




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/> 25821

To cite this version:

Touitou, Florian . *Impact de la sélection génétique sur la résistance à *Haemonchus contortus* et de l'apport alimentaire de protéines sur le microbiote ruminal et l'efficacité alimentaire de brebis gestantes et allaitantes*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2019, 218 p.

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

IMPACT DE LA SELECTION GENETIQUE SUR LA RESISTANCE A *HAEMONCHUS CONTORTUS* ET DE L'APPORT ALIMENTAIRE DE PROTEINES SUR LE MICROBIOTE RUMINAL ET L'EFFICACITE ALIMENTAIRE DE BREBIS GESTANTES ET ALLAITANTES

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

Florian TOUITOU
Né, le 21 août 1994 à Gonesse (95)

Directeur de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER

JURY

PRESIDENT :
M. Alexis VALENTIN

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :
Mme Annabelle MEYNADIER
M. Emmanuel LIENARD

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



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

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- 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. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- 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*
- 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*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- 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*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*

PROFESSEURS CERTIFIÉS 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*
- 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. **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**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie - Analgésie*
- 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 réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*
- Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*
- Mme **ROMANOS Lola**, *Pathologie des ruminants*
- M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

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

À mon jury de thèse,

À Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN

Professeur des Universités de la Faculté de Pharmacie de Toulouse en Parasitologie et Zoologie et Praticien Hospitalier au Centre Hospitalier Universitaire de Rangueil,

Pour nous faire l'honneur de présider ce jury de thèse,

Mes hommages respectueux.

À Madame le Docteur Annabelle MEYNADIER

Maître de Conférences en Alimentation Animale à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour nous avoir proposé ce sujet de thèse, pour votre encadrement et votre bienveillance,

Mes sincères remerciements.

À Monsieur le Docteur Emmanuel LIÉNARD,

Maître de Conférences en Parasitologie, Maladies Parasitaires et Zoologie Appliquée à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de prendre part au jury de cette thèse,

Ma gratitude.

À mes collègues et amis,

Pour leur implication et leur participation à ce travail de thèse,

Ma reconnaissance chaleureuse.

Table des matières

Liste des Figures :	13
Liste des Tableaux :	17
Liste des sigles et acronymes utilisés :	19
Partie 1 : Gestion du parasitisme en élevage ovin.....	21
I) Présentation du cheptel ovin mondial et particularités françaises	21
A) La domestication des ovins.....	21
B) Répartition mondiale actuelle des ovins	22
C) Particularités du cheptel ovin français	23
II) Parasitisme en élevage ovin.....	25
A) Notion de parasitisme	25
B) Importance économique du parasitisme en élevage ovin	25
C) Parasitoses majeures des ovins	25
III) Focus sur le parasitisme associé à <i>Haemonchus contortus</i>	29
A) Description du parasite	29
B) Cycle biologique d' <i>Haemonchus contortus</i>	30
1) La phase libre du cycle biologique d' <i>Haemonchus contortus</i>	30
2) La phase parasitaire du cycle d' <i>Haemonchus contortus</i>	31
3) Cinétique de l'infestation par <i>Haemonchus contortus</i>	32
C) Pathogénicité d' <i>Haemonchus contortus</i>	34
D) Diagnostic de l'haemonchose ovine	36
1) Diagnostic épidémio-clinique	36
2) Diagnostic nécropsique	37
3) Diagnostic de laboratoire	37
a) La coproscopie	37
b) La coproculture	41
c) Les méthodes immunologiques	41
d) Les méthodes biochimiques	42
e) Les méthodes moléculaires	42
IV) Lutte contre les strongles gastro-intestinaux : emphase sur <i>Haemonchus contortus</i>	43
A) Actions de lutte contre le parasitisme se concentrant sur le parasite.....	44
1) Utilisation de strongicides médicamenteux	44
a) Les familles de molécules anthelminthiques utilisables en France	44
i) Les benzimidazolés et pro-benzimidazolés	44
ii) Les imidothiazolés.....	46

iii) Les salicylanilides	47
iv) Les lactones macrocycliques	48
v) Les dérivés d'amino-acétonitrile	51
b) Pratique de la lutte chimique	53
c) Limites à l'utilisation des anthelminthiques.....	54
i) Apparition de résistances aux anthelminthiques	54
ii) Écotoxicité des principaux anthelminthiques	58
2) Utilisation de substances non-médicamenteuses présentant une activité anthelminthique : les métabolites secondaires de plantes.	59
a) Les tanins.....	59
i) Définition et classification.....	59
ii) Mise en évidence de propriétés anthelminthiques des tanins condensés.....	60
iii) Mode d'action des tanins condensés	60
iv) Variabilité des effets des tanins condensés	62
v) Intérêts et limites de l'utilisation des tanins condensés	62
b) Les alcaloïdes des pépins de citrouille et du lupin doux	63
B) Actions de lutte contre le parasitisme centrées sur l'environnement	64
1) La gestion des pâtures	64
a) Gestion de la densité de population : application du principe de dilution.	64
b) Utilisation de « pâtures tournants » : application du principe d'évasion.....	65
c) Utilisation de pâtures mixtes entre hôtes différents.	65
i) Pâturage mixte entre espèces différentes.....	65
ii) Pâturage mixte entre individus d'une même espèce.....	66
2) Contrôle biologique de l'infestation des pâtures.....	66
a) Utilisation de champignons nématocides	67
b) Utilisation de bactéries nématocides	68
ii) Bactéries responsables de la digestion interne du nématode : exemple de <i>Chryseobacterium nematophagum</i>	70
c) Utilisation de nématodes « cannibales »	70
C) Actions de lutte contre le parasitisme centrées sur l'hôte	71
1) Le contrôle immunologique de l'infestation parasitaire	71
a) Réponse immunitaire de l'hôte	71
i) Réponse immunitaire innée face à l'infestation parasitaire.....	71
ii) Réponse immunitaire adaptative face à l'infestation parasitaire	73
b) Facteurs impactant la mise en place de la réponse immunitaire	75
i) La race	75

ii) Le sexe.....	76
iii) Âge et statut physiologique.....	77
2) Amélioration de la résistance et de la résilience des animaux à l'infestation parasitaire.....	79
a) La vaccination.....	79
i) Un vaccin contre l'haemonchose ovine, enfin !.....	79
ii) Principes généraux de la vaccination contre <i>Haemonchus contortus</i>	80
iii) Mode d'action du Barbervax®.....	80
b) Nutrition et parasitisme.....	81
c) Sélection génétique.....	83
i) Hypothèses initiales associées à la sélection génétique.....	83
ii) L'héritabilité d'un caractère : notion de base de la sélection génétique (241).....	85
iii) Efficacité de la sélection génétique pour la résistance à <i>Haemonchus contortus</i>	88
iv) Interaction entre la sélection génétique pour la résistance à <i>Haemonchus contortus</i> et les paramètres de production.....	89
v) Intégration de la sélection génétique pour la résistance à <i>Haemonchus contortus</i> dans les schémas de sélection.....	89
D) Bilan sur la lutte contre <i>Haemonchus contortus</i>	90
1) Réfléchir à une stratégie de contrôle avec un conseiller et/ou un vétérinaire.....	90
2) Éviter l'importation de nématodes résistants, utilisation d'une quarantaine.....	90
3) Suivre la résistance aux anthelminthiques au sein de l'élevage.....	91
4) Administrer les anthelminthiques efficacement.....	91
5) N'utiliser les anthelminthiques que quand cela est nécessaire.....	91
6) Choisir le bon anthelminthique.....	91
7) Préserver des populations-refuges de vers sensibles.....	92
8) Réduire la dépendance aux anthelminthiques.....	93
E) Ouverture sur le microbiote.....	95
Partie 2 : Étude du microbiote ruminal ovin et relations avec l'infestation parasitaire et les stratégies de lutte contre celle-ci.....	96
I) Caractérisation du microbiote ruminal ovin.....	96
A) Particularités anatomo-physiologiques du tube digestif des Ruminants.....	96
B) Le microbiote ruminal.....	97
1) Présentation du microbiote ruminal.....	97
2) Relations entre le microbiote ruminal et le microbiote du reste du tractus digestif.	98
C) Techniques de mesure du microbiote ovin.....	100

1) Observation	100
2) Culture.....	100
3) Utilisation de l'ARN ribosomal 16S en métataxonomie	102
a) La révolution de l'ARNr 16S	102
b) Utilisation d'outils d'écologie microbienne : les indices de diversité.....	105
i) Notions de diversité	105
ii) Diversité α	107
iii) Diversité β	110
c) Problèmes associés à la métataxonomie.....	112
4) La métagénomique.....	113
5) Les méthodes métatranscriptomiques	114
6) Les méthodes métaprotéomiques	114
7) Comparaison des méthodes : exemple des archées.....	114
D) Caractérisation du microbiote ovin	116
1) Abondances des microorganismes dans le rumen des ovins.....	116
2) Composition du microbiote ruminal ovin	117
a) Les bactéries	117
i) Phyla bactériens majoritaires	117
ii) Les Firmicutes	119
iii) Les Bacteroidetes	120
iv) Les Proteobacteria.....	120
b) Les archées	121
c) Les protozoaires	122
d) Les champignons.....	124
II) Relations entre le parasitisme et le microbiote des ovins.....	125
A) Leviers d'action de l'infestation parasitaire sur le microbiote	125
B) Infestation par <i>Haemonchus contortus</i> et microbiote abomasal ovin.....	125
C) Infestation par <i>Haemonchus contortus</i> et microbiote intestinal ovin	126
D) Infestation par <i>Haemonchus contortus</i> et microbiote ruminal ovin.....	127
Partie 3 : Étude de l'impact de la sélection génétique pour la résistance à <i>Haemonchus contortus</i> sur le microbiote ruminal de brebis périparturientes et sur son activité.	128
I) Présentation de l'étude	128
II) Matériel et Méthodes.....	128
A) Éthique des essais sur animaux	128
B) Animaux	128

C)	Régimes	129
D)	Infestation	129
E)	Prélèvements et mesures.....	132
F)	Dosages sanguins.....	132
G)	Coproscopies.....	133
H)	Étude du contenu ruminal	133
1)	Évaluation des produits de fermentation microbienne.....	133
2)	Étude du microbiote ruminal	133
I)	Analyse bio-informatique	135
J)	Analyses biostatistiques.....	137
III)	Résultats.....	139
A)	Vérifications du modèle experimental.....	139
1)	Divergence des lignées.....	139
2)	Effets de la ration sur les paramètres sanguins	141
3)	Effet de la ration sur les paramètres de production.....	144
B)	Étude de la communauté bactérienne ruminale	145
1)	Résultats du séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S des bactéries ruminales	145
2)	Analyse multivariée de la communauté bactérienne ruminale	148
a)	Analyse en Composantes Principales.....	148
b)	Régression des moindres carrés partiels parcimonieuse	149
3)	Étude de la diversité bactérienne	150
C)	Étude des métabolites microbiens du contenu ruminal	154
1)	Concentration ruminale en azote ammoniacal	154
.....	154
2)	Concentration en acides gras volatils dans le contenu ruminal	155
IV)	Discussion.....	158
A)	Validation du modèle expérimental.....	158
1)	Divergence des lignées.....	158
2)	Divergence de ration	159
B)	Étude de la communauté bactérienne ruminale	160
C)	Étude des métabolites microbiens du rumen	162
	Conclusion :.....	165
	Bibliographie :.....	167
	Annexes :.....	205

Liste des Figures :

Figure 1: Répartition mondiale des ovins en 2010 d'après l'étude GLW 3 publiée en 2018 par Gilbert et al. (6). Le côté de chaque pixel représente 0,083333 degrés (soit environ 10km à l'équateur).	22
Figure 2 : Répartition des ovins laitiers et allaitants en France au recensement du SSP de novembre 2016 (10).	24
Figure 3 : Intervalle de température pour le développement des œufs embryonnés des trois espèces de nématodes gastro-intestinaux majoritaires en larves infestantes (L3). Les températures optimales sont représentées par les intensités de couleur, les traits pointillés représentent les limites minimale et maximale. D'après O'Connor (2006)(28).	28
Figure 4 : Dimorphisme sexuel d' <i>Haemonchus contortus</i>	29
Figure 5: Cycle biologique d' <i>Haemonchus contortus</i>	32
Figure 6: Infestation des pâtures par des les différentes formes libres des nématodes gastro-intestinaux, d'après Abbott et al.(46).	33
Figure 7: Pourcentage de larves développées à partir de coprocultures, d'après González-Garduño et al. (47).	33
Figure 8 : Œdème de l'auge, classiquement associé à la forme aiguë de l'haemonchose ovine.	35
Figure 9: Utilisation du FAMACHA ^(C) pour la caractérisation de l'anémie chez les petits ruminants.	36
Figure 10 : Représentation de l'excrétion fécale d'œufs de nématode en fonction de la charge parasitaire. D'après Bishop et Stear (2000) (63).	38
Figure 11 : Méthode de coproscopie de mélange pour la détermination de l'excrétion fécale d'œufs d'un troupeau. Bonnefont et Canellas (2014) (60).	39
Figure 12: Morphologie des œufs de strongles digestifs : (A) Morphologie courante des œufs de trichostrongles , (B) Morphologie des œufs de <i>Nematodirus</i> spp.	40
Figure 13 : Corrélation entre l'excrétion fécale d'œufs et la charge parasitaire mise en évidence par la méta-analyse de Cabaret et al. (1998).	40
Figure 14 : Différents leviers d'action associés aux trois éléments de la triade Hôte/Parasite/Environnement.	43
Figure 15 : Action des inhibiteurs de microtubules tels que les benzimidazolés sur la polymérisation des microtubules. D'après Lancey (1990).	45
Figure 16: Mode d'action des anthelmintiques disponibles pour le traitement des strongyloses ovines en France.	52
Figure 17 : Mécanismes de résistance aux anthelmintiques, d'après Kotze et Prochard (2016) (92).	55
Figure 18 : Schéma récapitulatif des hypothèses concernant le mode d'action des tannins.	61
Figure 19 : Piégeage d'une larve infestante de nématode par le réseau d'hyphes de <i>Duddingtonia flagrans</i> . D'après Youssar et al. (2019) (152).	68
Figure 20 : Mode d'action de <i>Bacillus thuringiensis</i> après ingestion de sporanges par une larve d'insecte. D'après Loudhaief (2016) (157)	69
Figure 21: Mécanismes de l'immunité innée impliqués dans la réponse précoce à l'infestation par <i>Haemonchus contortus</i>	73
Figure 22: Mise en place de la réponse immunitaire adaptative en réponse à une infestation par des nématodes gastro-intestinaux d'après McRae et al. (190). CD : Cellule Dendritique ;	

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes ; E : Éosinophiles ;M : Mastocyte ; P : Plasmocyte ; T : Lymphocyte T.....	75
Figure 23: Races de moutons comparées dans l'étude de Courtney et al. (1985). De droite à gauche, de haut en bas : Saint-Croix, Barbados Blackbelly, Florida-Native Gulf Coast, Suffolk & Dorset (197)	76
Figure 24 : Besoins énergétiques d'une brebis en fonction de son statut physiologique autour de la mise-bas et du nombre d'agneaux de la portée. INRA 2018 (227).....	82
Figure 25 : Illustration des approches de sélection génétique basées sur le nombre de gènes impliqués.	84
Figure 26: Cinétique de propagation des résistances aux anthelminthiques avec les stratégies "Dose and Move", "Dose and Wait" et de préservation de 10% du troupeau non traité.....	93
Figure 27: Gestion intégrée et durable du parasitisme.	94
Figure 28: Schéma de coupe de l'ensemble pré-estomacs/estomac d'un ruminant. Source : Dictionnaire Larousse.	96
Figure 29: Analyse canonique réalisée à partir d'échantillons collectés le long du tractus digestif et analysés par Douglas et al.(2016)(265). Chaque point représente un échantillon.	99
Figure 30: Image obtenue au microscope électronique à transmission d'un protozoaire du genre <i>Epidinium</i> spp. se nourrissant d'autres microorganismes et de composants alimentaires. L'échelle représente 500nm. (F) Vésicule alimentaire, (B) Bactéries, (Ch) Chloroplastes. D'après Huws et al. (2009) (270).....	100
Figure 31: Représentation du biais de prédiction des méthodes de culture. Illustration de Zehavi et al. (2018)(277).....	101
Figure 32 : Comparaison des structures des ARN ribosomiaux 16S et 5S des principaux règnes du vivant. D'après Pace et al. (1986) (282).....	104
Figure 33 : Importance de la richesse et de l'équitabilité dans la définition de diversité. D'après Marcon (2015) (287).	106
Figure 34 : Importance de la disparité dans la définition de la diversité.....	107
Figure 35 : Schéma explicatif de la β -diversité.....	110
Figure 36 : Représentation schématique des calculs d'UniFrac entre deux échantillons A et B dans trois situations : (1) des échantillons très dissociés, (2) des échantillons similaires sans OTU commune, (3) des populations identiques.....	112
Figure 37: Méthodes "Omics" dans l'étude du microbiote ruminal. D'après McSweeney et al. (2012) (318).....	115
Figure 38 : Paramètres modifiant les proportions des différents phyla de l'écosystème bactérien ruminal.....	119
Figure 39: Schéma explicatif du protocole expérimental.....	130
Figure 40 : (A) Méthode classique de clustering reposant sur une distance seuil à partir d'un centroïde calculé à partir des séquences ; (B) Méthode Swarm développée par Mahé et al. (372) reposant sur la constitution pas-à-pas d'un réseau à partir de différences simples entre séquences.....	135
Figure 41 : Schéma explicatif de la chimérisation lors d'une polymérisation en chaîne.	136
Figure 42: Représentation du pipeline utilisé dans le logiciel FROGS.....	137
Figure 43 : Formule de l'indice d'alpha-diversité de Gini-Simpson.	137
Figure 44 : Modèle Linéaire employé pour les analyses de métabolites microbiens et les abondances relatives en différents niveaux taxonomiques.	138

Figure 45 : Excrétion fécale d'oeufs de nématodes chez les brebis génétiquement sélectionnées pour leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) à l'infestation par <i>Haemonchus contortus</i> ($^{\circ}p<0,1$; $*p<0,05$; $**p<0,01$).....	140
Figure 46 : Hématocrite des brebis génétiquement sélectionnées pour leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) à <i>Haemonchus contortus</i> ($^{\circ}p<0,1$; $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$). .	140
Figure 47 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur la concentration sanguine en bêta-hydroxybutyrate (BOHB) pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues de tests de Student entre rations à chaque date de prélèvement.	141
Figure 48 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur la concentration en protéines totales sanguines pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues d'un test de Student entre rations à chaque date de prélèvement.	142
Figure 49 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur l'albuminémie pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues d'un test de Student entre rations à chaque date de prélèvement.	142
Figure 50 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur l'urémie pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues d'un test de Student entre rations à chaque date de prélèvement.	143
Figure 51 : Proportions des différents phyla bactériens obtenus par séquençage de la combinaison des deuxième et troisième prélèvements réalisés sur individus infestés par <i>Haemonchus contortus</i>	145
Figure 52 : Proportions relatives des différents phyla bactériens obtenus par séquençage des échantillons prélevés sur les ovins avant la première infestation parasitaire.	145
Figure 53 : Représentation graphique en deux dimensions de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des échantillons en distinguant : (A) les lignées résistante et sensible ; (B) les rations ; (C) les jours de prélèvement.	148
Figure 54 : Régression des moindres carrés partiels parcimonieuse discriminante sur les données de séquençage obtenues à partir du prélèvement réalisé à J22 et discriminée sur la ration distribuée.	150
Figure 55 : (A) Nombre de séquences obtenues par séquençage à J0, J22, J64 ; (B) Richesse des échantillons prélevés à J0, J22, J64. Les étoiles représentent les moyennes, $^{NS}p>0,1$; $***p<0,001$	151
Figure 56 : Indice de Gini-Simpson en fonction de la lignée des individus prélevés. ($^{NS}p>0,1$; $**p<0,01$; $***p<0,001$).	152
Figure 57 : (A) Indices d'alpha-diversité en fonction de la couverture des besoins protéiques par la ration : (A) Indice de Shannon, (B) Indice de Simpson.	153
Figure 58: Concentration en ammoniac (mg N-NH ₃ /L) dans le rumen de brebis péri-parturientes en fonction de leur lignée (résistante (R) ou sensible (S) aux helminthes) et du niveau protéique de leur ration (120% des besoins (HP) ou 70% (LP)). (HP vs LP : $***p<0,001$; $**p<0,01$; $^{NS}p>0,1$)	154
Figure 59 : Évolution de la concentration molaire (mmol/L) en AGV totaux dosés par chromatographie en phase gazeuse en fonction du jour de prélèvement ($***p<0,001$).	155
Figure 60 : Évolution de la concentration molaire en différents AGV dosés par chromatographie en phase gazeuse en fonction du jour de prélèvement. Deux périodes diffèrent significativement ($p<0,05$) si deux lettres différentes leur sont attribuées.	155
Figure 61 : Évolution des proportions molaires (%AGV totaux) des acides gras volatils à J0, J22 et J64(3) en fonction du niveau protéique des rations avec lesquels les animaux sont	

nourris, respectivement une couverture de 120% (HP) et 70% (LP) du besoin PDI : (A) Acétate, (B) Propionate, (C) Butyrate, (D) Isobutyratee, (E) Valérate et (F) Isovalérate (**p<0,001), *p<0,01, p<0,05, p<0,1, ^{NS} p>0,1).....	157
Figure 62 : Évolution du rapport acétate/propionate (C2/C3) à J0,, J22 et J64 en fonction du niveau protéique des rations avec lesquelles les animaux sont nourris (**p<0,001 ; °p<0,1 ; ^{NS} p>0,1).....	158

Liste des Tableaux :

Tableau 1: Principaux helminthes pathogènes en élevage ovin, d'après (22) (C : Cestodes, N : Nématodes, T : Trématodes)	27
Tableau 2 : Benzimidazolés utilisables en médecine des ovins (PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelmintique cité.	46
Tableau 3: Imidothiazolés utilisables en médecine des ovins (IM = intra-musculaire, PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelmintique cité.	47
Tableau 4: Salicylanilides utilisables en médecine des ovins (SC = sous-cutané, PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelmintique cité.	48
Tableau 5 : Lactones macrocycliques utilisables en médecine des ovins (IM = intra-musculaire, PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelmintique cité).	50
Tableau 6: Dérivés d' amino-acétonitrile utilisables en médecine des ovins (L4 = Larves L4, PV = poids vif) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelmintique cité... ..	52
Tableau 7: Premiers cas de résistances observés relativement à la date de mise sur le marché des principales familles d'anthelminitiques utilisables en France dans le traitement des strongyloses gastro-intestinales ovines. D'après Kaplan et al. (97).....	57
Tableau 8: Répartition des animaux en fonction de leur lignée de provenance et du niveau protéique de leur ration selon les recommandations INRA 2007 (227).....	129
Tableau 9: Constitution des six différents régimes utilisés au cours du protocole (apports estimés d'après INRA 2007) (227).	131
Tableau 10 : Composition nutritionnelle des concentrés (% massique de la matière sèche). ..	131
Tableau 11 : Affiliation des séquences obtenues sur l'ensemble des trois prélèvements de contenu ruminal.	146
Tableau 12 : Proportions relatives des différents taxons bactériens en fonction du niveau protéique de la ration et au cours des différents périodes de prélèvement : Moyenne +/- (Écart-type standard).	147
Tableau 13 : Significativité des différences d'abondances relatives des différents phyla entre les périodes de prélèvement.	147
Tableau 14 : Significativité des différents paramètres du modèle mixte appliqué aux proportions molaires des AGV dosés par chromatographie (***p<0,001), **p<0,01, *p<0,05, NSp>0,05).	156
Tableau 15 : Significativité des différents paramètres du modèle mixte appliqué aux proportions molaires des AGV dosés par chromatographie (***p<0,001), **p<0,01, *p<0,05, NSp>0,05).	156

Liste des sigles et acronymes utilisés :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AGV : Acides Gras Volatils

ARNr : Acide Ribonucléique ribosomal

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

BOHB : Bêta-Hydroxybutyrate

EFO : Excrétion Fécale d'Œufs

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse

FAO : Food and Agriculture Administration

FAMACHA : Faffa Malan Chart

FECRT : Fecal Egg Count Reduction Test (test de réduction de l'excrétion fécale d'œufs)

GABA : Acide Gamma-Amino-Butyrique

GMQ : Gain Moyen Quotidien

GWAS : Genome-Wide Association Study (étude d'association pangénomique)

HCl : Acide Chlorhydrique

HP : ration « High-Protein » (couvrant environ 120% des besoins protéiques)

Ig : Immunoglobuline

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IV : (injection) Intra-Veineuse

LP : ration « Low-Protein » (couvrant environ 70% des besoins protéiques)

MS : Matière Sèche

MSP : Métabolite Secondaire de Plante

NDF : Neutral Detergent Fiber

OTU : Operational Taxonomy Unit

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern (motif moléculaire caractéristique des pathogènes)

PBT : (Substance) Persistante, Bioaccumulable et Toxique

PCA : Principal Component Analysis (Analyse en Composante Principale)

PDI : Protéines Digestibles dans l'Intestin

PDIE : Protéines Digestibles dans l'Intestin permises par l'Énergie de la ration

PDIN : Protéines Digestibles dans l'Intestin permises par l'Azote de la ration

PEG : Polyéthylène glycol

pH : potentiel Hydrogène

PPR : Periparturient Rise (résurgence péri-partum)

PPRI : Periparturient Relaxation of Immunity (Relâchement d'immunité péri-partum)

PV : Poids Vif

PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone

QTL : Quantitative Trait Loci (locus de caractères quantitatifs)

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SC : (injection) Sous-Cutanée

SCOPS : Sustainable Control of Parasites in Sheep (contrôle durable du parasitisme ovin)

sPCA : sparse Principal Component Analysis (analyse en composantes principales parcimonieuse)

sPLS-DA : sparse Partial Least-Square Discriminant Analysis (régression des moindres carrés partiels parcimonieuse et discriminante)

SSP : Service de la Statistique et de la Prospective

TA : Temps d'Attente

TRFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux)

Partie 1 : Gestion du parasitisme en élevage ovin

I) Présentation du cheptel ovin mondial et particularités françaises

A) La domestication des ovins

Les premiers ossements d'ovins potentiellement domestiques, datés à près de 11 000 ans avant Jésus-Christ, ont été retrouvés sur le site préhistorique du Shanidar dans la province d'Ebil au nord-est de l'Irak actuel. Cependant, il est difficile de déterminer s'il s'agissait réellement d'une domestication ou simplement de l'encadrement de hordes sauvages. Clutton-Brock se base sur la présence d'ossements de moutons et de chèvres sur le site néolithique d'Argissa-Magula en Grèce en 7 200 avant Jésus-Christ pour affirmer que ce sont des hommes, les ayant domestiqués, qui les y auraient amenés (1). En effet, ces espèces n'étaient alors pas indigènes de la région mais d'Asie Centrale. Cela fait des petits ruminants les premiers animaux de rente domestiqués.

L'élevage ovin, probablement pour la viande initialement, s'est développé en Asie Mineure où certains phénotypes lainiers ont été sélectionnés. Puis il s'est répandu sur le pourtour méditerranéen par l'intermédiaire des commerçants qui circulaient en bateau dans cet espace prospère. Des analyses d'intégrations rétrovirales au sein de l'ADN de moutons de diverses races ont permis à Chessa et al. (2) de retracer l'histoire de la domestication du mouton. En effet, lorsqu'un rétrovirus parvient à intégrer le génome des cellules germinales de son hôte – on le qualifie alors d'endovirus ou de rétrovirus endogène – il se transmet à sa descendance. Cet événement est irréversible et il est possible d'identifier les descendants de l'animal initialement contaminé. Cela permet notamment d'identifier des groupes qui ont été isolés puisque les uns auront intégré le rétrovirus depuis plusieurs générations alors que les autres en seront exempts. Ainsi, des endovirus ont été retrouvés dans le génome de moutons vivant dans l'ancienne région phénicienne (actuel Liban) ainsi que dans le sud de l'Europe témoignant d'une circulation desdits moutons entre ces deux régions après la contamination.

Des études menées sur l'ADN mitochondrial des brebis ont permis de mettre en évidence plusieurs épisodes de domestication au cours de l'histoire. L'ADN mitochondrial est transmis à chaque animal par sa mère, il subit quelques altérations et mutations à l'instar de l'ADN génomique mais permet d'établir des liens de parenté entre individus et d'identifier à quel moment deux lignées ont divergé. En 1998, Hiendleder et al. étaient parvenus à regrouper les ADN mitochondriaux des moutons testés en deux lignées maternelles et à identifier un héritage du moufflon asiatique (*Ovis musimon*) mais pas de l'Urial (*Ovis vignei boohariensis*) ni de

l'Aragli (*Ovis ammon nigrimontana*). Ces deux lignées ont alors été qualifiées d'Européenne et d'Asiatique selon la région où elles étaient trouvées majoritairement. En 2005, Pedrosa et al. (3) ont identifié une troisième lignée maternelle en analysant l'ADN mitochondrial de brebis turques et Meadows et al, en 2007 (4) ont identifié deux lignées supplémentaires suggérant qu'au moins cinq groupes de moutons ayant divergé avant domestication ont été successivement domestiqués. Les mêmes conclusions ont été obtenues en étudiant l'ADN mitochondrial de porcs ou de chèvres soulignant que la domestication ne s'est pas faite en un seul lieu ni à un seul moment.

B) Répartition mondiale actuelle des ovins

Le cheptel mondial de petits ruminants est difficile à évaluer du fait du manque d'informations concernant l'élevage ou la consommation dans certains pays, notamment dans les pays pratiquant l'autoconsommation comme en Inde. La FAO (Food and Agriculture Organization) estimait à 2,2 milliards le nombre de petits ruminants élevés dans le monde en 2018 répartis en 1,2 milliard d'ovins et 1 milliard de caprins. Parmi ces animaux une part relativement faible était destinée à la production laitière (entre 20 et 30% selon les régions du monde et les pays au sein de ces régions) tandis que l'essentiel de l'élevage était destiné à la production de viande d'agneau (5).

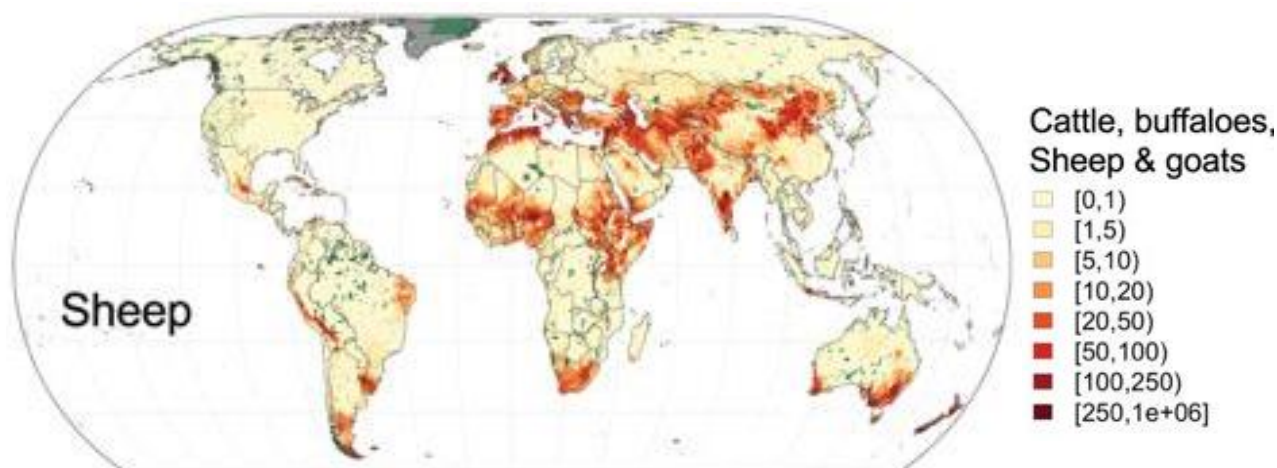


Figure 1: Répartition mondiale des ovins en 2010 d'après l'étude GLW 3 publiée en 2018 par Gilbert et al. (6). Le côté de chaque pixel représente 0,083333 degrés (soit environ 10km à l'équateur).

Si historiquement, l'élevage ovin était centré autour de la mer Méditerranée et en particulier en Asie Mineure où la domestication des moutons commença, on trouve aujourd'hui des moutons un peu partout sur la planète. La carte dressée par Gilbert et al. (6) en 2018 (Figure 1) montre

cependant une répartition inhomogène des populations de moutons. En effet, ceux-ci se trouvent essentiellement autour de la Méditerranée, en Asie Centrale et au sud de l'Inde avec également une densité importante (sous-estimée par le mode de représentation) en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Afrique du Sud, en Argentine et au Chili. La population de moutons au sud du Sahara est légèrement surestimée en proportions mais reste importante. Ces mésestimations viennent essentiellement du fait qu'un degré de longitude correspond à 58 km environ à Saint-Pétersbourg contre 111 km à Quito près de l'équateur du fait de l'aplatissement de la sphère terrestre sur la Figure 1.

Dans la plupart des régions du monde, les brebis et les chèvres sont élevées en proportions similaires. L'Europe et l'Océanie sont des exceptions notables avec une population ovine respectivement 8 fois et 24 fois plus importante que la population caprine (5).

La production de lait de petits ruminants et en particulier de brebis est une tradition méditerranéenne (7). Ainsi, en Océanie, la quasi-intégralité des brebis est élevée pour la production d'agneaux tandis qu'en Grèce 93% de brebis sont des brebis laitières. L'Europe et l'Asie Mineure produisent 41,4% du lait de brebis mondial en n'ayant que 27,1% des brebis laitières élevées dans le monde (5). Cette différence s'explique principalement par le rendement laitier des brebis européennes, deux fois supérieur à la moyenne mondiale. Cela résulte de la mise en place de schémas de sélection, notamment en France, depuis les années 1950, avec notamment le développement du contrôle laitier ovin ou la démocratisation des inséminations artificielles (8).

C) Particularités du cheptel ovin français

Le cheptel ovin français comptait environ 7,2 millions d'animaux répartis en un peu moins de 70 000 élevages d'après le recensement du Service de la Statistique et de la Prospective (SSP) de novembre 2018 (9). Parmi ces animaux, on trouvait 1,7 million de brebis laitières réunies dans moins de 10% des élevages ; 4,1 millions de brebis allaitantes et 1,3 million d'autres ovins (y compris béliers). La répartition géographique du cheptel ovin était inhomogène avec 45% des animaux dans les deux seules régions Occitanie et Nouvelle-Aquitaine, cette situation étant plus marquée encore en élevage laitier pour lequel 97% des animaux se trouvaient en Occitanie, Nouvelle-Aquitaine ou Corse.

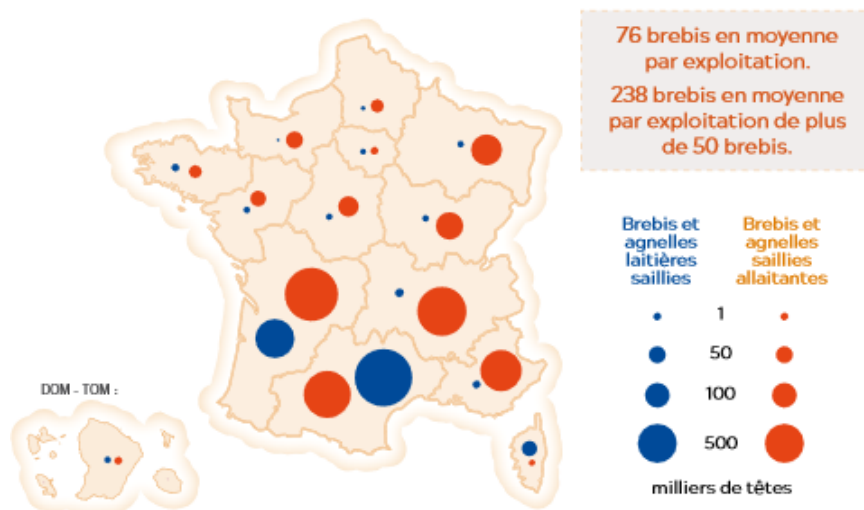


Figure 2 : Répartition des ovins laitiers et allaitants en France au recensement du SSP de novembre 2016 (10).

