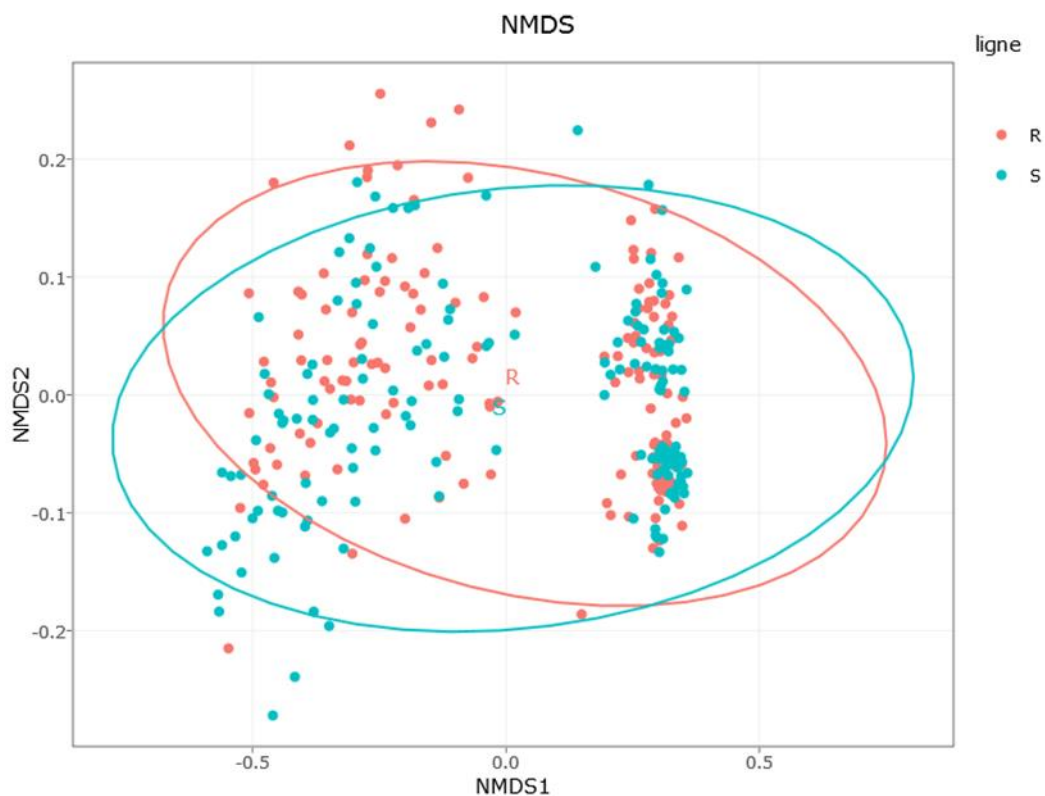
**Figure 15 :** Boxplots représentant la distribution de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal (en nombre d'OTUs observés) en fonction de la lignée d'agneaux (R ou S)

Quel que soit l'index d' $\alpha$ -diversité, aucune différence significative de composition du microbiote n'est observée entre les lignées R et S.

### $\beta$ -diversité

Il s'agit ici d'étudier la diversité entre nos échantillons. Sur le graphique en nuage de points de la figure 16, chaque point correspond donc à un échantillon.

Avec Jaccard, nous avons obtenu le graphique suivant (figure 16) :



**P-value (MANOVA) = 0,1551**

**Figure 16 : Graphique en nuage de points représentant la  $\beta$ -diversité des échantillons en fonction de la lignée**

Les deux nuages de points sur la figure 16 se superposent, et la p-value est supérieure à 0,05, donc aucune différence significative n'est observée entre les deux lignées d'agneaux.

Aucun effet lignée n'est observé sur la diversité bactérienne des rumens des agneaux.

Cependant, deux groupes de points paraissent se distinguer l'un de l'autre sur ce graphique, indépendants des lignées. Un groupe de points à gauche du graphique, assez dispersés, et un autre groupe de points à droite, concentrés sur un axe vertical.

Nous avons donc étudié différents effets pour essayer d'identifier ces deux groupes.

L'étude des effets Parasite, Père, Sexe et Agneau n'ont donné aucun résultat significatif.



Mais l'étude des effets Jour et Période ont donné des résultats intéressants.

### 3.3.2. Etude de la diversité en fonction du jour

La figure 17, qui représente l' $\alpha$ -diversité du microbiote en fonction du début (Jdeb, en bleu) et de la fin (J30, en rouge) des 2 challenges parasitaires, nous montre une différence significative entre Jdeb et J30 (P-values < 0,05) : l' $\alpha$ -diversité est plus importante à J30 qu'à Jdeb.

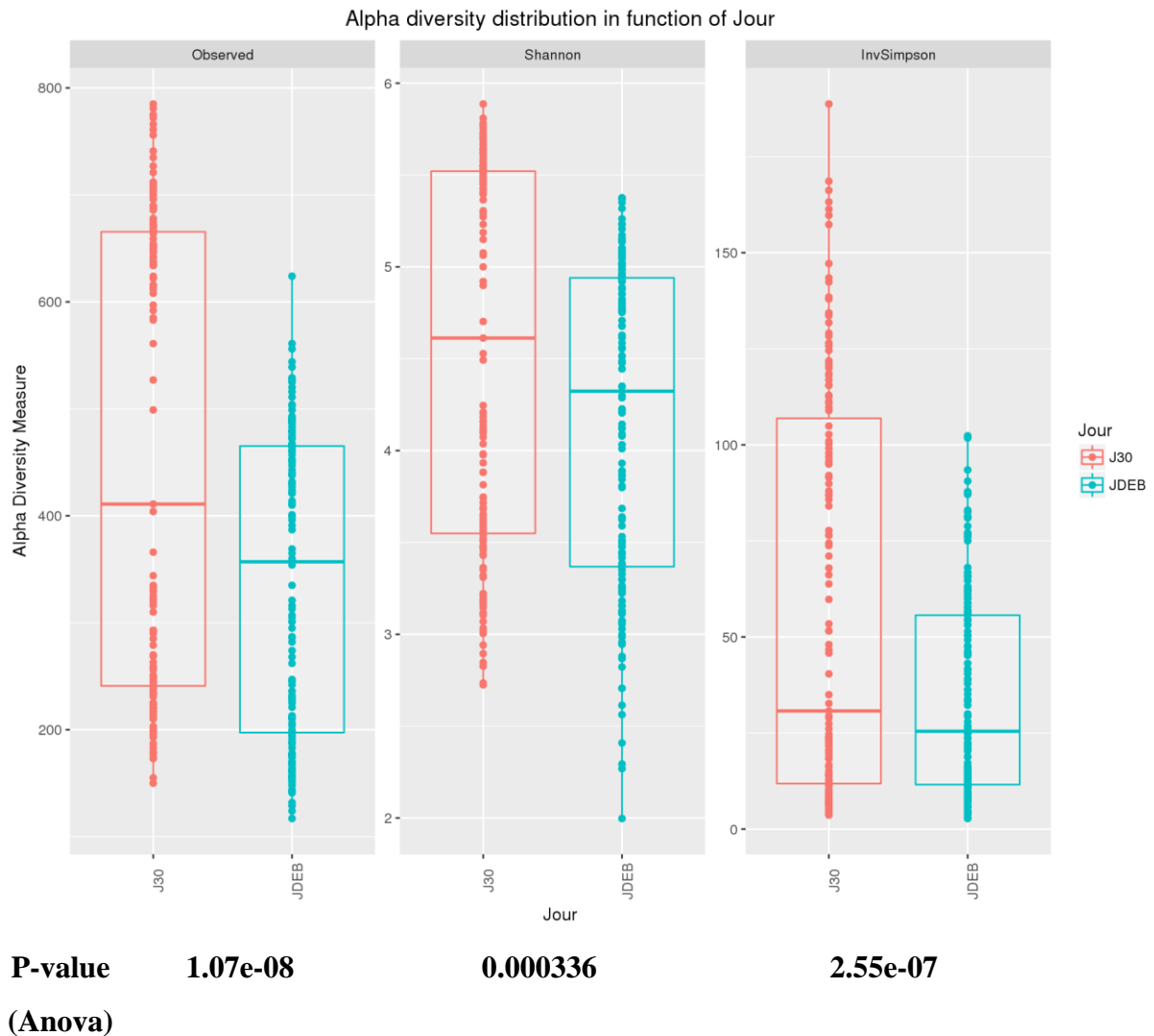


Figure 17 :  $\alpha$ -diversité du microbiote en fonction du début (Jdeb) et de la fin (J30) des challenges parasitaires

Sur la figure 18, représentant l'effet Jour sur la  $\beta$ -diversité du microbiote ruminal, les ellipses sont significativement différentes (P-value < 0,05). Ceci confirme une modification de la diversité du microbiote au cours des challenges parasitaires, mais ne permet pas d'identifier les groupes de points mentionnés précédemment.

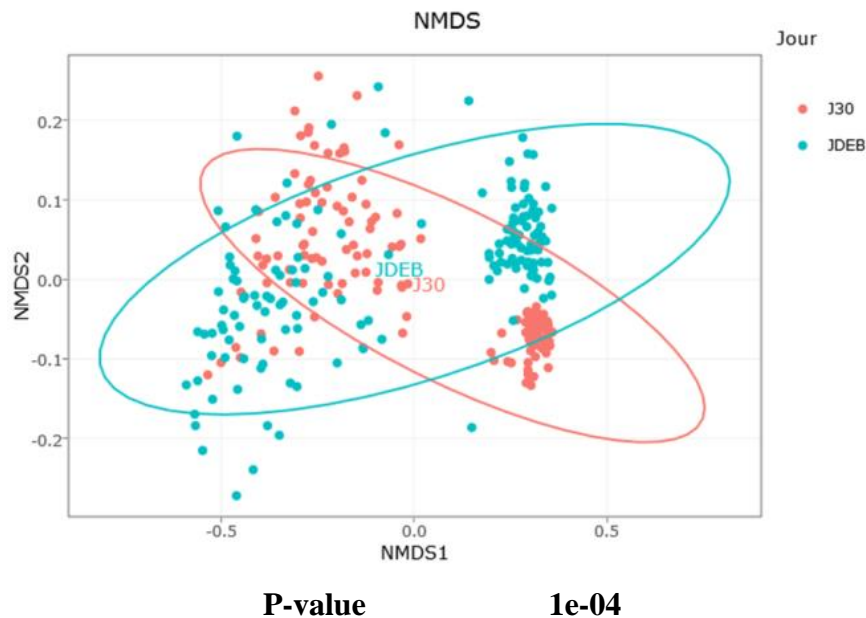


Figure 18 :  $\beta$ -diversité du microbiote en fonction du début (Jdeb) et de la fin (J30) des challenges parasitaires