La carte publiée par l'Interprofession Bétail & Viande (interbev) à partir du recensement du SSP de novembre 2016 (10) présente bien cette démarcation nord-sud de l'élevage ovin en France (Figure 2). La production ovine, notamment laitière, est associée à l'utilisation d'un espace difficilement valorisable autrement, ce qui explique la forte proportion d'élevages laitiers situés en zone montagneuse (11). Traditionnellement l'élevage ovin, notamment français, est plutôt un élevage extensif avec des systèmes pastoraux et herbagers, selon l'importance des parcours, et relativement peu d'élevage intensif (12). L'herbe représente 82% de la ration moyenne des ovins en France (10).

De nombreux élevages sont des élevages mixtes ovins/bovins avec essentiellement des ovins laitiers et des bovins allaitants. Cette association, traditionnelle dans le Pays Basque et le Béarn, représente les deux tiers des élevages d'ovins laitiers dans cette zone géographique (13).

L'élevage ovin permet une valorisation optimale de l'herbe mais explique l'importance de la gestion du parasitisme, l'essentiel des infestations se faisant au pâturage. Une étude réalisée en 2002 par Benoit et Laignel (14) estime entre 7 et 12 % la part des frais vétérinaires dans les charges d'élevages conventionnels français. Ces valeurs sont en accord avec l'estimation réalisée en 2015 par INOSYS Réseaux d'élevage (15). Ces frais sont en grande partie explicables par la lutte contre les parasites responsables de nombreuses affections en élevage ovin.

II) Parasitisme en élevage ovin

A) Notion de parasitisme

La notion de parasitisme est associée à la nécessité pour un être vivant d'utiliser les ressources d'un autre être vivant pour sa survie, sa croissance, son développement ou sa reproduction. Les parasites peuvent être des ectoparasites (vivant à l'extérieur de leur hôte) ou des endoparasites (vivant à l'intérieur de leur hôte) intracellulaires ou extracellulaires. Ils sont responsables d'affections plus ou moins importantes.

B) Importance économique du parasitisme en élevage ovin

Les études les mieux renseignées sur l'impact du parasitisme en élevage ovin ont été réalisées en Australie. L'étude de McLeod et al. (1995) estimait à 222 millions de dollars les pertes associées au parasitisme en se basant sur des études menées dans les années 1970-1980. Ces pertes étaient regroupées en trois pôles : coûts associés au contrôle du parasitisme (81 millions de dollars soit 36,5%), pertes de production (100 millions de dollars soit 45%) et mortalité (41 millions de dollars soit 18,5%) (16). L'impact économique du parasitisme en Australie a été revu à la hausse par Sackett et al. en 2006 avec une estimation de 369 millions de dollars (soit presque 10% du capital total de la filière ovine d'après <http://apps.agriculture.gov.au/mla/mla.asp>) puis par Lane et al. en 2015 avec une estimation de 436 millions de dollars (17). Le parasitisme est le premier poste de dépenses en santé animale dans les élevages ovins et coûte cinq fois plus que la mortalité post-sevrage (18). Ces estimations prennent en compte les coûts associés au traitement, ainsi que les pertes en termes de production lainière et carnée. Dans les pays où la production laitière est importante, le rendement laitier et les paramètres d'intérêt du lait (taux butyreux et taux protéique) seraient à prendre en considération.

C) Parasitoses majeures des ovins

Les parasites les plus importants en élevage ovin sont sans conteste les helminthes bien que d'autres parasites comme les coccidies puissent être responsables de maladies sévères et de pertes économiques importantes (19). Le terme vernaculaire « helminthes » regroupe des animaux phylogénétiquement très différents puisqu'on qualifie d'helminthes l'ensemble des vers ronds, appartenant à l'embranchement Nematoda, et des vers plats, appartenant à l'embranchement des Plathelminthes. L'importance pathogène d'un ver est fonction de sa fréquence (c'est-à-dire de l'exposition des animaux) et de son pouvoir pathogène intrinsèque (Tableau 1).

On distingue classiquement, au sein des Plathelminthes, la classe des Cestoda (céstodes) et la classe des Trematoda (trématodes). Parmi les cestodes, le genre *Moniezia* est de loin le plus pathogène. Les vers ont pour hôte définitif le mouton et sont à l'origine de signes cliniques résultant de la présence de ténias dans le tube digestif avec notamment des alternances d'épisodes de constipations et diarrhées et une possible entérotoxémie parfois mortelle en cas d'infestation massive chez des animaux jeunes du fait de lésions et de l'inflammation de la muqueuse rendant la colonisation par des bactéries anaérobies et le passage sanguin de leurs toxines plus aisé (20). D'autres cestodes utilisent les ruminants comme hôtes intermédiaires et les parasitent à l'état larvaire. Ces derniers ont souvent un pouvoir pathogène plus faible. Parmi les trématodes, on retrouve fréquemment *Fasciola hepatica* dont la migration des larves dans le parenchyme hépatique est à l'origine d'une anémie aiguë et dont l'établissement des adultes dans les canaux biliaires peut être à l'origine de cholangites chroniques.

Les nématodes, ou vers ronds, sont de loin le groupe comprenant le plus d'espèces considérées comme nuisibles à la santé ou la productivité des ovins (21). La plupart des nématodes infestent le tractus digestif mais certains sont capables de migrer dans les poumons (comme les représentants du genre *Dictyocaulus*). Les principaux nématodes rencontrés en élevage ovin sont les parasites appartenant au genre *Trichostrongylus* (par exemple *Trichostrongylus axei*, parasite de la caillette, ou *Trichostrongylus colubriformis*, parasite de l'intestin grêle), *Teladorsagia circumcincta* (parasite de la caillette) et *Haemonchus contortus* (parasite de la caillette) (19) (Figure 3).

Tableau 1: Principaux helminthes pathogènes en élevage ovin, d'après (22) (C : Cestodes, N : Nématodes, T : Trématodes)

Organe-cible	Espèce(s) parasite(s)	Pathogénicité
Caillette	<i>Haemonchus contortus</i> (N)	Forte : Larves et adultes hématophages
	<i>Teladorsagia circumcincta</i> (N)	Faible à Moyenne : Larves histophages, adultes hématophages
	<i>Trichostrongylus axei</i> (N)	Forte mais rare : Larves histophages, Adultes hématophages
Intestin grêle	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> (N)	Faible à Moyenne : Larves et adultes chymivores
	<i>Nematodirus spp.</i> (N)	Moyenne à Forte : Larves et Adultes chymivores
	<i>Moniezia spp</i> (C)	Moyenne à Forte : Adultes chymivores, irritants, phlogogènes
Gros intestin	<i>Chabertia ovina</i> (N)	Moyenne : Larves et Adultes histophages
Foie	<i>Fasciola hepatica</i> (T)	Forte : Jeunes histophages et Adultes hématophages

La prévalence du parasitisme gastro-intestinal par des nématodes est généralement très importante. Ainsi, 51 à 100% des troupeaux étudiés dans le cadre de l'étude de Idris et al. (2012) en Allemagne étaient parasités par des nématodes gastro-intestinaux (23), 73% des élevages de l'étude de Domke et al. (2013) en Norvège (24) et 100% des élevages de l'étude de Martinez-Valladares et al. (2013) dans le Nord-Ouest de l'Espagne l'étaient également (25).

Dans la plupart des publications, les nématodes gastro-intestinaux majoritaires des pays tempérés sont *Trichostrongylus colubriformis* et *Teladorsagia circumcincta* (18, 20, 23, 27) tandis que dans les pays tropicaux et subtropicaux *Haemonchus contortus* est le principal parasite retrouvé (27). Ces différences de répartition découlent de la résistance plus ou moins importante des formes larvaires externes du parasite en fonction du climat. La revue d'O'Connor et al. (2006) s'impose en référence concernant l'écologie des formes libres des

nématodes gastro-intestinaux et montre une résistance moins importante au froid et à la dessiccation des larves d'*Haemonchus contortus* (Figure 3) par rapport aux autres espèces parasitaires. Ces variations quant aux conditions optimales de développement expliquent également les pics différés d'excrétion fécale d'œufs des différents nématodes gastro-intestinaux (28).

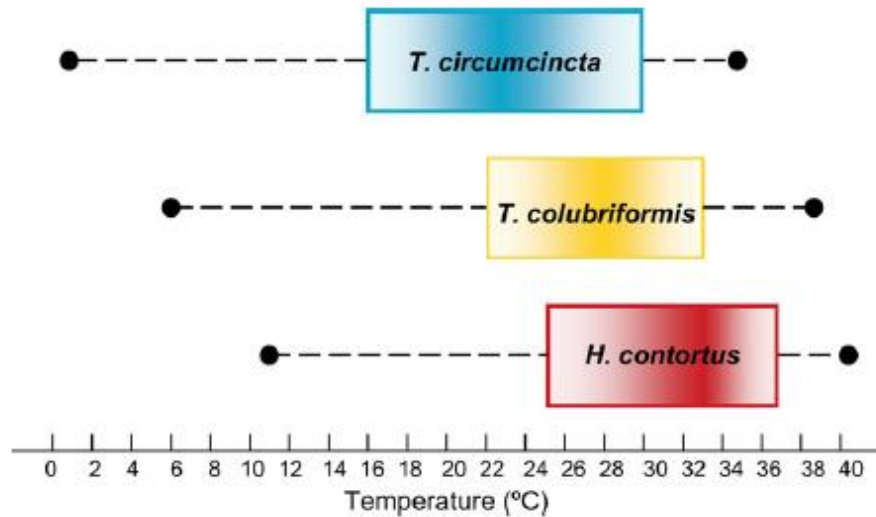


Figure 3 : Intervalle de température pour le développement des œufs embryonnés des trois espèces de nématodes gastro-intestinaux majoritaires en larves infestantes (L3). Les températures optimales sont représentées par les intensités de couleur, les traits pointillés représentent les limites minimale et maximale. D'après O'Connor (2006)(28).

Le paramètre le plus important concernant la capacité des œufs embryonnés à contaminer les hôtes semble être la pluviométrie, nécessaire à la sortie des larves des fèces des animaux (28–30).

Cependant, depuis les dernières années, *Haemonchus contortus* semble prendre une place de plus en plus importante dans les maladies associées aux infestations parasitaires dans des régions où il était autrefois peu présent (31) voire totalement absent. Ainsi l'étude de Lindqvist et al. (2001) rapporte la présence d'*Haemonchus contortus* dans 37% des élevages suédois étudiés, y compris dans des élevages avoisinant le cercle polaire (32). Ce parasite étant le parasite d'intérêt de notre étude expérimentale, il nous semblait important de décrire brièvement les points principaux de l'infestation parasitaire qui lui est associée.

III) Focus sur le parasitisme associé à *Haemonchus contortus*

A) Description du parasite

Haemonchus contortus est un nématode, c'est-à-dire un ver cylindrique, non segmenté, possédant un tube digestif complet (doté d'une bouche et d'un anus) et présentant un dimorphisme sexuel marqué. La femelle, d'une longueur d'environ 18 à 30 mm (33), présente un corps strié de rouge et de blanc (expliquant sa dénomination anglaise de « Barber Pole Worm » du fait de la ressemblance du parasite et des enseignes de barbier). Ces deux couleurs s'expliquent respectivement par la présence de sang dans le tube digestif, *Haemonchus contortus* étant hématophage, et par les deux cordons génitaux spiralés de couleur blanche entourant le tube digestif. Les mâles sont plus petits (une dizaine de mm) et leur corps est uni. Contrairement aux parasites du genre *Trichostrongylus*, les adultes *Haemonchus contortus* sont facilement visibles à l'œil nu (Figure 4).

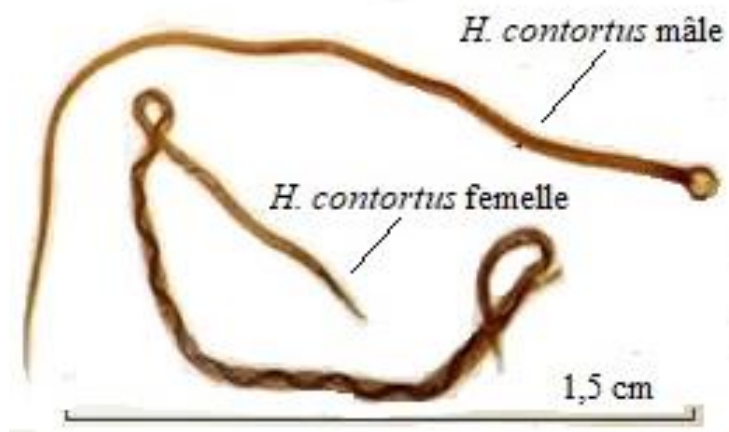


Figure 4 : Dimorphisme sexuel d'*Haemonchus contortus*.

Haemonchus contortus est un parasite hématophage de la caillette des ruminants et en particulier des ovins. L'extrémité antérieure de sa capsule buccale est terminée par une lancette qui permet au parasite d'atteindre les capillaires sanguins de la muqueuse abomasale.

Une de particularités d'*Haemonchus contortus* est son importante fertilité, estimée à près de 1300 œufs par femelle par jour dans la méta-analyse menée par Saccareau et al. (2017) (34). À titre de comparaison, la fertilité de *Teladorsagia circumcincta* est dix fois moins importante et la fertilité des parasites du genre *Trichostrongylus* cent fois moins importante que celle d'*Haemonchus contortus* (35).

B) Cycle biologique d'*Haemonchus contortus*

Le cycle biologique d'*Haemonchus contortus* est un cycle dit monoxène diphasique (Figure 4). Cela signifie qu'un seul hôte est parasité au cours du cycle et que celui-ci se déroule en deux phases : une phase libre (ou exogène) et une phase parasitaire au sens strict (ou endogène).

*1) La phase libre du cycle biologique d'*Haemonchus contortus**

La phase libre débute avec l'élimination dans les fèces des œufs pondus par les femelles *Haemonchus contortus* et se termine à l'ingestion de larves infestantes L3.

Dans les quelques heures à jour suivant l'excrétion fécale, les œufs s'embryonnent et éclosent libérant des larves L1 qui muent rapidement en larves L2. Ces deux stades se nourrissent des matières fécales dont ils sont issus, ils sont très peu résistants dans le milieu extérieur ce qui explique un fort taux de mortalité (65 à 100% dans l'étude in vivo de Coyne et Smith (1992) menée à différentes températures entre 5°C et 35°C (36)). Les larves L2 évoluent au cours d'une mue incomplète en larves L3 qui conservent l'exuvie du stade précédent. Cette gaine ne sera perdue que dans le rumen et protège la larve L3 du milieu extérieur la rendant plus résistante que les stades précédents.

La durée du développement des œufs en larves infestantes dépend des conditions de température et d'humidité (26). Ainsi, Smith et al. (1990) ont montré qu'à 30°C, les œufs d'*Haemonchus contortus* évoluaient en larves infestantes en 3 jours tandis qu'à 10°C, 96 heures étaient nécessaires pour la seule éclosion des œufs (37) et que cette même évolution pouvait se faire sur plus de 15 jours (38). La particularité des stades libres précoces d'*Haemonchus contortus* est leur sensibilité aux températures basses (39) et à la dessiccation (38).

Après les deux premières mues, la larve L3 utilise les réserves accumulées par les deux premiers stades larvaires pour migrer hors des matières fécales où elle s'est développée. En effet, prisonnière de l'exuvie de la larve L2, la larve L3 est incapable de se nourrir. Quitter « l'anneau de répugnance », c'est-à-dire la zone d'herbe entourant une défécation qui ne sera pas consommée, est le meilleur moyen d'être ingérée par l'animal et d'entamer la phase parasitaire dite « endogène ».

La migration de la larve L3 est favorisée par l'humidité de l'herbe qui forme une solution de continuité dans laquelle la larve peut se déplacer. Les larves L3 sont beaucoup moins sensibles que les stades précédents aux températures basses et si aucun œuf n'est capable de survivre à 3°C, les larves L3 peuvent survivre plusieurs jours à semaines à cette température. En revanche,

des températures élevées peuvent être délétères aux larves L3 par assèchement des pâtures et de la larve qui a quitté l'environnement humide des fèces et par augmentation du métabolisme de la larve qui utilise alors ses réserves plus rapidement (40).

2) *La phase parasitaire du cycle d'Haemonchus contortus*

La phase parasitaire du cycle commence à l'ingestion des larves L3 par l'hôte lors du pâturage. Les larves vont alors passer successivement dans les pré-estomacs du ruminant (rumen, réseau, feuillet) avant d'atteindre la caillette, futur lieu de résidence des adultes. Lors de leur passage dans le rumen les larves d'*Haemonchus contortus* vont rapidement perdre leur exuvie. Ainsi, l'étude Hertzberg et al. (2002) montre que 90% des larves L3 d'*Haemonchus contortus* dégainent dans la première heure suivant l'arrivée dans le rumen et que les dernières larves dégainent entre 6 et 12h après arrivée dans le rumen (41). L'environnement digestif (notamment le pH) lève l'inhibition des phénomènes endocriniens contrôlant la mue. Cette levée d'inhibition, qui se déroule dans différents organes en fonction du parasite concerné, est souvent réalisée dans l'organe précédant l'organe-cible du ver. Le dégainement est donc dépendant de conditions physico-chimiques particulières survenant dans un organe précis et la rapidité du dégainement des larves d'*Haemonchus contortus* est cohérent avec le temps passé par ces larves dans le rumen (42). Certaines larves finissent de dégainer dans la caillette.

Une fois arrivées dans la caillette, les larves L3 pénètrent la muqueuse au sein de laquelle elles vont rapidement muer en larves L4. Dans la plupart des cas, les larves L4 sortent de la muqueuse dans les premières 48h après y avoir pénétré (42) et évoluent en stades 5 dits juvéniles avant de donner des adultes mâles et femelles. Cependant dans certains cas particuliers, comme une charge parasitaire trop importante ou des mauvaises conditions extérieures, les larves L4 peuvent s'enkyster dans la muqueuse abomasale retarder leur développement (on parle alors d'« hypobiose larvaire »). Ce phénomène est particulièrement présent dans les pays froids. Passer l'hiver dans l'hôte est alors un bon moyen d'optimiser la reproduction et de ne pas perdre d'œufs à cause d'une gelée trop intense (24). Dans les pays chauds, l'hypobiose hivernale a été rapportée comme en régression dans une méta-analyse réalisée sur deux périodes séparées de 35 ans (43).

Les adultes présents dans la caillette se nourrissent du sang de l'hôte en pénétrant les capillaires abomasaux à l'aide de la lancette terminant leur extrémité buccale. Après fécondation, les œufs sont excrétés dans les matières fécales de l'hôte et deviennent une nouvelle source de contamination des pâtures.

L'intervalle de temps séparant l'ingestion des larves infestantes et l'excrétion des premiers œufs (en l'absence de phénomène d'hypobiose) est qualifié de période pré-patente. Cette période pré-patente dure environ 3 semaines, certaines études ayant trouvé une période pré-patente de 17 jours (44) et d'autres plutôt de 21 jours (45).

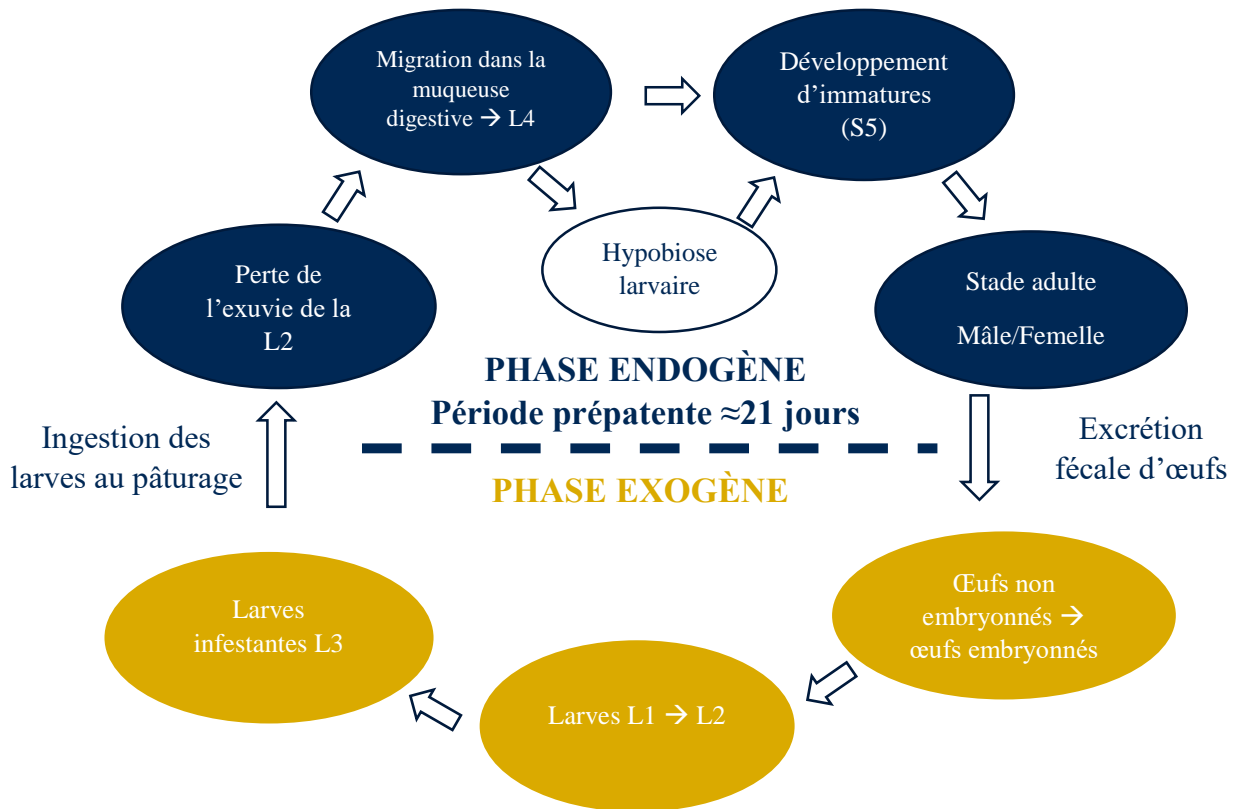


Figure 5: Cycle biologique d'*Haemonchus contortus*.

3) Cinétique de l'infestation par *Haemonchus contortus*

Les principales sources de contamination des prairies à la sortie de l'hiver sont les larves L3 ayant survécu au froid et à la dessiccation durant l'hiver. Ces larves sont ingérées par les brebis, à une période où, juste après l'agnelage, leur immunité est diminuée. Le premier pic d'excrétion d'œufs d'*Haemonchus contortus* survient un peu moins d'un mois après l'ingestion et les agneaux alors à peine sevrés servent de multiplicateurs pour le parasite. Pour ces raisons l'infestation maximale de la pâture survient à la fin du printemps et à l'été (46) (Figure 6).

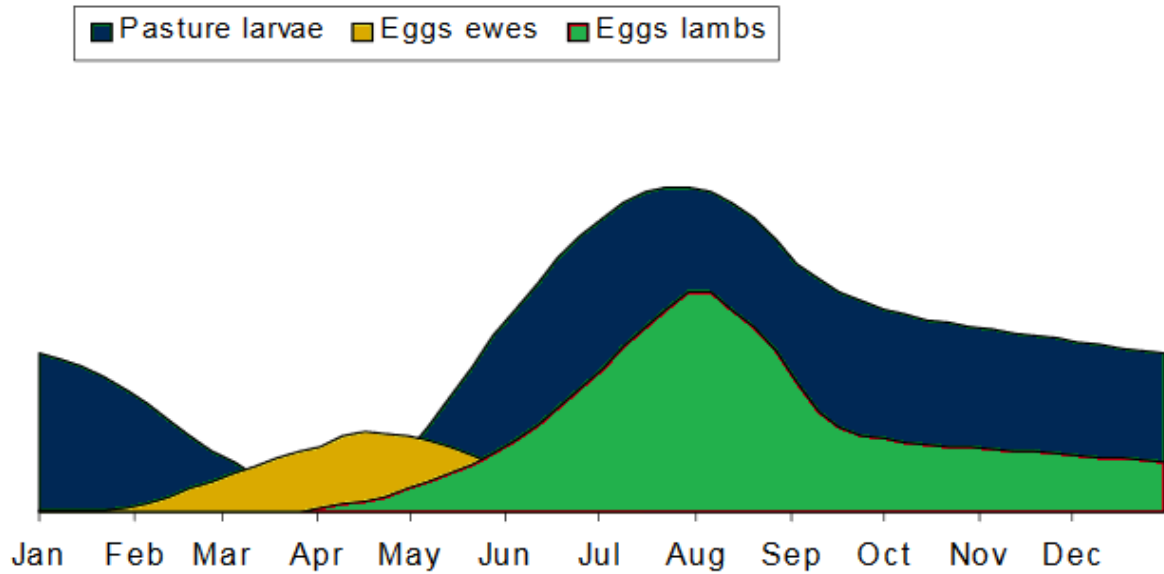


Figure 6: Infestation des pâtures par des les différentes formes libres des nématodes gastro-intestinaux, d'après Abbott et al.(46).

Ce schéma se vérifie particulièrement bien pour *Haemonchus contortus*. La prolificité de ce parasite lui permet de prendre en importance au cours de la saison de pâturage ce qui en fait un parasite majeur en été comme le montre une étude réalisée sur l'année 2013-2014 par González-Garduño et al. (47) (Figure 7).

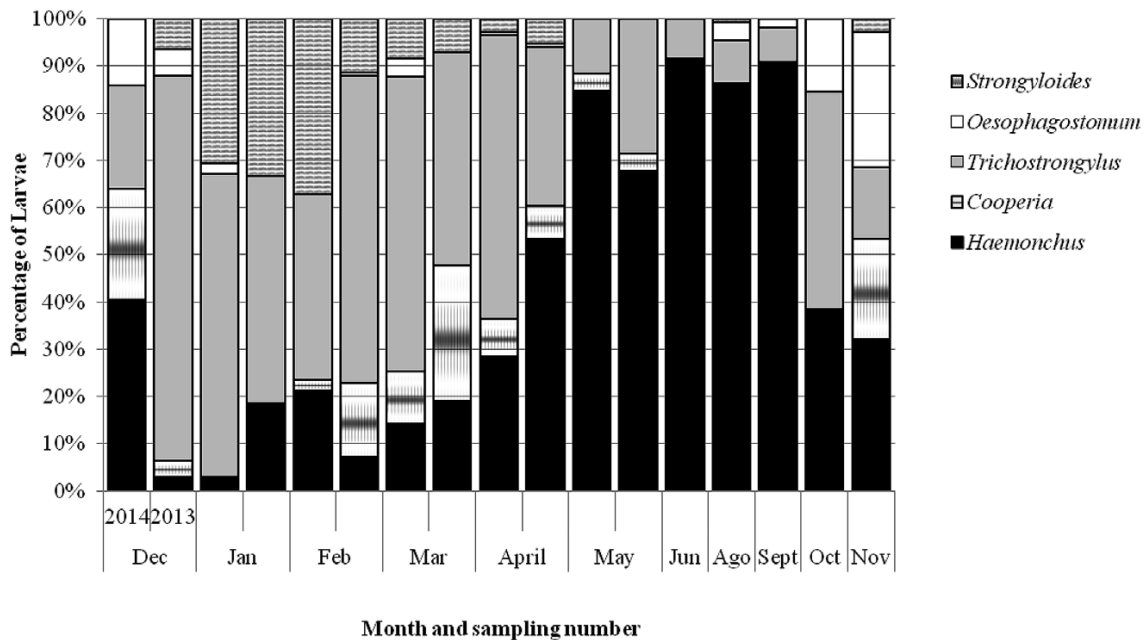


Figure 7: Pourcentage de larves développées à partir de coprocultures, d'après González-Garduño et al. (47).

C) Pathogénicité d'*Haemonchus contortus*

La majorité des signes cliniques associés à l'infestation par *Haemonchus contortus* est liée au caractère hématophage des larves L4, des immatures et des adultes (48). En effet, chaque ver étant capable de prélever de 30 μL (43) à 50 μL (49) de sang par jour à son hôte et de provoquer des saignements pendant plusieurs minutes après repas sanguin (action anti-coagulante de sa salive), les pertes sanguines peuvent être considérables en cas d'infestation massive.

Le syndrome anémique associé à l'haemonchose ovine est plus ou moins visible et marqué selon l'intensité de l'infestation et le statut de l'hôte. Le plus souvent, 3 formes d'haemonchose sont citées (50) :

* l'haemonchose suraiguë : elle touche majoritairement les animaux très jeunes et naïfs à l'infestation pâturant pour la première fois des herbages intensément contaminés mais peut également toucher certaines brebis lors du relâchement de l'immunité autour de la mise-bas (PPRI pour *Periparturient Relaxation of Immunity*). Les animaux meurent subitement d'une gastrite hémorragique sévère sans dégradation préalable de leur état de santé.

* l'haemonchose aiguë : c'est la forme la plus souvent rencontrée, ou du moins la plus souvent remarquée. Elle se caractérise par une anémie s'installant progressivement à partir de la deuxième semaine suivant l'ingestion des larves infestantes. Les pertes sanguines stimulent l'érythropoïèse chez tous les animaux infectés (51), mais chez certains d'entre eux, l'hémorragie abomasale est trop importante et les pertes protéiques et ferriques ne sont pas compensées ou pas assez rapidement. Les animaux atteints d'haemonchose aiguë limitent leurs mouvements, semblent fatigués et essoufflés. Leurs muqueuses pâlisent progressivement et ils peuvent présenter des œdèmes en régions déclives notamment en région infra-mandibulaire (dite « de l'auge ») du fait de l'hypoprotéïnémie associée à la perte de sang.

Le « bottle jaw » traduit en français par « signe de la bouteille », n'est pas pathognomonique mais est souvent évocateur d'une haemonchose aiguë (Figure 8). Il est causé par la diminution de la digestion des protéines alimentaires et microbiennes du fait de l'augmentation du pH abomasal causée par la destruction de cellules pariétales de la caillette sécrétrices d'acide chlorhydrique (HCl) à l'origine d'une moindre activation du pepsinogène en pepsine. Par ailleurs, l'infestation est responsable d'une augmentation de la perméabilité intestinale à l'origine de fuites protéiques.



Figure 8 : Œdème de l'auge, classiquement associé à la forme aiguë de l'haemonchose ovine.

* L'haemonchose chronique : elle est moins souvent remarquée car beaucoup plus insidieuse mais elle est responsable de la majorité des pertes économiques liées à l'infestation par *Haemonchus contortus*. L'action spoliatrice continue des parasites entraîne une mobilisation importante de la moelle osseuse et du foie ce qui entraîne un surcoût métabolique. Cette forme est responsable d'une diminution du gain moyen quotidien (GMQ) attendu des agneaux, d'une altération de la quantité et de la qualité de la laine (52), d'une diminution de la production laitière (53) ainsi que d'une diminution du rendement carcasse car les animaux deviennent cachectiques.

La migration des larves L4 et la spoliation sanguine de la muqueuse abomasale par les derniers stades larvaires et les adultes sont également responsables d'une inflammation locale caractérisée par une congestion, une hyperhémie, une hypersécrétion de mucus, un épaissement de la muqueuse et un œdème de la sous-muqueuse. De petits ulcères, formés aux points de fixation des vers peuvent également être observés à l'examen nécropsique ainsi que des nodules blanchâtres témoignant de la présence de larves enkystées. Tout cela peut avoir un effet délétère sur le fonctionnement de la caillette avec notamment une modification de la perméabilité de la muqueuse, des troubles de la motricité et une altération des fonctions sécrétoires à l'origine d'une réduction de la dégradation des protéines alimentaires et microbiennes renforçant l'apparente malnutrition des animaux (50, 54).

D) Diagnostic de l'haemonchose ovine

1) Diagnostic épidémio-clinique

En élevage ovin, l'apparition de symptômes tels que l'œdème de l'auge ou une pâleur anormale des muqueuses quelques semaines après l'arrivée au pâturage doit faire penser à l'haemonchose. Les agneaux expriment généralement des signes cliniques plus marqués et plus précocement que les adultes. Cependant les signes cliniques associés à l'haemonchose ne sont en aucun cas pathognomoniques et peuvent être provoqués par une malnutrition chronique ou d'autres helminthiases (fasciolose ovine par exemple) (55).

L'utilisation du FAMACHA[®] (FAffa MALan CHArt) du nom du Dr François Malan qui l'a développé, permet une estimation de la sévérité de l'anémie des animaux (Figure 9). Ce test consiste en la comparaison de la couleur des muqueuses des animaux avec un nuancier gradué correspondant à un hématokrite. Le nuancier ne compte que cinq couleurs ce qui rend les cinq catégories du FAMACHA[®] parfois insuffisantes mais il permet tout de même de repérer les animaux les plus sévèrement atteints et de les traiter en priorité (56–58). Cependant les animaux sont généralement repérés aux stades 4 et 5 lorsque leur hématokrite est déjà sévèrement diminué (<17%).

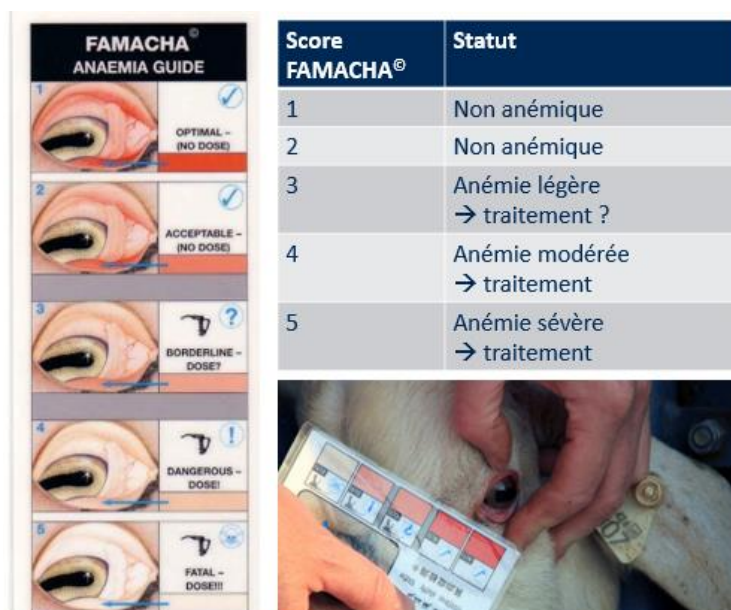


Figure 9: Utilisation du FAMACHA^(C) pour la caractérisation de l'anémie chez les petits ruminants.

2) *Diagnostic nécropsique*

Le diagnostic nécropsique est particulièrement intéressant en cas de mortalité souvent liée à un infestation massive sur des animaux fragiles. La nécropsie doit être réaliser le plus rapidement possible après la mort de l'animal.

Un examen de la caillette permettra de mettre en évidence les lésions associées à l'haemonchose : congestion exsudative et foyers hémorragiques. Si la nécropsie est réalisée suffisamment précocement, des adultes *Haemonchus contortus*, dont l'apparence est facilement reconnaissable, pourront être identifiés immédiatement confirmant de façon certaine l'haemonchose.

3) *Diagnostic de laboratoire*

a) **La coproscopie**

En l'absence de mortalité et d'examen nécropsique, des techniques de laboratoire réalisées sur animaux vivants peuvent être réalisées. Parmi celles-ci, la coproscopie est de loin l'examen le plus effectué en pratique courante pour caractériser l'infestation des animaux ou, indirectement, l'infestation des pâtures.

Plusieurs méthodes de coproscopie existent mais la plupart sont des variations de la procédure de McMaster qui consiste en la quantification des œufs sur une lame de McMaster après flottation dans une solution de densité supérieure à celle de l'eau comme de l'iodo-mercurate de potassium, du sulfate de magnésium (59) ou une solution sursaturée en chlorure de sodium (NaCl) (60). Les méthodes par flottation sont particulièrement adaptées aux œufs de nématodes ou de cestodes, pour les œufs de trématodes des méthodes par sédimentation peuvent être utilisées.