Le microbiote est plus diversifié à la fin des challenges qu'au début

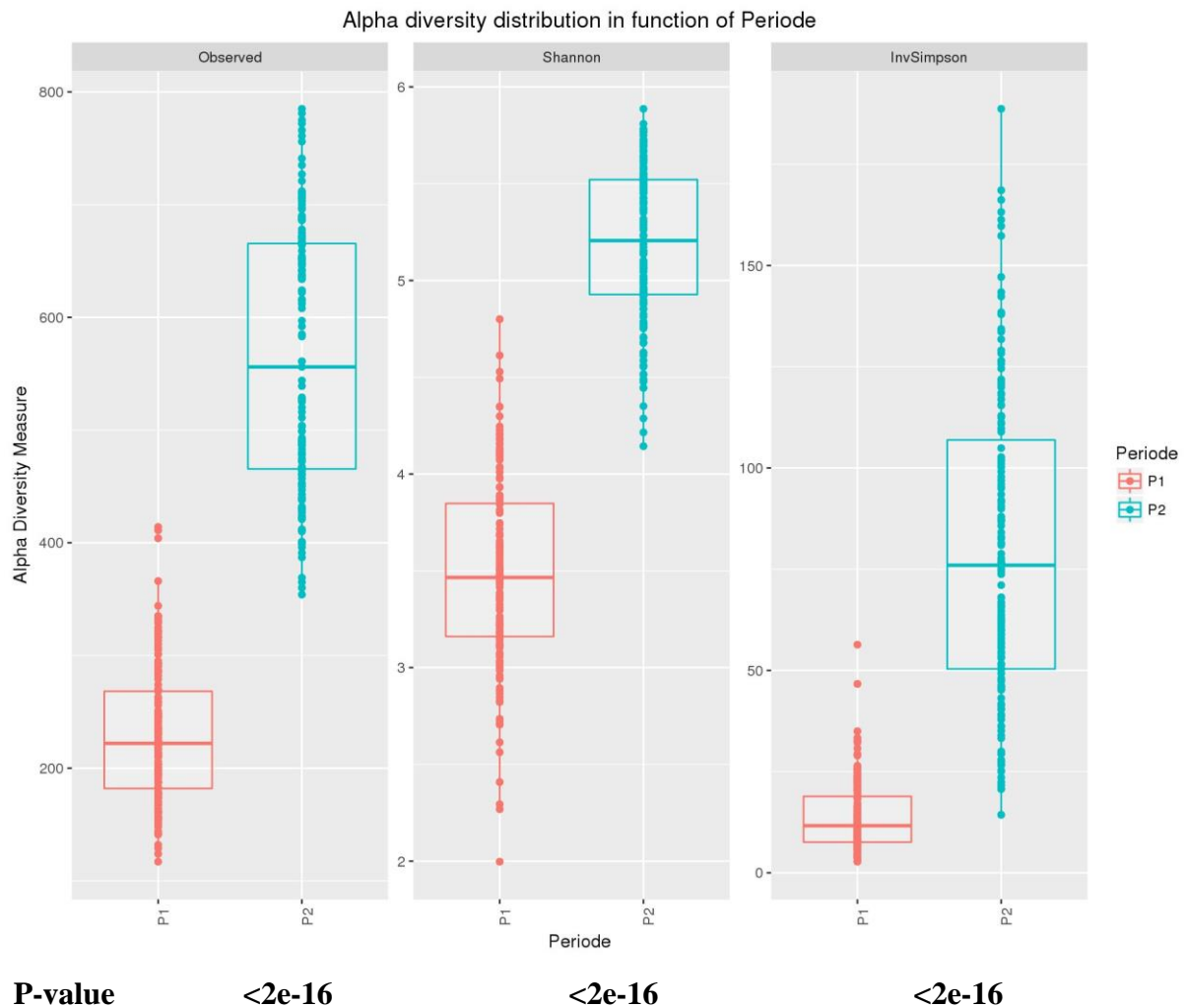
Nous n'avons cependant toujours pas identifié les deux groupes visibles en figure 16 et 18.

### 3.3.3. Etude de la diversité du microbiote en fonction de la période

Pour rappel, les agneaux ont subi deux challenges parasitaires de 30 jours chacun, séparés par un wash-out de 14 jours pendant lequel ils ont été déparasités. Ces deux périodes, notées P1 pour la première et P2 pour la seconde, ont suivi le même protocole expérimental. Cependant, entre P1 et P2, certains paramètres zootechniques étaient différents : les agneaux étaient plus âgés et plus lourds au début de P2 qu'au début de P1, et leur ration alimentaire a

été changée. En effet, pendant la période 1 les agneaux ont été nourris avec des concentrés uniquement, alors que des fourrages ont été ajoutés pendant la période 2. Une transition alimentaire a eu lieu pendant le wash-out de 14 jours.

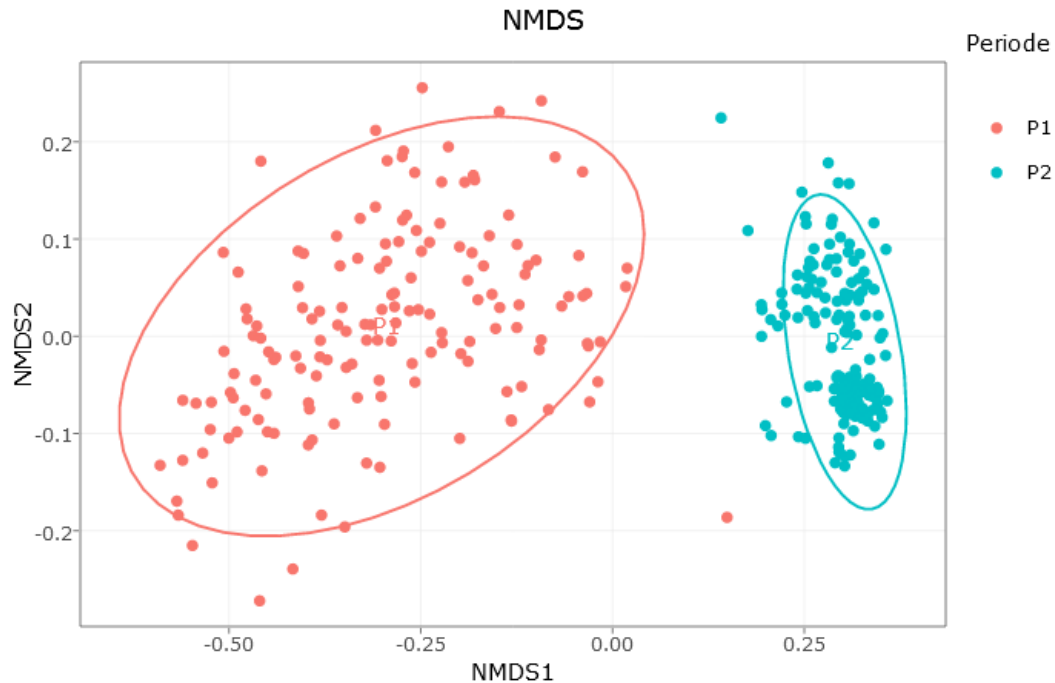
Les résultats sont présentés en figures 19 et 20.



**Figure 19 : Boxplots de l'α-diversité du microbiote ruminal des agneaux en fonction des périodes de challenge parasitaire P1 et P2**

Sur la figure 19, on observe que l'α-diversité du microbiote est significativement beaucoup plus importante pendant P2 que pendant P1 (P-values < 0,05). En effet, si on regarde en détail le nombre d'OTUs (colonne « Observed »), on note que P1 présente environ une médiane à 220, alors que P2 une médiane à environ 560, c'est 2,5 fois plus.

L'index de Shannon est significativement plus élevé en P2 qu'en P1, et on observe la même évolution significative pour l'inverse de Simpson.



**P-value = 1e-04**

**Figure 20 : Graphique en nuage de points représentant la  $\beta$ -diversité du microbiote ruminal en fonction des périodes de challenge parasitaire P1 et P2**

De même, lorsque l'on s'intéresse à la  $\beta$ -diversité du microbiote ruminal en fonction des périodes P1 et P2 (figure 20), on observe une différence significative entre les deux ellipses (P-value < 0,005). Par ailleurs on remarque que les ellipses ressemblent aux deux groupes de points que nous avons notés plus tôt (sur les figures 16 et 18). Il est cependant impossible d'identifier ces points, donc aucune certitude ne peut être établie.

La période a un effet majeur sur la diversité de la communauté bactérienne ruminale de nos agneaux.

Comme rappelé au début du paragraphe, dans l'effet Période sont nichés les effets Alimentation, Age, Poids, et une réponse différente à l'infestation parasitaire entre P1 (animal naïf) et P2 (animal déjà infesté) (développé dans la discussion).

### 3.3.3.1. Influence de l'âge

**Tableau 14 : Moyenne d'âge des agneaux au début et à la fin de chaque période parasitaire**

	<b>Jdeb P1</b>	<b>J30 P1</b>	<b>Jdeb P2</b>	<b>J30 P2</b>
<b>Moyenne des âges (jours)</b>	114,5 +/- 5,7	144,5 +/- 5,7	158,5 +/- 5,7	190,4 +/- 5,7

Les âges des agneaux sont proches, surtout entre J30 P1 et Jdeb P2.

### 3.3.3.2. Influence du Poids

**Tableau 15 : Moyenne des poids des agneaux au début et à la fin de chaque période parasitaire**

	<b>Jdeb P1</b>	<b>J30 P1</b>	<b>Jdeb P2</b>	<b>J30 P2</b>
<b>Moyenne des poids (kg)</b>	35,4 +/- 5,2	45,6 +/- 6,2	46 +/- 5,9	51,9 +/- 7

Les poids des agneaux sont proches, surtout entre J30 P1 et Jdeb P2.

### 3.3.3.3. Influence de l'alimentation

L'alimentation semble le facteur le plus probable. Afin de comparer son effet avec d'autres études, nous avons calculé les abondances relatives moyennes de chaque phylum bactérien identifié dans le rumen, en fonction de la période considérée, et donc en fonction du régime alimentaire des agneaux (Tableau 16).

Tableau 16 : Abondances relatives moyennes de chaque phylum bactérien identifié dans le rumen, en fonction de la période

	Moyenne P1	Moyenne P2	P-value (ANOVA)
<b>Actinobacteria</b>	7,15	1,50	<b>&lt;0.001</b>
<b>Bacteroidetes</b>	46,91	51,64	<b>&lt;0.001</b>
<b>Elusimicrobia</b>	0,00034	0,012	<b>&lt;0.001</b>
<b>Epsilonbacteraeota</b>	0,0035	0,010	<b>&lt;0.001</b>
<b>Fibrobacteres</b>	0,11	2,36	<b>&lt;0.001</b>
<b>Firmicutes</b>	42,24	40,17	0,074
<b>Fusobacteria</b>	0,0081	0,0022	0,444
<b>Patescibacteria</b>	0,0017	0,028	<b>&lt;0.001</b>
<b>Proteobacteria</b>	3,36	2,14	<b>&lt;0.001</b>
<b>Spirochaetes</b>	0,19	1,46	<b>&lt;0.001</b>
<b>Tenericutes</b>	0,02450295	0,67431655	<b>&lt;0.001</b>

On observe une différence significative de ces abondances relatives (P-value < 0,05) pour tous les phyla, sauf Firmicutes et Fusobacteria.

Une représentation graphique permet de mieux apprécier la variabilité entre P1 et P2 (Figure 21).