Les techniques de flottation présentent l'avantage d'être assez simples d'utilisation et relativement peu onéreuses (59). Toutefois, la réalisation d'une coproscopie par animal dans un élevage peut représenter un obstacle financier certain. Choisir quelques animaux au hasard dans l'élevage en espérant qu'ils soient représentatifs de l'ensemble est extrêmement risqué. En effet, cela reviendrait à considérer que tous les animaux sont susceptibles de s'infester de la même manière et qu'une même charge infestante sera responsable d'une même production d'œufs. Or, d'une part, la répartition des larves sur le pâturage n'est pas forcément homogène, d'autre part les animaux n'ont pas nécessairement le même « anneau de répugnance » et donc pas les mêmes risques d'ingérer des larves infestantes. De plus, au sein même d'expérimentations contrôlées avec un nombre précis et égal de larves ingérées, tous les animaux n'auront pas la même excrétion fécale d'œufs. La répartition des strongles gastro-intestinaux est dite « sur-

dispersée », cela signifie que la majorité des animaux est relativement peu infestée par rapport à quelques animaux portant l'essentiel du fardeau parasitaire (61, 62). La répartition des comptages d'œufs et des charges parasitaires suivent alors une distribution log-normale ou une distribution gamma (63, 64) dont la fonction de densité est représentée par une cloche asymétrique de pente plus forte sur la gauche et plus évasée sur la droite (Figure 10).

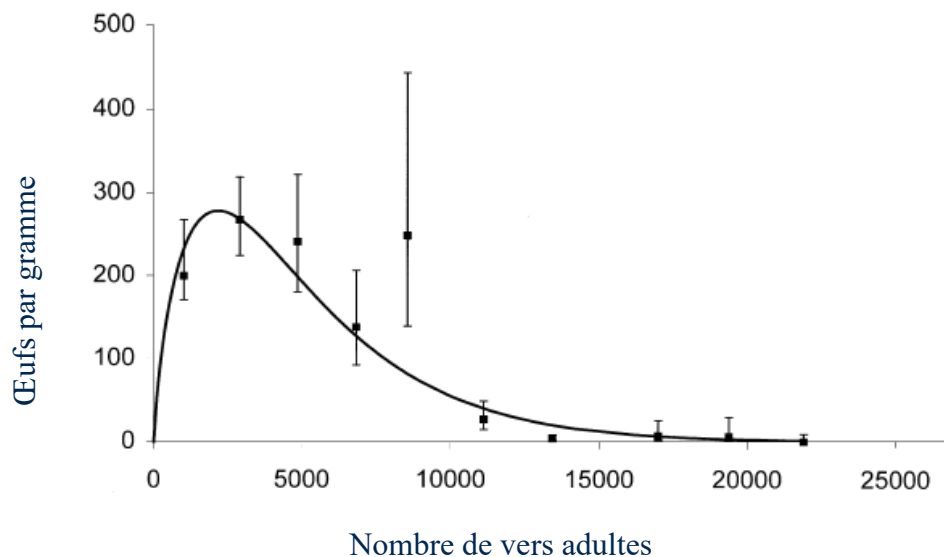


Figure 10 : Représentation de l'excrétion fécale d'œufs de nématode en fonction de la charge parasitaire. D'après Bishop et Stear (2000) (63).

De fait, plutôt qu'un échantillonnage aléatoire, les pratiques courantes privilégient une coproscopie de mélange à partir de 10 à 15 animaux. La représentativité de la coproscopie de mélange réalisée à partir des fèces de 15 animaux a été validée par Bonnefont et Canellas (2014) à l'aide du protocole présenté en figure 11 (60).

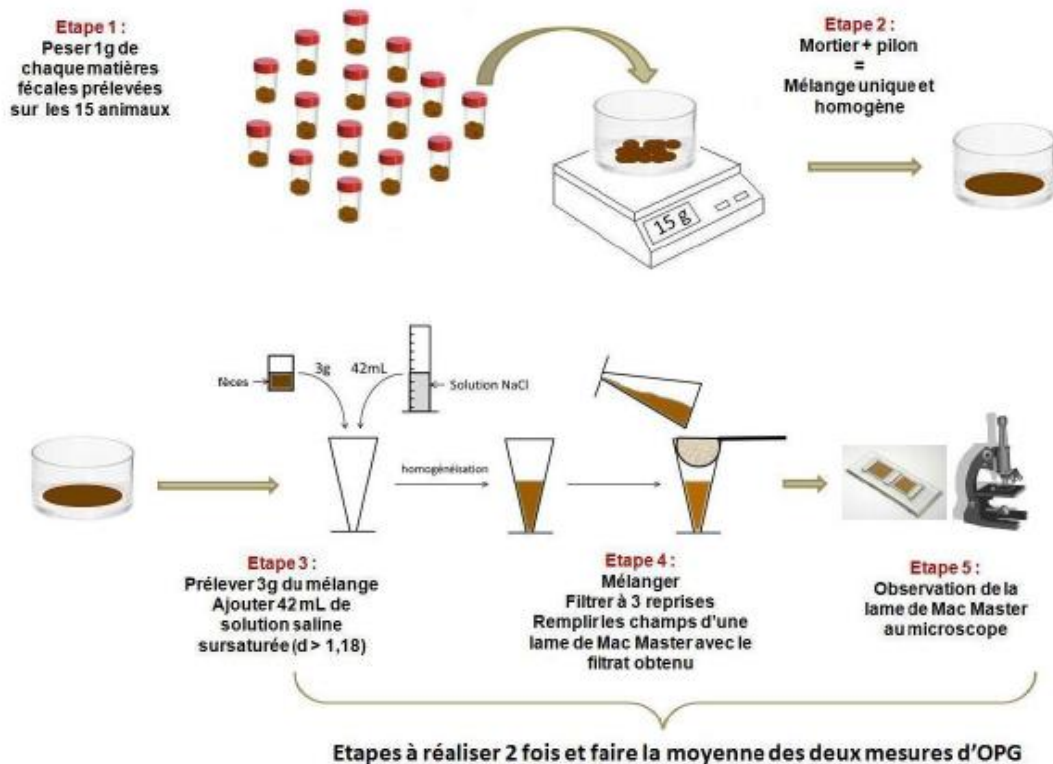


Figure 11 : Méthode de coproscopie de mélange pour la détermination de l'excrétion fécale d'œufs d'un troupeau. Bonnefont et Canellas (2014) (60).

Les œufs de nématodes, de forme oblongue, sont difficiles à discriminer les uns par rapport aux autres. Seuls les œufs de *Nematodirus spp* se distinguent par leur grande taille : 200 μm / 80 μm soit deux fois plus long et large que les œufs des autres nématodes (Figure 11) (65). De ce fait, la coproscopie par enrichissement, que ce soit par flottation ou sédimentation, permet une analyse quantitative des œufs de strongles excrétés dans les fèces mais pas une caractérisation des genres et espèces présents dans l'élevage. Cependant, du fait de la prolificité d'*Haemonchus contortus* et des signes de diarrhée associés aux autres nématodoses, en cas d'infestation importante, un comptage d'œufs dans les matières fécales élevé sans diarrhée associée peut être un signe d'appel pour intégrer l'haemonchose dans un diagnostic différentiel.

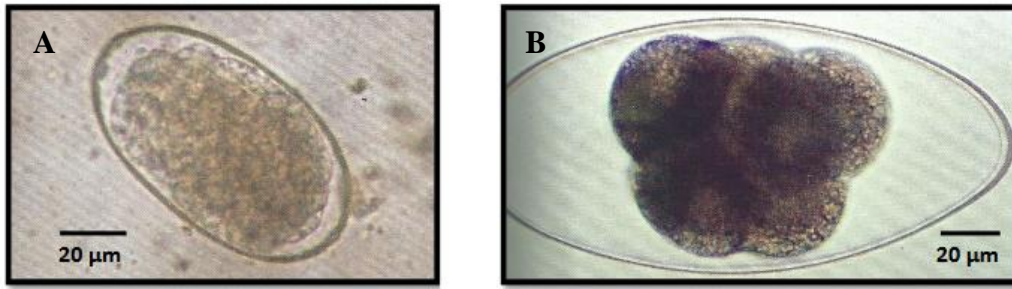


Figure 12: Morphologie des œufs de strongles digestifs : (A) Morphologie courante des œufs de trichostrongles , (B) Morphologie des œufs de *Nematodirus* spp.

Cette différence de prolificité entre les différentes espèces de nématodes rend l'interprétation des comptages d'œufs dans les matières fécales correctible. Ainsi dans une étude de 1998, Cabaret et al. ont montré une association assez forte ($r=0,62$) entre l'excrétion fécale d'œufs et la charge parasitaire de l'animal évaluée par nécropsie, les deux variables ayant été log-transformées au préalable (Figure 13), mais cette association devenait vraiment très importante ($r=0,8$) lorsque le pourcentage d'*Haemonchus contortus* parmi les strongles gastro-intestinaux était pris en compte (35). Ce résultat est confirmé par les études de Rinaldi et al. (2009) et González-Garduño et al. (2013) montrant que dans les infestations mixtes, les meilleurs coefficients de Pearson sont toujours ceux associés à *Haemonchus contortus* (66, 67).

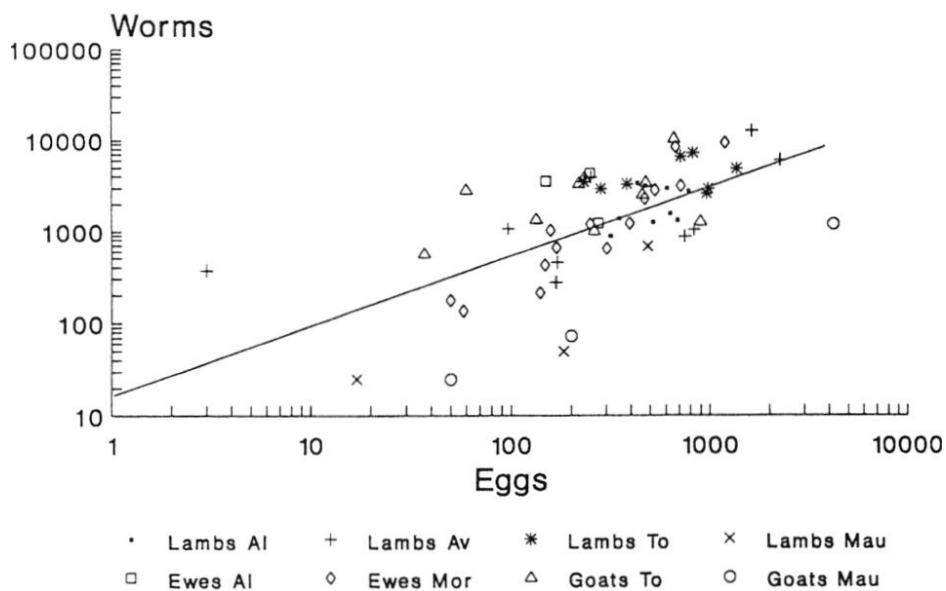


Figure 13 : Corrélation entre l'excrétion fécale d'œufs et la charge parasitaire mise en évidence par la méta-analyse de Cabaret et al. (1998).

La coproscopie de mélange est de fait un examen particulièrement approprié à l'estimation de l'état d'infestation par *Haemonchus contortus* bien qu'elle ne donne un reflet que de la population adulte et reproductrice des nématodes.

b) La coproculture

La coproculture, ou culture larvaire, consiste à incuber les matières fécales d'un animal ou d'un ensemble d'animaux dans un milieu propice à l'éclosion des œufs de strongles gastro-intestinaux et au développement des individus jusqu'au stade de larves infestantes L3, récupérées à l'aide d'un appareil de Baermann. Ces larves, contrairement aux œufs, seront identifiables au microscope en fonction de critères morphologiques et morphométriques (longueur de la queue, forme de la tête, caractère réfringent du corps) (68) par des helminthologues qualifiés.

La coproculture fournit des informations sur les œufs qui étaient présents dans les matières fécales du ou des animaux mais ne renseigne pas parfaitement sur la proportion des espèces composant le fardeau parasitaire du fait de la différence de fécondité des différentes espèces, en particulier de la fécondité importante d'*Haemonchus contortus*. Par ailleurs, les conditions de culture peuvent être plus ou moins favorables à une espèce et biaiser les résultats obtenus (26, 33).

La coproculture est réalisée dans des laboratoires spécialisés et est assez peu utilisée en pratique, ne serait-ce qu'en raison du temps nécessaire au développement des larves.

c) Les méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques directes consistent en la détection d'un antigène parasitaire dans le sang ou les fèces de l'hôte. Cependant, certains motifs antigéniques peuvent être partagés par différents parasites ou différer entre les stades larvaire, immature et adulte rendant ces méthodes peu fiables (69).

De la même manière, les méthodes immunologiques indirectes reposent sur la détection d'un anticorps produit par l'hôte contre l'agent pathogène par hémagglutination indirecte, immunofluorescence ou ELISA mais présentent l'inconvénient de ne pas permettre l'estimation de la charge parasitaire ni même de différencier une infestation passée d'une infestation en cours (33).

Ces méthodes sont assez peu utilisées en pratique.

d) Les méthodes biochimiques

Outre la mesure de l'hématocrite qui permet de caractériser l'anémie des animaux lors d'infestations à *Haemonchus contortus*, le dosage du pepsinogène ou de la gastrine dans le sang de ceux-ci peut renseigner l'expérimentateur sur l'état d'altération de la muqueuse abomasale. En effet, Berghen et al. (1993) ont proposé l'hypothèse que la présence de strongles gastro-intestinaux dans la caillette pourrait stimuler les cellules G responsables de la synthèse de gastrine qui stimule la synthèse de pepsinogène et la sécrétion d'acides par les cellules pariétales. Les cellules pariétales étant abîmées par les parasites, la sécrétion d'acide ne pourrait pas se faire correctement, résultant en une hausse du pH de la caillette aboutissant à une diminution du clivage acide du pepsinogène en pepsine. Le pepsinogène en excès, pénétrant la circulation sanguine à la faveur des brèches créées par les parasites pendant leur repas serait alors détectable par prélèvement sanguin.

Cette méthode, bien que séduisante, est qualifiée par les auteurs mêmes de l'étude comme trop peu spécifique pour pouvoir être utilisée en pratique (70).

e) Les méthodes moléculaires

Dans les dernières années, des méthodes de biologie moléculaire comme la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été utilisées pour l'identification de parasites et le diagnostic de certaines parasitoses, notamment de l'haemonchose à partir de matières fécales ou de coprocultures (71). Ces méthodes restent relativement onéreuses et ne sont pas exemptes de biais ou de problèmes, notamment la présence d'inhibiteurs de PCR dans les fèces. Cependant elles semblent prometteuses et devraient prendre plus d'importance dans les années à venir.

De la même manière, des méthodes de métagénomique ou de pyroséquençage ont été développées afin d'identifier les œufs de nématodes (71).

À ce jour, le comptage d'œufs dans les matières fécales reste le meilleur indicateur quantitatif et le diagnostic nécropsique le meilleur moyen d'identifier les parasites en pratique courante.

IV) Lutte contre les strongles gastro-intestinaux : emphase sur *Haemonchus contortus*.

L'infestation parasitaire est la résultante de la rencontre entre un parasite en capacité d'infester et un hôte susceptible d'être parasité dans un environnement propice au développement du parasite au cours de sa phase libre (cf 1.III.B.1) et au pâturage de l'hôte.

C'est sur les trois éléments de la triade Hôte/Parasite/Environnement et sur leurs interactions que reposent toutes les stratégies naturelles ou anthropiques de lutte contre les parasites (Figure 14).

Les stratégies anthropiques de lutte reposent globalement sur trois axes :

- Éliminer les strongles gastro-intestinaux,
- Tarir les sources de contamination,
- Augmenter la résistance, la résilience et/ou la tolérance de l'hôte (72).

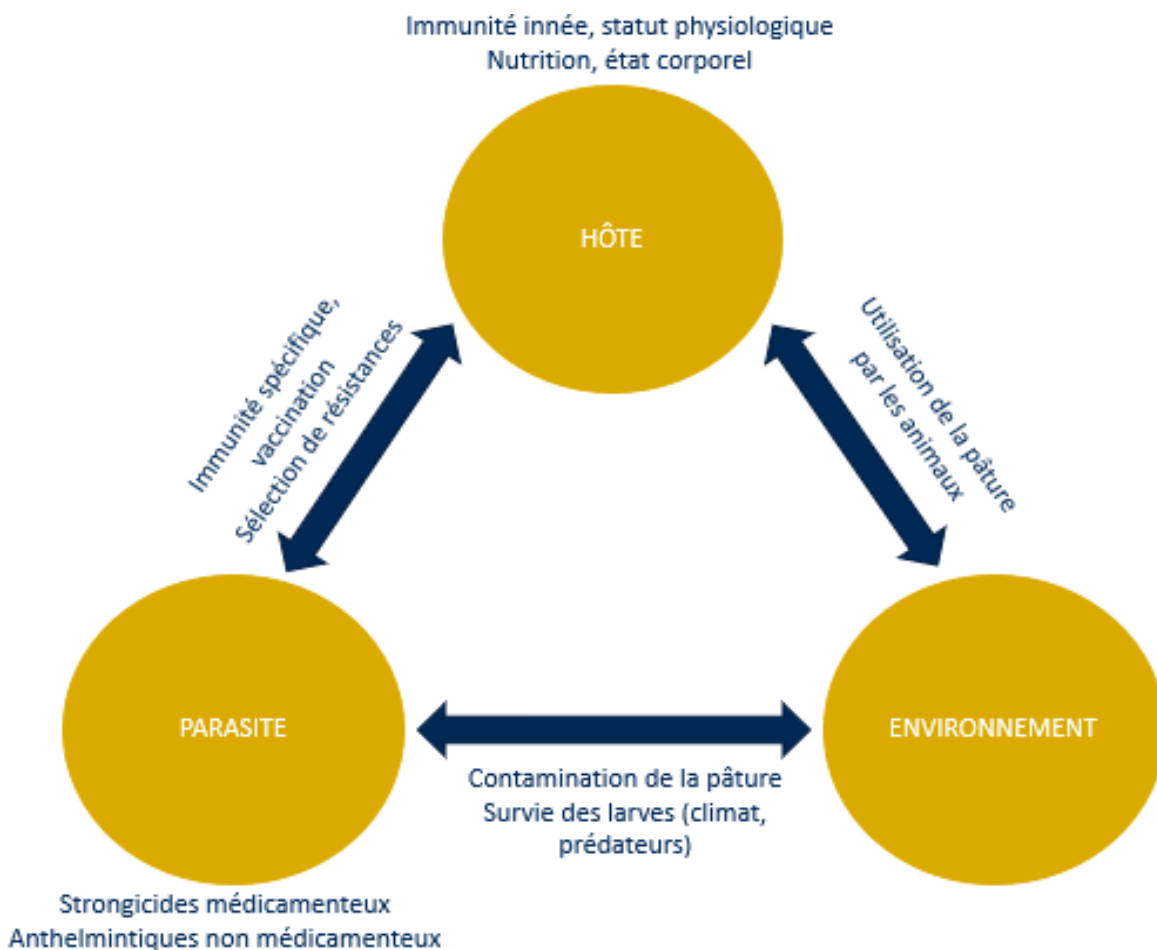


Figure 14 : Différents leviers d'action associés aux trois éléments de la triade Hôte/Parasite/Environnement.

A) Actions de lutte contre le parasitisme se concentrant sur le parasite

1) Utilisation de strongicides médicamenteux

a) Les familles de molécules anthelminthiques utilisables en France

L'introduction de la phénothiazine (dont les dérivés seront par la suite utilisés comme neuroleptiques) en tant qu'anthelminthique en 1940 a marqué le début de la lutte chimique contre les helminthes. Par la suite, d'autres molécules ont été développées mais l'arsenal thérapeutique helminthicide en général et nématocide en particulier reste assez restreint. En médecine vétérinaire, seules 5 familles pharmacologiques sont actuellement utilisables en France pour le traitement des strongyloses gastro-intestinales :

- les benzimidazolés et pro-benzimidazolés,
- les imidothiazolés,
- les salicylanilides,
- les lactones macrocycliques, divisées en avermectines et milbémycines,
- les dérivés d'amino-acétonitrile.

i) Les benzimidazolés et pro-benzimidazolés

La différence principale entre benzimidazolés et pro-benzimidazolés réside dans la nécessité d'une métabolisation par l'hôte après administration par voie orale pour activer ces derniers et leur conférer leurs propriétés nématocides.

À la suite du thiabensazole, découvert en 1961 et introduit sur le marché du médicament vétérinaire en 1963 (73), de nombreuses molécules appartenant à la famille des benzimidazolés ont été développées (74).

Tous les benzimidazolés et pro-benzimidazolés fonctionnent sur le même principe. Ce sont des inhibiteurs de la synthèse des microtubules (73). En se fixant sur la β -tubuline, ils inhibent la formation d'hétérodimères d' α -tubuline et de β -tubuline et empêchent l'élongation des microtubules, ne laissant d'autre choix à ceux-ci que de se dépolymériser (Figure 15). Ces microtubules ayant des rôles à jouer dans les transports cellulaires, la multiplication cellulaire ou encore le maintien de la forme de la cellule, leur disparition est à l'origine d'une mort cellulaire rapide.

Bien que les tubulines soient des molécules ubiquitaires chez tous les eucaryotes, les benzimidazolés montrent une affinité plus forte avec les tubulines des helminthes et sont assez sûrs d'utilisation (73) aux doses utilisées. Ils ont une activité ovicide, larvicide et adulticide pour la plupart et une activité sur les larves L4 dans la muqueuse peut exister bien qu'elle soit moins importante (75).

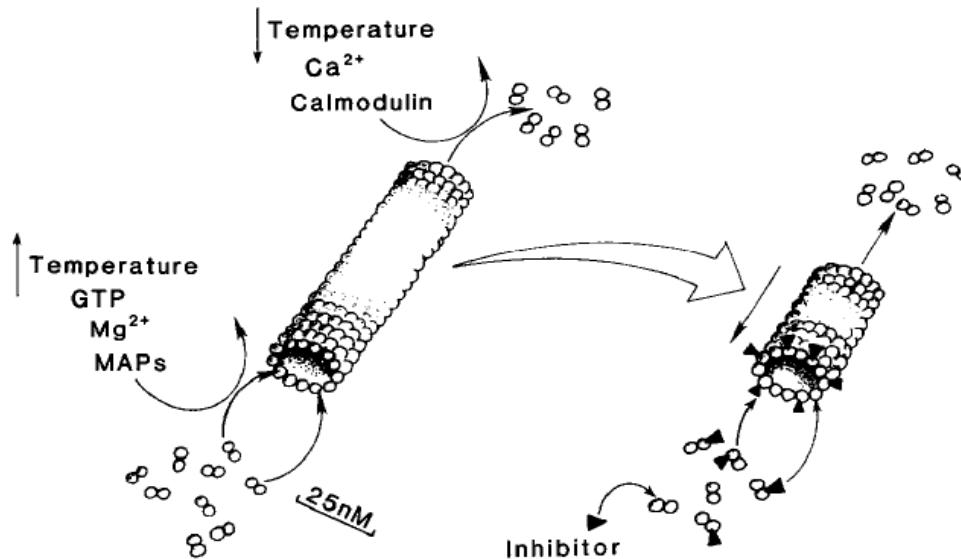


Figure 15 : Action des inhibiteurs de microtubules tels que les benzimidazolés sur la polymérisation des microtubules. D'après Lancey (1990).

Actuellement 5 benzimidazolés sont utilisables en médecine vétérinaire. Certains d'entre eux sont interdits d'utilisation sur les femelles en lactation, d'autres sont autorisés mais soumis à des temps d'attente lait (Tableau 2).

La plupart des benzimidazolés se présentent sous une forme galénique adaptée à l'administration orale, l'albendazole est parfois incorporé dans des aliments médicamenteux tels que Mediamix® ou Rumifuge®.

Bien que la toxicité des benzimidazoles soit presque inexistante aux doses thérapeutiques, des perturbations de la digestion et de l'absorption des nutriments par action sur les cellules intestinales à division rapide ont été rapportées, ainsi qu'une potentielle tératogénicité (76). L'existence d'effets secondaires tels que des céphalées ou des nausées en médecine humaine justifient des temps d'attente appliqués (Tableau 2).

Tableau 2 : Benzimidazolés utilisables en médecine des ovins (PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelminthique cité.

Molécule (Spécialité)	Voie d'administration	Dose recommandée (mg/kg PV)	Stades sensibles	Utilisation femelles laitières (TA lait)
Albendazole (ex : Valbazen®)	Orale	3,8	Adultes et L4	Non
Fenbendazole (ex : Panacur®)	Orale	5	Adultes, L4 (+hypobiose)	Oui (8,5 jours)
Mebendazole (ex: Supaverm® association avec du closantel)	Orale	15 (+10)	Adultes et L4	Non
Nétobimin (ex : Hapadex®)	Orale	7,5	Adultes et L4	Oui (10 traites)
Oxfendazole (ex : Synanthic®)	Orale	5	Adultes et L4	Oui (8 jours)

ii) Les imidothiazolés

Les imidothiazolés agissent en tant qu'agonistes cholinergiques. Le lévamisole, premier imidothiazolé, a été autorisé en médecine vétérinaire en 1970 (1986 en France) et c'est à ce jour encore le seul imidothiazolé autorisé en France pour traiter les ovins (77) (Tableau 3).

En se fixant sur les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, les imidothiazolés (lévamisole, butamisole) comme les dérivés de la tétrahydropyrimidine (pyrantel, oxantel) utilisés en médecine humaine, provoquent l'ouverture non spécifique des canaux sodium et une dépolarisation de la membrane post-synaptique causant une paralysie du ver qui n'est alors plus capable de se fixer à la muqueuse et est éliminé par le péristaltisme (78).

Tableau 3: Imidothiazolés utilisables en médecine des ovins (IM = intra-musculaire, PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelminthique cité.

Molécule (Spécialité)	Voie d'administration	Dose recommandée (mg/kg PV)	Stades sensibles	Utilisation femelles laitières (TA lait)
Lévamisole (ex : Lévisole injectable®/ Lévamisole® 3,75%)	IM/ Orale	7,5	Adultes	Non

Le spectre d'action du lévamisole est plus étroit que celui des benzimidazolés et il cible essentiellement les strongles digestifs et respiratoires. La spécificité des cibles vient des différences moléculaires interspécifiques des récepteurs à l'acétylcholine (79, 80) . Le lévamisole n'agit que sur les formes adultes.

Le lévamisole est métabolisé dans une très large proportion dans le foie, il a une durée de demi-vie plasmatique de 4h environ et est excrété dans les urines, en partie inchangé et en partie sous forme de métabolites (81).

iii) Les salicylanilides

Les salicylanilides sont des molécules extrêmement lipophiles qui possèdent un proton labile et sont susceptibles d'agir comme vecteurs de protons à travers les membranes. De cette manière les salicylanilides sont responsables d'un découplage de la phosphorylation oxydative et de la production d'ATP par suppression du gradient de protons au niveau de la membrane interne de la mitochondrie impactant en aval toute la machinerie cellulaire (79).

En théorie, ce phénomène se produit de la même façon chez le parasite et chez son hôte mais la forte affinité des salicylanilides pour les protéines plasmatiques (fixation supérieure à 99%) empêche sa circulation vers les tissus et explique la concentration de l'anthelminthique dans le parasite hématophage (82). En revanche, les parasites non hématophages ne seront pas efficacement traités par les salicylanilides.

L'élimination des salicylanilides est essentiellement fécale par excrétion biliaire, 90% de la dose absorbée est ainsi éliminée sous forme inchangée dans la bile (83). Du fait de leur fixation importante aux protéines plasmiques, l'élimination est lente et les salicylanilides présentent une rémanence longue (action rémanente de 7 à 8 semaines sur *Haemonchus contortus* lors d'un traitement par voie orale à la dose de 10 mg/kg de poids vif) (84).

En France, trois molécules appartenant à la famille des salicylanilides sont autorisées pour le traitement antiparasitaire des ovins : le closantel, le nitroxylnil et l'oxyclozanide (Tableau 4).

Tableau 4: Salicylanilides utilisables en médecine des ovins (SC = sous-cutané, PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelminthique cité.

Molécule (Spécialité)	Voie d'administration	Dose recommandée (mg/kg PV)	Stades sensibles	Utilisation femelles laitières (TA lait)
Closantel (ex : Flukiver®/ Seponver®)	SC / Orale	5 / 10	Stades hématophages	Non
Nitroxylnil (ex : Dovenix®)	SC	10	Stades hématophages	Non
Oxyclozanide (ex : Imena® en association avec du lévamisole)	Orale	15 (+6,35)	Stades hématophages (étendu par le lévamisole)	Non

iv) Les lactones macrocycliques

Jusqu'à très récemment, la dernière famille de molécules utilisables en médecine des ovins en France était celle des lactones macrocycliques. Elle se divise en deux sous-familles : les avermectines et les milbémycines. Dernières arrivées parmi les anthelminthiques, les lactones macrocycliques sont souvent qualifiées d'endectocides du fait de leur spectre d'action très large étendu aux ectoparasites. L'ivermectine, dont le nom qui est un mot-valise de **ver**micide et anti-**ectoparasite** laisse transparaître le spectre d'action, a été introduite en 1981.

Les lactones macrocycliques ont en commun une structure semblable à celle des macrolides utilisés pour lutter contre les bactéries. La différence entre les deux sous-familles tient à ce que les avermectines sont des disaccharides (ivermectine, doramectine) ou des monosaccharides (sélamectine) tandis que les milbémycines (milbémycine oxime, moxidectine) ne présentent pas de radicaux glucidiques (on les appelle parfois avermectines aglycones) et sont de fait moins volumineuses (76). Originellement, les deux sous-familles n'étaient pas synthétisées par la même espèce de *Streptomyces*.

Les lactones macrocycliques agissent en bloquant la transmission de l'influx nerveux et de la contraction musculaire par stimulation de la libération d'acide γ -aminobutyrique (GABA) au niveau des terminaisons nerveuses. Cet acide, en se fixant sur des canaux Chlorure provoque un influx d'ions chlorure et une hyperpolarisation des membranes plasmiques à l'origine d'une paralysie. La spécificité d'action des lactones macrocycliques repose sur la différence de localisation des récepteurs GABA-ergiques qui se situent au niveau des jonctions neuromusculaires chez les nématodes et les insectes tandis qu'elles se situent majoritairement dans le cerveau chez les mammifères. En l'absence de mutation perméabilisant la barrière hémato-méningée, celle-ci protège les mammifères de l'action des lactones macrocycliques.

Les lactones macrocycliques sont des molécules lipophiles distribuées dans tout l'organisme et stockées dans le tissu adipeux et le foie. Le relargage depuis le tissu adipeux de ces molécules leur confère une certaine rémanence.

Tableau 5 : Lactones macrocycliques utilisables en médecine des ovins (IM = intra-musculaire, PV = poids vif, TA = Temps d'attente, L4 = Larves L4) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelmintique cité).

Molécule (Spécialité)	Voie	Dose (mg/kg PV)	Stades sensibles	Utilisation femelles laitières (TA lait)
Ivermectine (ex : Ivomec® Ovin)	SC	0,2	Adultes et L4	Non
Eprinomectine (ex : Eprinex Multi®)	Pour-On	1	Adultes	Oui (0 jour)
Doramectine (ex : Dectomax®)	IM	0,2	Adultes et L4	Non
Moxidectine (ex : Cydectine®)	Orale	0,2	Adultes et L4 (+hypobiose)	Oui (5 jours)

Les lactones macrocycliques sont utilisables sous de nombreuses formes en médecine ovine. Elles ont généralement un spectre assez large que ce soit pour les nématodes pour lesquels les larves L4 sont sensibles aux lactones macrocycliques, ou pour les insectes. Ce spectre large peut être à l'origine d'une écotoxicité importante de molécules principalement excrétées sous forme active.

L'éprinomectine est une exception parmi les lactones macrocycliques. En effet, sa forte liaison aux protéines plasmatiques et son faible coefficient de répartition lait/plasma justifient son utilisation sur des brebis en lactation (85).

La forme d'utilisation des lactones macrocycliques a une importance. Ainsi la moxidectine peut être utilisée par voie orale comme indiqué dans le Tableau 5, cette forme autorisant une utilisation chez la brebis laitière à condition de ne pas commercialiser le lait produit pendant les cinq premiers jours après traitement tandis qu'elle ne peut pas être utilisée chez la brebis laitière sous forme injectable.

v) *Les dérivés d'amino-acétonitrile*

Entre 1981 et les années 2010, les lactones macrocycliques ont été les dernières molécules développées en matière de traitement anthelminthique. Cependant, l'apparition de résistances de plus en plus importantes a poussé les laboratoires à élaborer de nouvelles molécules. La découverte, à la fin des années 2000, des propriétés anthelminthiques de molécules assez simples, les dérivés d'amino-acétonitrile, a constitué une avancée majeure.

Découvert en 2008 (86, 87), introduit pour la première fois en Nouvelle-Zélande, il a été brièvement proposé en France par Novartis en 2010 puis retiré du marché en 2012 avant d'être réintroduit en 2018 par Elanco (ayant racheté Novartis) sous le même nom : Zolvix®.

Le monépanel, est un activateur allostérique de la sous-famille DEG-3/DES-2 des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine de plusieurs espèces de nématodes, notamment *Haemonchus contortus*. Son action provoque une hyper-contraction des muscles somatiques des nématodes aboutissant à une paralysie spastique de ceux-ci (86). Des études montrent qu'il aurait également un effet inhibiteur allostérique en se fixant sur un site différent du récepteur (88) de certains nématodes comme *Ascaris suum*. Le monépanel est efficace contre les stades adultes et les L4 (y compris inhibées) des principaux strongles gastro-intestinaux des ovins.

Du fait de l'action spécifique du monepanel sur des récepteurs absents chez les mammifères, sa toxicité est quasi-nulle chez ceux-ci. Ainsi, suite à l'administration d'une dose excédant 50 fois la dose thérapeutique, les seuls effets secondaires observés ont été de l'abattement et une anorexie passagère de 24h (89).

Le monepanel est rapidement absorbé et métabolisé en monepanel sulfone, son métabolite actif. Il est ensuite excrété principalement par voie fécale et dans une moindre mesure par voie urinaire (89). La demi-vie du monepanel est de cinq jours, il est autorisé chez les brebis laitières et allaitantes mais pas chez les brebis productrices de lait destiné à la consommation humaines, quel que soit le stade de leur vie (Tableau 6) bien que des limites maximales de résidus aient été établies.

Tableau 6: Dérivés d'acétoacétonitrile utilisables en médecine des ovins (L4 = Larves L4, PV = poids vif) d'après le Dictionnaire du Médicament Vétérinaire en ligne consulté le 29 Juillet 2019 et les Résumés des Caractéristiques du Produit de chaque anthelminthique cité.

Molécule (Spécialité)	Voie d'administration	Dose recommandée (mg/kg PV)	Stades sensibles	Utilisation femelles laitières (TA lait)
Monepantel (ex : Zolvix®)	Orale	2,5	Adultes et L4 (+hypobiose)	Non

Les activités des familles d'anthelminthiques utilisables en France sont synthétisées sur la Figure 16. D'autres familles d'anthelminthiques existent dans le monde mais ne disposent pas d'autorisation de mise sur le marché en France. Parmi ces familles on trouve, par exemple, les spiroindoles (comme le derquantel) qui agissent comme antagonistes cholinergiques ou les dérivés de la pipérazine (comme la diéthylcarbamazine) qui ne sont pas utilisables en France pour le traitement des helminthiases des ovins.