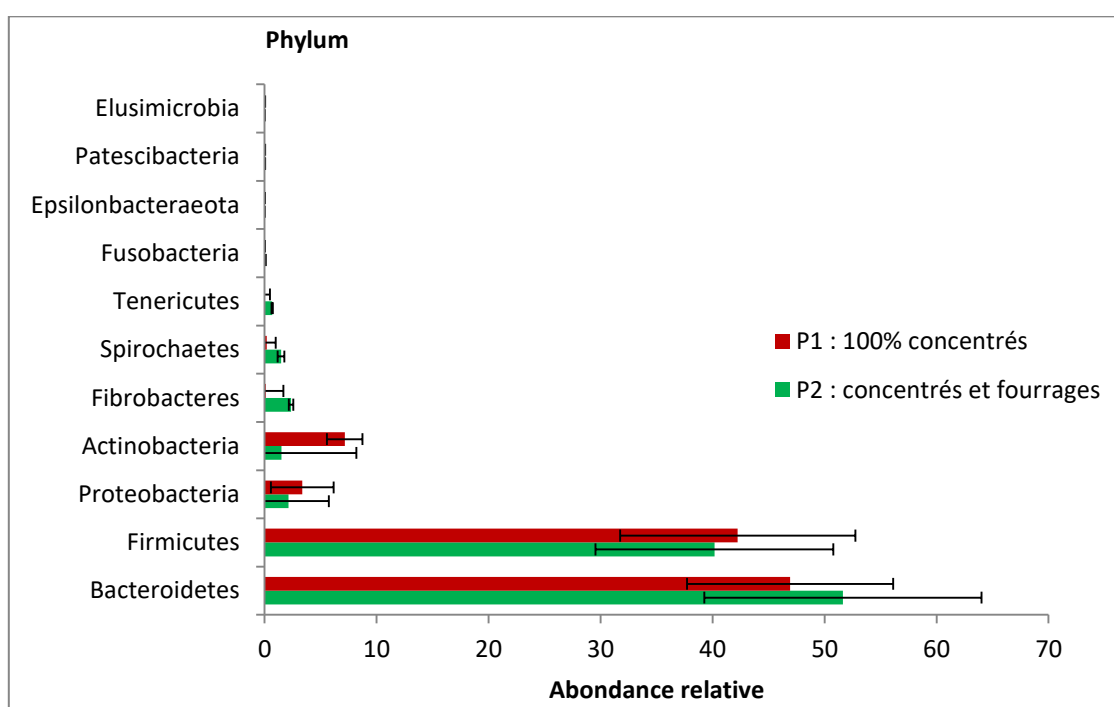


Figure 21 : Composition du microbiote ruminal des agneaux en fonction du type d'alimentation (100% concentrés ou concentrés+fourrages)

On observe une différence de composition entre les deux groupes.

Le groupe P1, nourrit avec une ration 100% concentrée a comme phylum majoritaire les Bacteroidetes.

C'est toujours le cas en P2 (ajout de fourrages), mais les abondances relatives des Bactéroidetes, Fibrobacteres, Spirochaetes Epsilonbacteraeota, Patescibacteria, Elusimicrobia et Tenericutes augmentent, alors que celles des Proteobacteria et Actinobacteria baissent, de façon significative (p-values < 0,05).

### 3.4. Etude de la variabilité de la communauté bactérienne entre les individus

#### 3.4.1. Sans facteur discriminant

Une s-PCA a été réalisée sur l'ensemble des 311 échantillons. Une analyse en composantes principales (ACP, ou PCA en anglais) explique au mieux la variabilité des données, en ne prenant en compte aucun facteur de variation (on parle de variables décorréliées les unes des autres). Cette méthode permet une représentation graphique de toutes les données.

Une analyse s-PCA modère les effets des individus dispersés lors d'une analyse PCA, tout en gardant leur information.

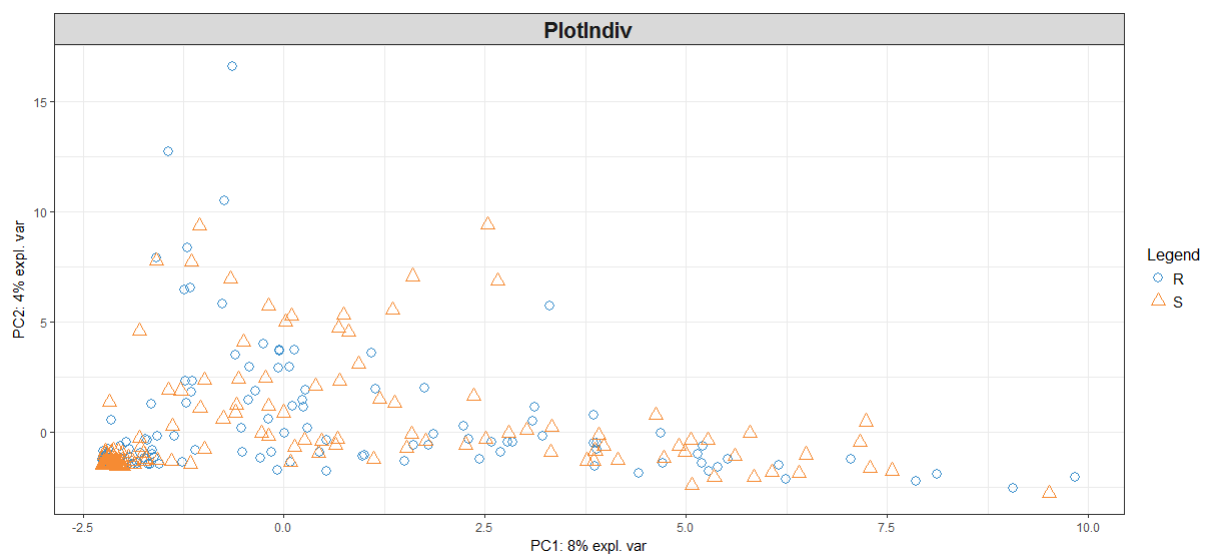


Figure 22 : Variabilité bactérienne de nos échantillons expliquée par la lignée R ou S (s-PCA)

Sur la figure 22, on note que seule 8% de la variabilité entre les échantillons est expliquée par cet axe.

Il est cependant intéressant de rechercher les OTUs (ou clusters) corrélés à cette légère variabilité.

Nous avons conservé ceux qui avaient un poids sur l'axe 1 supérieur à 0,2 (Tableau 17).

**Tableau 17 : Clusters dont la valeur de corrélation avec la composante 1 de la sPCA est supérieure à 0,2**

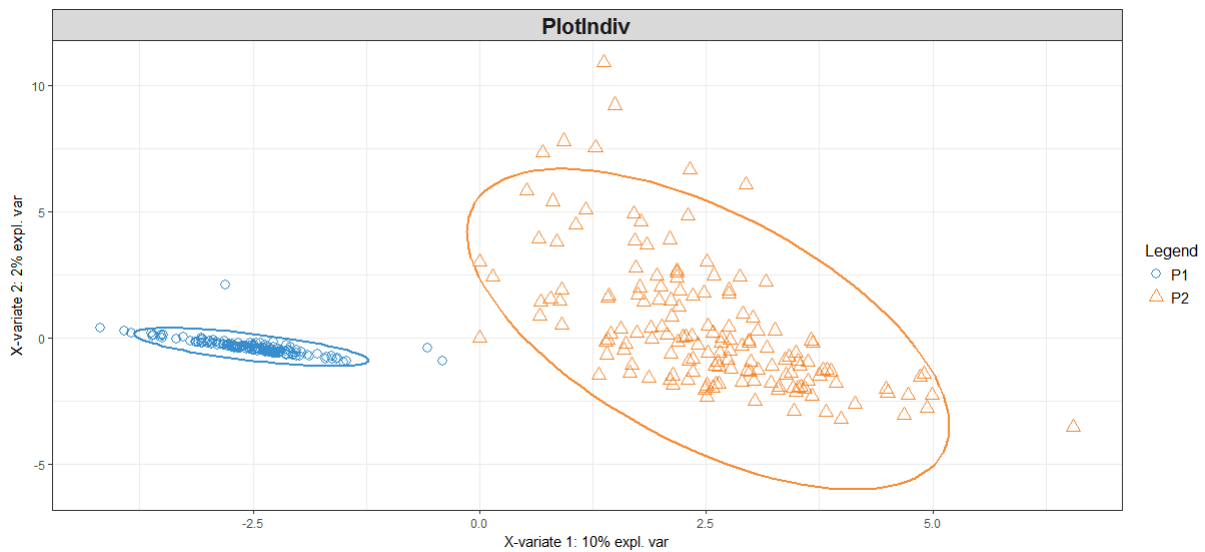
Cluster (OTU)	Value var.	Affiliation (Domaine Phylum Classe Ordre Famille Groupe Genre Espèce)
<b>Cluster_61</b>	0.43	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidales UCG-001;unknown genus;unknown species
Cluster_71	0.41	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidales BS11 gut group;unknown genus;unknown species
<b>Cluster_372</b>	0.37	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcales;Ruminococcales UCG-005;unknown species
<b>Cluster_704</b>	0.32	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Acetitomaculum;unknown species
Cluster_128	0.26	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidales RF16 group;unknown genus;unknown species
Cluster_34	0.25	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Lachnospiraceae NK3A20 group;unknown species
Cluster_590	0.24	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae;Prevotella 1;unknown species
<b>Cluster_628</b>	0.23	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Lachnospiraceae XPB1014 group;unknown species
Cluster_766	0.22	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcales;Ruminococcus 2;unknown species
<b>Cluster_1253</b>	0.21	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae;Rikenellaceae RC9 gut group;unknown species



NB : Dans les tableaux 17, 18 et 19, les clusters en gras sont des clusters communs à plusieurs tableaux.

### 3.4.2. Avec facteur discriminant : la Période

L'effet période ayant été le plus important sur la diversité, nous avons décidé de faire une sPLS-DA, pour identifier les clusters impliqués. C'est une analyse discriminante, donc avec un apriori, ici le facteur période. On obtient le graphique suivant (figure 23).



**Figure 23 : Variabilité des échantillons expliquée pour 10% par la période P1 ou P2**

On note deux groupes de points distincts selon la période, et une composante 1 expliquant 10% de la variabilité et permettant bien de discriminer nos 2 groupes.

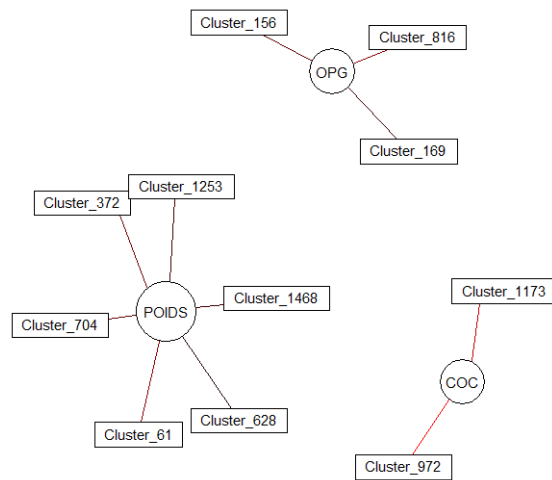
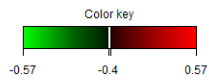
Les clusters majoritairement impliqués dans cette variabilité sont réunis dans le tableau 18.

Tableau 18 : Clusters dont la valeur de corrélation avec la variabilité des individus en fonction de la période d'infestation est supérieure à 0,2

Cluster (OTU)	Value var.	Affiliation (Domaine Phylum Classe Ordre Famille Groupe Genre Espèce)
Cluster_1253	0.47	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae;Rikenellaceae RC9 gut group;unknown species
Cluster_781	0.42	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Lachnospiraceae NK3A20 group;unknown species
Cluster_295	- 0.40	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Family XIII;[Eubacterium] nodatum group;unknown species
Cluster_1273	0.32	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae;Prevotella 1;unknown species
Cluster_531	0.26	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae;Alloprevotella;unknown species
Cluster_240	0.24	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococcaceae;Ruminococcus 1;unknown species
Cluster_1191	0.21	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae;unknown genus;unknown species

### 3.4.3. Recherche de co-évolution entre certains paramètres zootechniques et des OTUs

Nous nous sommes intéressés au nombre de coccidies (noté COC) et au nombre d'œufs de parasites (noté OPG) comptés dans les fèces des agneaux, ainsi qu'à leur poids. Pour cela nous avons effectué une analyse s-PLS, et utilisé une représentation en réseau pour l'illustrer, en ne retenant que les clusters les plus corrélés ( $> 0,4$  et  $< -0,4$ ) (figure 24).



**Figure 24 : Network des corrélations existantes entre les paramètres zootechniques POIDS OPG et COC, et certains clusters**

Nous avons identifié les clusters les plus corrélés dans le tableau 19 suivant.

Tableau 19 : Clusters co-évoluant avec les facteurs COC, OPG et POIDS

Facteur	Cluster (OTU)	Affiliation	Effet (ANOVA)	
COC	Cluster_972	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria;	Période NS	
		Rhodospirillales; unknown family; unknown genus; unknown species	Jour NS Parasite NS Lignée NS	
	Cluster_1173	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;	Période *	
		Defluviitaleaceae; Defluviitaleaceae UCG-011; unknown species	Jour NS Parasite NS Lignée NS	
POIDS	Cluster_1253	Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales;	Période ***	
		Rikenellaceae; Rikenellaceae RC9 gut group; unknown species	Jour *** Parasite * Lignée NS	
	Cluster_372	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;	Période ***	
		Ruminococcaceae; Ruminococcaceae UCG-005; unknown species	Jour *** Parasite NS Ligne *	
	Cluster_704	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;	Période ***	
		Lachnospiraceae; Acetitomaculum; unknown species	Jour *** Parasite ***	
	OPG	Cluster_1468	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales;	Lignée NS Période ***
			Lachnospiraceae; Lachnospiraceae NK3A20 group; unknown species	Jour *** Parasite NS Lignée NS
Cluster_61		Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidales UCG-001;unknown genus;unknown species	Période *** Jour *** Parasite ***	
		Cluster_628	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Lachnospiraceae;Lachnospiraceae XPB1014 group; unknown species	Lignée NS Période *** Jour *** Parasite NS Lignée NS
Cluster_156	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevotellaceae;Prevotella 7;unknown species		Période *** Jour *** Parasite * Lignée NS	

Cluster_816	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Prevote	Période ***
	llaceae;Prevotella 1; unidentified rumen bacterium 12-130	Jour *** Parasite * Lignée *
Cluster_169	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Ruminococ	Période ***
	aceae;Ruminococcaceae UCG-013;unknown species	Jour *** Parasite ***
		Lignée NS

*NS : non significatif ; \* : <0,05 ; \*\* : <0,01 ; \*\*\* : <0,001*

Les clusters liés à COC constituent une information intéressante dont nous parlerons dans la discussion.

On observe que 6 clusters sont liés au poids. Chez chacun d’entre eux, on observe un effet Période majeur.

Parmi les clusters liés au poids, l’un d’entre eux est commun à ceux liés à la période observé dans le tableau 18 : le **Cluster 1253**.

Quant aux OPG, 3 clusters sont liés à ce paramètre dont un seul, le Cluster 816, est significativement affecté par l’effet lignée.

## 4. DISCUSSION

### **4.1. Effet des lignées sur les parasites et sur le microbiote ruminal**

Dans la partie 3.2, nous avons prouvé l'efficacité de la sélection génétique de nos deux lignées divergentes quant à leur résistance à *H. contortus*. En effet, *in vivo*, la lignée R excrète moins d'œufs d'*H. contortus* que la lignée S. La lignée R est donc plus résistante à ce parasite que la lignée S.

Cependant, cette résistance n'est pas conservée pour le parasite du duodénum *T. colubriformis* : les deux lignées n'ont pas présenté de différence significative de leurs comptages OPG pour ce parasite. Les lignées R et S expriment donc la même sensibilité à son égard.

Par ailleurs, bien que les deux lignées aient été bien sélectionnées, aucun effet de cette sélection n'a été observé sur la composition bactérienne du microbiote ruminal des agneaux, dans la partie 2.3. Ces résultats contredisent ceux de l'étude de Tirabassi et al. (2016), mais les critères de sélection des moutons résistants étaient différents (pas sur des marqueurs génétiques) et leurs résultats ont été obtenus sur le microbiote abomasal, et non ruminal.

### **4.2. Influence de la période sur la résistance aux parasites et la composition bactérienne du rumen**

Dans les parties 3.2 et 3.3.3, un effet période a été démontré sur les teneurs en OPG des fèces des moutons lors des infestations, ainsi que sur la composition bactérienne du rumen. En période 2, les moutons excrètent plus d'œufs et ont une population bactérienne ruminale plus diversifiée.

La différence d'excrétion d'OPG entre les 2 périodes fait l'objet d'une étude séparée dont les résultats vont très prochainement être publiés. Néanmoins, il est clair que le statut des agneaux face aux parasites entre les 2 périodes n'est pas le même. En période 1 les animaux sont naïfs, alors qu'en période 2 ils ont déjà rencontré le parasite. La réponse des animaux est donc probablement différente lors de la deuxième infestation par rapport à la première.

Il est moins probable que cette différence de statut immunitaire soit à l'origine de la différence observée sur la communauté bactérienne ruminale entre les 2 périodes.

Entre les deux périodes, les âges et poids des agneaux ont également changé. Des agneaux plus gros et plus âgés voient leur volume ruminal et leur capacité d'ingestion augmenter. Il serait intéressant d'étudier l'influence de l'évolution de ces facteurs sur l'excrétion d'œufs et la diversité bactérienne ruminale, en donnant aux animaux la même alimentation.

Chez la vache laitière, une étude a montré que le microbiote ruminal évoluait au cours des lactations (Pitta et al. 2016). Chez une vache en première lactation, c'est Bacteroidetes qui semble contribuer à la majorité de ses fonctions métaboliques, alors que les contributions de Firmicutes et Proteobacteria augmentent progressivement en seconde et troisième lactation. Le microbiote ruminal co-évolue donc avec l'âge, le statut physiologique de l'animal, et sa capacité d'ingestion. Il n'existe pas de publication chez le mouton ni chez le jeune post-sevrage, mais nous pouvons envisager des phénomènes similaires chez les moutons.

On ne peut pas exclure que cette modification de la communauté bactérienne soit due à l'évolution physiologique des agneaux. Pour cela il aurait fallu avoir un lot d'agneaux de même âge et même poids au début du premier challenge parasitaire, et suivre la composition bactérienne de leur rumen et leur poids à Jdeb et J30 de chaque challenge, en leur donnant la même alimentation. Il aurait également fallu avoir un lot témoin non parasité.

Néanmoins, le facteur alimentaire semble le plus important au vue des faibles différences d'âge et de poids, qui, s'ils agissent, seraient des facteurs minoritaires.

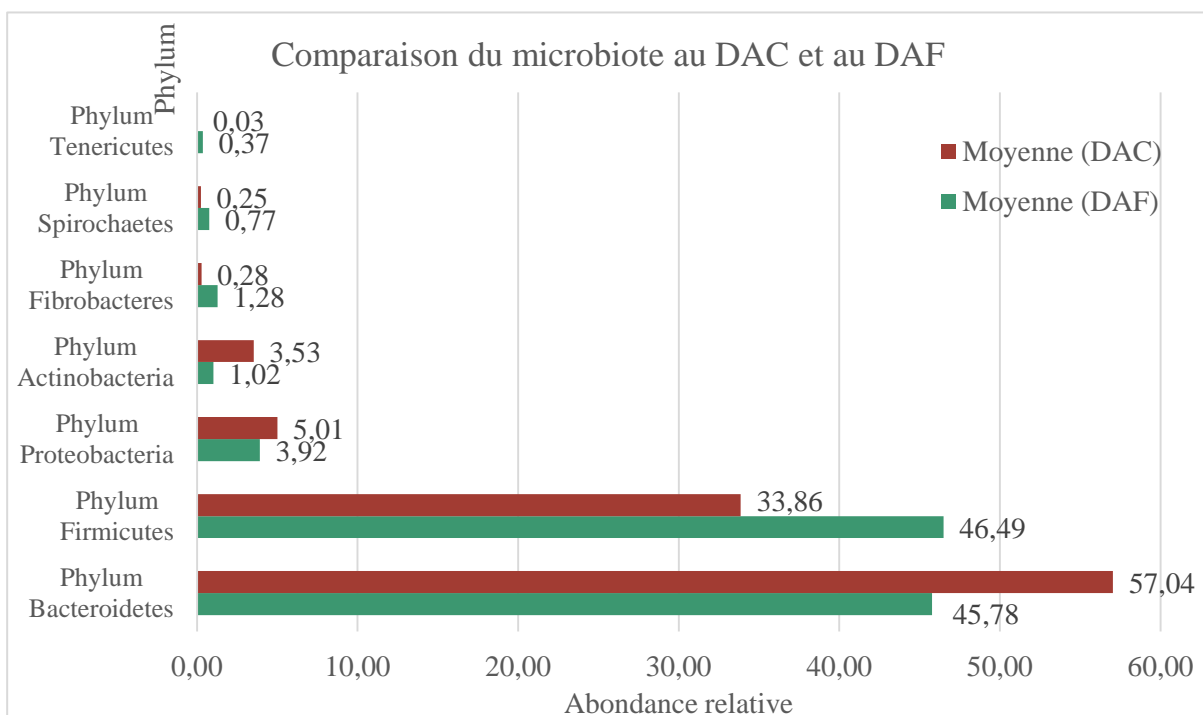
### **4.3. Influence de l'alimentation sur la diversité bactérienne**

La figure 21 présentée dans la partie 3.3.3.3, nous a suggéré une influence alimentaire sur la variabilité bactérienne du microbiote ruminal. Cependant, d'autres paramètres que le régime alimentaire ont changé entre les deux périodes : l'âge, le poids, le statut de l'animal face au parasite. En effet, cette figure représente les moyennes de tous les échantillons,

prélevés à Jdeb et J30 de chaque période, donc sur des animaux parasités ou non, et tout niveau de croissance confondus.

Une étude s'est intéressée à la modification du microbiote bactérien ruminal d'agneaux en fonction de leur alimentation, en travaillant sur des lots de moutons homogènes en âge et en poids, et non parasités. Ils ont également comparé les phyla majoritaires présents dans le rumen, selon si ces agneaux étaient nourris au DAC (Distributeur Automatique de Concentré : ration 100% concentrés) ou au DAF (Distributeur Automatique de Fourrage : ration 67% fourrages et 33% concentrés) (De Almeida 2017). Une transition alimentaire de 15 jours a été réalisée entre ces deux périodes d'alimentation.

Après un calcul des abondances relatives moyennes des différents phyla bactériens présents, ils ont constaté qu'entre leurs deux groupes, les phyla bactériens majoritaires étaient les mêmes, mais leurs abondances relatives étaient significativement différentes entre les 2 régimes (figure 25).



**Figure 25 : Composition du microbiote ruminal des agneaux en fonction du type d'alimentation (DAC ou DAF) (d'après De Almeida 2017)**

Nos agneaux ayant également été nourris pendant P1 avec 100% de concentrés, puis pendant P2 avec 38% de concentrés et 62% de fourrages, nous pouvons émettre l'hypothèse



raisonnable que leur population bactérienne ruminale a également significativement évolué sous l'influence de ce changement d'alimentation (cf p-values Tableau 16). Nos valeurs sont dans les mêmes ordres de grandeurs que celles de cette étude, avec 2 phyla majoritaires (Firmicutes et Bacteroidetes supérieurs à 30% chacun) et 2 phyla intermédiaires (Actinobacteria et Proteobacteria supérieurs à 1% chacun).

Dans la littérature, certains genres bactériens dominants dans les phyla identifiés ont été étudiés et sont connus pour se développer préférentiellement en contact de certains aliments. Il serait intéressant de comparer les abondances relatives de ces genres entre nos deux groupes de moutons, comme l'a fait De Almeida (2017), pour affiner notre étude de l'influence alimentaire sur la composition du microbiote.