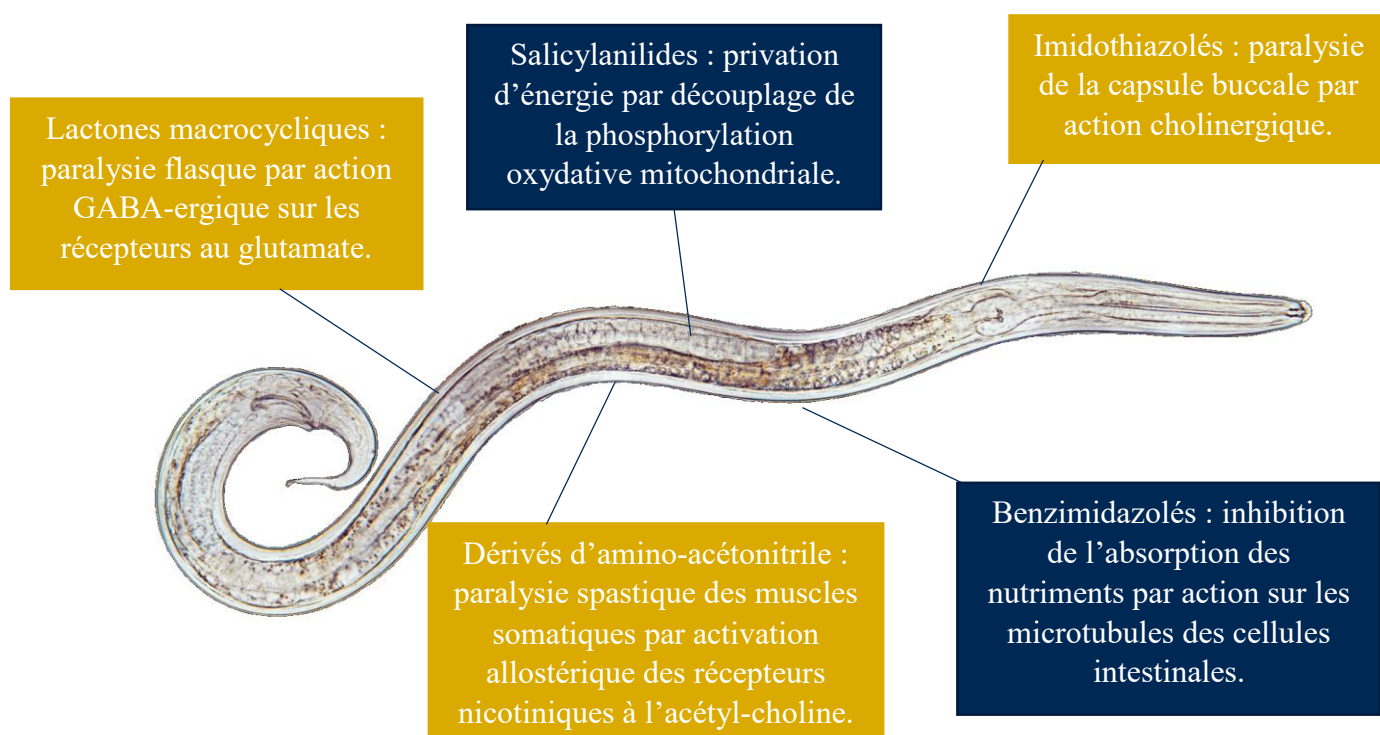


Figure 16: Mode d'action des anthelminthiques disponibles pour le traitement des strongyloses ovines en France.

b) Pratique de la lutte chimique

Il n'existe pas de protocole prédéfini de traitement des helminthiases. Les différentes stratégies utilisées par les éleveurs dépendent de leur cahier des charges, notamment lorsqu'ils travaillent en agriculture biologique, de la dynamique d'infestation de leurs pâtures, de l'âge et de la maturité de leurs animaux et des parasites présents dans l'élevage.

Ainsi, du fait de leurs cycles de durées inégales, les parasites ne contaminent pas la pâture de la même manière. Les paramètres climatiques présentés en 1.II.B.1 (température, humidité) vont également influencer la dynamique de contamination de la pâture.

Comme on l'a expliqué précédemment, l'élevage ovin est un élevage globalement extensif, permettant la valorisation de l'herbe. Dans certains élevages, notamment en Corse, les animaux sont au pâturage toute l'année. Les agneaux sont avec leurs mères et peuvent changer de pâturage au sevrage. Dans ces élevages, l'infestation parasitaire est assez forte, en relation avec une contamination continue des prairies. On privilégiera alors l'administration de bolus à libération prolongée ou séquentielle (notamment des benzimidazolés ou du lévamisole) (75).

Dans la majorité des élevages, les ovins sont rentrés en bergerie à l'hiver et on observe alors durant cette période une diminution de la contamination de la pâture suivie d'un pic en mai-juin, soit un mois après la sortie de brebis de la bergerie.

Les agneaux, naïfs à l'infestation parasitaire seront les plus sensibles lors de la sortie de bergerie. Ils seront souvent traités en début d'été pour éviter une parasitose trop intense lors du pic de contamination de la pâture. Dans la plupart des cas, tous les animaux de l'élevage sont traités en même temps et changés de pâture après le traitement si possible sur le principe du « dose and move » (75).

Traditionnellement, une autre administration d'antiparasitaire a lieu à l'entrée en bergerie soit en début, soit en milieu d'automne.

Idéalement un roulement des molécules utilisées est opéré de manière à ne pas accroître de façon trop importante la résistance des parasites à une molécule. Mais l'attachement de certains éleveurs à une molécule considérée comme miraculeuse et particulièrement efficace peut les amener, par souci de simplicité, à réitérer les traitements avec la même molécule d'une saison à l'autre. Ce genre de comportements est à l'origine de l'émergence très importante de résistances aux anthelminthiques, principal obstacle à la lutte chimique actuellement.

c) Limites à l'utilisation des anthelminthiques

i) Apparition de résistances aux anthelminthiques

Une population résistante à un anthelminthique se définit comme présentant « une capacité significativement plus importante à tolérer des concentrations d'un composé qui habituellement se révélerait léthal pour les individus d'une population normale de la même espèce » (90).

La résistance s'évalue classiquement par un test de réduction de l'excrétion fécale d'œufs après traitement (FECRT). Des animaux de niveau d'infestation identiques sont répartis aléatoirement dans deux groupes : un groupe qui sera traité par l'anthelminthique dont on souhaite évaluer l'efficacité et un groupe témoin. Après un temps considéré comme suffisant pour que l'anthelminthique agisse on mesure l'excrétion fécale d'œufs (FEC) des deux espèces et on calcule : $FECR = \left(1 - \left(\frac{FEC_{traités}}{FEC_{témoins}}\right)\right) \times 100$.

Plus le FECR se rapproche de 100%, plus le traitement est efficace car cela signifie que les animaux traités excrètent peu d'œufs dans leurs matières fécales. Différents seuils peuvent être utilisés pour définir la résistance, le plus utilisé étant 95% (avec un intervalle de confiance à 95% donnant une marge basse de 90% de réduction) (91, 92).

La résistance peut concerner une unique molécule (résistance simple) mais peut également s'étendre à un groupe de molécules ayant le même mode d'action. Ce genre de résistance, dit résistance de famille, est assez courant et s'explique par une modification d'une même cible pharmacodynamique par exemple (93, 94).

Dans de plus rares cas, la résistance peut être étendue à un ensemble de composés ayant des modes d'action différents, on parle alors de résistance multiple. Les conséquences de la résistance multiple sont très importantes puisqu'un même troupeau peut se retrouver avec des parasites résistants à toutes les molécules présentes sur le marché. Ces phénomènes de résistance multiple peuvent s'expliquer par la capacité du parasite à métaboliser les anthelminthiques plus efficacement ou à une difficulté pour la molécule d'accéder à son site d'action (diminution de la perméabilité cellulaire par exemple) (93). Les phénomènes de résistance multiples étaient encore rares jusqu'à il y a quelques années mais se développent de plus en plus. Une méta-analyse réalisée aux Pays-Bas par Ploeger et al. (2018) a révélé que de nombreux élevages présentaient des FECRT compris entre 38 et 69%, parfois pour plusieurs anthelminthiques. La résistance multiple des parasites, en particulier *Haemonchus contortus*, a poussé certains fermiers à utiliser le monepantel comme seul traitement conduisant à une réduction drastique de son efficacité (91, 92).

Les mécanismes de résistance peuvent être très variés et dépendent des molécules utilisées. Quelques-uns de ces mécanismes, répertoriés par Kotze et Prichard (2016) (92) sont représentés en figure 17.

Certains mécanismes sont non-spécifiques tels qu'un changement dans le métabolisme des nématodes comme une modification des P-glycoprotéines qui agissent comme des pompes à efflux pour les antiparasitaires notamment (ce mécanisme a été identifié dans la résistance aux lactones macrocycliques) ou une modification des enzymes du cytochrome P450 responsable de la métabolisation de nombreux xénobiotiques. D'autres sont plus spécifiques, comme la mutation sur le gène codant pour la β -tubuline responsable de la substitution Phe200Tyr identifiée comme responsable de la résistance de certains vers, dont *Haemonchus contortus* aux benzimidazolés (95)

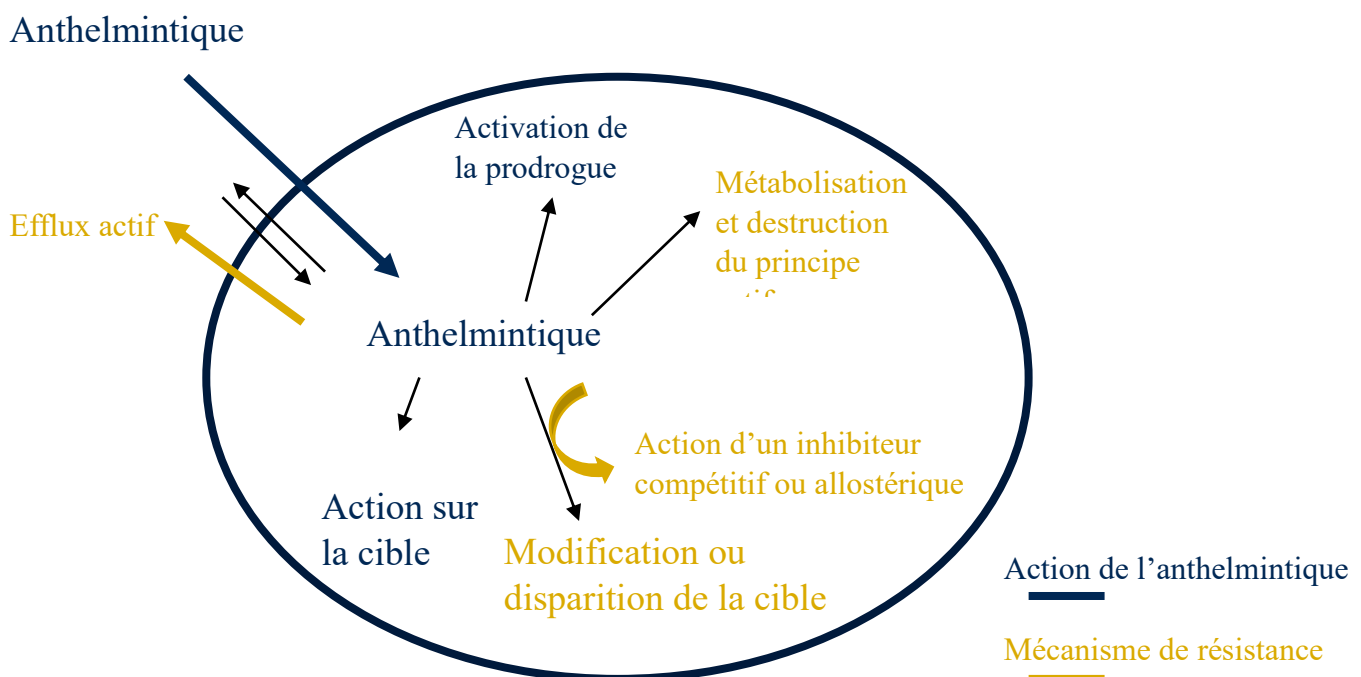


Figure 17 : Mécanismes de résistance aux anthelminthiques, d'après Kotze et Prochard (2016) (92).

L'apparition de résistances aux anthelminthiques est majoritairement associée à des mutations qui sont essentiellement dues au hasard. En revanche, une pression de sélection importante favorisant un phénotype peut augmenter significativement la fréquence d'une mutation dans une population. Des individus résistants préexistants à l'utilisation d'un produit antiparasitaire en petit nombre présentent un avantage sélectif certain lors de l'utilisation dudit produit. Plus l'utilisation de cet anthelminthique (ou d'un anthelminthique de la même famille) est répétée, plus la fréquence relative des individus résistants dans la population augmente (96).

La diffusion de la résistance est également liée à la fécondité du parasite. En effet, un parasite présentant une fécondité importante va avoir la capacité d'imposer rapidement son patrimoine génétique dans la population. C'est pour cette raison qu'*Haemonchus contortus* est une espèce particulièrement intéressante dans l'étude des résistances aux anthelminthiques (92).

Enfin, le maintien de la résistance dans la population dépend de la possibilité d'une réversion. Si la résistance est associée avec une diminution de la fertilité ou avec une survie inférieure en l'absence de traitement, un traitement alternatif pendant plusieurs années peut être à l'origine d'une réversion (92). La présence d'animaux « refuge » pour les vers sensibles, c'est-à-dire d'animaux non traités à un moment donné, peut freiner la diffusion de la résistance au sein d'un troupeau (48).

Les strongles gastro-intestinaux des petits ruminants, et en particulier *Haemonchus contortus*, ont un cycle biologique court et une fertilité importante donc les résistances s'installent rapidement. Ainsi les premières résistances rapportées pour les anthelminthiques le sont généralement moins de 10 ans après la première utilisation du produit. Le Tableau 7, reproduit à partir de la méta-analyse de Kaplan et al. (2004), met en parallèle les années de mise sur le marché des anthelminthiques et l'apparition des premières résistances (97, 98).

Tableau 7: Premiers cas de résistances observés relativement à la date de mise sur le marché des principales familles d'anthelminthiques utilisables en France dans le traitement des strongyloses gastro-intestinales ovines. D'après Kaplan et al. (97).

Famille (Molécule)	Introduction sur le marché	Première résistance rapportée
Phénothiazine	1940	1957
Benzimidazolés (Thiabendazole)	1961	1964
Imidothiazolés (Levamisole)	1970	1979
Salicylanilides (Closantel)	1977	1982
Lactones macrocycliques (Ivermectine)	1981	1988
(Moxidectine)	1991	1995
Dérivés d'amino-acétonitrile (Monepantel)	2010	2013

L'apparition de résistances est d'autant plus rapide que la molécule est fréquemment utilisée. Lors de l'apparition sur le marché du monepantel en 2010, de nombreuses études ont montré que son efficacité était de 100% alors que d'autres anthelminthiques peinaient à juguler l'infestation parasitaire (99, 100). Il a été utilisé extensivement, notamment en Australie et en Nouvelle-Zélande si bien qu'à peine trois ans plus tard des résistances étaient observées chez *Teladorsagia circumcincta* et *Trichostrongylus colubriformis* (101) puis chez *Haemonchus contortus* (102). Aujourd'hui la résistance au monepantel est fréquente et ubiquitaire (103).

Un moyen de limiter la résistance serait de restreindre les traitements aux animaux les plus touchés afin de préserver une population-refuge sensible (104) mais cela semble souvent fastidieux voire impossible pour les éleveurs d'ovins qui ont souvent plusieurs centaines de bêtes (105). Torres-Acosta et al. (2008) proposent également de changer le classique « Dose and Move » en « Move then Dose » qui consiste à déplacer les animaux avant de leur

administrer le traitement antiparasitaire afin de préserver une population-refuge sensible sur la pâture que les animaux quittent et d'ensemencer celle sur laquelle ils arrivent avec une population mixte et non résistante (106) (cf I.D de la partie 1).

Outre le développement de résistances, les anthelminthiques peuvent agir dans l'environnement sur la pédofaune et avoir un impact écologique négatif.

ii) *Écotoxicité des principaux anthelminthiques*

L'impact environnemental des antiparasitaires dépend de leurs propriétés pharmacologiques, de celles de leurs métabolites quand ils sont métabolisés, de la quantité de molécules actives excrétées par l'animal et de la stabilité de ces molécules dans l'environnement (107).

Il semblerait que globalement les effets soient plutôt locaux. En effet, les concentrations en anthelminthiques retrouvées dans les rivières ou nappes phréatiques sont généralement insuffisantes actuellement pour causer des dommages aux espèces sauvages (108).

En revanche de nombreux antiparasitaires sont excrétés sous forme active (monepantel sulfone, lactones macrocycliques et benzimidazolés dans une moindre mesure) (107). Parmi ces molécules, celles qui possèdent un spectre large sont les plus susceptibles de présenter une écotoxicité. Les lactones macrocycliques notamment ont été rapportées comme étant à l'origine d'une mortalité accrue des larves de certaines mouches et coléoptères (107).

Un intérêt tout particulier a été porté récemment aux substances dites « persistantes, bioaccumulables et toxiques » ou PBT. Ces substances ne se décomposent pas rapidement dans l'environnement (demi-vie supérieure à 120 jours à 12°C). Elles ont tendance à se concentrer dans les organismes vivants du fait de leur lipophilie et elles peuvent avoir des effets délétères immédiats (toxicité aiguë) ou retardés (toxicité chronique). Le closantel est une substance persistante et toxique mais non bioaccumulable ; en revanche, les lactones macrocycliques risquent d'être classées PBT à l'issue des études en cours actuellement (109). Ainsi le résumé des caractéristiques du produit (RCP) de la Cydectine® (anthelminthique dont le « principe actif est la moxidectine, qui est une milbémycine) précise que les ovins ne doivent pas pouvoir accéder aux cours d'eau dans les trois jours suivant le traitement pour limiter l'exposition des organismes aquatiques au produit, toxique pour eux.

La lutte chimique contre les strongles gastro-intestinaux dépend grandement de la découverte de nouvelles molécules efficaces et d'un protocole de traitement limitant au maximum l'apparition de résistances par roulement des molécules utilisées et abolition du sous-dosage (volontaire ou non). Cependant, cette course à l'armement ne saurait suffire et pose des questions importantes quant à notre capacité de développement de nouveaux produits et à l'innocuité de ces produits sur l'environnement.

En complément de la lutte chimique, l'utilisation de molécules naturelles, n'ayant pas pour but la destruction du parasite est envisageable.

2) Utilisation de substances non-médicamenteuses présentant une activité anthelmintique : les métabolites secondaires de plantes.

Sont appelés métabolites secondaires de plantes (MSP) les substances qui n'interviennent pas directement dans la croissance et le développement d'une plante mais sont nécessaires à sa survie dans l'environnement. Ces MSP peuvent être classés en différentes catégories : les flavonoïdes et autres composés phénoliques et polyphénoliques parmi lesquels les tanins, les terpénoïdes, les alcaloïdes azotés et les composés soufrés (110). D'autres définitions plus précises peuvent également être appliquées.

Les MSP sont souvent des moyens pour les plantes de se défendre vis-à-vis des insectes ou des herbivores et peuvent présenter, à ce titre, des propriétés intéressantes pharmacologiquement.

Parmi les MSP, les plus fréquents sont les tanins appartenant à la famille des polyphénols. Ces molécules sont les plus répandues dans les végétaux après la cellulose, les hémicelluloses et les lignines.

a) Les tanins

i) Définition et classification

Les tanins sont des molécules souvent hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da définies par leur capacité à précipiter des macromolécules telles que les protéines, les alcaloïdes ou les polysaccharides à partir d'une solution aqueuse (111). Pendant longtemps la classification des tanins s'est cantonnée à cette définition et ils ont été séparés en deux

groupes : les polyesters d'acide gallique et/ou d'acide hexahydrodiphénique qualifiés de tanins hydrolysables et les proanthocyanidines qualifiées de tanins condensés (111).

Quelques découvertes plus récentes, notamment que certains ellagitanins (autrefois classés dans les tanins hydrolysables) n'étaient pas hydrolysables, ont modifié la classification (112). Cependant, la plupart des articles de la littérature y compris actuelle continuent à séparer tanins hydrolysables ne présentant que peu d'intérêt en tant qu'anthelminthiques et tanins condensés présentant des propriétés anthelminthiques intéressantes.

Les tanins condensés sont présents dans de nombreux fourrages utilisés en alimentation des ruminants. Les légumineuses, tels que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*), le lotier (*Lotus corniculatus*) ou la sulla (*Sulla coronaria*), sont particulièrement riches en tanins (113, 114). Ces fourrages présentant à la fois des propriétés nutritionnelles (telles que leur richesse en protéines et leur complémentarité avec les céréales en termes d'acides aminés essentiels) et un intérêt en santé animale sont qualifiés de nutraceutiques.

ii) Mise en évidence de propriétés anthelminthiques des tanins condensés

Différentes expériences peuvent être menées *in vitro* pour étudier l'effet anthelminthique des tanins : mesure de l'éclosion des œufs, du développement de la larve, de la migration de la larve, du dégainement, de la mobilité des adultes (114). Parfois les tanins sont testés directement, parfois ce sont des extraits de plantes qui sont utilisés auquel cas une expérience avec un inhibiteur des tanins tel que le polyéthylène glycol (PEG) ou le polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) permet de justifier la spécificité d'action. L'effet majeur des tanins semble être une inhibition dose-dépendante du dégainement de la larve L3 au niveau ruminal (113, 115) et une inhibition du développement des larves L1 en larves L3 (115, 116). Ces effets ont été confirmés *in vivo* par la mesure de l'excrétion fécale d'œufs et du fardeau parasitaire des animaux après qu'ils aient été nourris avec un fourrage riche en tanins (117, 118).

iii) Mode d'action des tanins condensés

Plusieurs hypothèses ont été émises quant au mode d'action des tanins condensés *in vivo*. Les tanins condensés se lient de manière non-covalente et réversible à des macromolécules telles que les protéines ou les polysaccharides. Un exemple aisément appréciable est la sensation d'astringence, d'assèchement de la cavité buccale lors de la consommation de fruits riches en tanins due à la précipitation de l'amylase salivaire. Ce sont majoritairement des interactions hydrophobes qui expliquent la liaison entre le polyphénol et la macromolécule mais des liaisons

hydrogène entre la cétone d'un acide aminé au sein d'une protéine et un groupement hydroxyle du polyphénol ou des interactions ioniques peuvent également intervenir (119).

Trois hypothèses principales existent quant aux propriétés anthelminthiques des tanins *in vivo* :

- La liaison des tanins aux protéines dans le rumen limite la dégradation de celles-ci par le microbiote ruminal et entraîne une plus forte disponibilité de protéines qui seront absorbées dans l'intestin grêle. Ce surplus de protéines, probablement à l'origine des meilleurs rendements laitiers et lainiers parfois observés lors d'une alimentation avec des fourrages riches en tanins (120, 121) pourrait également être orienté vers une meilleure réponse immunitaire.
- La liaison des tanins aux protéines alimentaires empêche l'utilisation de celles-ci par les parasites.
- La liaison des tanins à la cuticule des parasites, favorisée par l'affinité particulière des tanins pour les protéines riches en acides aminés hydrophobes et en prolines, comme le collagène composant la cuticule (122) est responsable de l'inhibition du dégainement des larves L3 dans le rumen et de la mobilité des larves dans le tractus digestif.

Ces trois hypothèses ne constituent pas une liste exhaustive et ne sont probablement pas exclusives les unes des autres (Figure 18).

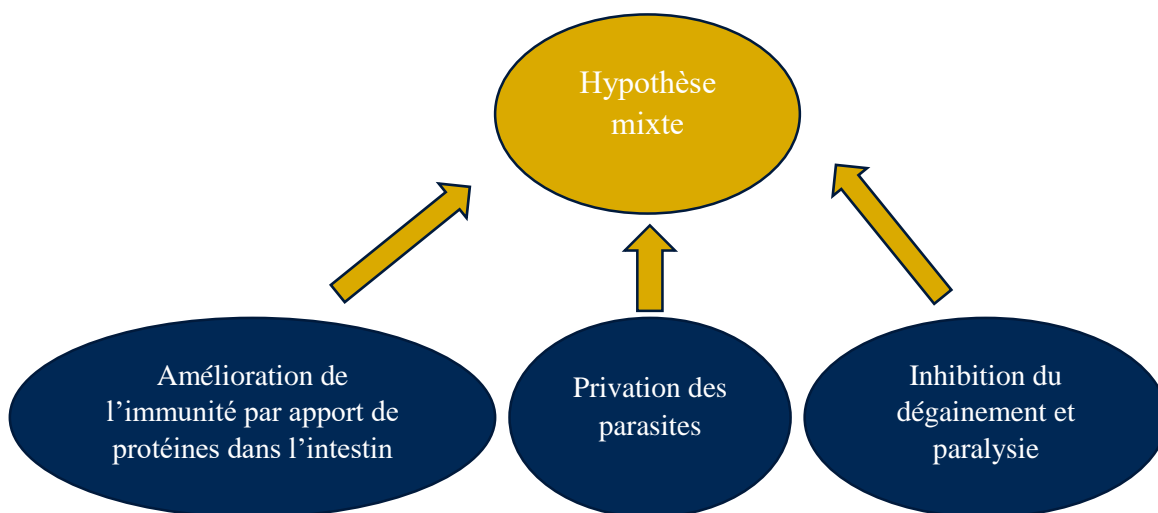


Figure 18 : Schéma récapitulatif des hypothèses concernant le mode d'action des tanins.

iv) *Variabilité des effets des tanins condensés*

La variabilité des effets des tanins condensés réside dans 3 paramètres : la structure des tanins, la structure des macromolécules auxquelles les tanins se lient, les conditions physico-chimiques de l'environnement où se déroulent les réactions (123).

Ainsi, les tanins de fort poids moléculaire, c'est-à-dire de fort degré de polymérisation, provoquent une précipitation plus importante des macromolécules auxquelles ils se lient (119). La flexibilité des tanins augmente aussi la possibilité des interactions avec les macromolécules et donc leur potentiel précipitant (119). L'hydrophobicité des tanins permet la formation de liaisons hydrophobes avec les macromolécules et donc une meilleure précipitation de celles-ci. Enfin, la composition des tanins peut avoir un effet. Ainsi les tanins riches en prodelphinines se lient plus facilement et fortement aux protéines que les tanins riches en procyanidines et ont une activité anthelminthique plus importante *in vitro* (124).

La proportion d'acides aminés hydrophobes et en particulier de proline influence la formation de liaisons entre les tanins et les protéines, les tanins ayant une affinité plus forte pour ces acides aminés (121).

La principale condition physico-chimique influençant la liaison des tanins aux protéines ou aux polysaccharides est le pH. En effet, la liaison entre protéines et tanins est stable entre pH=5 et pH=7 mais dissociée en dehors de cet intervalle (118). Le pH optimal de liaison dépend du point isoélectrique des protéines (le pH auquel les protéines se trouvent sous la forme de zwitterions) puisque c'est ainsi que sont favorisées les liaisons ioniques entre lesdites protéines et les tanins (124).

Les effets sur les vers adultes, parfois rapportés, varient en fonction de l'espèce parasitaire d'une part du fait de la composition de la cuticule du parasite et d'autre part du fait de sa localisation dans le tractus digestif influençant les conditions physico-chimiques au moment de l'interaction tanin-parasite adulte.

v) *Intérêts et limites de l'utilisation des tanins condensés*

L'utilisation des tanins condensés ne se fait pas dans le même cadre que celle des anthelminthiques classiques. En effet, si l'objectif des seconds est de réduire au maximum voire de supprimer la charge parasitaire, les premiers visent davantage à enrayer le cycle biologique du parasite et la contamination des pâtures. Les fourrages riches en tanins condensés sont considérés comme des nutraceutiques (125) et, de fait, leur utilisation diffère de celle de

molécules curatives. Les nutraceutiques doivent présenter une bonne valeur nutritionnelle, être consommés volontairement par l'animal et ne pas avoir d'effets délétères sur la production.

L'administration de ces fourrages dépend de l'ingestion volontaire par les animaux ce qui suppose une palatabilité importante. Par ailleurs, l'activité anthelmintique doit s'ajouter à une bonne valeur nutritionnelle et à un bon équilibre énergie/protéines et non s'imposer seule. Une autre condition indispensable à l'utilisation de tels fourrages est la capacité d'approvisionnement. Un fourrage difficilement cultivable ou en des quantités insuffisantes pour un élevage à grande échelle ne peut être une solution alternative aux anthelmintiques applicable au long terme (125). C'est pour ces raisons que le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) s'est imposé dans la majorité des études actuelles.

L'évaluation de l'efficacité des fourrages nutraceutiques est plus difficile que l'évaluation d'un médicament puisque les animaux du groupe contrôle doivent recevoir une alimentation iso-énergétique et iso-protéique alors même qu'ils ne reçoivent pas le même fourrage afin de pouvoir attribuer les potentiels effets observés à la présence de tanins condensés et non simplement à la différence de régime. Par ailleurs la quantité de tanins condensés et la structure des différents tanins dépend de l'espèce végétale étudiée, du stade de récolte et du moyen de conservation ce qui rend les comparaisons plus difficiles.

b) Les alcaloïdes des pépins de citrouille et du lupin doux

Certains végétaux riches en alcaloïdes comme certaines espèces de lupins ont été étudiées dans le but de pouvoir être utilisées comme nutraceutiques (126). Ces alcaloïdes, tels que les dérivés de la pipéridine ou de la quinolizidine (comme la spartéine ou la lupanine) ont une action sur les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine qui sont des cibles importantes pour l'activité anthelmintique (127) et ont montré des effets prometteurs *in vitro* sur la migration larvaire mais ces effets ne se sont pas confirmés *in vivo* (126). Par ailleurs, les graines de lupin utilisées sont souvent bien plus riches en alcaloïdes que les espèces utilisées en alimentation animale qui sont moins amères et présentent une toxicité potentielle moins importante. En effet, les alcaloïdes ont été identifiés comme responsables de l'arthrogrypose touchant les veaux dont les mères ont consommé des lupins riches en alcaloïdes pendant la période s'étalant de 40 à 110 jours de gestation ou des défaillances respiratoires aiguës chez des moutons ayant consommé ces mêmes lupins (128).

Des études ont également été menées sur les pépins de citrouille et se sont révélées concluantes *in vitro* et *in vivo* chez des souris (129, 130). L'hypothèse principale de l'effet des pépins de

citrouille repose sur la présence de deux alcaloïdes : la berberine et la palmitine mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer leur action (129).

B) Actions de lutte contre le parasitisme centrées sur l'environnement

Du fait du cycle biologique particulier, comprenant une phase libre, des nématodes gastro-intestinaux, l'environnement présente un intérêt tout particulier dans la gestion des parasitoses. En effet, le niveau d'infestation des animaux est globalement corrélé avec le niveau de contamination de la pâture et une gestion optimisée de la pâture peut permettre de diminuer fortement la prévalence des formes graves des parasitoses.

1) La gestion des pâtures

La gestion des pâtures en vue de leur assainissement repose sur trois stratégies développées dès 1976 par Michel et al. (131). Ces stratégies peuvent être qualifiées d'évasion (ou d'évitement), de prévention et de dilution.

La prévention repose sur l'utilisation de pâtures non-contaminées pour les animaux sensibles. L'évitement consiste en une mobilité des troupeaux de manière à éviter le maintien de ceux-ci sur des pâtures abondamment contaminées. La dilution se base sur une diminution du contact entre les animaux et les larves en évitant le surpâturage et en favorisant le pâturage multi-espèces (132).

a) Gestion de la densité de population : application du principe de dilution.

Il est bien connu qu'un lien existe entre le nombre d'animaux pâturant sur une surface herbagée et le risque parasitaire pour ces animaux. En effet, une forte densité d'animaux sur une pâture pousse les animaux à brouter l'herbe plus à ras et plus proche des bouses de leurs congénères augmentant le risque d'ingestion des larves L3 qui se trouvent sur les premiers centimètres des brins d'herbe et à une distance des bouses permise par leur capacité de migration. Ainsi Thamsborg et al. (1996) ont montré qu'une diminution du nombre d'ovins de 17,2 par hectare à 8,6 par hectare (soit deux fois moins) était associée avec une excrétion fécale d'œufs de nématodes dix fois moins élevée (133). Mahieu et al. (2013) ont montré que la diminution de l'excrétion fécale d'œufs n'était pas linéairement corrélée à la densité de population de la pâture mais qu'une densité plus élevée expliquait toujours une excrétion d'œufs significativement plus importante. Des effets sur la mortalité et la croissance ont également été mis en évidence dans cette même étude (134).

b) Utilisation de « pâturages tournants » : application du principe d'évasion.

Les animaux s'infestent principalement à partir des larves L3 infestantes émergeant des œufs qu'ils ont eux-mêmes excrétés. Ainsi, déplacer les animaux de la pâture avant que les œufs d'*Haemonchus contortus* ne deviennent des larves infestantes permettrait de limiter l'infestation. Les animaux ne devraient alors retourner sur la pâture qu'après un temps excédant la durée de vie des L3.

Cependant, comme vu au I.C de la Partie 1, la survie des larves infestantes dans l'environnement dépend non seulement de l'espèce parasitaire mais également des conditions climatiques (26). De fait, l'efficacité de la rotation des pâtures est généralement plus importante dans les régions tropicales ou subtropicales où, si le développement de l'œuf en larve est plus rapide, la durée de vie des larves est inférieure (72, 132).

En régions tempérées, la gestion de la rotation des pâtures impose une charge de travail supérieure pour une efficacité limitée. Par ailleurs cette pratique entraîne un risque de propagation de la résistance aux helminthes par suppression du contact entre les parasites sensibles et les hôtes.

c) Utilisation de pâturages mixtes entre hôtes différents.

i) Pâturage mixte entre espèces différentes

L'utilisation d'un pâturage commun pour des hôtes différents, le plus souvent des petits et des grands ruminants, peut permettre de réduire les risques d'infestation par les strongles du tube digestif par diminution de l'exposition de chacun des hôtes. Cela découle de la spécificité parasitaire des nématodes gastro-intestinaux pour un hôte donné.

En conséquence, lorsqu'un bovin ingère un strongle spécifique des petits ruminants, ce dernier va bien souvent se retrouver dans une impasse biologique. Cela va conduire à la mort de la larve ingérée et donc à une contamination subséquente moins importante de la pâture.

La chèvre et le mouton ne peuvent pas être considérés comme des hôtes différents au regard de l'infestation parasitaire car ils sont sujets aux infestations par les mêmes nématodes gastro-intestinaux.

Par ailleurs, certains nématodes gastro-intestinaux, notamment *Haemonchus contortus* (135), sont relativement ubiquistes et peuvent se développer à la fois chez les petits et les grands ruminants. Le pâturage mixte équidés/ruminants peut permettre de contourner l'ubiquité relative de ces parasites.

Les deux hôtes du pâturage mixte peuvent évoluer sur la parcelle de manière simultanée ou en alternance (136). Dans le premier cas, on observe une dilution de l'infestation parasitaire par compétition sur l'ingestion des larves infestantes, dans le second, vient s'ajouter une période de « décontamination » de la prairie par absence de pâturage de l'espèce sensible au parasite.

L'étude réalisée par Brito et al. en 2013 a montré une efficacité supérieure du pâturage mixte simultané par rapport au pâturage mixte alterné chez les ovins en termes d'excrétion fécale d'œufs de nématodes tandis que chez les bovins, aucune différence n'a été observée (137). Cela peut s'expliquer par la différence entre les niveaux d'ingestion des bovins et des ovins sur la pâture. Cette même étude a montré une diminution de l'occurrence d'*Haemonchus contortus* dans les cultures fécales des ovins en pâturage mixte par rapport au pâturage simple (137). Ces résultats peuvent être nuancés dans le cas où les différences de comportement alimentaire favorisent au contraire l'infestation, si les bovins consomment les herbes hautes et qu'à la suite de cela les ovins consomment l'herbe près du sol. Encore une fois, la densité de la pâture est à prendre en compte lors de pâturage mixte simultané (138).

ii) Pâturage mixte entre individus d'une même espèce

Lorsque les animaux sont confrontés aux parasites ils peuvent développer une immunité plus ou moins importante (cf IV.C.1.b de la Partie 1). De fait, les animaux plus âgés sont moins sensibles à l'infestation et excrètent généralement moins d'œufs que les plus jeunes. La consommation d'une même pâture par des animaux immunisés et naïfs ou présentant une diminution d'immunité liée par exemple à la fin de gestation ou à la lactation peut permettre une moindre infestation de ces derniers bien que les résultats soient moins probants que lors du pâturage mixte multi-espèces (138).

2) Contrôle biologique de l'infestation des pâtures

La lutte biologique consiste en l'utilisation d'organismes vivants antagonistes dans le cadre de la lutte contre un nuisible. Ces organismes sont qualifiés d'agents de lutte biologique et peuvent être des prédateurs, des agents pathogènes spécifiques du nuisible, ou des êtres vivants entrant en compétition avec le nuisible pour les ressources sans avoir son pouvoir pathogène.