Cependant, nous savons que les bactéries du phylum Fibrobacteres ont une activité cellulolytique (Ransom-Jones et al. 2012), ce qui est conforme avec un régime riche en fourrage. Les phyla Tenericutes (AlZahal et al. 2017) et Spirochaetes (Zened et al. 2013) sont également préférentiellement présents chez des animaux nourris avec ce régime.

Ainsi, dans nos échantillons, les phyla Fibrobacteres, Spirochaetes et Tenericutes sont des phyla bactériens composés de bactéries qui semblent préférer les fourrages, ce qui est cohérent avec l'augmentation de leurs abondances relatives en P2 (ajout de fourrages), à confirmer par une analyse plus fine de la variation des abondances relatives de certains genres bactériens au sein de chaque phylum.

Pour les phyla Actinobacteria et Proteobacteria, c'est l'inverse : les bactéries qui les composent semblent préférer les concentrés (Zened et al. 2013), et leurs abondances relatives diminuent en P2 (baisse des concentrés).

Les bactéries identifiées comme appartenant au phylum Bacteroidetes dans nos échantillons sont nombreuses et très variées. Aucune préférence de substrat ne peut être identifiée à l'échelle du phylum.

Quant aux phyla Patascibacteria, Elusmicrobia et Epsilonbacteraeota, leurs abondances relatives sont particulièrement basses (< 0,003%), on considère donc ces phyla comme biologiquement insignifiants.

Enfin, pour les phyla Firmicutes et Fusobacteria, les variations d'abondances relatives n'étant pas significatives (P-values > 0,05), nous n'avons pas cherché de relation entre ces phyla et l'alimentation.

#### **4.4. Identification des OTUs corrélés à la communauté bactérienne du rumen**

Parmi les 10 clusters révélés par la s-PCA (tableau 17), 3 d'entre eux sont identifiés jusqu'au genre :

- Le cluster 704, affilié à une Firmicutes du genre *Acetitomaculum*, favorisée par les régimes riches en fourrages. Elle est impliquée dans la production d'acide butyrique et dans la dégradation de la matière végétale (Petri et al. 2013).
- Le cluster 590, affilié à une Bacteroidetes du genre *Prevotella 1*. Elle dégrade de nombreux substrats et est favorisée par les régimes riches en amidon, donc les concentrés (Petri et al. 2013).
- Le cluster 766, affilié à une Firmicutes du genre *Ruminococcus 2*, impliquée dans la dégradation de la cellulose (Petri et al. 2013).

Parmi les 7 clusters identifiés par la s-PLSDA avec pour facteur discriminant la période, (cf Tableau 17), 3 sont identifiés jusqu'au genre :

- Le cluster 1273, affilié à une Bacteroidetes du genre *Prevotella 1*
- Le cluster 240, affilié à une Firmicutes du genre *Ruminococcus*
- Le cluster 531, affilié à une Bacteroidetes du genre *Alloprevotella*

On retrouve les genres *Prevotella 1* et *Ruminococcus*, déjà identifiés avant discrimination. Le genre *Alloprevotella* est proche de celui des *Prevotella*. Il hydrolyse également plusieurs types de glucides, et est favorisé par les régimes riches en concentrés (Downes et al. 2013; Cheng et al. 2017).

Dans ces deux analyses, on retrouve également le **cluster 1253**, affilié seulement jusqu'au groupe : Rikenellaceae RC9 gut. Ce groupe de bactéries est favorisé par les régimes riches en fourrages (Kong et al. 2010).

Et lorsqu'on regarde les clusters d'influence minoritaire (non conservés dans les tableaux 16 et 17), 3 autres clusters sont communs aux deux analyses : les **clusters 372, 704 et 781**, tous les 3 affiliés à des Firmicutes de l'ordre des Clostridiales.

Le cluster 372 est affilié à une bactérie de la famille des Ruminococcaceae, le cluster 781 est affilié à une bactérie de la famille des Lachnospiraceae, et le cluster 704 est une bactérie du genre *Acetitomaculum*, comme mentionné plus haut.

La famille des Ruminococcaceae est composée de bactéries qui participent à la dégradation de la cellulose (Petri et al. 2013). La famille des Lachnospiraceae est très diversifiée sur le plan des activités de fermentation, mais participe à la production d'acide butyrique et à la dégradation des composants végétaux (Meehan, Beiko, nd). Ces deux familles sont favorisées par des régimes riches en fourrages (Zened et al. 2013), tout comme le genre *Acetitomaculum* (Petri et al. 2013).

Tout ceci nous conforte dans l'idée que l'alimentation joue un rôle majeur dans la composition bactérienne du rumen, comme mentionné dans la partie précédente (partie 4.3).

#### **4.5. Identification des OTUs corrélés à des facteurs zootechniques**

Dans la partie 3.4.3, nous avons montré qu'il existait une corrélation entre certains clusters et certains paramètres zootechniques comme le comptage des OPG, le poids de l'agneau, et le comptage des coccidies. Parmi tous ces clusters, seuls quelques-uns sont affiliés jusqu'au genre, nous permettant ainsi de chercher quelques pistes sur leur rôle dans le rumen et leurs relations avec ces paramètres zootechniques.

##### **4.5.1. OTU lié au comptage des coccidies**

Parmi les 2 clusters qui co-évoluent de façon positive avec le comptage des coccidies, 1 seul est identifié jusqu'au genre : le cluster 1173, affilié à une Firmicutes du genre *Defluviitaleaceae*, impliquée dans la fermentation de sucres (Jabari et al. 2012). Il serait intéressant de comparer les métabolismes des coccidies et de cette bactérie, pour essayer de trouver un lien dans cette co-évolution, dans l'optique de progresser dans nos connaissances sur les coccidies et leur contrôle.

#### 4.5.2. OTUs liés au poids

Parmi les 6 clusters co-évoluant de façon significative avec le poids, les **clusters 1253** (une bactérie du groupe Rickenellaceae favorisée par les fourrages) et **704** (une bactérie acétogène favorisée par les fourrages) sont également des clusters révélés par la sPCA (partie 3.5.2). Pour ces 2 clusters il est donc difficile de dire s'ils sont liés au poids ou à un autre paramètre changeant avec la période.

Parmi les 4 clusters co-évoluant uniquement avec le poids, 1 d'entre eux est identifié jusqu'au genre :

- Le cluster 372, affilié à une Firmicutes du genre *Ruminococcaceae UCG-005*, potentiellement cellulolytique comme la majorité des autres Ruminococcaceae.

Ces 4 OTUs semblent donc liées à la prise de poids des agneaux au cours de leur croissance. Mais il est difficile de vraiment conclure sur leur lien direct avec le poids étant donné les facteurs se confondant avec l'effet poids. Une expérience sans changement alimentaire et sans infestation parasitaire a été effectuée pour tenter de mieux identifier ce lien, dont les résultats n'ont pas encore été publiés (De Almeida 2017).

#### 4.5.3. OTUs liés au comptage des œufs de strongles (OPG)

Les 3 clusters co-évoluant avec le comptage des œufs de strongles (exprimé en OPG) sont identifiés jusqu'au genre :

- Le cluster 156, affilié à une Bacteroidetes du genre *Prevotella 7*
- Le cluster 816, affilié à une Bacteroidetes du genre *Prevotella 1*
- Le cluster 169, affilié à une Firmicutes du genre *Ruminococcaceae UCG-013*

Comme vu dans la partie 4.2, les bactéries des genres *Prevotella* et *Ruminococcaceae* sont favorisées par les régimes riches en concentrés (Petri et al. 2013)...

Or pour rappel, dans les résultats en OPG, la période 2 était plus excrétrice que la période 1, et associée à un régime alimentaire différent. Néanmoins ces clusters ne sont pas communs à l'effet période précédemment décrit. Un seul d'entre eux démontre un effet de la lignée.

Ces résultats ouvrent une perspective d'étude intéressante sur le lien qu'il pourrait exister entre alimentation, microbiote et excrétion fécale d'œufs de strongles. Pour confirmer cette idée, il faudrait réaliser de nouvelles analyses de co-évolution avec le même régime alimentaire et en séparant le type de parasite.

#### **4.6. Microbiote ruminal et microbiote abomasal**

Nous nous sommes intéressés au microbiote bactérien du rumen, car c'est un organe par lequel passe *H. contortus*, mais il s'installe dans la caillette. Ce choix a été fait dans l'optique de chercher des moyens d'action sur le cycle du parasite, et en particulier sur l'étape de dégainement de la larve L4 se déroulant dans le rumen.

Certaines études se sont intéressées au microbiote de la caillette.

Ainsi, une étude de la diversité bactérienne de la caillette entre des moutons sensibles et résistants à *H. contortus* a montré une dominance des phyla Firmicutes, Proteobacteria et Bacteroidetes, mais dans des proportions différentes que celles que nous avons obtenus dans le rumen (Tirabassi et al. 2016).

Une étude chez la chèvre a montré que la présence d'*H. contortus* entraînait une augmentation de la charge bactérienne abomasale. Les phyla les plus représentés sont également Bacteroidetes, Firmicutes et Actinobacteria, et ils ont identifié 20 OTUs d'abondance significativement différente entre leurs animaux infestés et les animaux contrôle (Li et al. 2016). Parmi eux on retrouve une *Prevotella*, comme notre cluster 590 (cf Tableau 16).

## CONCLUSION

L'apparition de résistances aux traitements anthelminthiques traditionnels et la prise de conscience quant à leur écotoxicité rendent nécessaire leur usage raisonné de la part des éleveurs et des vétérinaires. Pour cela, des études se penchent sur le développement de biomarqueurs du parasitisme, marqueurs du risque parasitaire aidant à la prise de décision de mettre en place un traitement. Nous avons présentement étudié le microbiote ruminal.

Le premier objectif de cette étude était de valider *in vivo* la méthode de sélection génétique des deux lignées de moutons résistants et sensibles à *Haemonchus contortus*, réalisée par l'équipe de l'UMR de Bourges. Les résultats nous permettent de dire que les marqueurs génétiques identifiés et utilisés dans cette étude sont validés comme outil efficace de sélection rapide des ovins par génotypage. Un second objectif était de tester la conservation de la résistance entre espèces parasites d'intérêt agronomique, comme *Trychostrongylus colubriformis*. Les résultats nous permettent d'affirmer que ce n'est pas le cas. Les moutons génétiquement sélectionnés pour être résistants à *H. contortus* ne le sont pas à *T. colubriformis*. Un troisième objectif de l'étude, non abordé dans cette thèse, était de contrôler l'absence d'impacts délétères sur les performances des animaux sélectionnés. Les résultats sont en cours de traitement et feront l'objet d'une publication prochaine.

Une éventuelle association entre un microbiote ruminal particulier et une meilleure résistance à une infestation parasitaire a été recherchée, sans succès. Aucune différence majeure de population bactérienne ruminale n'a été observée entre les deux lignées. Le microbiote ruminal ne peut donc être un témoin de l'infestation parasitaire aux strongles gastro-intestinaux, ni un levier d'action.

Cependant, une différence notable de population bactérienne ruminale a été objectivée entre le début et la fin de chaque challenge parasitaire, et entre les deux challenges, soulevant différentes questions quant aux paramètres ayant influencé cette variabilité. La présence des parasites semble avoir influencé la composition bactérienne au cours des challenges. L'alimentation semble aussi jouer un rôle important dans la composition du microbiote ruminal, et il se pourrait que l'évolution du poids des animaux également.