Dans la lutte contre les nématodes, plusieurs catégories d'agents biologiques ont fait l'objet d'études, en particulier les champignons nématocides, les bactéries nématocides et les nématodes « cannibales ».

a) Utilisation de champignons nématocides

Les champignons nématophages ont dans un premier temps été utilisés en agronomie dès les années 1950 pour lutter contre des nématodes parasitant et détruisant les cultures (139). Ces champignons capturent les larves libres des nématodes à l'aide de réseaux adhésifs. D'autres champignons peuvent avoir des propriétés nématocides par sécrétion de substances toxiques pour les nématodes tels que certains alcaloïdes (comme le paraherquamide synthétisé par *Penicillium paraherquei*) ou des terpènes (140).

L'observation de ces effets nématophages ou nématocides a conduit les chercheurs à examiner l'effet de l'ensemencement *in vitro* de matières fécales d'animaux infestés par des parasites par des conidies (spores assurant la multiplication asexuée) de *Monacrosporium eudermatum* ou *Arthrobotrys oligospora* à raison de 20 000 conidies par gramme de fèces. Cet ensemencement a résulté en une réduction du nombre de larves infestantes de respectivement 95,7 et 98,3% (141).

Parmi les champignons nématophages, *Duddingtonia flagrans* s'est rapidement imposé comme le champignon le plus étudié pour sa capacité à survivre dans le tube digestif des ruminants grâce à la formation de chlamydospores, sa capacité à croître rapidement sur les bouses et sa capacité à piéger les larves de nématodes au sein des déjections animales (132). Ainsi, des administrations orales de chlamydospores de *Duddingtonia flagrans* à hauteur de 11 millions de chlamydospores par individu ont provoqué une réduction du développement des larves L3 de 71% dans les deux jours suivants l'administration et de 56% aux troisième et quatrième jour (142) probablement du fait de l'élimination du champignon du tractus digestif (136).

Des doses inférieures se sont montrées inefficaces (144) car les spores, bien que possédant une paroi épaisse, sont partiellement dégradées dans la caillette des ruminants (145). De fait l'étude d'Ojeda et al. (2008) a postulé que la quantité optimale de spores pour prévenir le développement et la migration des larves infestantes était de 10 spores ingérées par œuf de nématode dans les matières fécales (146).

L'utilisation de ces champignons permet une décontamination de la pâture par action *in situ* dans les fèces des animaux. Ainsi, des animaux recevant des concentrés contenant des spores vont contaminer la pâture de manières moins importante que ceux n'en recevant pas ce qui aura pour conséquence une infestation moins importante d'animaux sains leur succédant sur la pâture (147). L'efficacité des concentrés ne dépendant ni des conditions de stockage ni de la température, ce système pourrait être utilisable dans tous les zones géographiques (148, 149)

notamment en combinaison avec une gestion raisonnée du pâturage dans les zones tempérées où l'assainissement de la pâture est plus lent.

L'utilisation de *Duddingtonia flagrans* ne semble pas avoir d'impact négatif sur l'environnement (150). Des granulés contenant des spores de *Duddingtonia flagrans* sont disponibles sur le marché australien (exemple : BioWorma®) mais ne semble pas encore commercialisé en France bien que des essais y aient été menés (151).

Le mode d'action de *Duddingtonia flagrans* a été élucidé en utilisant la microscopie à fluorescence (152). Dans les premiers temps de l'interaction entre la larve et le champignon, un anneau de chitine se forme à la zone de contact des cellules de *Duddingtonia flagrans* et de la cuticule de la larve. Puis, le champignon sécrète des enzymes lytiques qui dégradent la cuticule et croît à l'intérieur de la larve (152) (Figure 19).

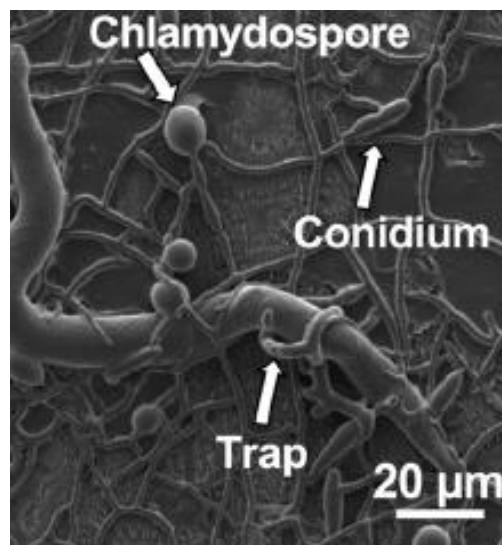


Figure 19 : Piégeage d'une larve infestante de nématode par le réseau d'hyphes de *Duddingtonia flagrans*. D'après Youssar et al. (2019) (152).

b) Utilisation de bactéries nématocides

i) Bactéries productrices d'endotoxines : exemple de *Bacillus thuringiensis*

L'utilisation de substances d'origines bactériennes ou de bactéries dans le cadre de la lutte contre les insectes ou les nématodes parasites de plantes n'est pas récente (153, 154). Parmi ces « biopesticides » les bactéries les plus utilisées sont celles du genre *Bacillus spp* (155) qui représentent près de 90% du marché des biopesticides, bien que leur utilisation représente une part assez faible des pesticides au sens large.

L'espèce bactérienne la plus étudiée est *Bacillus thuringiensis*, un bacille Gram positif, flagellé dans sa forme végétative et capable de sporuler. Divers variants de *Bacillus thuringiensis* se

sont révélés efficaces contre les larves de nématodes, de même que *Bacillus circulans*, tandis que *Bacillus cereus*, responsable de nombreuses intoxications alimentaires pour les humains, ne semble pas avoir d'effet particulier sur les larves de nématodes (156).

Lors de la sporulation, *Bacillus thuringiensis* synthétise un cristal protéique constitué de δ -endotoxines qui sont libérées et solubilisées dans l'intestin des larves d'insectes. Celles-ci sont alors responsables de la formation de pores dans la muqueuse intestinale et de la mort rapide desdites larves (157) (Figure 20).

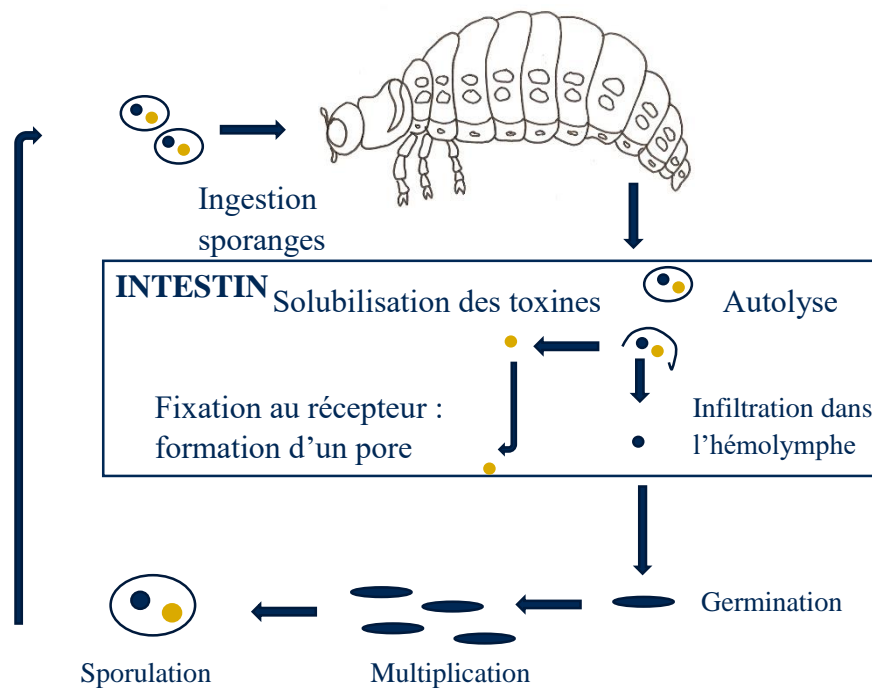


Figure 20 : Mode d'action de *Bacillus thuringiensis* après ingestion de sporanges par une larve d'insecte. D'après Loudhaief (2016) (157).

Plusieurs études réalisées sur des nématodes laissent supposer un mode d'action similaire (158). L'administration directe des δ -endotoxines présentant un effet nématocide a fait ses preuves *in vitro* à des concentrations molaires (20-40 ng/mL) inférieures à celles utilisées pour de nombreuses molécules anthelmintiques (les molécules étant cependant de poids moléculaire beaucoup plus important) (159). Cependant, ces toxines sont rendues beaucoup moins actives lors d'un séjour à pH acide ce qui complique leur utilisation *in vivo* du fait de l'acidité de la caillette des ruminants. L'administration péritonéale des toxines n'a pas eu d'effet sur les moutons, ce qui était prévisible du fait de la faible toxicité desdites toxines sur les mammifères (160) et a réduit le nombre de parasites retrouvés à l'autopsie démontrant un effet des toxines sur les stades parasitaires en plus de l'effet sur les formes libres (161). Cependant, ce mode d'administration, réalisable en expérimentation n'est pas adapté au terrain.

Une autre solution consiste à cibler les larves dans les fèces en faisant ingérer des sporanges à l'animal comme c'était le cas avec *Duddingtonia flagrans*. Cependant, cela supposerait une germination immédiate des spores puisque l'efficacité de *Bacillus thuringiensis* décroît avec le temps passé par les larves dans les fèces (162).

L'utilisation d'*Escherichia coli* génétiquement modifiée pour produire les toxines de *Bacillus thuringiensis* pourrait se révéler un bon moyen de lutter contre les formes larvaires d'*Haemonchus contortus*. En effet, plusieurs études ont montré une toxicité plus importante d'une toxine particulière de *Bacillus thuringiensis* lorsqu'elle était produite par *Escherichia coli* par rapport au « cocktail » de protéines du cristal produit par la bactérie d'origine (163). De plus, *Escherichia coli* n'introduit pas le temps de latence lié à la germination des spores de *Bacillus spp.*

ii) *Bactéries responsables de la digestion interne du nématode : exemple de Chryseobacterium nematophagum.*

La découverte de *Chryseobacterium nematophagum*, un bacille Gram négatif capable de synthétiser des chitinases et des métalloprotéases analogues à des collagénases, est très récente (2019). Deux souches très proches ont été découvertes dans le même temps dans une pomme pourrie à Paris en France et dans une figue en décomposition à Bangalore en Inde. Des expériences *in vitro* ont montré que la bactérie lorsqu'elle était ingérée tuait 100% des larves L1, L2 et L3 de *Haemonchus contortus* par lyse du pharynx puis de la cuticule depuis l'intérieur du nématode (164).

Par ailleurs les nématodes, en particulier *Caenorhabditis elegans*, ne semblent pas être repoussés par les cultures bactériennes de *Chryseobacterium nematophagum* et les consommer spontanément (164). Des études plus approfondies doivent être menées pour confirmer le potentiel anthelmintique de cet agent de contrôle biologique nouvellement découvert.

c) Utilisation de nématodes « cannibales »

Peu de recherches ont été réalisées par rapport à l'utilisation de nématodes nématophages pour lutter contre les strongles gastro-intestinaux. Une étude menée par d'Alexis et al. (2009) a montré une réduction de 29% de la quantité de larves infestantes dans des bacs contenant des vers de terre par rapport à ceux qui n'en contenaient pas (165) et une étude plus récente a montré que les nématodes appartenant au genre *Buttlerius* pouvaient diminuer l'évolution des œufs en larves infestantes de 61,9% dans les fèces de moutons (166).

Par ailleurs l'ensemencement d'une pâture par des vers de terre est connu pour avoir des effets plutôt positifs sur les aspects agronomiques de celle-ci (aération des sols, enrichissement) ce qui s'ajoute au léger intérêt dans la lutte biologique contre les nématodes gastro-intestinaux (167).

C) Actions de lutte contre le parasitisme centrées sur l'hôte

Les actions de lutte contre le parasitisme centrées sur l'hôte reposent principalement sur les notions de résistance et de résilience des hôtes au parasitisme. La résistance se définit par la capacité de l'hôte à réguler son infestation en agissant sur l'élimination des parasites, sur leur développement ou sur leur fécondité (72, 168, 169) tandis que la résilience se définit par sa capacité à maintenir sa production malgré la présence de parasites (72).

Généralement, une amélioration de la résistance est accompagnée d'une meilleure résilience dans la mesure où les animaux supportent mieux des niveaux d'infestation plus faibles (106, 170). Cependant ces deux concepts peuvent parfois être dissociés. Des études ont montré, par exemple, que les mécanismes de résistance, lorsqu'ils étaient excessifs ou dérégulés pouvaient engendrer un coût physiologique supérieur à celui de l'infestation (171).

1) Le contrôle immunologique de l'infestation parasitaire

a) Réponse immunitaire de l'hôte

La réponse immunitaire est classiquement composée de deux branches : la réponse immunitaire innée dans laquelle des mécanismes non spécifiques sont rapidement mis en œuvre et la réponse immunitaire adaptative dans laquelle des réponses plus tardives mais spécifiques de l'agent pathogène se mettent en place. Cette deuxième réponse présente, outre sa spécificité, l'intérêt d'être rapidement reproduite en cas de seconde exposition grâce à sa propriété de « mémoire ». Ces deux branches, bien que souvent séparées car distinctes chronologiquement, ne sont pas indépendantes et doivent être considérées comme deux éléments connectés d'un unique système.

i) Réponse immunitaire innée face à l'infestation parasitaire

Au niveau du tractus gastro-intestinal l'immunité innée est assurée par l'imperméabilité de l'épithélium digestif aux strongles gastro-intestinaux. Cette barrière cellulaire est renforcée par la production de sécrétions muqueuses (notamment les mucines) ainsi que par le péristaltisme intestinal qui permet l'élimination des pathogènes non attachés.

La surface luminale du tube digestif est couverte par une couche de mucus, produite par les « cellules du collet » dans la caillette et par les cellules caliciformes dans l'intestin. Le mucus,

essentiellement constitué de mucines, qui sont des glycoprotéines de fort poids moléculaire, a longtemps été considéré comme une simple barrière physique dont la synthèse était augmentée en cas d'infestation parasitaire en lien avec une prolifération et une hyperplasie des cellules caliciformes (172, 173). Cependant des études plus récentes ont révélé l'importance de certaines mucines dont les chaînes oligosaccharidiques confèrent une protection plus ou moins importante (173). Ainsi, l'infection par *Haemonchus contortus* semble associée avec une diminution de l'expression de Muc5AC moins importante chez les animaux résistants que chez les animaux sensibles suggérant un rôle protecteur de ladite mucine (174). Par ailleurs, une altération de la glycosylation des mucines fundiques lors d'infestation par *Haemonchus contortus* peut jouer un rôle dans la résistance des brebis, les sulphomucines et sialomucines ayant été associées à plusieurs reprises avec une expulsion des nématodes de l'intestin (173, 175, 176).

L'importance de la motilité du tube digestif, bien démontrée dans les études sur rongeurs (177) est plus controversée chez les moutons. Cependant l'étude de MacKinnon et al. (2009) a montré une surexpression des gènes impliqués dans la motilité intestinale en cas d'infestation par *Haemonchus contortus* (178).

Un autre élément important de la réponse immunitaire innée est l'activation des molécules du complément (179, 180). L'opsonisation du parasite provoque, entre autres, le recrutement d'éosinophiles indépendamment des mécanismes spécifiques (par l'intermédiaire de l'interleukine 5 notamment) à l'origine de la destruction des parasites (181). Cependant des mécanismes de résistance d'*Haemonchus contortus* existent respectivement pour la voie classique et alterne. L'inactivation de C1q par une protéine analogue à la Calréticuline retrouvée dans les produits d'excrétion et de sécrétion du parasite (182) est responsable d'une diminution de l'efficacité de la voie classique tandis que la voie alterne est altérée par une protéine nommée H.c-C3BP se liant à C3, pivot central du fonctionnement du complément. Ces deux mécanismes résultent en une diminution de formation du complexe d'attaque membranaire (183)

Enfin, la quantité d'histamine, tant dans le mucus que dans la muqueuse a été négativement corrélée avec la charge parasitaire suggérant que les animaux résistants, en sécrétant plus d'histamine, limitaient l'infestation (184).

De nombreux éléments interviennent dans l'immunité innée (Figure 21) et ont également un impact sur l'immunité adaptative. Ainsi le complément favorise la présentation de motifs antigéniques appelés PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern) aux PRR (Pattern Recognition Receptor), récepteurs des cellules immunitaires. Cette reconnaissance provoque une libération d'histamine par les mastocytes après stimulation par le complément (178). L'histamine, par son action vasoactive, augmente la perméabilité vasculaire et le recrutement des effecteurs de l'immunité adaptative.

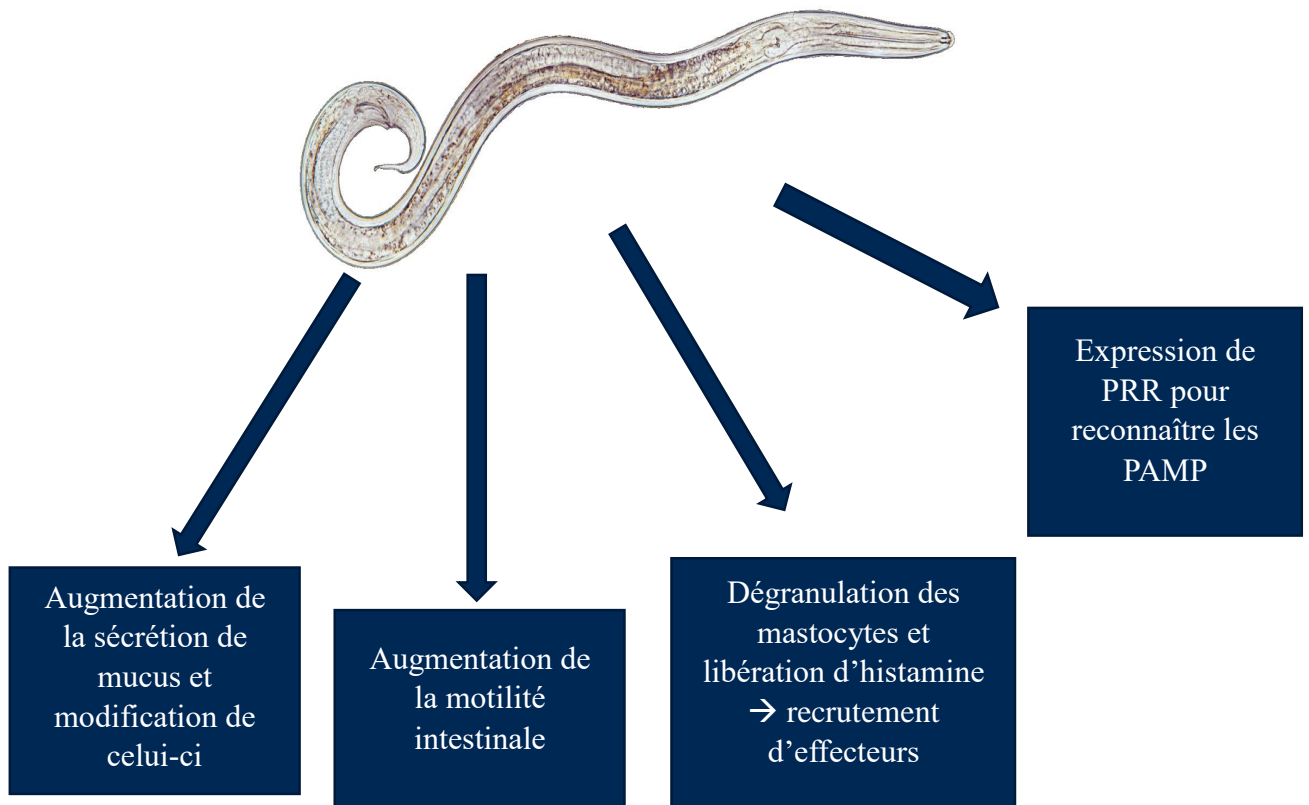


Figure 21: Mécanismes de l'immunité innée impliqués dans la réponse précoce à l'infestation par *Haemonchus contortus*.

ii) Réponse immunitaire adaptative face à l'infestation parasitaire

L'immunité innée était plutôt associée avec une élimination rapide des parasites au premier contact par l'intermédiaire de mécanismes non-spécifiques. Au contraire, l'immunité adaptative est un phénomène qui se met en place plus lentement et nécessite un premier contact avant d'être efficace.

La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative à l'infestation par *Haemonchus contortus* est rendue difficile par la succession rapide des stades parasitaires qui ne présentent

pas toujours les mêmes antigènes de surface (181). Chaque étape du développement du parasite représente un stimulus immunologique différent (185).

La réponse immunitaire adaptative à l'infestation par *Haemonchus contortus* est souvent qualifiée de Th2, d'après la nomenclature mise en place par Mosmann et al. (1984) qui différencie deux types de réponses adaptatives (186). Les lymphocytes T helper de type 1 (Th1) produisent plutôt de l'interleukine-2, de l'interféron- γ ou du TNF- β tandis que les lymphocytes T helper de type 2 produisent de l'interleukine-4, de l'interleukine-6 et de l'interleukine-10 par exemple.

Une vision simpliste consiste à associer les réactions de type Th1 avec les infections intracellulaires, qu'elles soient virales, bactériennes ou à protozoaires ; et les réactions de type Th2 avec les infections par des pathogènes extracellulaires, en particulier les parasites métazoaires (187).

L'importance des lymphocytes T CD4⁺ dans la réponse immunitaire à *Haemonchus contortus* a été montrée par Gill et Watson en 1993 grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces cellules. Les animaux les plus résistants présentaient une hyperplasie de la muqueuse associée avec une augmentation de la quantité de mastocytes et d'éosinophiles mais ces critères revenaient au niveau du contrôle lors d'inactivation des lymphocytes T CD4⁺ (188, 189). Au contraire, les anticorps monoclonaux dirigés contre les lymphocytes T CD8⁺ n'ont eu aucun effet sur la résistance, suggérant que ces cellules n'interviennent pas dans l'immunité contre *Haemonchus contortus*. L'inoculation de larves d'*Haemonchus contortus* induit par ailleurs une prolifération des lymphocytes résultant en une hypertrophie des nœuds lymphatiques abomasaux et en une augmentation de la quantité de lymphocytes T CD4⁺ dans la paroi abomasale et dans le sang périphérique.

L'orientation Th2 de la réponse immunitaire provoquée par les nématodes gastro-intestinaux se traduit par une stimulation des lymphocytes B et leur différenciation en plasmocytes sécrétant des immunoglobulines A, E et G. Les IgA produites à la surface de la muqueuse sont impliquées dans la diminution de la croissance du parasite par action sur les larves L4 (190), probablement par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (179). D'autres rôles potentiels des IgA mucosales ont été proposés, notamment une diminution de la longueur (168) et de la fécondité (191) des vers adultes. Les IgE se fixent sur la cuticule des parasites et induisent la cytotoxicité à médiation humorale des éosinophiles et des mastocytes qui possèdent des récepteurs ayant une bonne affinité pour les IgE (192).

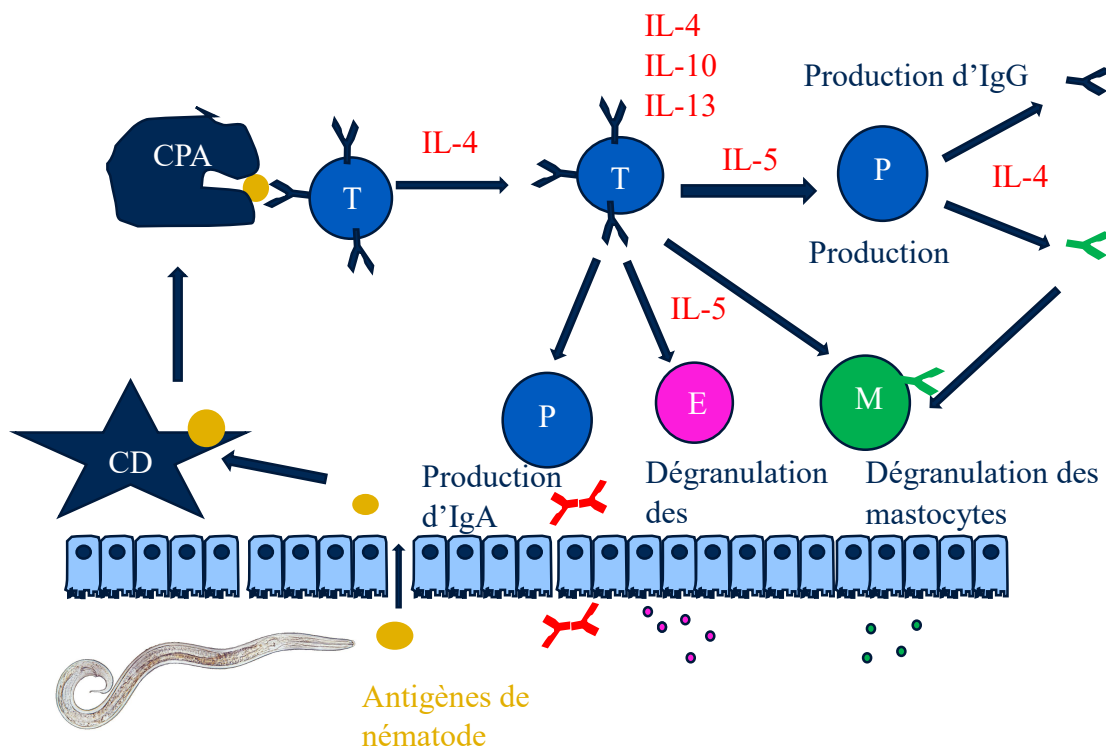


Figure 22: Mise en place de la réponse immunitaire adaptative en réponse à une infestation par des nématodes gastro-intestinaux d'après McRae et al. (190). CD : Cellule Dendritique ; CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes ; E : Éosinophiles ; M : Mastocyte ; P : Plasmocyte ; T : Lymphocyte T.

b) Facteurs impactant la mise en place de la réponse immunitaire

i) La race

Toutes les races de brebis ne sont pas aussi résistantes au parasitisme et en particulier à l'haemonchose. En effet, de nombreuses études menées sur des brebis rustiques ou endémiques de milieux tropicaux ont montré une meilleure résistance de ces brebis par rapport à celle des brebis « domestiques » ou des races sélectionnées pour leur production (193–196). Un bon exemple est l'étude menée par Courtney et al. (1985) (197). Quatre « races » de moutons ont été comparées, à savoir : les Saint-Croix, un mouton à poil originaire des Îles Vierges ; les Barbados Blackbelly, une race à poil originaire de la Barbade ; les Florida-Native Gulf Coast, moutons lainiers importés d'Espagne aux États-Unis ; et des moutons issus de croisement entre Dorset, Suffolk, Finn et Rambouillet en proportions variables nommés « moutons domestiques » dans l'étude (Figure 23). En seconde infestation, les excréments fécaux d'œufs et les hématocrites des moutons des différentes races ont été mesurés et ont révélé des différences significatives permettant de classer les différentes races en fonction de leur

résistance selon l'ordre suivant : Saint-Croix > Florida-Native Gulf Coast > Barbados Blackbelly > Moutons domestiques (197).

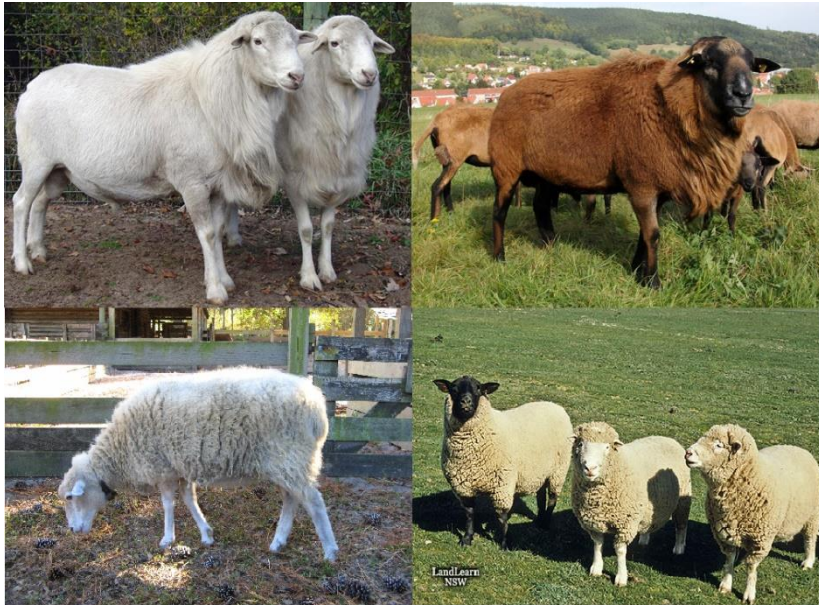


Figure 23: Races de moutons comparées dans l'étude de Courtney et al. (1985). De droite à gauche, de haut en bas : Saint-Croix, Barbados Blackbelly, Florida-Native Gulf Coast, Suffolk & Dorset (197)

ii) Le sexe

Bien avant la mise en évidence scientifique d'une différence de résistance entre les mâles et les femelles, les éleveurs d'ovins avaient constaté que les mâles étaient souvent plus affectés par le parasitisme. La revue de Barger (1993) réunit les preuves expérimentales de la moindre résistance des béliers à l'infestation par *Oesophagostomum columbarium*, *Trichostrongylus colubriformis* et *Haemonchus contortus* lorsque l'infestation est réalisée autour de la puberté ou après celle-ci (198).

Cette différence se ressent sur l'excrétion fécale d'œufs, significativement plus faible chez les femelles que chez les mâles (47, 61, 199), sur le taux d'établissement lui aussi significativement plus faible chez les femelles (199). Des paramètres de résilience sont également significativement impactés par l'effet sexe avec un hémocrite, une croissance (exprimée par le GMQ) et un état corporel inférieurs chez les mâles que chez les femelles à la suite d'une infestation par *Haemonchus contortus* (199). Cet effet n'est pas marginal et l'analyse multivariée réalisée par Stear et al. (1995) estime que parmi les quatre facteurs expliquant 99% de la variabilité de la charge parasitaire, le sexe représentait 14% de ladite variabilité (les trois autres facteurs étant l'excrétion fécale d'œufs, l'hémocrite et le poids corporel des animaux) (170).

Cette différence n'était pas observée lorsque les agneaux étaient comparés avant la puberté et était moins marquée voire inversée lorsque les études comparaient des agnelles entières et des agneaux castrés (200). La principale hypothèse expliquant ces différences réside dans l'effet immunostimulant des œstrogènes notamment sur la réponse Th2 (201). Au contraire la testostérone est plutôt considérée comme ayant un effet dépresseur sur l'immunité notamment en diminuant l'activation des macrophages et la production d'immunoglobulines (201). L'effet de la testostérone semble plus important que celui des œstrogènes sur l'infestation par les helminthes chez les souris puisqu'une ovariectomie de souris femelles n'a pas eu d'effet sur la charge parasitaire tandis que l'injection de testostérone chez les mêmes souris augmentait sensiblement cette dernière (202).

La différence de résistance observée repose essentiellement sur l'immunité adaptative puisque l'effet sexe ne s'observe pas, ou de manière moins marquée en première infestation (197). Par ailleurs González-Garduño et al. (2018) ont montré que les mâles présentaient une concentration d'IgA muqueuses et salivaires inférieure à celle des femelles et une quantité de leucocytes circulants également inférieure ce qui semble confirmer cette affirmation (47).

iii) *Âge et statut physiologique*

** Effets de l'âge sur la mise en place de l'immunité*

L'immunité développée par les hôtes contre *Haemonchus contortus* dépend, non seulement du rang d'infestation des animaux -les animaux naïfs étant moins résistants que les animaux qui ont déjà été infestés et ont déjà exprimé une réponse immunitaire par le passé – mais également de l'âge des hôtes. Sargison et al. (2011) ont mené une étude comparative entre des agneaux de 12 semaines et des brebis de 14 mois, élevés dans des conditions les préservant de tout contact avec des nématodes gastro-intestinaux. Les comparaisons d'excrétion d'œufs fécaux étaient environ 4 fois plus importantes chez les agneaux que chez les brebis entre le 17^{ème} et le 32^{ème} jour suivant l'infestation puis décroissaient chez les agneaux pour se stabiliser à un niveau légèrement supérieur au niveau stabilisé des brebis. Cette différence ne s'expliquait pas par la charge parasitaire, identique entre les deux catégories d'animaux, mais par la fécondité des femelles *Haemonchus contortus*, 4 à 8 fois plus importante chez les agneaux que chez les brebis (203). Du fait du manque d'animaux, les analyses statistiques n'ont pas été menées dans cette étude mais les résultats sont visuellement frappants.

Par ailleurs l'immunité adaptative associée à une deuxième infestation dépend de la maturité du système immunitaire des animaux lors de la première infestation et de la capacité de mise en place de la mémoire immunitaire (204). Ces résultats se retrouvent également dans l'étude

de Vervelde et al. (2001), dans laquelle la vaccination était plus efficace sur les animaux de 9 mois (réduction de 82% de la charge parasitaire par rapport aux contrôles non vaccinés à 9 mois) que sur les animaux de 6 mois (réduction de 77% de la charge parasitaire par rapport aux contrôles non vaccinés à 6 mois). Les animaux vaccinés à 3 mois présentaient une charge parasitaire 34% plus importante que les animaux contrôles lors de la mesure, quinze semaines après vaccination soit cinq semaines après challenge immunologique (205). Ces différences en termes de charge parasitaire ont également été retrouvées pour la production d'IgG1 spécifiques des produits d'excrétion et de sécrétion d'*Haemonchus contortus*, significativement plus élevée chez les animaux de 9 mois. De même la production d'IgA spécifiques de ces produits d'excrétion et de sécrétion, toujours significativement différente entre le groupe vacciné et le groupe contrôle, était d'autant plus importante que les animaux étaient âgés (205). Enfin, bien que la vaccination ait induit une augmentation des mastocytes dans tous les groupes d'âge, elle n'a induit une augmentation des éosinophiles que chez les agneaux de 9 mois (205).

*** *Relâchement d'immunité péri-partum***

Comme évoqué *supra*, les brebis péri-parturientes présentent un relâchement d'immunité (nommé PPRI pour Periparturient Relaxation of Immunity) qui se caractérise, dans le cadre de l'infestation par des nématodes gastro-intestinaux, par une augmentation temporaire de l'excrétion fécale d'œufs (qualifiée de Periparturient Rise : PPR) responsable de la contamination massive des agneaux nouvellement nés. Cette augmentation de l'excrétion fécale d'œufs est plus importante chez les brebis allaitantes que chez les brebis gestantes et, que ce soit pour la gestation ou l'allaitement, elle est renforcée par la prolificité des brebis (206). Plusieurs hypothèses ont été proposées concernant l'augmentation de l'excrétion fécale d'œufs : une réactivation des larves L4 entrées en hypobiose à la faveur d'une diminution de l'immunité mucoale ou une augmentation de la prolificité par manque d'inhibition par l'immunité (207).

La PPRI survient chez toutes les races ovines mais les races rustiques semblent la subir de façon moins marquée que les espèces à haute production et en particulier les moutons à poil (par exemple les Barbados Blackbelly dans les Caraïbes ou les Katahdin issus de races africaines) la subissent moins que les moutons lainiers (208). La PPRI commence, en fin de gestation, par une diminution des éosinophiles circulants, une diminution générale des anticorps circulants et une diminution de la quantité de mastocytes, de leucocytes et de cellules caliciformes dans la muqueuse intestinale lors de l'infestation par *Trichostrongylus colubriformis* (209). Cette diminution est plus forte encore pendant la lactation mais un retour

à la normale suit rapidement le sevrage et un sevrage précoce permet un retour à la normale plus rapide (210).

Les principales hypothèses concernant le relâchement de l'immunité péri-partum sont : un déficit énergétique-protéique lié aux besoins excédentaires engendrés par le développement du fœtus ou des fœtus (211) et une modification immunitaire liée à la présence, plus ou moins importante selon le nombre d'agneaux, de progestérone (212). La concentration de progestérone circulante sans être proportionnelle au nombre d'agneaux, augmente de façon non-linéaire avec le nombre de corps jaunes. Bien qu'orientant globalement l'immunité vers une réponse Th2, la progestérone inhibe la production d'oxyde nitrique par les macrophages, donc la capacité cytolytique de ceux-ci ; la maturation des cellules dendritiques et la prolifération des lymphocytes T et elle augmente la production de cytokines associées à la réponse T-régulatrice (201).