Le microbiote ruminal ne peut ainsi pas être utilisé comme biomarqueur de la résistance génétique des moutons aux strongles, mais des relations avec le parasitisme sont montrées, bien que faibles. Caractériser ces liens semble donc être une piste prometteuse pour progresser dans notre connaissance du fonctionnement de ces parasites, et ainsi faire progresser les moyens de lutte.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

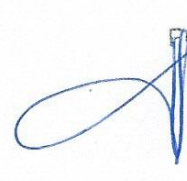
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, **Annabelle MEYNADIER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Anne-laure LESCARRET** intitulée « **Relation entre le microbiote ruminal et le parasitisme gastro-intestinal chez 2 lignées divergentes de moutons résistante et sensible aux strongles digestifs** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

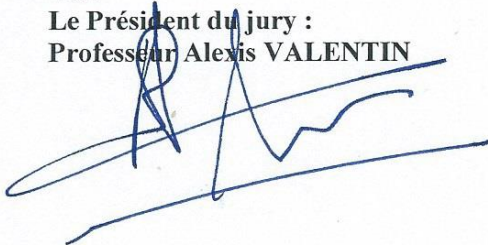
Fait à Toulouse, le **25 janvier 2019**  
Docteur **Annabelle MEYNADIER**  
Maître de Conférences  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse  
**Isabelle CHMITELIN**

 Pour la Directrice et par délégation,  
la Directrice de l'enseignement et de la vie étudiante  
**Caroline LACROUX**

Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur **Alexis VALENTIN**



Mlle **Anne-laure LESCARRET**  
a été admis(e) sur concours en : 2013  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 04/07/2017  
a validé son année d'approfondissement le : 07/02/2019  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
**Paul Sabatier**  
**Monsieur Jean-Pierre VINEL**

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CEVU

  
Régine **ANDRE-OBRECHT**



## BIBLIOGRAPHIE

ABBOTT, K.A, TAYLOR, M et STUBBINGS, L.A, 2012. *Sustainable worm control strategies for sheep 4th Edition : A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisers*. juin 2012. SCOPS.

ALZAHAL, Ousama, LI, Fuyong, GUAN, Le Luo, WALKER, Nicola D. et MCBRIDE, Brian W., 2017. Factors influencing ruminal bacterial community diversity and composition and microbial fibrolytic enzyme abundance in lactating dairy cows with a focus on the role of active dry yeast. *Journal of Dairy Science*. juin 2017. Vol. 100, n° 6, pp. 4377-4393.

BÄCKHED, Fredrik, FRASER, Claire M., RINGEL, Yehuda, SANDERS, Mary Ellen, SARTOR, R. Balfour, SHERMAN, Philip M., VERSALOVIC, James, YOUNG, Vincent et FINLAY, B. Brett, 2012. Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host & Microbe*. novembre 2012. Vol. 12, n° 5, pp. 611-622.

BENSON, A. K., KELLY, S. A., LEGGE, R., MA, F., LOW, S. J., KIM, J., ZHANG, M., OH, P. L., NEHRENBURG, D., HUA, K., KACHMAN, S. D., MORIYAMA, E. N., WALTER, J., PETERSON, D. A. et POMP, D., 2010. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2 novembre 2010. Vol. 107, n° 44, pp. 18933-18938.

BESIER, R.B., KAHN, L.P., SARGISON, N.D. et VAN WYK, J.A., 2016. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In : *Advances in Parasitology*. Elsevier. pp. 181-238.

BOKULICH, Nicholas A, SUBRAMANIAN, Sathish, FAITH, Jeremiah J, GEVERS, Dirk, GORDON, Jeffrey I, KNIGHT, Rob, MILLS, David A et CAPORASO, J Gregory, 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*. janvier 2013. Vol. 10, n° 1, pp. 57-59.

BONNEFONT, Marie et CANELLAS, Amandine, 2014. *Optimisation des outils de diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins*. 2014. Thèse ENVT.

BOUQUET, B, 2016. Le lupin doux allié des ruminants contre les helminthes? *Le Point Vétérinaire*. mars 2016. N° 363, pp. 62-65.

BOWMAN, Dwight D., 1999. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. seventh edition.

BRARD, C et CHARTIER, C, 1997. Quand suspecter une strongylose digestive chez les ovins et les caprins et conduite à tenir. *Le Point Vétérinaire*. 1997. Vol. 28, n° spécial, pp. 83-88.

BRUNET, Severine et HOSTE, Herve, 2006. Monomers of Condensed Tannins Affect the Larval Exsheathment of Parasitic Nematodes of Ruminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. octobre 2006. Vol. 54, n° 20, pp. 7481-7487.

CABARET, J., GASNIER, N. et JACQUIET, P., 1998. Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats. *Parasite*. juin 1998. Vol. 5, n° 2, pp. 137-142.

CABARET, J. et NICOURT, C, 2018. Minimiser la résistance des strongles aux anthelminthiques : de la gestion individuelle à celle des groupes d'éleveurs. *Bulletin des GTVs*. 2018. N° spécial, pp. 87-90.

CALENGE, F, MARTIN, C, FLOCH, N Le, PHOCAS, F, MORGAVI, D, ROGEL-GAILLARD, C et QUÉRÉ, P, 2014. Intégrer la caractérisation du microbiote digestif dans le phénotypage de l'animal de rente : vers un nouvel outil de maîtrise de la santé en élevage ? . 2014. pp. 14.

CHARTIER, C, RAVINET, N, HOSTE, H, JACQUIET, P, MERLIN, A et CHAUVIN, A, 2018. Résistance aux anthelminthiques et traitement raisonné contre les strongles gastro-intestinaux chez les bovins et les petits ruminants. *Bulletin des GTV*. 2018. N° spécial, pp. 17-30.

CHARTIER, Christophe, 2000. *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Tec & Doc. Broché.

CHENG, Weiwei, LU, Jing, LI, Boxing, LIN, Weishi, ZHANG, Zheng, WEI, Xiao, SUN, Chengming, CHI, Mingguo, BI, Wei, YANG, Bingjun, JIANG, Aimin et YUAN, Jing, 2017. Effect of Functional Oligosaccharides and Ordinary Dietary Fiber on Intestinal Microbiota Diversity. *Frontiers in Microbiology*. 20 septembre 2017. Vol. 8.

COOP, Robert L et KYRIAZAKIS, Ilias, 2001. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*. juillet 2001. Vol. 17, n° 7, pp. 325-330.

DE ALMEIDA, Marie-Lea, 2017. *La communauté bactérienne du microbiote de l'agneau : existence d'un lien entre le microbiote et le comportement alimentaire ?* 2017. ENVT, INRA.

DOUCH, P G C, GREEN, R S, MORRIS, C A, BISSETA, S A, VLASSOFF, A, BAKER, R L, WATSON, T G, HURFORD, A P et WHEELER, M, 1995. Genetic and phenotypic relationships among anti-Trichostrongylus colubriformis antibody level, faecal egg count and body weight traits in grazing Romney sheep. *Livestock Production Science*. 1995. N° 41, pp. 121-132.

DOUCH, P G C et WINDON, R G, 1996. Phenotypic Markers for Selection of Nematode-resistant Sheep. *International Journal for Parasitology*. 1996. Vol. 26, n° 8/9, pp. 899-911.

DOWNES, J., DEWHIRST, F. E., TANNER, A. C. R. et WADE, W. G., 2013. Description of *Alloprevotella rava* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity, and reclassification of *Prevotella tanneri* Moore et al. 1994 as *Alloprevotella tanneri* gen. nov., comb. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 1 avril 2013. Vol. 63, n° Pt 4, pp. 1214-1218.

ESCUDIÉ, F, AUER, L, BERNARD, M, CAUQUIL, L, MAMAN, S, MARIADASSOU, M, COMBES, S, HERNANDEZ-RAQUET, G et PASCAL, G, 2017. *Training on Galaxy : Metagenomics. Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution*. novembre 2017.

GEURDEN, Thomas, HOSTE, Herve, JACQUIET, Philippe, TRAVERSA, Donato, SOTIRAKI, Smaragda, FRANGIPANE DI REGALBONO, Antonio, TZANIDAKIS, Nikolaos, KOSTOPOULOU, Despoina, GAILLAC, Christie, PRIVAT, Simon, GIANGASPERO, Annunziata, ZANARDELLO, Claudia, NOÉ, Laura, VANIMISETTI, Bindu et BARTRAM, David, 2014. Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*. mars 2014. Vol. 201, n° 1-2, pp. 59-66.

GOSALBES, María José, DURBÁN, Ana, PIGNATELLI, Miguel, ABELLAN, Juan José, JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, Nuria, PÉREZ-COBAS, Ana Elena, LATORRE, Amparo et MOYA, Andrés, 2011. Metatranscriptomic Approach to Analyze the Functional Human Gut Microbiota. *PLoS ONE*. 8 mars 2011. Vol. 6, n° 3, pp. e17447.

GUAN, Le Luo, NKRUMAH, Joshua D., BASARAB, John A. et MOORE, Stephen S., 2008. Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters*. novembre 2008. Vol. 288, n° 1, pp. 85-91.

HEGARTY, R. S., GOOPY, J. P., HERD, R. M. et MCCORKELL, B., 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production<sup>1,2</sup>. *Journal of Animal Science*. 1 juin 2007. Vol. 85, n° 6, pp. 1479-1486.

HENDAWY, Seham H. M., 2018. Immunity to gastrointestinal nematodes in ruminants: effector cell mechanisms and cytokines. *Journal of Parasitic Diseases*. décembre 2018. Vol. 42, n° 4, pp. 471-482.

HENDRIX, Charles M. et ROBINSON, Ed, 2012. *Diagnostic parasitology for Veterinary Technicians*. fourth edition. Elsevier.

HERTZBERG, H., HUWYLER, U., KOHLER, L., REHBEIN, St et WANNER, M., 2002. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae in vivo and in vitro. *Parasitology*. juillet 2002. Vol. 125, n° 01.

HOBSON, P. N. et STEWART, C. S., 2012. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer Science & Business Media. Google-Books-ID: JAj9CAAQBAJ

HOOPER, Lora V., LITTMAN, Dan R. et MACPHERSON, Andrew J., 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. 2012. Vol. 336, n° 6086, pp. 1268–1273.

HOSTE, H, GUITARD, JP et PONS, JC, 2003. *Pâturage mixte entre ovins et bovins intérêt dans la gestion des strongyloses gastro intestinales*. 2003. Fourrages.

HOSTE, H., TORRES-ACOSTA, J.F.J., SANDOVAL-CASTRO, C.A., MUELLER-HARVEY, I., SOTIRAKI, S., LOUVANDINI, H., THAMSBORG, S.M. et TERRILL, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*. août 2015. Vol. 212, n° 1-2, pp. 5-17.

HOSTE, Hervé, JACKSON, Frank, ATHANASIADOU, Spiridoula, THAMSBORG, Stig. M. et HOSKIN, Simone O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. juin 2006. Vol. 22, n° 6, pp. 253-261.

HOSTE, Hervé, TORRES-ACOSTA, Juan Felipe, ALONSO-DIAZ, Miguel Ángel, BRUNET, Séverine, SANDOVAL-CASTRO, Carlos et ADOTE, Sylvie Houzangbe, 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. . 25 février 2008. pp. 17.

JABARI, L., GANNOUN, H., CAYOL, J.-L., HAMDI, M., FAUQUE, G., OLLIVIER, B. et FARDEAU, M.-L., 2012. Characterization of *Defluviitalea saccharophila* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters, and proposal of *Defluviitaleaceae* fam. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 1 mars 2012. Vol. 62, n° Pt 3, pp. 550-555.

JACQUIET, P, FIDELLE, F, LEPETITCOLLIN, E, PRIVAT, S, GAILLAC, C, BERGEAUD, JP et HOSTE, H, 2014. Etat des lieux de la résistance aux anthelminthiques en France chez les ovins. *Le Nouveau Praticien Vétérinaire*, 7, 29, 240-246. . 2014.

JACQUIET, P, 2012. Première sélection sur phénotype de béliers résistants aux strongles Gastro-intestinaux. *La Semaine Vétérinaire*. 23 mars 2012. N° 1488, pp. 42.

JACQUIET, P, 2014. *Les strongyloses gastro-intestinales des Ruminants*. 2014. Parasitologie ENVT.

JACQUIET, Philippe, 2006. L'infestation par *Haemonchus contortus* induit une réponse immunitaire de type Th2. *La Semaine Vétérinaire*. 7 octobre 2006. N° 1240.

KHACHATRYAN, Zaruhi A., KTSOYAN, Zhanna A., MANUKYAN, Gayane P., KELLY, Denise, GHAZARYAN, Karine A. et AMINOV, Rustam I., 2008. Predominant Role of Host Genetics in Controlling the Composition of Gut Microbiota. *PLoS ONE*. 26 août 2008. Vol. 3, n° 8, pp. e3064.

KING, Erin E., SMITH, Rachel P., ST-PIERRE, Benoit et WRIGHT, André-Denis G., 2011. Differences in the Rumen Methanogen Populations of Lactating Jersey and Holstein Dairy Cows under the Same Diet Regimen. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 août 2011. Vol. 77, n° 16, pp. 5682-5687.

KONG, Yunhong, TEATHER, Ronald et FORSTER, Robert, 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages: Effect of diet on the rumen microbial composition. *FEMS Microbiology Ecology*. décembre 2010. Vol. 74, n° 3, pp. 612-622.

KYRIAZAKIS, I., ANDERSON, D.H., OLDHAM, J.D., COOP, R.L. et JACKSON, F., 1996. Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology*. février 1996. Vol. 61, n° 3-4, pp. 297-313.

LARSEN, M, FAEDO, M, WALLER, P.J et HENNESSY, D.R, 1998. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Studies with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*. mars 1998. Vol. 76, n° 1-2, pp. 121-128.

- LEE, Soo Ching, TANG, Mei San, LIM, Yvonne A. L., CHOY, Seow Huey, KURTZ, Zachary D., COX, Laura M., GUNDRU, Uma Mahesh, CHO, Ilseung, BONNEAU, Richard, BLASER, Martin J., CHUA, Kek Heng et LOKE, P'ng, 2014. Helminth Colonization Is Associated with Increased Diversity of the Gut Microbiota. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 22 mai 2014. Vol. 8, n° 5, pp. E2880.
- LEQUEUX, G et CHAUVIN, A, 2018. Gestion des parasitoses chez les bovins : intérêts et limites du diagnostic de laboratoire. *Bulletin des GTV*. 2018. N° spécial, pp. 115-122.
- LI, Robert W., LI, Weizhong, SUN, Jiajie, YU, Peng, BALDWIN, Ransom L. et URBAN, Joseph F., 2016. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Scientific Reports*. août 2016. Vol. 6, n° 1.
- LI, Robert W., WU, Sitao, LI, Weizhong, HUANG, Ying et GASBARRE, Louis C., 2011. Metagenome Plasticity of the Bovine Abomasal Microbiota in Immune Animals in Response to Ostertagia Ostertagi Infection. *PLoS ONE*. 9 septembre 2011. Vol. 6, n° 9, pp. e24417.
- LI, Robert W., WU, Sitao, LI, Weizhong, NAVARRO, Karl, COUCH, Robin D., HILL, Dolores et URBAN, Joseph F., 2012. Alterations in the Porcine Colon Microbiota Induced by the Gastrointestinal Nematode *Trichuris suis*. *Infection and Immunity*. juin 2012. Vol. 80, n° 6, pp. 2150-2157.
- LOUIE, K., VLASSOFF, A. et MACKAY, A.D., 2007. Gastrointestinal nematode parasites of sheep: A dynamic model for their effect on liveweight gain. *International Journal for Parasitology*. février 2007. Vol. 37, n° 2, pp. 233-241.
- LUMARET, JP et KADIRI, N, 2018. Les médicaments vétérinaires et leurs résidus : quels risques pour les organismes non cibles et le fonctionnement des écosystèmes ? *Bulletin des GTV*. 2018. N° spécial, pp. 93-100.
- MCKELLAR, Q.A., 1997. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*. novembre 1997. Vol. 72, n° 3-4, pp. 413-435.
- MCLEOD, R.S., 1995. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. *International Journal for Parasitology*. novembre 1995. Vol. 25, n° 11, pp. 1363-1367.
- MEEHAN, Conor J et BEIKO, Robert G, [sans date]. Environmental Distribution, Adaptation and Evolution of the Lachnospiraceae, Core Members of Mammalian Digestive System Microbiomes. . pp. 1.
- MENG, He, ZHANG, Yan, ZHAO, Lele, ZHAO, Wenjing, HE, Chuan, HONAKER, Christa F., ZHAI, Zhengxiao, SUN, Zikui et SIEGEL, Paul B., 2014. Body Weight Selection Affects Quantitative Genetic Correlated Responses in Gut Microbiota. *PLoS ONE*. 7 mars 2014. Vol. 9, n° 3, pp. e89862.
- MIDHA, Ankur, SCHLOSSER, Josephine et HARTMANN, Susanne, 2017. Reciprocal Interactions between Nematodes and Their Microbial Environments. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [en ligne]. 27 avril 2017. Vol. 7. [Consulté le 26 janvier 2019]. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00144/full>

- MORENO-ROMIEUX, C, 2016. Sélection de petits ruminants résistants aux strongles gastro-intestinaux. *La Semaine Vétérinaire*. 12 février 2016. N° 1661, pp. 34.
- MORGAN, E.R. et VAN DIJK, J., 2012. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology*. septembre 2012. Vol. 189, n° 1, pp. 8-14.
- MORGAVI, D. P., FORANO, E., MARTIN, C. et NEWBOLD, C. J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *animal*. juillet 2010. Vol. 4, n° 07, pp. 1024-1036.
- O'CONNOR, Lauren J., WALKDEN-BROWN, Stephen W. et KAHN, Lewis P., 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. novembre 2006. Vol. 142, n° 1-2, pp. 1-15.
- O'SULLIVAN, B.M et DONALD, A.D, 1972. *Responses to infection with Haemonchus contortus and Trichostrongylus colubriformis in ewes of different reproductive status, International Journal of Parasitology, 1973, Vol. 3, pp 521-530.* octobre 1972.
- PETRI, Renee M., SCHWAIGER, Tyler, PENNER, Greg B., BEAUCHEMIN, Karen A., FORSTER, Robert J., MCKINNON, John J. et MCALLISTER, Tim A., 2013. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. *PLoS ONE*. 31 décembre 2013. Vol. 8, n° 12, pp. e83424.
- PIOZ, M et VIDAU, C, 2018. Antiparasitaires et biocides : un facteur de risque pour les insectes en général et pour l'abeille mellifère en particulier? *Bulletin des GTV*. 2018. N° spécial, pp. 101-112.
- PITTA, Dipti W., INDUGU, Nagaraju, KUMAR, Sanjay, VECCHIARELLI, Bonnie, SINHA, Rohini, BAKER, Linda D., BHUKYA, Bhima et FERGUSON, James D., 2016. Metagenomic assessment of the functional potential of the rumen microbiome in Holstein dairy cows. *Anaerobe*. avril 2016. Vol. 38, pp. 50-60.
- PRYCE, J. E., WALES, W. J., DE HAAS, Y., VEERKAMP, R. F. et HAYES, B. J., 2014. Genomic selection for feed efficiency in dairy cattle. *animal*. janvier 2014. Vol. 8, n° 01, pp. 1-10.
- RANSOM-JONES, Emma, JONES, David L., MCCARTHY, Alan J. et MCDONALD, James E., 2012. The Fibrobacteres: an Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Microbial Ecology*. février 2012. Vol. 63, n° 2, pp. 267-281.
- RAVINET, N, CHARTIER, C, HOSTE, H, MAHIEU, M, DUVAUCHELLE-WACHE, A, MERLIN, A, BAREILLE, N, JACQUIET, P et CHAUVIN, A, 2017. Enjeux et outils du traitement raisonné contre les strongles gastro-intestinaux chez les bovins et les petits ruminants. . 2017. pp. 20.
- RAYNAUD, JP, LEROY, JC, VIRAT, M et NICOLAS, JA, 1979. Une technique de coproscopie quantitative polyvalente par dilution et sédimentation en eau, flottaison en solution dense (DSF) et numération en lame de Mac Master. *Revue de Médecine vétérinaire*. 1979. Vol. 130, n° 3, pp. 377-404.

- REYNOLDS, Lisa A, SMITH, Katherine A, FILBEY, Kara J, HARCUS, Yvonne, HEWITSON, James P, REDPATH, Stephen A, VALDEZ, Yanet, YEBRA, María J, FINLAY, B Brett et MAIZELS, Rick M, 2014. Commensal-pathogen interactions in the intestinal tract: Lactobacilli promote infection with, and are promoted by, helminth parasites. *Gut Microbes*. juillet 2014. Vol. 5, n° 4, pp. 522-532.
- ROEBER, Florian, JEX, Aaron R. et GASSER, Robin B., 2013. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*. décembre 2013. Vol. 31, n° 8, pp. 1135-1152.
- ROOKE, John A., WALLACE, R. John, DUTHIE, Carol-Anne, MCKAIN, Nest, DE SOUZA, Shirley Motta, HYSLOP, Jimmy J., ROSS, David W., WATERHOUSE, Tony et ROEHE, Rainer, 2014. Hydrogen and methane emissions from beef cattle and their rumen microbial community vary with diet, time after feeding and genotype. *British Journal of Nutrition*. août 2014. Vol. 112, n° 03, pp. 398-407.
- ROOS, Marleen H., KWA, Marcel S.G., VEENSTRA, Jetty G., KOOYMAN, Frans N.J. et BOERSEMA, Jaap H., 1993. Molecular aspects of drug resistance in parasitic helminths. *Pharmacology & Therapeutics*. janvier 1993. Vol. 60, n° 2, pp. 331-336.
- ROSENBERG, Eugene et ZILBER-ROSENBERG, Ilana, 2011. Symbiosis and development: The hologenome concept. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 1 mars 2011. Vol. 93, n° 1, pp. 56-66.
- SCHLOSS, Patrick D., GEVERS, Dirk et WESTCOTT, Sarah L., 2011. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE*. 14 décembre 2011. Vol. 6, n° 12, pp. e27310.
- SHAW, D. J. et DOBSON, A. P., 1995. Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. *Parasitology*. janvier 1995. Vol. 111, n° S1, pp. S111.
- STEAR, M.J. et WAKELIN, D., 1998. Genetic resistance to parasitic infection. *Revue Scientifique et Technique de l'Organisme International des Epizooties*. 1 avril 1998. Vol. 17, n° 1, pp. 143-153.
- TIRABASSI, Adriane Holtz, MADEIRA, Humberto Maciel França, FRAGOSO, Stenio Perdigão, UMAKI, Adriana Castilhos Souza, EGEVARDT, Rodrigo, MELO, Talita, PEREIRA, João Filipi, TEIXEIRA, Valéria Natasha, OLLHOFF, Rüdiger Daniel et SOTOMAIOR, Cristina Santos, 2016. Molecular identification of abomasal bacteria associated with genetic resistance and susceptibility to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Semina: Ciências Agrárias*. 14 décembre 2016. Vol. 37, n° 6, pp. 4097.
- TORRES-ACOSTA, J.F.J. et HOSTE, H., 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*. juillet 2008. Vol. 77, n° 2-3, pp. 159-173.
- TURNBAUGH, Peter J., HAMADY, Micah, YATSUNENKO, Tanya, CANTAREL, Brandi L., DUNCAN, Alexis, LEY, Ruth E., SOGIN, Mitchell L., JONES, William J., ROE, Bruce A., AFFOURTIT, Jason P., EGHOLM, Michael, HENRISSAT, Bernard, HEATH, Andrew

C., KNIGHT, Rob et GORDON, Jeffrey I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 22 janvier 2009. Vol. 457, n° 7228, pp. 480-484.