La réponse immunitaire mise en place par les ovins pour lutter contre l'infestation parasitaire est une réponse essentiellement adaptative. Quelques phénomènes de l'immunité innée se mettent en place lors de la première rencontre avec le parasite : sécrétion de mucus, dégranulation de cellules effectrices non spécifiques mais c'est lors de la seconde rencontre avec le parasite qu'une véritable résistance se manifeste. Cette résistance dépend de la race, du sexe de l'âge et du statut physiologique des animaux.

Pour améliorer la résistance des animaux, les méthodes reposeront sur les différences que nous avons observées dans les paragraphes précédents. Ainsi la sélection génétique permettra de reproduire l'effet « race » par reproduction des individus résistants, la vaccination pourra permettre une immunisation avant la première rencontre parasitaire véritable et la gestion de l'alimentation tentera de compenser le déficit énergétique-protéique lié au péri-partum.

2) *Amélioration de la résistance et de la résilience des animaux à l'infestation parasitaire.*

a) **La vaccination**

i) *Un vaccin contre l'haemonchose ovine, enfin !*

Si les premières recherches dans le but de créer un vaccin pour lutter contre les helminthiases chez les ruminants remontent aux années 1950, il a fallu attendre 2014 pour qu'apparaisse sur le marché le premier vaccin dirigé contre un nématode gastro-intestinal : *Haemonchus contortus*. Développé par le *Moredun Institute of Research* en Écosse, Barbervax® est

désormais utilisable en Australie ainsi qu'en Afrique du Sud sous le nom commercial de Wirevax® (<http://barbervax.com.au>). Le vaccin est administré par voie sous-cutanée et la posologie est la même indépendamment du poids de l'animal. À notre connaissance, aucun vaccin n'est actuellement disponible en France.

ii) *Principes généraux de la vaccination contre Haemonchus contortus*

Les études menées pour chercher un vaccin contre *Haemonchus contortus* ont majoritairement consisté en une recherche d'antigènes immunogènes et donc protecteurs. Deux grandes catégories d'antigènes ont été étudiées : les antigènes dits « naturels » et les antigènes dits « cachés ». Les antigènes « naturels » sont présentés naturellement à l'hôte, ce sont par exemple des protéines de la cuticule du parasite aux différents stades, des larves irradiées (213) ou des produits d'excrétion-sécrétion du parasite (214). Ces antigènes sont susceptibles d'interagir avec les cellules immunitaires de l'hôte. Les antigènes « cachés », quant à eux, sont des antigènes que l'hôte ne devrait en théorie pas rencontrer. Le plus souvent ce sont des protéines du tractus digestif du parasite qui sont ciblées par les anticorps issus de la vaccination lors de l'ingestion du repas sanguin par le parasite.

L'administration de larves irradiées s'est assez rapidement révélé décevant (213) et, de fait, l'essentiel des recherches sur les antigènes naturels s'est concentré sur les produits d'excrétion et de sécrétion d'*Haemonchus contortus* (215). Ces derniers ont montré leur efficacité dans de nombreuses études expérimentales mais pas fait de même dans les études de terrain (205).

Le besoin d'homogénéité des vaccins a conduit les scientifiques à travailler sur des protéines recombinantes d'antigènes reconnus comme immunogènes dans le but d'une diffusion à grande échelle, les résultats d'un certain nombre d'essais ont été intégrés à la revue de Nisbet et al. (215).

L'utilisation de ce genre de vaccins est envisageable dans le cas où les infestations sont essentiellement dues à *Haemonchus contortus*. Cependant la plupart des infestations par des nématodes gastro-intestinaux sur le terrain sont des infestations mixtes et il n'existe pas de protection croisée puisque d'une part les antigènes peuvent varier fortement d'une espèce parasitaire à l'autre et puisque, a fortiori, les anticorps produits suite à la vaccination ne fonctionnent que sur les parasites hématophages (43).

iii) *Mode d'action du Barbervax®*

Le Barbervax® contient les deux antigènes « cachés » ayant engendré les meilleurs résultats lorsqu'ils ont été utilisés en tant que vaccins. H-gal-GP et H11 sont deux complexes

glycoprotéiques présents dans la muqueuse intestinale des vers et impliqués dans les processus de digestion du sang. La vaccination avec H-gal-GP a occasionné une diminution de l'excrétion fécale d'œufs de plus de 90% et une diminution de la charge parasitaire de 70% dans plusieurs études indépendantes (216)) et celle avec a permis une réduction de l'excrétion fécale d'œufs de 91% et d'une diminution de la charge parasitaire d'environ 70%) (217).

Puisque les antigènes présents dans le Barbervax® sont des antigènes « cachés », une vaccination répétée est nécessaire pour stimuler une réponse anticorps (essentiellement IgG1) suffisante (215) qui ne sera pas entretenue par les infestations suivantes. L'avantage principal de ce genre d'anticorps est de garantir une réponse immunitaire même chez les animaux jeunes ou en péri-partum (215, 218). Lorsque le parasite ingère le sang de l'hôte, il ingère par la même occasion les anticorps spécifiques dirigés contre les protéines du tube digestif ce qui altère l'efficacité de la digestion à l'origine d'un affaiblissement des vers, d'une chute de la fécondité voire d'un détachement (219).

Le vaccin a déjà fait ses preuves en diminuant l'excrétion fécale d'œufs, la contamination des pâtures et la charge parasitaire des ovins (220) et a présenté des résultats concluants chez d'autres espèces notamment des chèvres et des alpagas (221).

La vaccination repose sur une première stimulation du système immunitaire en amont de la menace réelle afin de le rendre plus prompt à réagir lors de l'infestation. Cependant la réponse ne sera adéquate que si l'animal est capable, grâce à une couverture optimale de ses besoins nutritionnels, de mettre en place tous les mécanismes de défense appropriés.

b) Nutrition et parasitisme

L'infestation par *Haemonchus contortus* est à l'origine de perturbations métaboliques majeures. En effet, elle tend à diminuer l'ingestion d'aliment par les animaux infestés et s'accompagne de pertes protéiques directes par spoliation sanguine nécessitant une réorientation des nutriments pour assurer l'homéostasie sanguine et indirectes par lésions de la muqueuse et maldigestion protéique associée (106). Ces pertes génèrent une dépense énergétique excédentaire pour assurer la réparation des tissus lésés et l'homéostasie.

Pour cette raison, la couverture des besoins énergétiques et protéiques est étroitement liée à la résilience des animaux (211, 222). La plupart des études indiquent que les nutriments essentiellement associés à l'augmentation de la **résilience** des animaux sont les protéines (222–224). Ceci peut s'expliquer d'une part par le besoin de compensation des pertes protéiques mais également par le fait que la plupart des éléments de la réponse immunitaire (mucus,

immunoglobulines, cytokines et produits de mastocytes ou d'éosinophiles) contre l'infestation parasitaire sont de nature protéique (224) et nécessitent parfois un équilibre en acides aminés atypique (richesse des mucines en thréonine, sérine et proline par exemple) (222). Les effets de la supplémentation protéique sur la **résistance** à l'infestation sont moins marqués et la littérature est parfois contradictoire à ce sujet. En effet, Wallace et al. (1998) ont montré qu'une supplémentation avec de l'urée n'avait eu aucun effet visible sur les paramètres associés à la résistance (excrétion fécale d'œufs, charge parasitaire, fécondité des parasites) tandis que tous les paramètres associés à la résilience (maintien de la production laitière, de l'ingestion ou de la croissance) étaient meilleurs chez les animaux ayant reçu la supplémentation (225). Cependant, quelques études montrent un effet positif de la supplémentation protéique sur la concentration en éosinophiles, leucocytes totaux et mastocytes dans la muqueuse abomasale (222) ou sur la production d'immunoglobulines (226).

L'importance des protéines est d'autant plus grande pour les individus dont les besoins sont augmentés, notamment les agneaux en croissance et les brebis en fin de gestation et début de lactation. Par ailleurs, un déficit énergétique dans ces situations où les besoins sont augmentés de façon importante (Figure 24) peut résulter en une diminution de l'efficacité immunitaire.

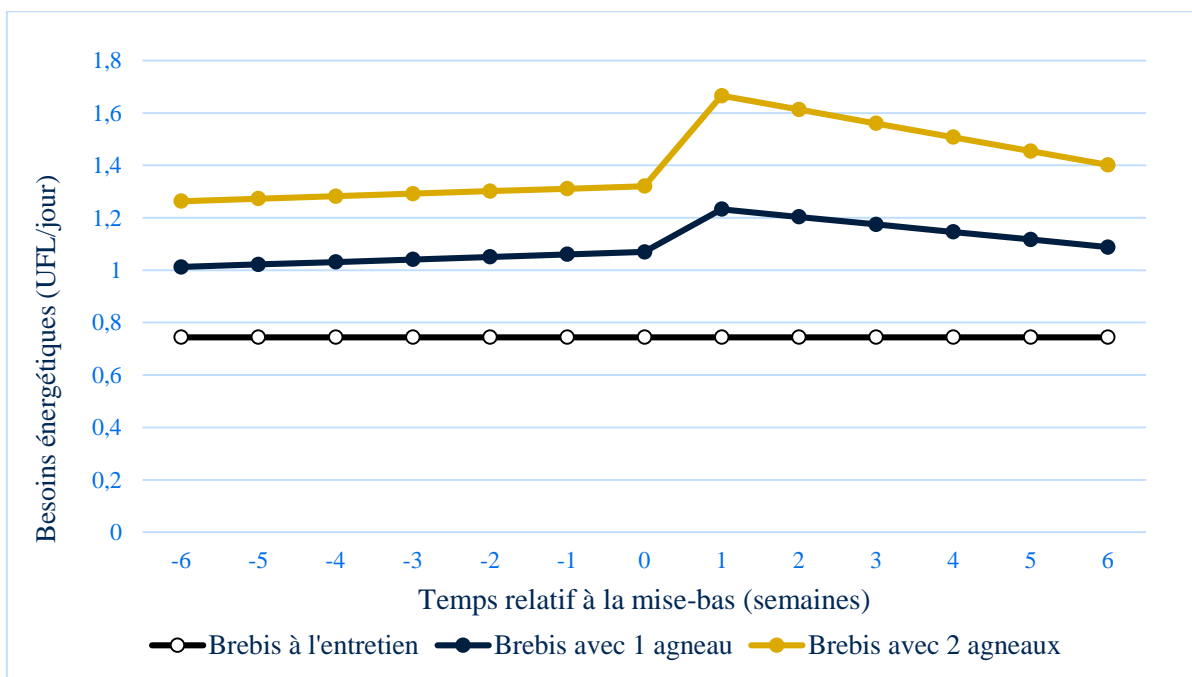


Figure 24 : Besoins énergétiques d'une brebis en fonction de son statut physiologique autour de la mise-bas et du nombre d'agneaux de la portée. INRA 2018 (227).

Par exemple, une restriction à hauteur de 30% des apports chez des brebis en début de gestation provoque une diminution de l'immunité (nombre d'éosinophiles circulants divisé par deux) et

de la résistance (excrétion fécale d'œufs multipliée par deux) en période péri-partum par rapport au témoin (228).

La nutrition seule ne permet pas de compenser totalement le relâchement péri-partum de l'immunité mais permet de le rendre moins drastique (229).

c) Sélection génétique

La sélection génétique pour la résistance au parasitisme en général et à *Haemonchus contortus* en particulier repose sur l'importance de la variabilité de l'infestation des animaux et de leurs réponses, observées depuis plusieurs décennies. La variabilité d'infestation, partiellement due à l'inhomogénéité de la présence des larves sur la pâture et au comportement alimentaire des animaux, peut également s'expliquer par une réponse différente desdits animaux.

La résistance au parasitisme, définie comme la capacité de l'hôte à réguler l'installation, le développement, la fécondité et la survie des nématodes (Douch 1996 et al), est évaluée à l'aide de différents marqueurs phénotypiques directs ou indirects, idéalement faciles à mesurer, reproductibles et ayant un rapport direct avec la charge parasitaire et l'intensité du parasitisme. Cependant, les mesures peuvent parfois se révéler difficiles à réaliser dans des conditions naturelles.

i) Hypothèses initiales associées à la sélection génétique

* Les différentes approches de la sélection génétique

La sélection génétique d'ovins résistants aux nématodes gastro-intestinaux est envisageable selon deux approches (Figure 25) :

- une approche **oligogénique** ou **monogénique**, qui suppose qu'il est possible d'expliquer une grande part de la variabilité du caractère sélectionné à partir d'un nombre réduit de gènes, voire d'un seul gène, appelé gène majeur dans le cadre de l'approche monogénique. On qualifie alors ces gènes de locus de caractères quantitatifs (QTL pour Quantitative Trait Loci).
- une approche **polygénique** qui sous-tend que la variabilité du caractère sélectionné dépend d'un nombre trop important de gènes pour pouvoir être captée par quelques QTL. Cette sélection sera essentiellement basée sur des mesures phénotypiques et la création de lignées ovines divergentes sur la base d'une bonne héritabilité des caractères sélectionnés.

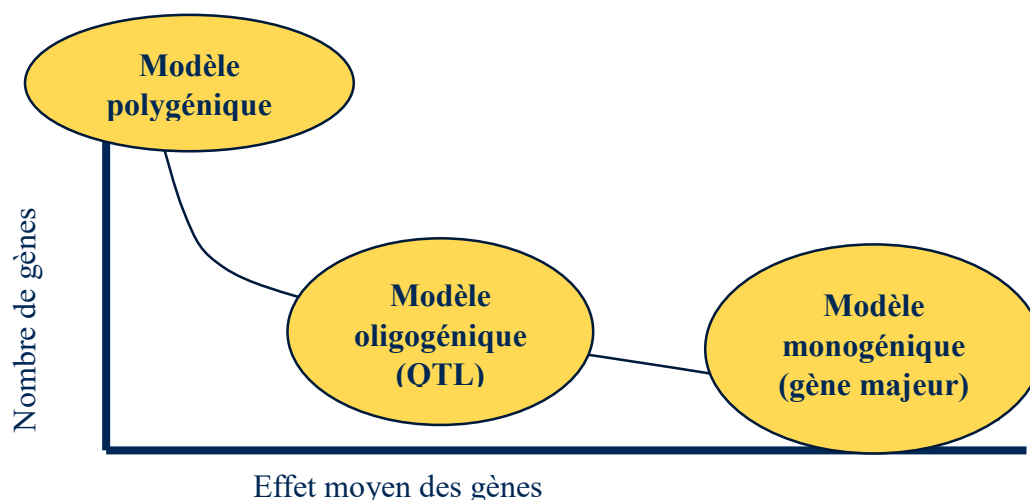


Figure 25 : Illustration des approches de sélection génétique basées sur le nombre de gènes impliqués.

*** Méthodes d'analyse nécessaires à l'évaluation de la sélection génétique**

La sélection génétique consiste à s'appuyer sur des différences phénotypiques entre des individus de race différente (230) ou de la même race (231) pour améliorer la moyenne de population sur la base de la conservation des individus les plus résistants.

Pour évaluer le degré de résistance ou de résilience des animaux différents marqueurs peuvent être utilisés, le plus fréquent étant l'excrétion fécale d'œufs pour la résistance et l'hématocrite pour la résilience à l'infestation par *Haemonchus contortus* (169). La prolifération lymphocytaire ou la synthèse d'anticorps, notamment des IgA, peuvent également être utilisés comme marqueurs de la résistance (232, 233) et le poids vif comme marqueur de résilience (234).

L'utilisation d'un protocole d'infestation précis et répété permet de rendre les mesures plus cohérentes et de rendre leur interprétation plus répétable. En effet, un certain nombre d'études s'appuient sur une infestation naturelle pour la première et/ou pour la deuxième infestation ce qui ne permet pas vraiment d'apprécier la réponse immunitaire puisque la dose infestante initiale n'est pas identique entre les animaux et n'est pas connue. Par ailleurs l'utilisation d'animaux trop jeunes risque de fausser la mesure par interaction avec des anticorps maternels et naïveté du système immunitaire (169).

Du point de vue génétique, la recherche de variabilité s'est longtemps appuyée sur les microsatellites, séquences répétées soumises à d'importants taux de mutation mais dans la dernière décennie de plus en plus d'études se sont appuyées sur des études d'association

pangénomiques (GWAS) (235). Ces études ont abouti à la caractérisation de nombreux locus de caractères quantitatifs dans de très nombreuses régions du génome ovin (230) supportant, pour les marqueurs étudiés, l'hypothèse d'un modèle polygénique comme c'est très souvent le cas dans des phénomènes complexes comme la réponse immunitaire à l'infestation parasitaire. Cependant, parmi les 26 chromosomes autosomaux des ovins, certains reviennent plus souvent dans les études comme le chromosome 2 (235–237), le chromosome 3 (236, 237) où un bon gène candidat semble être celui de l'interféron- γ (238), le chromosome 6 (233, 235, 236, 239) ou les chromosomes 8, 11, 13 ou 22. Il est important de noter que plus les échantillons étudiés sont petits plus la chance de ne pas détecter des QTL à effet faible est important et plus cela surestime les QTL détectés. Cet effet est qualifié d'effet « Beavis » du nom de William Beavis qui a réalisé des simulations pour estimer le taux d'erreur dans la détermination de QTL (240).

Bien que certaines études d'association pangénomiques, parfois renforcées par une cartographie par région plutôt que par polymorphisme nucléotidique simple pour limiter les comparaisons statistiques et gagner en puissance (235), ne retrouvent certains QTL découverts dans les études plus anciennes, il est à ce jour impossible de considérer qu'il existe des gènes majeurs impliqués dans la résistance génétique à *Haemonchus contortus*. Ainsi, dans l'étude menée par Atlija et al. (2016), les trois QTL les plus importants étaient estimés comme expliquant respectivement 0,075%, 0,077% et 0,069% de la variabilité phénotypique (233). De fait la sélection est toujours phénotypique et ne peut pas encore s'appuyer sur des marqueurs génétiques. Pour cela estimer l'héritabilité des marqueurs phénotypiques utilisés est très important.

ii) *L'héritabilité d'un caractère : notion de base de la sélection génétique (241)*

*** Cadre théorique de l'héritabilité :**

L'héritabilité d'un caractère peut se définir comme la part de variation phénotypique associée à ce caractère explicable par une variation génétique toutes choses égales par ailleurs. En effet, la variation phénotypique associée à un caractère peut dépendre non seulement de la génétique mais également de l'environnement.

On exprime alors l'expression phénotypique comme une valeur, μ représentant la moyenne de la population, auxquelles viennent s'ajouter un effet génétique G, qui ne dépend que de l'individu et un effet environnement E, partagé par tous les individus qui cohabitent dans le même environnement.

La variance phénotypique s'exprime alors : $\text{var}(P) = \text{var}(\mu+G+E)$ où P , G et E sont des variables aléatoires et où μ est un scalaire. Cette expression peut se simplifier en $\text{var}(P)=\text{var}(G+E)$ car l'adjonction d'un scalaire, par définition invariant, à une variable aléatoire ne modifie pas la variance de celle-ci.

La variance d'une somme de deux variables aléatoire s'exprime comme la somme des variances de deux variables aléatoires et du double de leur covariance : $\text{var}(P) = \text{var}(G)+\text{var}(E)+2\text{cov}(G,E)$.

En considérant que les variables G et E sont indépendantes, ce qui est très probablement une approximation (242), on déduit que la covariance entre G et E est nulle et on simplifie l'expression en $\text{var}(P)=\text{var}(G)+\text{var}(E)$.

À partir de cette dernière équation il est possible d'exprimer l'héritabilité au sens large, notée $H^2 = \text{var}(G) / \text{var}(P)$. On parle d'héritabilité au sens large car, en pratique, la valeur génétique est une variable composite. En supposant qu'un seul gène intervienne dans un phénomène (modèle monogénique de la Figure X), la part de génétique impliquée dans cette intervention dépend des deux allèles possédés par l'individu pour ce gène ainsi que du potentiel effet d'interaction entre les deux allèles. On notera $G_{ij} = g_i + g_j + \delta_{ij}$, où g_i et g_j sont les effets moyens des allèles i et j respectivement et δ_{ij} l'effet d'interaction entre ces allèles (aussi appelé valeur de dominance). Cette dernière équation sera simplifiée en $G=A+D$ où A est la somme des effets moyens des allèles désignée par **valeur additive** et D l'interaction entre les allèles.

Dans un modèle où plusieurs gènes sont impliqués dans la variation phénotypique, la somme des effets moyens des allèles associés à ces gènes peut être réunie dans la valeur additive A , la somme des interactions entre allèles d'un même gène dans D , et les nouvelles interactions entre allèles de gènes différents réunies dans une variable d'épistasie et pouvant être simples ou multiple.

L'héritabilité au sens strict, notée h^2 s'exprime comme le rapport de la valeur génétique additive sur la variation phénotypique : $h^2 = \text{var}(A) / \text{var}(P)$. C'est essentiellement cette valeur que l'on va retrouver dans les publications. Elle permet de prédire si l'amélioration génétique par sélection sera efficace.

Il est très important de se souvenir que l'héritabilité n'a pas de sens à l'échelle individuelle mais est un paramètre spécifique non seulement du caractère étudié mais aussi de la population observée et du milieu. En effet dans une population non représentative de la population générale

étudiée, par exemple dans le cas d'une population sélectionnée et de fait ne respectant pas l'hypothèse panmictique, les fréquences alléliques ne sont pas réparties de la même façon et peuvent modifier la variance génétique. Par ailleurs, l'augmentation de l'influence de l'environnement, c'est-à-dire l'étude de milieux très inhomogènes, va modifier l'héritabilité par augmentation du dénominateur sans modification du numérateur.

**** Valeurs d'héritabilité et interprétation***

Bien que l'héritabilité puisse varier grandement d'une population à l'autre, il semble que de grandes tendances se dégagent tout de même (241). Des ordres de grandeur peuvent être établis :

- $h^2 < 0,2$: on jugera le caractère comme peu héritable. Cet ordre de grandeur se retrouve notamment pour les caractères associés aux aptitudes de reproduction pour lesquels les conditions du milieu ont une importance très élevée (augmentation de $\text{var}(E)$).
- $0,2 < h^2 < 0,4$: on jugera le caractère comme moyennement, ou modérément, héritable. Cet ordre de grandeur se retrouve notamment pour les caractères associés à l'intensité de production.
- $h^2 > 0,4$: on jugera le caractère comme fortement héritable. Cet ordre de grandeur se retrouve notamment pour les caractères liés aux caractéristiques qualitatives des produits (finesse de la laine ou taux laitiers par exemple).

**** Héritabilité de la résistance génétique à l'infestation par *Haemonchus contortus****

De nombreuses études se sont intéressées à l'héritabilité de la résistance génétique à l'infestation par des nématodes gastro-intestinaux et la plupart convergent vers une valeur d'héritabilité comprise entre 0,2 et 0,4 sur la base de mesures d'excrétion fécale d'œufs (43, 232, 243, 244). Il est parfois difficile d'estimer la part de variation phénotypique expliquée par la variation additive lors d'études avec infestation naturelle dans la mesure où les conditions environnementales ne sont pas les mêmes pour tous les animaux et ne sont pas connues exactement rendant l'interprétation de leur degré de résistance difficile.

L'héritabilité de la résistance semble plus importante en deuxième infestation qu'en première infestation ce qui tendrait à confirmer l'importance de la réponse immunitaire adaptative dans les phénomènes de résistance (245).

La concentration en immunoglobulines circulantes présente également une héritabilité modérée selon certaines études mais ce marqueur, plus invasif, est moins utilisé en pratique (245).

L'héritabilité des paramètres de résilience semble moins constante entre les différentes études et si certaines études l'ont estimée autour de 0,2 (244) voire 0,4 (243) sur la base de mesures d'hématocrite, plusieurs revues l'estiment comme non significativement différente de 0 (232, 246) et elle est globalement souvent plus faible pour les paramètres de production que pour l'hématocrite lors d'infestation. Quoiqu'il en soit, une sélection sur la base de la résistance ne pourra avoir que des effets positifs sur les paramètres associés à la résilience en diminuant la pression parasitaire (243, 244, 247).

iii) *Efficacité de la sélection génétique pour la résistance à Haemonchus contortus.*
Une première sélection, naturelle et non liée à l'intervention humaine, a commencé à s'opérer aussitôt qu'*Haemonchus contortus* a infesté son hôte. C'est depuis une course à l'armement qui s'opère entre le parasite et le petit ruminant notamment dans les régions où les conditions climatiques se prêtent à la multiplication rapide du nématode et donc à une pression parasitaire importante.

Le principal effet de cette sélection naturelle est la différence de résistance entre différentes races de moutons, les moutons originaires de pays tropicaux étant souvent plus résistants que leurs homologues domestiques comme nous l'avons vu dans le paragraphe consacré aux différences de résistances entre races ovines.

Cependant, au sein d'une même race, d'importantes variations de réponses existent permettant une sélection efficace. Ainsi la sélection de béliers en races ovines laitières dans les Pyrénées a permis de diminuer l'excrétion fécale d'œufs de 30 à 70% (245).

La sélection réalisée sur la base de la résistance à *Haemonchus contortus* s'étend dans un certain nombre de cas aux autres nématodes gastro-intestinaux, les mécanismes polygéniques impliqués étant probablement similaires (232).

La sélection génétique pour la résistance a pu avoir des conséquences surprenantes sur l'expression de certains gènes entre des populations divergentes (246). Ainsi l'étude d'Alba-Hurtado et Muñoz-Guzmán (2013) (181) a montré que les moutons résistants avaient une expression des gènes associés à la coagulation diminuée et une expression des gènes codants pour des anti-coagulants augmentée, une expression des gènes associés à la vasogénèse et à la réparation tissulaire augmentée et une diminution de l'apoptose des cellules intestinales associée à une augmentation de la motilité intestinale. Par ailleurs Doyle et al. (2011) ont montré une augmentation de l'hématocrite chez la lignée de moutons Mérino sélectionnée pour la résistance à *Haemonchus contortus*, concomitamment avec une augmentation des

éosinophiles circulants et de la quantité d'IgG1 circulante par rapport à la lignée sensible non significativement différente du contrôle (248).

iv) *Interaction entre la sélection génétique pour la résistance à Haemonchus contortus et les paramètres de production.*

Pour que la sélection génétique pour un caractère puisse être intégrée de façon raisonnée dans les schémas de sélection il faut que le progrès réalisé dans ce caractère n'occasionne pas de dépréciation des autres caractères du schéma de sélection (paramètres de production ou de reproduction par exemple).

Si la majorité des études montrent que la corrélation génétique entre l'excrétion fécale d'œufs et les paramètres de production n'est pas significativement différente de 0 voire induit des résultats positifs au cours d'une infestation (249–251), quelques études supposent qu'une augmentation des ressources allouées à l'immunité peut provoquer une diminution de la croissance, de l'enlèvement ou de la production laitière, notamment hors infestation (178).

v) *Intégration de la sélection génétique pour la résistance à Haemonchus contortus dans les schémas de sélection.*

Le principal obstacle à l'intégration de la sélection génétique pour la résistance à *Haemonchus contortus* dans les schémas de sélection est le coût des mesures des marqueurs phénotypiques (8 à 12 euros par coproscopie et jusqu'à 50 euros par animal en prenant en compte d'autres marqueurs de résistance et de résilience en France) (169, 245) et la lourdeur de celles-ci dans les élevages reproducteurs. Il semble donc impraticable de d'établir des phénotypes de résistance aux strongles gastro-intestinaux chez toutes les femelles d'un noyau de sélection.

Une solution consiste à réaliser la sélection sur les béliers reproducteurs (245) avec une espérance de diffusion dans la population générale de 5 à 7 ans.

La sélection génétique, décrite par Waller et Thamsborg en 2004 comme le « moyen de contrôle durable du parasitisme ultime », semble pleine de promesses du fait de son coût limité si la sélection est réalisée en amont de la filière, de sa durabilité – la probabilité de contournement de la résistance par les vers étant assez faible du fait de son caractère polygénique – et de la limitation des intrants utilisés, s'inscrivant dans la démarche agro-écologique émergente (132, 232, 252).

D) Bilan sur la lutte contre *Haemonchus contortus*

Bien que de nombreuses solutions alternatives existent l'usage des anthelmintiques reste aujourd'hui le moyen de contrôle majoritaire en élevage ovin. Cependant, un certain nombre de bonnes pratiques et de logiques durables ont vu le jour notamment avec le SCOPS (Sustainable Control Of Parasites in Sheep) (46).

Les principaux facteurs de risque identifiés et justifiant la mise en place des bonnes pratiques sont l'abondance et la proportion relative de vers portant des allèles de résistance à certains anthelmintiques dans l'élevage, l'usage trop fréquent et irréfléchi d'anthelmintiques, l'absence de population-refuge de taille suffisante pour diluer les vers résistants après traitement.

Les solutions alternatives doivent être pensées comme des compléments aux traitements anthelmintiques dans une gestion intégrée du parasitisme permettant peu à peu de réduire la dépendance en des molécules pour lesquelles les résistances croissent rapidement.

1) Réfléchir à une stratégie de contrôle avec un conseiller et/ou un vétérinaire

La mise en place de contrôles réguliers et quantitatifs quant à l'infestation et à la résistance nécessite une bonne communication entre l'éleveur et son vétérinaire. Ces échanges à double-sens permettent d'associer une bonne connaissance des parasites, de leurs cycles biologiques et des résistances qu'ils peuvent développer contre les traitements conventionnels et une vision pratique de la gestion du pâturage et du troupeau.

2) Éviter l'importation de nématodes résistants, utilisation d'une quarantaine

Bien qu'*Haemonchus contortus* soit de plus en plus présent même dans les régions tempérées, certaines fermes en sont encore dépourvues et peuvent bénéficier d'une quarantaine efficace pour éviter l'introduction de ce parasite. Par ailleurs, les fermes où il sévit déjà peuvent, à l'aide d'une quarantaine, se protéger de l'entrée dans leurs locaux de parasites résistants à de multiples anthelmintiques. La quarantaine doit s'appliquer à tous les entrants, qu'ils aient été achetés ou qu'ils aient pâture avec d'autres moutons ou chèvres comme cela peut être le cas au retour de transhumance (253) par exemple.

Les protocoles de quarantaine sont composés de trois étapes, le traitement des nouveaux entrants, l'isolation hors-pâture pendant 24 à 48 heures pour éviter que leurs fèces, qui seront incinérés, ne contaminent les autres animaux et le retour sur une pâture infestée pour diluer le parasitisme résiduel et potentiellement résistant avec une charge infestante locale.

3) *Suivre la résistance aux anthelminthiques au sein de l'élevage*

Les signes cliniques associés à l'infestation par des nématodes gastro-intestinaux étant parfois frustes, certains éleveurs ne se rendent compte de l'inefficacité des traitements qu'ils utilisent que tardivement. Les nématodes résistants ont alors eu le temps de s'imposer face à leurs homologues rendant l'intégralité de la population parasitaire résistante à l'anthelminthique. Pour cette raison il est important de tester régulièrement l'efficacité des anthelminthiques.

4) *Administrer les anthelminthiques efficacement*

Si de nombreux échecs thérapeutiques proviennent de l'apparition inévitable de résistances au sein de l'élevage, certaines pratiques favorisent leur apparition. Ainsi un sous-dosage, qu'il soit lié à une sous-estimation du poids des animaux, à un mauvais réglage de la drogueuse dans le cas d'administration orale, ou à une mauvaise administration (by-pass du rumen en cas d'administration dans la cavité buccale au lieu de l'œsophage, fuite hors de la cavité buccale, injection dans la laine en cas d'administration sous-cutanée) peut favoriser les individus les plus résistants parmi les parasites. De même, l'utilisation de produits anthelminthiques après leur date limite d'utilisation ne garantit pas une efficacité optimale du traitement et peut contribuer à la diffusion des résistances.

5) *N'utiliser les anthelminthiques que quand cela est nécessaire*

Un suivi médical approfondi et l'utilisation de méthodes de diagnostic comme la coproscopie, le FAMACHA® (56) ou les indices de diarrhée peuvent être utilisés pour identifier les animaux les plus sévèrement atteints et les traiter en priorité (254).

La multiplication des traitements dans les périodes à risque telles que le relâchement d'immunité péri-partum ou la phase de croissance des agneaux permet de garder le niveau d'infestation assez bas mais sélectionne également les parasites résistants qui peu à peu s'imposent dans l'élevage. Le compromis est de ne pas traiter les brebis les plus résistantes et de traiter les autres précocement durant leur lactation pour qu'elles puissent se réinfester avec des parasites non sélectionnés.

6) *Choisir le bon anthelminthique*

L'utilisation d'anthelminthiques ayant un spectre restreint comme le Closantel ou le Nitroxynil, cf *supra*, qui ne sont utilisables que sur les parasites hématophages permet de limiter la propagation des résistances à l'ensemble des nématodes parasites lorsque le traitement vise à limiter une haemonchose aiguë.

Par ailleurs l'utilisation d'anthelminthiques pour lesquels la résistance est avérée dans la population parasitaire d'un élevage est non seulement inefficace mais également contreproductif puisque cela accroît la résistance encore davantage.

Pendant longtemps il a été conseillé de changer d'anthelminthique régulièrement pour éviter l'apparition de résistance. Le SCOPS mentionne que dans les élevages où les résistances sont déjà installées, cette rotation des anthelminthiques a peu de chance de se révéler efficace et ne doit en aucun cas prendre le pas sur les autres conseils prodigués dans le guide des bonnes pratiques.

7) Préserver des populations-refuges de vers sensibles

La stratégie « Dose and Move » qui consiste à traiter les animaux puis à les changer de pâture est efficace sur le court-terme mais en réalité la nouvelle pâture ne sera contaminée que par les parasites résistants au traitement ce qui tend à propager la résistance aux anthelminthiques.

Il est aujourd'hui conseillé de ne pas traiter tous les moutons d'un groupe avant de le changer de pâture pour que la nouvelle pâture ne soit pas contaminée que par des parasites résistants et qu'il subsiste une compétition. Une autre possibilité est de garder les animaux sur la pâture où ils ont été traités pendant plus longtemps afin qu'ils se réinfestent avec une population mixte (Figure 24). Par ailleurs, en plus de sélectionner les parasites les plus résistants la stratégie « Dose and Move » réduit la stimulation antigénique des animaux sur la nouvelle pâture ce qui peut résulter en une diminution de la réponse immunitaire (255).

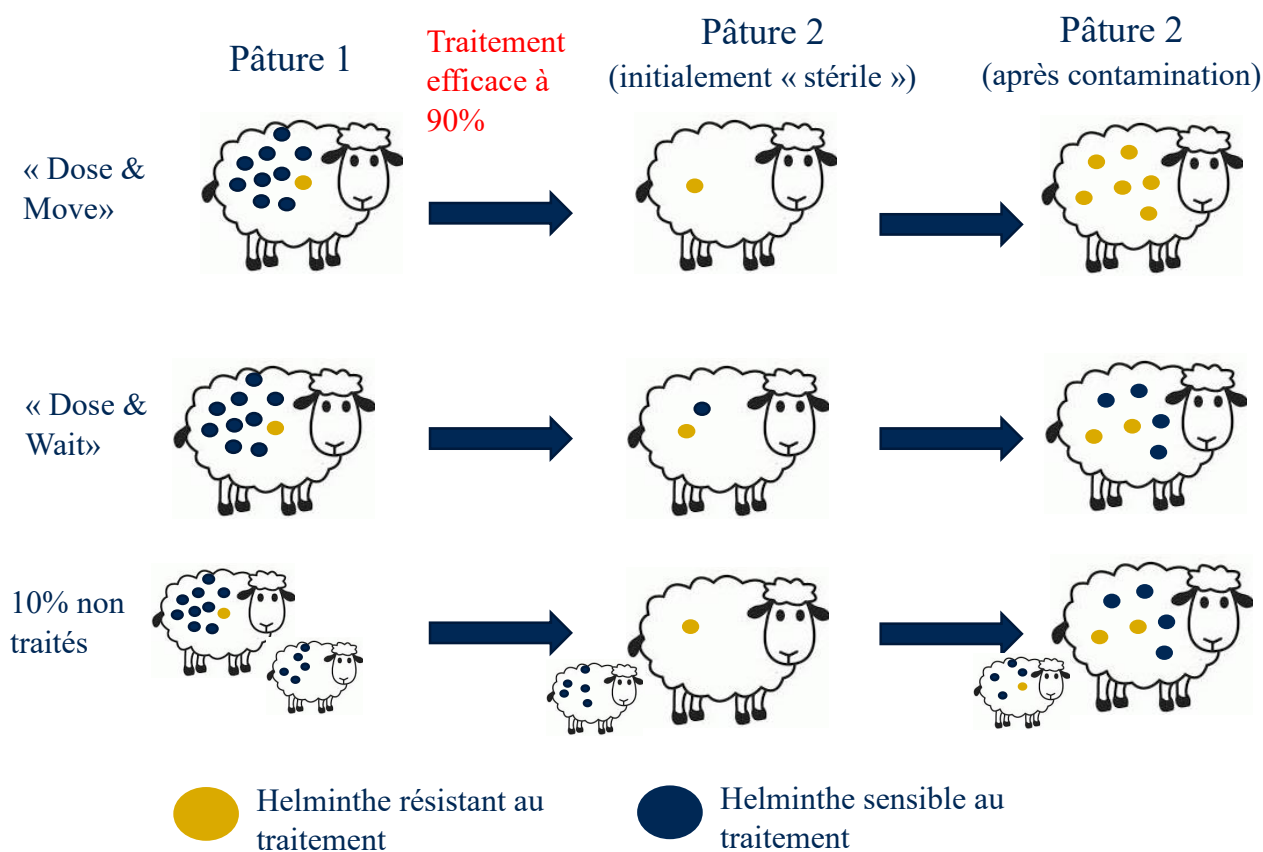


Figure 26: Cinétique de propagation des résistances aux anthelminthiques avec les stratégies "Dose and Move", "Dose and Wait" et de préservation de 10% du troupeau non traité.

Dans l'état actuel des choses, il ne s'agit plus d'essayer de se débarrasser totalement des parasites mais d'optimiser la cohabitation entre les moutons et les parasites en limitant au maximum les signes cliniques et les pertes associées au parasitisme. Les deux stratégies susnommées permettent de diminuer l'infestation globale des pâtures tout en limitant la progression de la résistance aux anthelminthiques.

8) Réduire la dépendance aux anthelminthiques

Cet aspect des bonnes pratiques repose essentiellement sur les solutions alternatives que nous avons tenté d'exposer de façon exhaustive tout au long de la partie X à savoir la gestion des pâtures, de l'alimentation que ce soit par couverture des besoins ou utilisation de fourrages bioactifs et nutraceutiques, la vaccination et l'utilisation d'agents de contrôle biologiques.

Ces stratégies, représentant deux piliers du tryptique « Éviter, Résister, Traiter » sont particulièrement importantes dans les systèmes où l'usage d'anthelminthique vise à être limité (254) comme en Agriculture Biologique où les éleveurs traitent leurs animaux quatre fois moins souvent d'après l'étude de Cabaret et al. (2009) réalisée à partir de visites et de sondages dans

des fermes situées entre Limoges et Poitiers en France (105) bien que depuis le règlement (CE) n°889/2008 du 5 Septembre 2008, les traitements antiparasitaires ne soient plus considérés comme comptant parmi les « traitements » au titre de l'article 24 relatif aux « Traitements vétérinaires », alinéa 4 qui stipule : « En dehors des vaccinations, des traitements antiparasitaires et des plans d'éradication obligatoires, si un animal ou un groupe d'animaux reçoit au cours d'une période de douze mois plus de trois traitements à base de médicaments vétérinaires allopathiques chimiques de synthèse ou d'antibiotiques, ou plus d'un traitement si leur cycle de vie productive est inférieur à un an, les animaux concernés ou les produits obtenus à partir de ces animaux ne peuvent être vendus en tant que produits biologiques et les animaux sont soumis aux périodes de conversion définies à l'article 38, paragraphe 1. ».

L'ensemble des stratégies de lutte doit être raisonné dans le cadre d'une gestion intégrée et durable du parasitisme (Figure 25).

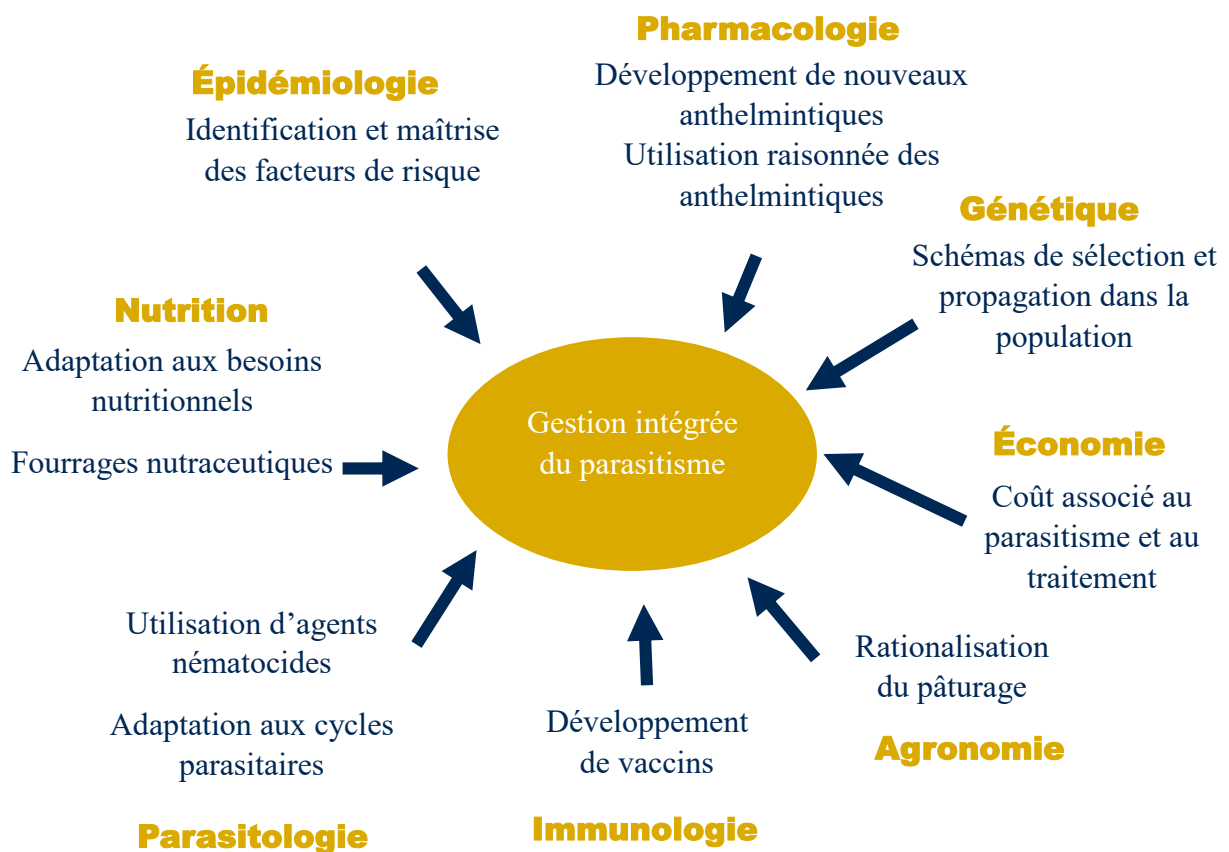


Figure 27: Gestion intégrée et durable du parasitisme.

C'est dans ce cadre très particulier que le vétérinaire, qui n'est véritablement expert dans aucun mais possède les bases de tous ces domaines entre en jeu.

E) Ouverture sur le microbiote

Comme présenté à la figure 14, les trois pôles interagissant lors de l'infestation parasitaire sont le parasite, l'hôte et l'environnement. Les principaux moyens d'action sur l'hôte sont la stimulation de sa réponse immunitaire et une adaptation nutritionnelle aux besoins des animaux. Dans toutes les espèces le microbiote joue un rôle dans l'éducation immunitaire, chez les ruminants il a également un rôle très important à jouer dans la digestion des aliments et donc dans la disponibilité des nutriments.

Par ailleurs dans le tube digestif, microbiote et parasites se côtoient et peuvent potentiellement interagir l'un avec l'autre ou agir l'un sur l'autre. De fait, il est intéressant d'étudier le microbiote associé avec une résistance particulière à l'infestation parasitaire pour comprendre les interactions qui lient les différents pôles.

Partie 2 : Étude du microbiote ruminal ovin et relations avec l'infestation parasitaire et les stratégies de lutte contre celle-ci.

I) Caractérisation du microbiote ruminal ovin

A) Particularités anatomo-physiologiques du tube digestif des Ruminants

Les Ruminants possèdent, en plus de leur estomac glandulaire, similaire à celui des autres mammifères et appelé caillette ou abomasum, trois pré-estomacs dont le plus volumineux est le rumen. L'œsophage aboutit d'abord dans le rumen, vaste compartiment bilobé dont le volume peut aller de 6 à 8 L selon la taille de l'animal et son alimentation (256–258), recouvert de papilles kératinisées qui ont pour rôle principal d'absorber les produits des fermentations microbiennes. Des échanges entre le rumen et le réseau sont permis par les contractions et le réseau contrôle la sortie des aliments venant du rumen vers le feuillet grâce à l'orifice réticulo-omasal qui limite la taille des éléments qui peuvent transiter. Le feuillet, aussi appelé omasum, est presque entièrement occupé de lames parallèles de différentes hauteurs disposées dans le sens du transit qui piègent les éléments grossiers restants. Enfin, les particules plus ou moins digérées par le microbiote ruminal entrent dans la caillette, aussi appelée abomasum, comparable à l'estomac des monogastriques (Figure 26) (259).



Figure 28: Schéma de coupe de l'ensemble pré-estomacs/estomac d'un ruminant. Source : Dictionnaire Larousse.

Ce tube digestif particulier est le résultat d'une co-évolution entre les mammifères et leur écosystème digestif. C'est dans les pré-estomacs, en amont de la caillette, que se déroule une grande partie de la digestion. En effet, le rumen, dans lequel trois phases peuvent être mises en évidence, est le siège d'un grand nombre de fermentations microbiennes. La phase liquide, située ventralement, est majoritairement constituée d'eau et de particules en suspension issue de la phase intermédiaire solide composée des aliments ingérés. Les réactions microbiennes qui se déroulent dans ces deux phases sont à l'origine de la production de gaz qui, par gravité remontent, et constituent la phase dorsale.

L'environnement ruminal est relativement stable avec une température légèrement supérieure à celle du corps de l'animal (37 à 41°C selon la température de l'environnement) (260) et pouvant la dépasser d'un à deux degrés après le repas, au moment où les processus de fermentation sont les plus intenses. Le pH du rumen varie au cours de la journée à la faveur des processus fermentaires et dépend de l'alimentation mais il est maintenu dans un intervalle compris entre 5,5 et 7 grâce à l'action tampon de la salive apportée en permanence notamment grâce au processus de rumination qui permet une mastication quasi permanente d'aliments.

Les contractions du réticulo-rumen remplissent quatre rôles : un rôle de brassage de la phase intermédiaire permettant d'augmenter le contact des microorganismes et des fibres, un rôle de vidange pour permettre le transit des aliments vers le feuillet, et l'évacuation des gaz de la phase supérieure par éructation, et un rôle dans la régurgitation du bol mérycique vers la cavité buccale pour le processus de rumination.

B) Le microbiote ruminal

1) Présentation du microbiote ruminal

L'ensemble des microorganismes présents dans le rumen était autrefois souvent qualifié de « flore et faune microbiennes du rumen ». Aujourd'hui l'appellation « microbiote ruminal » est la plus utilisée du fait de la révision de la classification du vivant.

Le microbiote ruminal est constitué de nombreux microorganismes parmi lesquels des procaryotes comme les bactéries et les archées et des eucaryotes comme les protozoaires ciliés et les champignons. Grâce aux relations symbiotiques que les ruminants ont développées avec leur microbiote au cours de l'évolution, ils sont capables d'utiliser les aliments fibreux riches en celluloses et hémicelluloses comme sources d'énergie. Les micro-organismes jouent différents rôles dans la digestion des glucides cytoplasmiques et pariétaux ainsi que des protéines. La fermentation des glucides et des chaînes carbonées issues de la digestion des

protéines est responsable de la production d'acides gras volatils qui représentent plus de 70% des apports énergétiques chez les ruminants (261).

Par ailleurs, les microorganismes sont également responsables de la synthèse de protéines microbiennes à partir de la matière azotée alimentaire ainsi que de vitamines qui rendent les ruminants moins dépendants que les autres espèces des apports alimentaires en ces nutriments (262).

Tous les microorganismes du rumen ne sont pas capables de dégrader de la même manière les différents substrats.

Ainsi on qualifiera de microorganismes fibrolytiques les microorganismes capables de dégrader la cellulose, les hémi-celluloses et les pectines. Par exemple, certaines bactéries telles que *Fibrobacter succinogenes* ou *Ruminococcus albus* dégradent préférentiellement les glucides pariétaux cités ci-dessus. Ces bactéries se développent préférentiellement à un pH supérieur ou égal à 6,5 et sont responsables de la production d'acide acétique (C2) et d'acide butyrique (C4) en majorité. Les protozoaires et les champignons sont également des microorganismes fibrolytiques

Par opposition, certains microorganismes sont plutôt amylolytiques et dégradent les glucides cytoplasmiques. Par exemple, certaines bactéries telles que *Ruminobacter amylophilus* prolifèrent à des pH inférieurs à 6 et dégradent les sucres solubles et l'amidon en acide propionique (C3) (263).

La protéolyse est en grande partie réalisée par des bactéries amylolytiques comme *Prevotella ruminicola* (264) qui libèrent de l'azote sous forme ammoniacale par désamination. Cet azote ammoniacal sera alors réincorporé par l'ensemble des microorganismes pour la synthèse de protéines microbiennes ou absorbé au niveau du rumen.

2) *Relations entre le microbiote ruminal et le microbiote du reste du tractus digestif.*

Les microorganismes commensaux sont présents sur l'intégralité du tractus digestif des ruminants à des concentrations plus ou moins importantes et avec des différences de représentation comme cela est visible sur la figure 27 empruntée à l'étude de Douglas et. en 2016 (265). Le microbiote ruminal est ainsi plus proche du microbiote du réseau ou du feuillet que de celui de la caillette et de l'intestin grêle, qui sont tous deux plus proches l'un de l'autre que du microbiote du caecum ou du côlon.

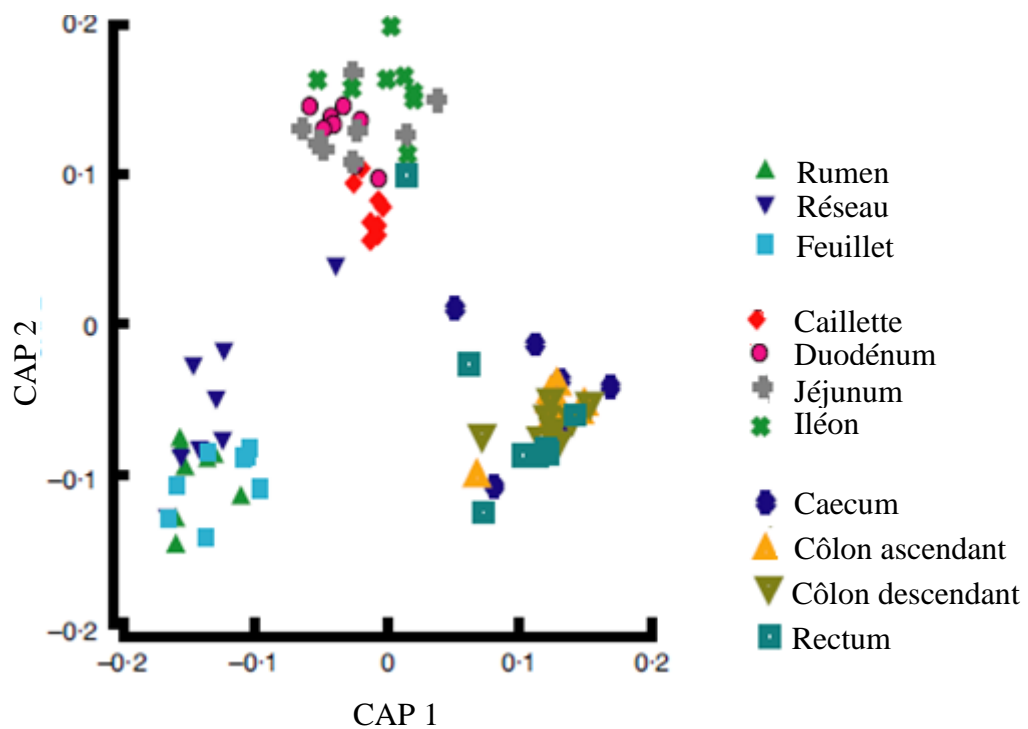


Figure 29: Analyse canonique réalisée à partir d'échantillons collectés le long du tractus digestif et analysés par Douglas et al. (2016) (265). Chaque point représente un échantillon.

La composition du microbiote ruminal est un champ d'étude très développé notamment autour des problématiques d'efficacité alimentaire (266, 267), de méthanogenèse (268, 269) ou de production et de composition laitières. Cependant il est encore aujourd'hui assez difficile de définir ce qu'est un bon microbiote, ou même un microbiote sain. Ceci découle de la complexité de l'écosystème ruminal et des interactions entre les différents microorganismes, entre les microorganismes et l'hôte, ou entre les microorganismes et certains paramètres « externes » tels que l'alimentation ou le parasitisme.

C) Techniques de mesure du microbiote ovin

1) Observation

Pour les microorganismes les plus gros, à savoir les protozoaires, des observations au microscope confocal ou au microscope électronique à transmission permettent un comptage voire une caractérisation sommaire (270) (Figure 30). Cependant cette méthode induit très probablement une sous-estimation de la quantité de protozoaires du fait de leur lyse lors de la collecte des échantillons et des manipulations (271).

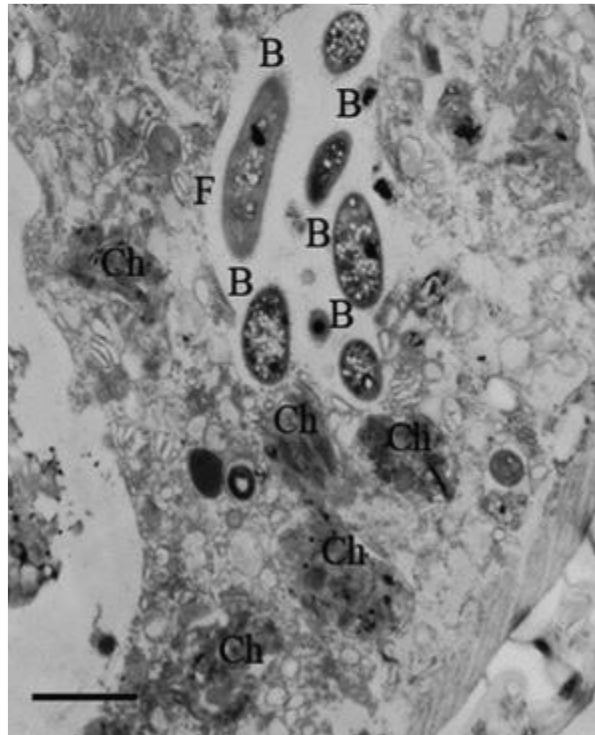


Figure 30: Image obtenue au microscope électronique à transmission d'un protozoaire du genre *Epidinium* spp. se nourrissant d'autres microorganismes et de composants alimentaires. L'échelle représente 500nm. (F) Vésicule alimentaire, (B) Bactéries, (Ch) Chloroplastes. D'après Huws et al. (2009) (270).

2) Culture

Les premières études menées sur le microbiote ruminal utilisaient des techniques de cultures *in vitro* qui ont permis d'identifier plus de 200 bactéries ainsi qu'un grand nombre de protozoaires et de champignons vivant dans le rumen (272).

Cependant, un grand nombre des microorganismes présents dans le rumen ne sont pas cultivables à ce jour ou pas isolables (273, 274). Ainsi la méta-analyse réalisée par Kim et al. (2011) montrait que seuls 6,5% des bactéries et 1,7% des archées du rumen avaient été cultivées (275). L'étude de Stivenson et al. (2011) montrait par PCR quantitative que cinq bactéries non cultivées étaient présentes dans des abondances relatives non significativement différentes de *Fibrobacter succinogenes*, ou du genre *Butyrivibrio* qui, du fait de leur culture plus facile, ont

fait l'objet de nombreuses études (276). Ainsi, les connaissances sur certains microorganismes et l'importance qui leur est accordée peut être biaisée par la facilité de culture de ceux-ci. L'étude de Zehavi et al. (2018) considère que les bactéries cultivables représentent environ 23% de la totalité des bactéries ruminales (277) et, par comparaison avec l'étude métataxonomique d'Henderson et al. (2015), elle montre que l'étude des bactéries cultivables introduit un biais considérable pour la prédiction des bactéries qui se trouvent effectivement dans le rumen (Figure 31). Ainsi, en se basant uniquement sur la culture, la proportion de Firmicutes est largement exagérée tandis que les Bacteroidetes sont sous-estimés par les méthodes de culture en comparaison avec les méthodes métataxonomiques.

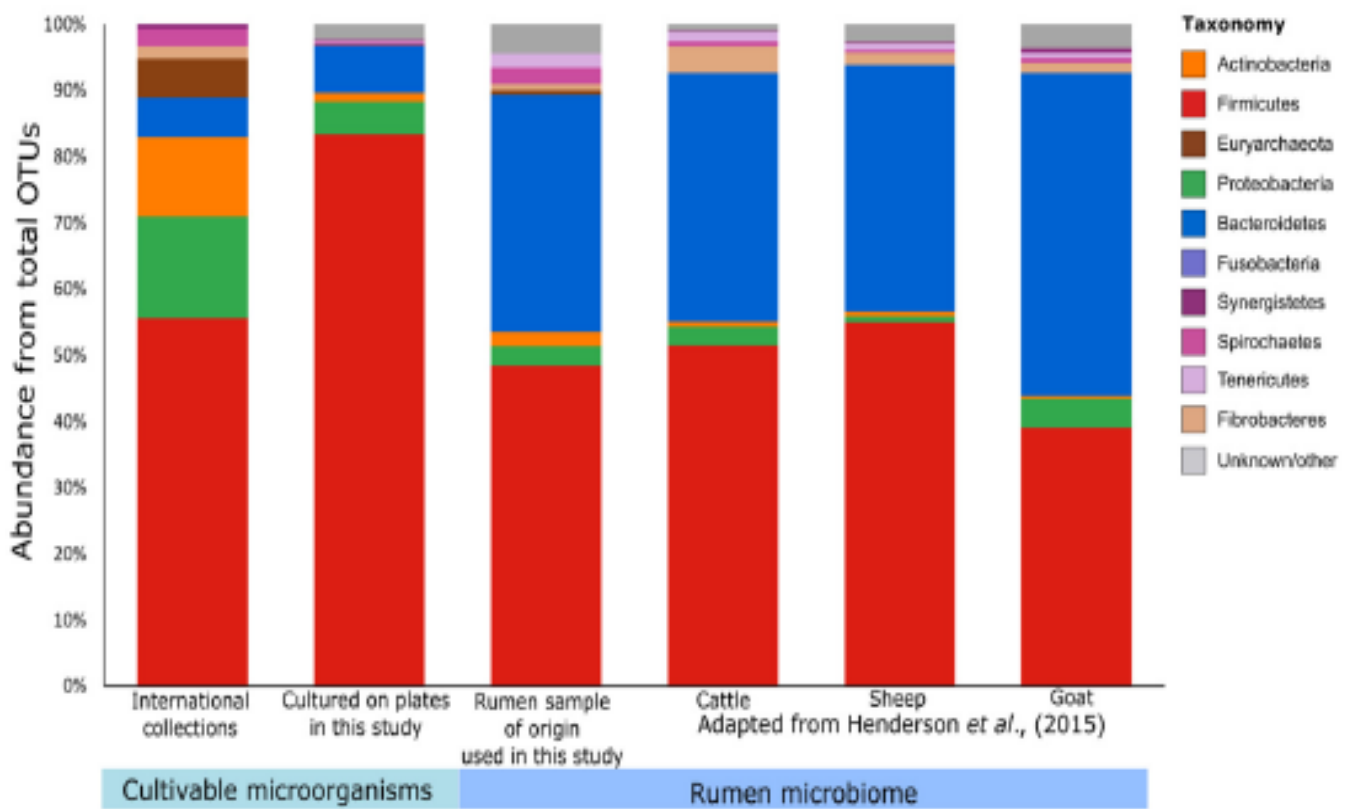


Figure 31: Représentation du biais de prédiction des méthodes de culture. Illustration de Zehavi et al. (2018)(277).

Les échecs de culture peuvent être liés à l'absence de certains nutriments indispensables dans les milieux de culture, à des conditions physico-chimiques (température, pH, potentiel d'oxydo-réduction, conditions anaérobies) inadéquates, à la présence de microorganismes à croissance plus rapide et produisant des substances inhibitrices ou encore à la rupture de réseaux de communication cytokiniques bactériens (278) entraînant la mort des bactéries ou leur incapacité à former des colonies (279).

Enfin, la culture bactérienne par elle-même ne permet pas d'identifier avec précision des bactéries ou des archées. En effet, la taille réduite et la morphologie, en générale assez simple et peu discriminante n'offrent pas de bases solides pour l'établissement d'une identification pertinente et d'une classification fiable (279).

C'est pourquoi, même si les méthodes de culture sont efficaces pour isoler certains microorganismes en particulier, elles ne sont pas capables de rendre compte de l'importante diversité de ceux-ci (280). Rapidement, des méthodes moins chronophages et moins sélectives se sont développées pour rendre compte de la diversité de la population microbienne de différents écosystèmes, en particulier du rumen.

3) Utilisation de l'ARN ribosomal 16S en métataxonomie

a) La révolution de l'ARNr 16S

La principale révolution dans le domaine de l'identification et de la description d'environnements microbiens est basée sur la théorie de Zuckerkandl et Pauling (1965) d'une possibilité d'utiliser les macromolécules du vivant comme témoins de l'histoire de l'évolution des espèces (281). Les macromolécules étaient alors classées en sémantophorétiques ou sémantides (qui désignent les molécules transportant l'information d'un gène ou de son expression : ADN, ARN, protéines), en épisémantiques synthétisées sous le contrôle des sémantides tertiaires (les protéines) et en asémantiques (molécules non produites par l'organisme, devant épisémantique quand elles subissent une transformation).

Le postulat des chercheurs est que l'aptitude des macromolécules à servir de base à l'établissement d'une phylogénie décroît depuis les sémantides vers les molécules épisémantiques et que les molécules asémantiques sont incapables de remplir ce rôle. Des molécules épisémantiques très répandues (ATP ou coenzymes d'oxydo-réduction par exemple) ne permettent pas l'établissement d'une phylogénie mais certains produits de réactions spécifiques pourraient permettre de catégoriser certains microorganismes.

Cependant les meilleurs candidats à l'établissement d'une phylogénie sont les sémantides et en particulier l'ADN. Afin de pouvoir comparer des organismes parfois très différents, il a fallu trouver un « gène de ménage », c'est-à-dire des gènes indispensables à la survie des cellules, par conséquent présent dans tous les organismes vivants. Les premières études phylogénétiques l'ont été à partir du gène codant pour l'ARN ribosomal 5S dont la petite taille (environ 120 nucléotides) permettait d'isoler facilement des ARNr 5S qui possédaient des différences structurales même minimales (282). Cependant, cette faible dimension entraîne une assez faible

précision lorsque les séquences comparées sont trop proches. Ainsi cette méthode ne permet pas de différencier un humain, d'une souris ou d'un marsupial (283) et ne permet de décrire que des environnements microbiens relativement simples en termes de nombres d'espèces, pour peu que ces espèces soient phylogénétiquement suffisamment éloignées (284).

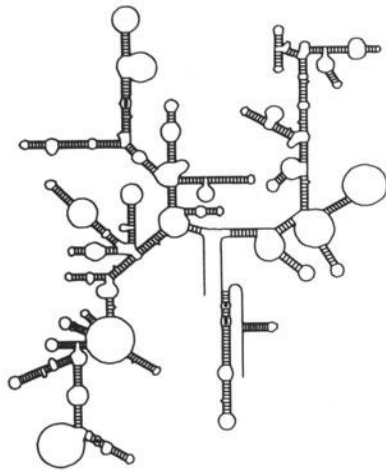
Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (environ 1500 nucléotides) est bien plus large que celui codant pour l'ARN ribosomal 5S ce qui permet d'être beaucoup plus précis (Figure 32).

Des données ont été accumulées à partir de la fin des années 1960 par Woese et ses collaborateurs, auteurs de la première phylogénie moléculaire du vivant (285), et par conséquent des banques de gènes codant pour les ARN ribosomaux 16S ont commencé à se développer. C'est cette phylogénie qui a contribué à montrer que les archées étaient un règne à part entière.

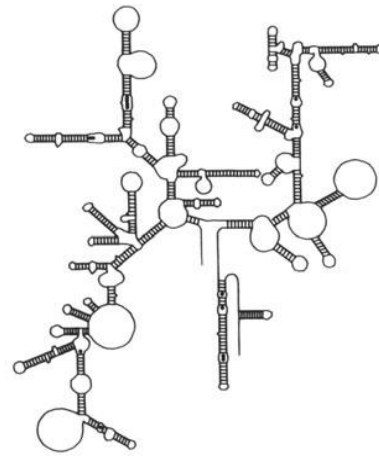
Le principal intérêt de l'ARNr 16S, en dehors de sa taille est que les variations de la séquence nucléotidique ne sont pas totalement hasardeuses. En effet, bien que les substitutions soient essentiellement hasardeuses, certaines régions du gène semblent conservées au cours de l'évolution ce qui permet notamment l'utilisation d'amorces « universelles » pour la polymérisation en chaîne de ces gènes (282).

La métataxonomie, un temps dépassée par les méthodes de métagénomiques que nous développerons dans la suite de cette thèse, a bénéficié des avancées en termes de séquençage, (286) qui permettent de générer de jeux de données bien plus conséquents, des techniques de barcoding qui permettent de séquencer les contenus ruminiaux de plusieurs individus en même temps et d'outils statistiques d'écologie microbienne permettant de rendre compte de la diversité microbienne de façon plus poussée.

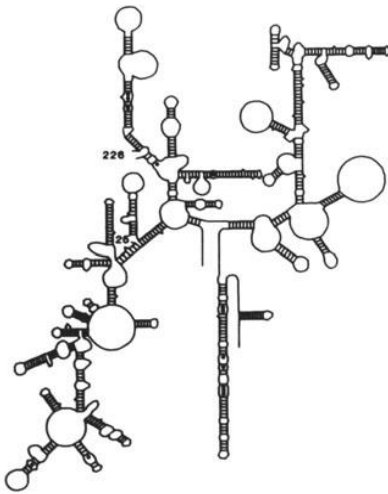
D'autres gènes cibles peuvent être utilisés pour faire de la métataxonomie ou de la métagénomique ciblée sur les microorganismes non archéaux et non bactériens comme l'ITS 1 (Internal Transcribed Spacer 1) les champignons ou le gène codant pour l'ARNr 18S pour les protozoaires.



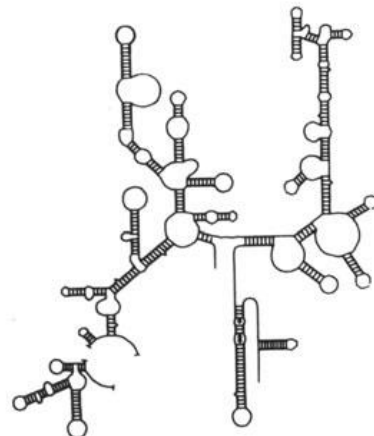
Bacteria (*Escherichia coli*)



Archaea (*Haloferax volcanii*)



Fungi (*Saccharomyces cerevisiae*)



ARNr 16S mitochondrial



Bacteria
(*Escherichia coli*)



Archaea
(*Haloferax volcanii*)



Animalia
(*Homo sapiens*)

Figure 32 : Comparaison des structures des ARN ribosomiaux 16S et 5S des principaux règnes du vivant. D'après Pace et al. (1986) (282).

b) Utilisation d'outils d'écologie microbienne : les indices de diversité.

Après séquençage, les séquences obtenues sont réunies en clusters qui aussi appelés OTU pour « Operational Taxonomy Unit », terme utilisé à l'origine pour désigner un ensemble d'individus par similitudes sans que ces similitudes soient nécessairement en accord avec la classification phylogénétique. Dans un environnement complexe, de très nombreuses OTU sont identifiées et cela implique la nécessité, pour décrire les variations, d'introduire un indice mono ou bi-dimensionnel qui permette de représenter celles-ci graphiquement ou numériquement.

i) Notions de diversité

Les indices de diversité tentent de représenter la biodiversité d'un milieu à partir de deux notions complémentaires : la richesse et l'équitabilité (287, 288).

La richesse est le nombre, ou une fonction strictement croissante du nombre, de catégories différentes au sein d'une communauté. Définir une richesse sous-entend qu'un individu ne peut appartenir qu'à une catégorie ce qui revient à dire que la taxonomie est précise et établie. Par ailleurs, en tant que telle, la richesse n'introduit pas de distance entre les catégories et elle augmente linéairement lorsqu'on ajoute un individu qu'il soit phylogénétiquement proche des individus déjà présents ou non. L'indice de richesse le plus simple est le nombre de catégories représentées dans la communauté.

L'équitabilité permet de quantifier la contribution d'une catégorie à la communauté en fonction de la quantité d'individus qui en font partie. Une catégorie très majoritaire entraînera une diminution de l'abondance d'individus des autres catégories, minimisant l'équitabilité. Le maximum d'équitabilité est obtenu dans une communauté où toutes les catégories ont la même abondance.

Ainsi une communauté qui contient un grand nombre de catégories mais très minoritaires au regard d'une catégorie clairement dominante ne sera pas considérée comme plus diverse qu'une communauté avec un nombre plus restreint de catégories mais plus équitablement réparties. Ainsi sur la Figure 33, toutes choses égales par ailleurs, une communauté de 7 espèces est plus diverse qu'une communauté de 2 catégories (ligne du haut) et une communauté de 5 catégories est plus diverse si les individus sont équitablement répartis (ligne du bas). De même, une communauté plus riche peut sembler moins diverse si elle est moins équitable (colonne de droite).

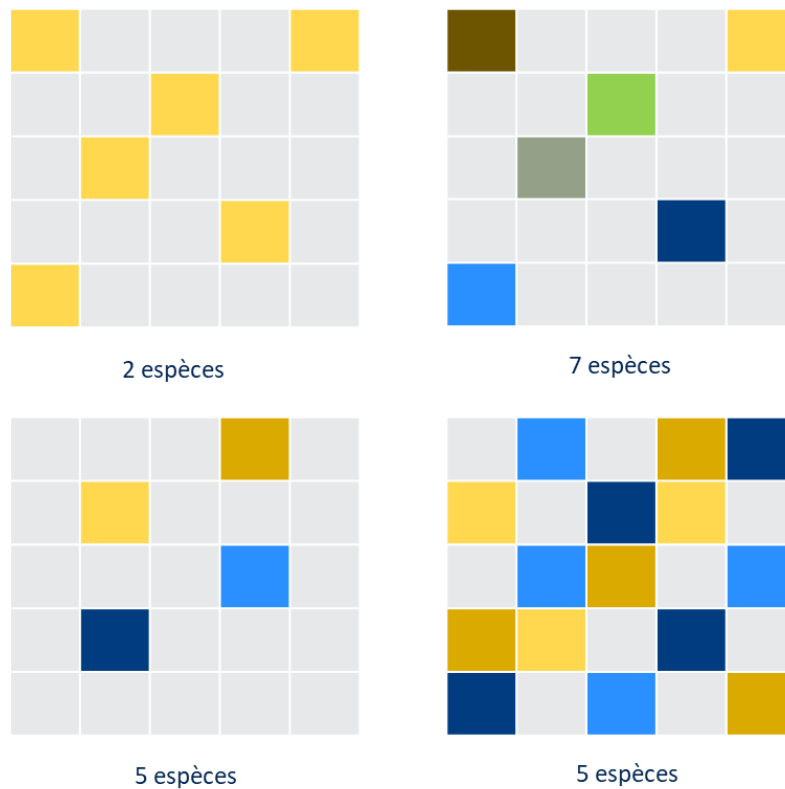


Figure 33 : Importance de la richesse et de l'équitabilité dans la définition de diversité. D'après Marcon (2015) (287).