ZAJAC, Anne M., 2006. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. novembre 2006. Vol. 22, n° 3, pp. 529-541.

ZENED, Asma, COMBES, Sylvie, CAUQUIL, Laurent, MARIETTE, Jérôme, KLOPP, Christophe, BOUCHEZ, Olivier, TROEGELER-MEYNADIER, Annabelle et ENJALBERT, Francis, 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiology Ecology*. février 2013. Vol. 83, n° 2, pp. 504-514.



## Annexe 1 : Mode opératoire d'extraction du microbiote

Guide d'utilisation du Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 Kit  
(Zymo Research Corp. 2018)



### 1. Highlights

Rapid, high-throughput (96-well) method for the isolation of inhibitor-free, PCR-

quality DNA from microbes including Gram positive and negative bacteria, fungi, algae, protozoa, etc. in fecal and soil samples in as little as 50 minutes.

State-of-the-art, ultra-high density **BashingBeads™** are fracture resistant and chemically inert.

Omits the use of organic denaturants as well as proteinases.

### 2. Product Contents

<b>Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 Kit</b> (Kit Size)	<b>D6011</b> (2x96 preps.)	<b>Storage</b> <b>Temperature</b>
<b>ZR BashingBead™ Lysis Rack (0.1 &amp; 0.5 mm)</b>	2	Room Temp.
<b>Lysis Solution</b>	(2) 40 ml	Room Temp.
<b>Genomic Lysis Buffer<sup>1</sup></b>	150 ml	Room Temp.
<b>DNA Pre-Wash Buffer<sup>2</sup></b>	50 ml	Room Temp.
<b>g-DNA Wash Buffer</b>	100 ml	Room Temp.

<b>DNA Elution Buffer</b>	(2) 10 ml	Room Temp.
<b>Prep Solution (DNase/RNase-Free)</b>	30 ml	Room Temp.
<b>Deep-Well Block</b>	2	Room Temp.
<b>Silicon-A™ Plate</b>	2	Room Temp.
<b>Silicon-A™-HRC Plate</b>	2	Room Temp.
<b>Collection Plate</b>	2	Room Temp.
<b>Elution Plate</b>	6	Room Temp.
<b>Cover Foil</b>	4	Room Temp.
<b>Instruction Manual</b>	1	-

Note - Integrity of kit components is guaranteed for up to one year from date of purchase. Reagents are routinely tested on a lot-to-lot basis to ensure they provide maximal performance and reliability.

<sup>1</sup> For optimal performance, add beta-mercaptoethanol to 0.5%(v/v) i.e., 750 µl per 150 ml.

<sup>2</sup> A precipitate may have formed in the DNA Pre-Wash Buffer during shipping. To completely resuspend the buffer, incubate the bottle at 30 – 37 °C for 30 minutes and mix by inversion. DO NOT MICROWAVE.

### 3. Specifications

**Format** – Bead Beating, 96-Well Plate Purification.

**Sample Sources** – Host, bacterial, fungal, algal, protozoan, viral DNA can be isolated from

≤ 80 mg sample of mammalian feces or ≤ 135 mg soil. Additionally, 10 – 20 mg (wet weight) fungal/bacterial cells<sup>3</sup> can be processed.

**DNA Purity** – High quality, inhibitor-free DNA is eluted with **DNA Elution Buffer** suitable for the amplification of bacterial, protist, and/or mammalian templates ( $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ).

**DNA Size Limits** – Capable of recovering genomic DNA sized fragments from 100 bp to

$\geq 40$  kb. Typical fragment sizes range from 25 kb - 35 kb. If present, parasitic and viral DNA will also be recovered.

**DNA Recovery** – Typically, up to 5  $\mu\text{g}$  total DNA is eluted into 100  $\mu\text{l}$  (50  $\mu\text{l}$  minimum) **DNA Elution Buffer** per sample.

**Equipment** – Centrifuge w/ microplate carrier, 96-well plate/block disruptor or pulverizer.

#### 4. Product Description

The **Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 Kit** is designed for the simple, rapid, and high-throughput (96-well) isolation of inhibitor-free, PCR-quality DNA from a variety of fecal (including humans, birds, rats, mice, cattle, etc.) and soil (including clay, sandy, silty, peaty, chalky, and loamy soils) samples. The kit can be used to successfully isolate DNA from tough-to-lyse Gram positive and negative bacteria, fungi, algae, protozoa, etc. that inhabit fecal and soil samples. The procedure is easy and can be completed in as little as 50 minutes: fecal samples ( $\leq 80$  mg each) or soil samples ( $\leq 135$  mg) are added directly to a **ZR BashingBead™ Lysis Rack (0.1 & 0.5 mm)** and rapidly and efficiently lysed by bead beating (e.g., 2010 GenoGrinder<sup>®</sup>, Page 6) without the use of organic denaturants or proteinases. The DNA is then isolated and purified using our Zymo-Spin™ Technology, which is subsequently filtered to remove PCR inhibitors. The DNA is ideal for downstream molecular-based applications including PCR, arrays, genotyping, etc. A schematic of the **Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 Kit** procedure is shown below.

#### 5. Protocol

For optimal performance, add beta-mercaptoethanol (user supplied) to the **Genomic Lysis Buffer** to a final dilution of 0.5%(v/v) i.e., 750  $\mu\text{l}$  per 150 ml.

1. Add  $\leq 80$  mg of fecal sample or  $\leq 135$  mg of soil to the tubes of a **ZR BashingBead™**

**Lysis Rack (0.1 & 0.5 mm)**. Add 400  $\mu$ l **Lysis Solution** to each tube. Cap tubes tightly

to prevent leakage.

*Note: Alternatively, add 10-20 mg (wet weight) fungal and/or bacterial cells<sup>1</sup> that have been resuspended in up to 50  $\mu$ l of water or isotonic buffer (e.g., PBS) to the tubes of a ZR BashingBead™ Lysis Rack.*

2. Secure in a 96-well block/plate bead beater (e.g., 2010 GenoGrinder<sup>®</sup>) and process samples. Optimization of processing time/speed will be necessary for complete sample

lysis.

*Note: Processing times may be as little as one minute when using high-speed cell disrupters*

3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Rack (0.1 & 0.5 mm) at  $\geq 3,000 \times g$  (5,000  $\times g$  max.) for 5 minutes.

4. Transfer up to 250  $\mu$ l supernatant to each well of a **96-Well Block**.

5. Add 750  $\mu$ l of **Genomic Lysis Buffer** to the supernatant in the 96-Well Block from Step

4. Cover completely with **Cover Foil** and mix thoroughly by vortexing for 2 minutes. Centrifuge the 96-Well Block at  $\geq 3,000 \times g$  (5,000  $\times g$  max.) for 5 minutes.

6. Remove or pierce foil and transfer 500  $\mu$ l from the wells of Step 5 to the wells<sup>2</sup> of a **Silicon-A™ Plate**, mounted on a **Collection Plate**. Centrifuge the assembly at  $\geq 3,000 \times g$  (5,000  $\times g$  max.) for 5 minutes.

7. Discard the flow-through from the Collection Plate and repeat Step 6.

8. Add 200  $\mu$ l **DNA Pre-Wash Buffer** to the wells of the Silicon-A™ Plate, mounted on the emptied Collection Plate, and centrifuge the assembly at  $\geq 3,000 \times g$  for 5 minutes.
9. Add 500  $\mu$ l **g-DNA Wash Buffer** to the wells of the Silicon-A™ Plate on the Collection Plate and centrifuge the assembly at  $\geq 3,000 \times g$  for 5 minutes.
10. Prepare the **Silicon-A™-HRC Plate<sup>3</sup>** by mounting it on an **Elution Plate**. Add 150  $\mu$ l **Prep Solution** to the wells by piercing through the cover foil. Incubate at room temperature for 5 minutes, and centrifuge the assembly at exactly  $3,500 \times g$  for 5 minutes.
11. Place the Silicon-A™ Plate directly onto a prepared Silicon-A™-HRC Plate, and then mount the assembly on a new Elution Plate (this new assembly is a 3 plate stack).
12. Add 100  $\mu$ l (50  $\mu$ l minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the matrices to the Silicon-A™ Plate on top. Centrifuge the assembly at exactly  $3,500 \times g$  for 3 minutes.

Eluted, ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments, or the Elution Plate can be covered with Cover Foil for storage of the DNA.

Toulouse, 2019

NOM : LESCARRET

PRENOM : Anne-Laure

**TITRE : RELATION ENTRE LE MICROBIOTE RUMINAL ET LE PARASITISME GASTRO-INTESTINAL CHEZ DEUX LIGNEES DE MOUTONS RESISTANTE ET SENSIBLE AUX STRONGLES DIGESTIFS**

**RESUME** : En élevage ovin, l'apparition de résistances aux traitements anthelminthiques traditionnels utilisés contre les strongles gastro-intestinaux est un problème majeur. Pour essayer d'endiguer ce phénomène, de nombreuses recherches s'axent sur le développement de moyens de lutte alternatifs et de nouveaux biomarqueurs de ce parasitisme, notamment le microbiote ruminal. Cette thèse présente une étude *in vivo* sur les effets d'une sélection de deux lignées divergentes de moutons, résistante et sensible à *Haemonchus contortus*, sur le microbiote ruminal. Les analyses menées ont permis de valider l'efficacité de cette sélection et de prouver qu'il n'existait pas de relation directe entre le microbiote ruminal et la résistance de ces moutons à *Haemonchus contortus*. Certains résultats ont cependant permis d'établir des corrélations entre des OTUs bactériens du rumen et certains paramètres zootechniques comme le comptage OPG dans les fèces, ouvrant la voie à de nouvelles pistes de recherches.

**MOTS-CLES** : ovins - strongles gastro-intestinaux – *Haemonchus contortus*– sélection - résistance – microbiote

---

**TITLE : RELATION BETWEEN RUMINAL MICROBIOTA AND GASTROINTESTINAL PARASITISM IN TWO DIVERGENT RESISTANT AND SENSITIVE SHEEP LINES TO DIGESTIVE HELMINTHES**

**ABSTRACT** : In sheep farming, the emergence of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes is a growing concern. To stem this evolution, many researches focus on developing alternative ways of struggle and new parasitic biomarkers, especially the ruminal microbiota. This thesis describes an *in vivo* study on two divergent *Haemonchus contortus* resistant and sensitive sheep lines selection effects on ruminal microbiota. Analysis of results allowed the validation of the selection efficiency and proved that there isn't any direct relation between ruminal microbiota and sheep resistance to *Haemonchus contortus*. However, some results showed correlations between ruminal OTUs and some zootechnic markers as OPG feces counting, leading the way of new research tracks.

**KEYWORDS** : sheep – gastrointestinal nematodes – *Haemonchus contortus* – selection – resistance - microbiota