Nous avons volontairement choisi d'utiliser les termes catégorie, individu et communauté car ces concepts sont applicables aussi bien à l'étude d'une forêt que des animaux qui l'habitent ou de l'ensemble des microorganismes peuplant le rumen des ovins. Dans ce dernier cas on peut les remplacer respectivement par espèce ou OTU (si la phylogénie ne permet pas d'identifier l'espèce), microorganisme et microbiote.

La majorité des indices de diversité s'appuient sur la richesse et l'équitabilité. Cependant il est légitime de considérer que l'identification dans un écosystème d'un micro-organisme du même genre qu'un microorganisme déjà identifié introduit moins de diversité que l'identification d'un microorganisme qui ne partage avec les autres que son phylum (Figure 34).

L'introduction de la disparité, c'est-à-dire de la divergence moyenne entre deux espèces (représentée ici par une différence importante sur la palette chromatique) donne aux indices de diversité un aspect plus concret tenant compte de la proximité phylogénétique entre les microorganismes.

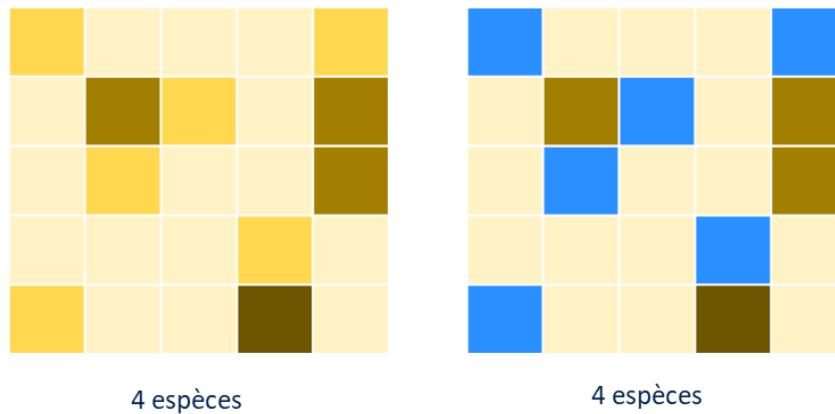


Figure 34 : Importance de la disparité dans la définition de la diversité.

Ainsi la diversité d'un écosystème augmente avec le nombre d'espèces représentées (richesse), la divergence entre les espèces (disparité) et l'équitabilité (parfois pondérée en fonction de la disparité).

La diversité peut être estimée à différentes échelles : à l'échelle d'un système local délimité et uniforme (diversité α), entre systèmes locaux délimités et uniformes (diversité β) et dans l'ensemble de l'écosystème ou méta-communauté (diversité γ) (289, 290).

ii) *Diversité α*

*** Richesse spécifique et biais d'échantillonnage**

Les notions introduites précédemment sont, comme on l'a mentionné, applicables à des écosystèmes très divers. Cependant, s'il est relativement aisé d'identifier et de quantifier les animaux présentes sur un territoire délimité, il est bien plus difficile de le faire pour des microorganismes à l'intérieur d'un rumen.

Pour cette raison, l'indice d'alpha-diversité le plus simple, à savoir la richesse spécifique, n'est pas mesurable directement. Un autre problème de cet écosystème est la difficulté de définition de l'espèce, on contournera ce problème en s'intéressant aux taxons issus des clusters obtenus par métataxonomie.

On pourra, selon les cas, se contenter d'une richesse observée à effort d'échantillonnage constant ou corriger la richesse observée à l'aide d'estimateurs comme les estimateurs Chao qui s'appuient sur les espèces rarement observées pour estimer la quantité d'espèces non observées (291). Les différents estimateurs ne peuvent fournir qu'une borne inférieure du nombre d'espèces réel (292). Ainsi l'estimateur de Chao1 s'écrit (287) :

$$\hat{S} = S_{\neq 0}^n + \frac{(n-1)(s_1^n)^2}{2ns_2^n}, \text{ avec } S_{\neq 0}^n \text{ le nombre d'espèces observées et } (s_1^n) \text{ et } (s_2^n) \text{ le}$$

nombre d'espèces observées respectivement une et deux fois.

La différence entre l'estimateur et la valeur réelle, mesurable à partir de jeux de données simulés, diminue à mesure que l'effort d'échantillonnage est conséquent.

Une alternative à l'utilisation d'estimateurs est l'inférence du nombre d'espèces à partir de courbes d'accumulation. Au cours de l'effort d'échantillonnage, le nombre d'espèce observées augmente jusqu'à une asymptote horizontale correspondant au nombre d'espèces total. Un modèle de Michaelis-Menten peut être utilisé (293) :

$$S^n = S \times \frac{n}{K+n}, \text{ avec } S^n \text{ le nombre d'espèces observées, } S \text{ le nombre d'espèces}$$

théorique de l'écosystème, n l'effort d'échantillonnage et K une constante associée à la difficulté de collecte.

Ce modèle a tendance à sous-estimer la richesse. D'autres modèles plus performants empiriquement peuvent être utilisés mais globalement l'estimation de la richesse par extrapolation est plus incertaine que par les méthodes non paramétriques (287).

*** Indice de Simpson :**

On note p_s la probabilité qu'un microorganisme, échantillonné au hasard, appartienne à l'espèce s. L'indice de Simpson (294) peut être interprété comme la probabilité qu'un microorganisme nouvellement identifié soit de la même espèce qu'un microorganisme préalablement identifié et s'écrit :

$$D = \sum_{s=1}^S p_s^2$$

L'indice de Gini-Simpson est plus régulièrement utilisé, il n'est autre que le complémentaire de l'indice de Simpson ($E=1-D$) et présente l'avantage de croître à mesure que la diversité augmente contrairement à l'indice initialement présenté dans la publication de Simpson (1949) (294). Bien évidemment, de même que la richesse spécifique réelle, l'indice de Gini-Simpson ne peut être qu'approximé lors d'un échantillonnage non exhaustif. L'estimateur est de la forme :

$$\hat{E} = \left(\frac{n}{n-1}\right) \left(1 - \sum_{s=1}^{S \neq 0} \hat{p}_s^2\right)$$

Le facteur correcteur $\left(\frac{n}{n-1}\right)$ tend rapidement vers 1 à mesure que l'échantillonnage s'intensifie. \hat{E} varie dans l'intervalle [0 ; 1] avec un minimum atteint lorsqu'une espèce unique est identifiée ($p_1 = 1$) et un maximum hypothétique avec S espèces de probabilité d'apparition 1/S. Dans un échantillon complexe avec des probabilités d'observation variable, les espèces minoritaires auront un poids peu important sur l'indice de Gini-Simpson.

*** Indice de Shannon :**

L'indice de Shannon dérive de la théorie de la communication du mathématicien du même nom (295) et illustre à nouveau à quel point les indices de diversité peuvent être utilisés dans des contextes variés puisqu'il s'agissait dans l'article original d'une communauté de symboles appartenant à des catégories « lettres » et portant ou non une information.

L'indice de Shannon est une fonction continue de l'ensemble des probabilités d'observation des microorganismes croissante en fonction de l'effort d'échantillonnage toutes choses égales par ailleurs de la forme :

$$H = - \sum_{s=1}^S p_s \times \ln(p_s)$$

Plusieurs estimateurs de l'indice de Shannon existent, plus ou moins corrigés par l'information apportée par les espèces rares. L'indice de Shannon, accorde une importance assez forte aux espèces minoritaires du fait de l'utilisation d'une fonction logarithmique.

La liste des indices d'alpha-diversité présentée ici n'est pas exhaustive mais a pour objectif de présenter les deux indices les plus utilisés et la différence pratique entre les deux par rapport à l'importance des espèces rares en matière d'information.

iii) Diversité β

*** Concept de diversité β**

La diversité β , dans son expression la plus simple, consiste à comparer la diversité entre deux ou plusieurs écosystèmes. Son expression à proprement parler ne fait pas consensus (287, 296) cependant toutes les formes ont en commun de combiner les diversités γ et α que ce soit par addition ($\gamma = \alpha + \beta$) (289) ou par produit ($\gamma = \alpha \times \beta$) (290). L'additivité permet d'assurer qu'un jeu de données auquel on rajoute une communauté sera plus divers qu'avant cette addition, cependant l'approche multiplicative permet d'exprimer la diversité β comme un nombre relatif de communautés diverses et elle évolue par conséquent entre 1 et le nombre de communautés comparées et c'est celle qu'on choisira ici de considérer.

Ainsi sur la Figure 35, les communautés de la première ligne ont tous une richesse de 4 mais partagent les mêmes catégories d'individus donc la diversité inter-communautés (c'est-à-dire la diversité β) est très faible. Au contraire sur la deuxième ligne, les différentes communautés n'ont pas toutes les catégories d'individus en commun et sur la troisième ligne elles n'en partagent aucune ce qui maximise la diversité β . La diversité β dépend de fait du nombre de communautés comparées avec γ la richesse de l'ensemble des communautés et α la moyenne des richesses des communautés.

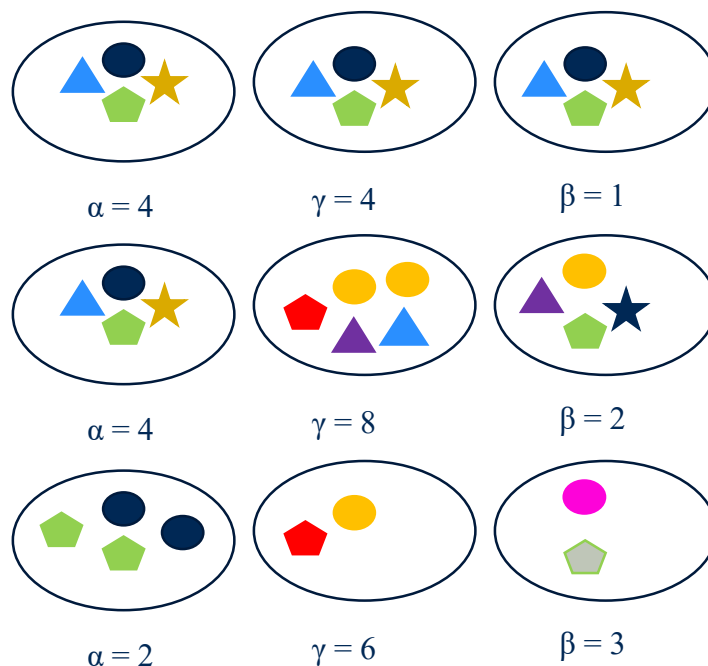


Figure 35 : Schéma explicatif de la β -diversité.

*** « Diversité » des indices de diversité β**

La diversité β mesure la dissimilarité entre communautés, généralement considérées par paires. Ces mesures peuvent se limiter à la présence ou l'absence des espèces (ce qui revient à confronter des matrices pleines de 0 ou de 1), intégrer leur abondance voire la distance des espèces à l'aide d'analyses multivariées.

*** *Indice de Jaccard : données de présence/absence***

L'indice de Jaccard (J) est le rapport entre le nombre d'espèces communes entre deux communautés et le nombre d'espèces total. Il est possible à partir des comparaisons deux à deux des communautés de comparer plusieurs communautés en calculant la matrice de leurs dissimilarités (1-J) qui pourra être représentée graphiquement.

*** *Distance de Bray-Curtis : données d'abondance***

En considérant S espèces dans une méta-communauté, la distance de Bray-Curtis peut s'écrire sous la forme :

$$D = 1 - 2 \times \frac{\sum_{s=1}^S \min(n_{s,1}; n_{s,2})}{\sum_{s=1}^S (n_{s,1} + n_{s,2})}$$
 avec $n_{s,1}$ et $n_{s,2}$ les nombres d'individus de l'espèce s respectivement dans la première et la seconde communauté comparées. Il est conseillé de n'utiliser cet indice que dans de des populations de tailles similaires car la distance de Bray-Curtis ne se base que sur les abondances brutes et non sur les abondances relatives des espèces présentes dans l'échantillon.

*** *UniFrac et Weighted-UniFrac :***

L'UniFrac et le Weighted-UniFrac sont les indices de diversité β prenant en compte les distances phylogénétiques entre les espèces observées respectivement sans prendre en compte leur abondance ou en la considérant. Ces indices se basent sur le rapport entre la somme des branches de l'arbre phylogénétique non partagées entre les deux communautés et la somme de toutes les branches de l'arbre (Figure 36).

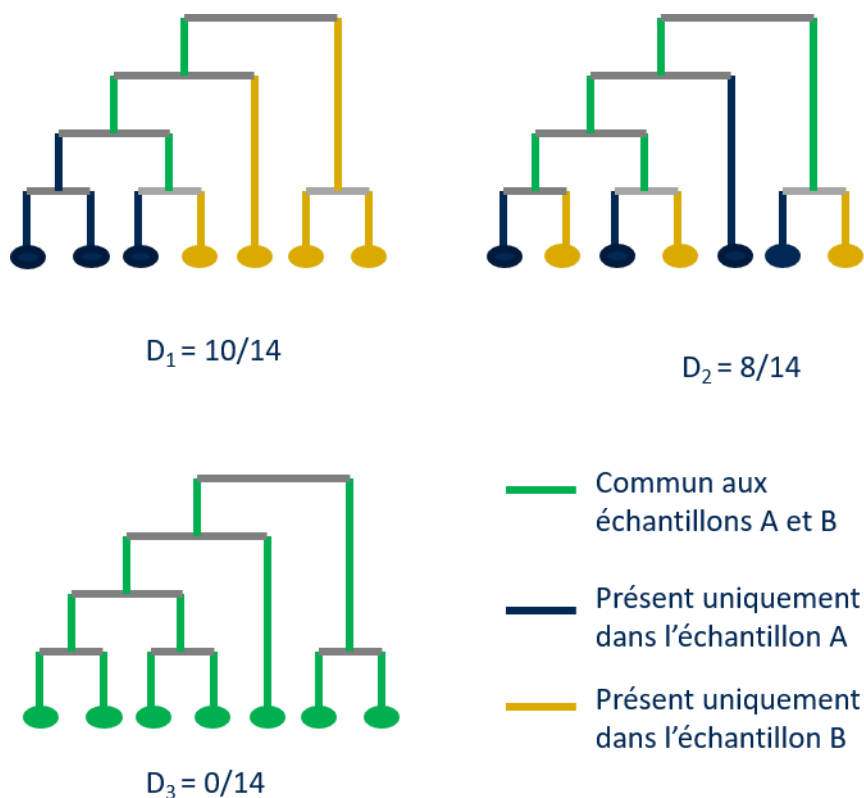


Figure 36 : Représentation schématique des calculs d'UniFrac entre deux échantillons A et B dans trois situations : (1) des échantillons très dissociés, (2) des échantillons similaires sans OTU commune, (3) des populations identiques.

c) Problèmes associés à la métataxonomie

Pollock et al. (2018) ont rédigé une revue des principales difficultés associées à la métataxonomie dans le but d'essayer de déterminer des « Bonnes Pratiques » en matière d'analyse de microbiote par cette méthode (297).

Plusieurs types de problèmes peuvent être associés à la métataxonomie. Premièrement, la population microbienne obtenue dépend du lieu de prélèvement. En effet, elle varie au sein même du rumen selon que l'on considère les microorganismes de la phase liquide, adhérents aux particules alimentaires ou adhérents à l'épithélium (298, 299).

Il existe une controverse quant à l'éventuelle variabilité associée avec les méthodes de conservation. Quelques études montrent une absence de différence significative entre des échantillons où l'extraction serait réalisée immédiatement et des échantillons congelés (300) ou des différences minimales non visibles à l'échelle du phylum ou de la famille mais uniquement du genre (301). Cependant, d'autres études montrent que la congélation induit une diminution de la quantité de Bacteroidetes (302) lorsque les échantillons n'étaient pas conservés dans un

cryptotecteur (303). Par ailleurs, une étude réalisée par Martinez-Fernandez et al. (2019) sur des prélèvements ruminiaux a montré que la centrifugation des échantillons et l'élimination du surnageant avant congélation permettait de protéger certaines bactéries et archées ayant une membrane cellulaire fragile de la lyse, justifiant leur plus forte abondance relative après séquençage (304).

Yu et Morrison (2004) ont également montré que différentes méthodes d'extraction pouvaient avoir une incidence sur l'abondance de certains phyla bactériens (305) et Henderson et al. (2013) préconisent une étape d'agitation avec des billes pour provoquer une rupture des parois de bactéries Gram + notamment (306). Par ailleurs, la méthode se basant sur l'amplification d'une ou plusieurs régions hypervariables avec des amorces spécifiques aux régions conservées les encadrant, il est possible d'obtenir une phylogénie différente à partir du même échantillon en utilisant des amorces différentes. Cela est d'autant plus vrai que la taxonomie des microorganismes du rumen n'est pas encore très précise (275). De surcroît, certaines amorces peuvent ne pas être si spécifiques, ainsi Hanshew et al. (2013) rapportent dans leur article une possible contamination des extraits bactériens par des chloroplastes dont le gène codant pour l'ARN 16S est amplifié par les amorces destinées à amplifier les bactéries (307).

Enfin il existe un biais intrinsèque aux microorganismes étudiés à savoir le nombre de copies de gènes codant pour des ARN ribosomiaux 16S, réduit pour certains comme les mycoplasmes qui ont entre une et deux copies d'après l'étude de Amikam et al (1984) (308), plus important pour d'autres comme *Bacillus subtilis* qui en possède 10 (309). En essayant plusieurs outils pour prendre en compte le nombre de copies des gènes codant pour l'ARNr 16S dans la métataxonomie Louca et al. (2018) ont conclu que les différents outils étaient tous imprécis et parfois contradictoires et ils déconseillent d'utiliser une correction par défaut tant que de nombreuses OTU ne sont pas très bien reliées à des génomes séquencés (310)

En dépit de ces inconvénients et de sa capacité limitée à fournir des données fonctionnelles interprétables, son coût raisonnable fait d'elle la plus utilisée encore à ce jour dans l'étude des populations microbiennes.

4) La métagénomique

La métagénomique est un ensemble de méthodes d'étude du contenu génétique d'échantillons par l'intermédiaire d'un séquençage direct des molécules d'ADN. En plus des informations phylogénétiques complétant les informations obtenues par métataxonomie, la métagénomique permet la reconstitution de génomes entiers et d'avoir un aperçu du potentiel fonctionnel de

l'échantillon prélevé par l'intermédiaire de cartes enzymatiques (311, 312). Par exemple, l'étude de Rubino et al. (2017) montre une différence quant à la quantité d'isoformes de certaines glycosylases entre les deux genres bactériens les plus représentés dans le rumen avec une plus grande variété d'enzymes dégradant la matrice d'hémicelluloses dans le genre *Prevotella* et une plus grande variété d'enzymes dégradant la cellulose dans le genre *Clostridium* (313).

5) *Les méthodes métatranscriptomiques*

La métagénomique permettait d'évaluer la diversité d'un microbiote et les fonctionnalités potentielles de ce microbiote. La métatranscriptomique, elle, consiste en l'étude des ARN messagers (ARNm) produits par ce microbiote et donc par conséquent d'évaluer les mécanismes fonctionnels effectivement mis en place. La principale difficulté des méthodes de métatranscriptomiques consiste à séparer les ARNm des ARNr plus nombreux et stables. Par ailleurs la corrélation entre les ARNm et les protéines produites peut parfois être faible en raison de modifications post-transcriptionnelles (314).

6) *Les méthodes métaprotéomiques*

La métaprotéomique s'inscrit entre les techniques de séquençage d'ADN et d'ARN et les études de métabolomiques qui visent à mesurer les produits terminaux des réactions microbiennes. Introduite par Wilmes et Bond (2004) la méthode consistait initialement en une électrophorèse bidimensionnelle pour séparer les protéines extraites à partir d'un échantillon complexe (315). L'avantage des protéines en comparaison à l'analyse des ARN messagers est leur durée de vie plus longue qui permet d'avoir une représentation plus précise de la situation au temps du prélèvement.

Cette méthode a permis d'identifier efficacement des protéines bactériennes à partir d'échantillons d'eaux usées ou de sols mais semble moins performante pour l'analyse des contenus ruminiaux du fait de la présence de tannins et autres composés phénoliques qui complexent les protéines et peuvent interférer avec l'extraction et la purification de celles-ci (316).

7) *Comparaison des méthodes : exemple des archées.*

En bilan, de nombreuses méthodes peuvent être utilisées pour étudier le microbiote ruminal (Figure 35) et le choix de la méthode doit se faire en fonction de la question à laquelle on souhaite répondre. À titre d'exemple, l'observation microscopique ne permet pas de différencier les bactéries et les archées et les méthodes de culture manquent entre 15% et 80% des archées détectées par séquençage de l'ARNr 16S (317). Cette dernière méthode permet

d'estimer la part des séquences à entre 0,3% et 3,3% des séquences d'ARNr 16S ou 18S du rumen d'après la méta-analyse de Janssen et al. (2008) (317). En revanche, l'étude métagénomique de Rubino et al. (2017) a mesuré que 8,2% des gènes séquencés provenaient du genre d'archées *Methanobrevibacter* en faisant le deuxième genre le plus représenté dans le rumen derrière le genre *Prevotella* (313). Par ailleurs cette communauté minoritaire est à l'origine de la plus grande partie de la production de méthane au sein du rumen comme le montrent les études de métaprotéomique et de métabolomique (316) (268), sachant que les différences entre les animaux produisant le plus de méthane et ceux en produisant le moins sont plus dues à des différences d'expression qu'à une quantité de microorganismes (269). Cette synthèse loin d'être exhaustive montre l'importance de la question posée dans le choix des méthodes de mesures employées (Figure 37).

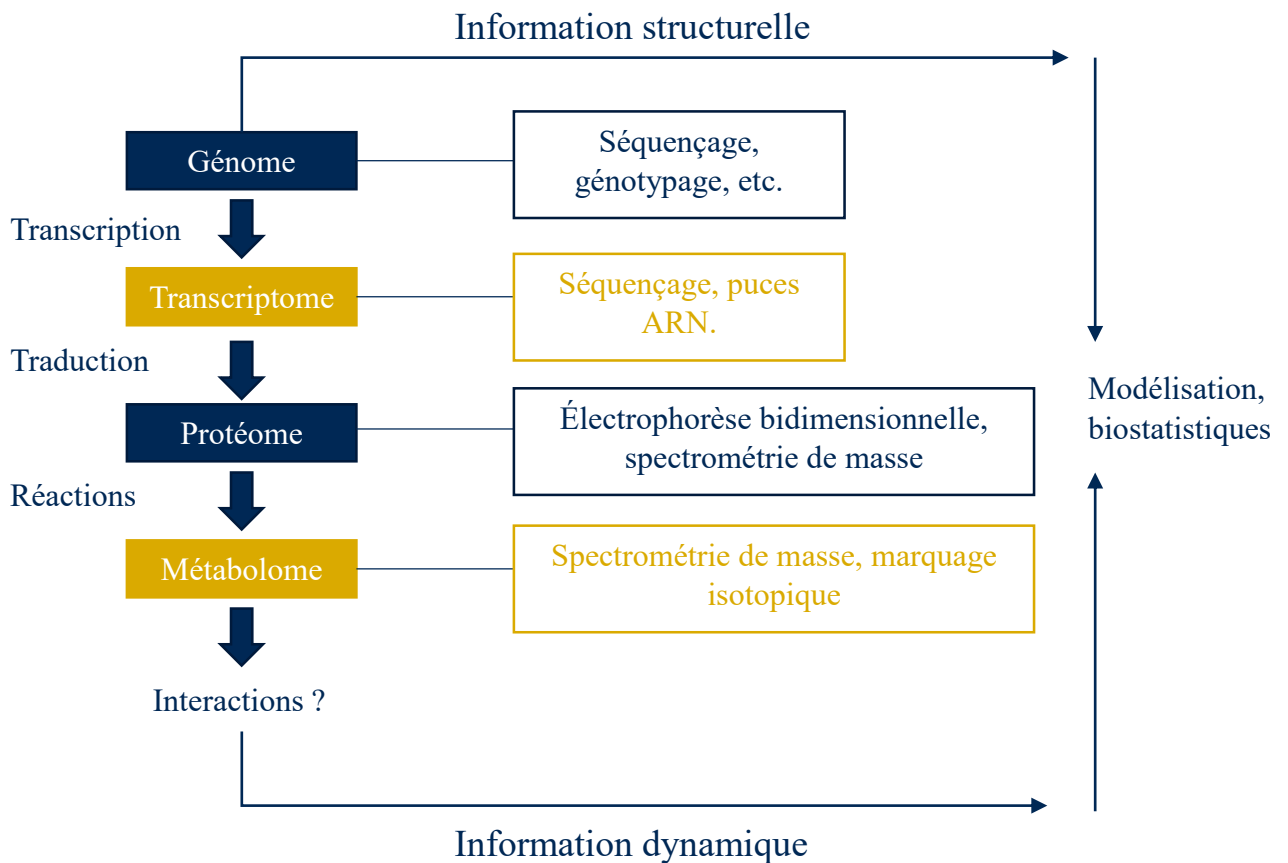


Figure 37: Méthodes "Omics" dans l'étude du microbiote ruminal. D'après McSweeney et al. (2012) (318).

D) Caractérisation du microbiote ovin

1) Abondances des microorganismes dans le rumen des ovins

Les études quantitatives du microbiote ruminal sont le plus souvent réalisées à l'aide de PCR quantitatives sur la base de la polymérisation du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S pour les bactéries et les archées, de l'ARN ribosomal 18S pour les protozoaires et de l'ITS 1 pour les champignons. La plupart des études faisant état de l'abondance des microorganismes ruminants concernent les bovins pour lesquels les chiffres les plus fréquemment avancés sont : 10^{10} à 10^{12} bactéries, 10^8 à 10^9 archées, 10^4 à 10^6 ciliés ou flagellés et 10^3 à 10^6 champignons anaérobies par millilitre de contenu ruminal (270, 273, 318, 319).

Ces chiffres ne sont pas forcément transposables aux autres espèces de ruminants domestiques ou sauvages. En effet, la plupart des études utilisant des PCR quantitatives réalisées sur les ovins donnent des concentrations bactériennes de l'ordre de 10^8 à 10^9 bactéries par millilitre de contenu ruminal (276, 320–322) tandis qu'une étude menée par Singh et al. (2014) sur des buffles donne une valeur de 2×10^{10} copies d'ADN bactérien/ml (323) et que l'étude de Pei et al. (2010) sur des alpagas donne une valeur de 7×10^6 copies d'ADN bactérien/ml.

De même les chiffres avancés en termes d'archées semblent légèrement surestimés si on se réfère aux études de Belanche et al. (2019) avec une concentration de 10^6 à 10^7 copies d'ADN/ml de contenu ruminal (320), voire à l'étude de Stiverson et al. (2011) qui mesure 10^5 à 10^6 copies d'ADN archéal/g de contenu ruminal (276). L'étude menée par Gu et al. (2011) confirme les variations inter-spécifiques avec des valeurs intermédiaires de $3,7 \times 10^7$ copies d'ADN dans un g de fluide ruminal et $9,3 \times 10^8$ archées dans un g de particules ruminales chez des chèvres noires coréennes (324).

Concernant la concentration de protozoaires, les études réalisées sur les ovins sont cohérentes avec l'intervalle énoncé pour les bovins et les ruminants en règle générale avec 10^5 à 10^6 protozoaires par millilitre de contenu ruminal (271, 325, 326) avec cependant une augmentation nette dans l'étude de Belanche et al. (2019) entre les brebis nourries avec une ration composée de 725g MS (Matière Sèche) de concentrés et de foin de ray-grass anglais à volonté et les brebis à l'herbe (respectivement $1,3 \times 10^5$ et $3,09 \times 10^8$ protozoaires par millilitre) (320).

Enfin les champignons anaérobies sont présents dans le rumen des ovins à des concentrations de 10^4 à 10^6 copies d'ADN par millilitre ce qui correspond à ce qu'on peut retrouver chez les bovins (320, 327).

2) *Composition du microbiote ruminal ovin*

En 2015, Henderson et al. (2015) ont publié un article fondateur sur la notion de « Core Microbiome », que l'on pourrait traduire par « Microbiote Commun » ou « Microbiote Central », au sein du rumen d'individus de différentes espèces et à des localisations géographiques très variées (328). L'étude d'échantillons provenant de 742 ruminants (bovidés, camélidés, giraffidés) appartenant à 32 espèces, prélevés dans 35 pays répartis sur tous les continents a révélé que les 30 groupes bactériens les plus abondants étaient présents dans 90% des échantillons et représentaient presque 90% des séquences totales et que 67, 1% des séquences étaient présentes dans absolument tous les échantillons.

a) **Les bactéries**

i) *Phyla bactériens majoritaires*

Quel que soit l'échantillon étudié les séquences bactériennes sont les plus nombreuses et parmi celles-ci deux phyla se détachent particulièrement : les Bacteroidetes et les Firmicutes représentent plus de 80% des séquences de la quasi-intégralité des échantillons. En revanche, selon la méthode de mesure les proportions de ces deux phyla varient sensiblement, avec une proportion plus importante de Bacteroidetes par rapport aux Firmicutes lorsque les mesures sont réalisées à partir de génomes entiers ou par polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (TRFLP) par rapport aux séquençages des produits de PCR sur le gène codant pour l'ARNr 16S. Ainsi, à titre d'exemple, les moutons du groupe contrôle de l'étude de Castro-Carrera et al. (2014) réalisée par TRFLP présentaient respectivement 69-77% de Bacteroidetes et 13-26% de Firmicutes (329) tandis que les Bacteroidetes représentaient 26,7% et les Firmicutes 57,8% dans la méta-analyse à partir de données d'ARNr 16 S réalisée par Kim et al. (2011) (275), ces données étant similaires à celles d'autres études utilisant la même méthode (287, 300, 307). Lopes et al. (2015) ont bien illustré ce phénomène en appliquant sur 4 moutons les deux méthodes aux mêmes échantillons et en trouvant des divergences entre la méthode par séquençage des produits de PCR de l'ARNr 16S et par Shotgun Sequencing pour les Firmicutes (35-50% contre 15,9%), les Bacteroidetes (17-51% contre 72,9%) et les Protéobactéries (7-40% contre 3%) notamment (330). L'hypothèse principale avancée par les auteurs est la présence d'un biais d'amplification dans les méthodes de séquençage du gène de l'ARNr 16S et une diminution de la profondeur de séquençage dans le Shotgun Sequencing. Les données obtenues par Shotgun Sequencing se rapprochent plus des données de culture mais il est impossible d'assurer que la vision qu'elles offrent est plus représentative du rumen pour autant (331).

L'alimentation des ruminants a un rôle déterminant à jouer dans les proportions des différents phyla. Ainsi, dans l'étude de Sadet-Bourgeteau et al. (2010), les mesures réalisées sur les animaux nourris successivement avec une ration entièrement composée de fourrages et une ration composée de 65% de concentrés ont montré des proportions différentes des phyla majoritaires, qui restaient cependant largement majoritaires (332). Classiquement les rations les plus riches en fourrages (et par définition pauvres en concentrés) résultent en une proportion de Firmicutes plus importante (332–335) à méthode identique tandis que les rations riches en concentrés favorisent les Bacteroidetes et les Proteobacteria (336). Cependant, quelques études ne trouvent pas de diminution de la proportion de ce phylum avec une augmentation de la proportion de concentrés, voire trouvent une augmentation de celle-ci (320, 337). Par ailleurs, à proportion de concentrés constante et à rapport énergie/protéines constant, la quantité d'aliment distribuée peut avoir une influence sur le microbiote des ovins comme le montre l'étude de Wang et al. (2017) qui montre une augmentation de la proportion de Firmicutes lorsque les rations ne suffisaient pas à couvrir les besoins des animaux (84 et 96% des besoins couverts d'après les chercheurs) et une augmentation de la proportion de Bacteroidetes et de Proteobacteria à mesure que la ration comblait voire excédait les besoins (108 et 120%) avec notamment 9 fois plus de Proteobacteria dans la ration 120% que dans la ration 84% (338).

Le lieu de prélèvement de l'échantillon peut, lui-aussi, avoir un impact sur les proportions de bactéries. Ainsi, l'étude menée par Cho et al. (2006) montre des différences considérables entre la partie liquidienne du contenu ruminal, la partie solide et l'épithélium ruminal avec une dominance nette des Bacteroidetes sur l'épithélium et des Firmicutes sur la partie fibreuse, tandis que le contenu liquidien comportait un équilibre de ces deux phyla avec une légère prédominance des Bacteroidetes (299).

Enfin, des effets individuels peuvent expliquer d'importantes variabilités. Ainsi dans les études de Yu et al. (2006) (333) et de Lopes et al. (2015) (330), un individu présentait une proportion forte de Proteobacteria comparativement aux autres individus de l'étude.

L'intégralité de ces influences (Figure 38) rendent difficile l'établissement d'une véritable méta-analyse du microbiote ruminal.

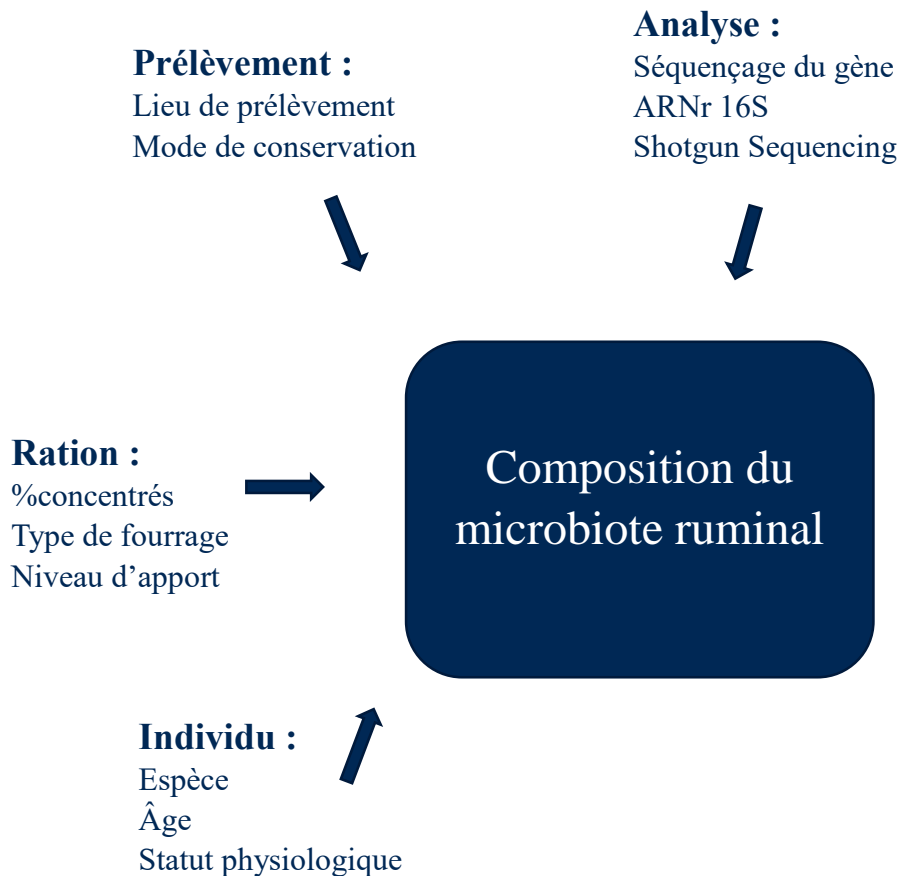


Figure 38 : Paramètres modifiant les proportions des différents phyla de l'écosystème bactérien ruminal.

Nous ne détaillerons dans la suite de ce paragraphe que les trois phyla bactériens majoritaires : Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria ; mais une vingtaine de phyla ont à ce jour été identifiés dans le rumen des ovins (275, 298) notamment les phyla Actinobacteria, Verrucomicrobia et Spirochaetes qui représentent souvent 1% de la communauté bactérienne ruminale chacun.

ii) Les Firmicutes

Les Firmicutes (du latin *firmus cutis*, « qui a la peau dure ») sont des bactéries colorées positivement à la coloration de Gram qui sert à différencier deux types de parois bactériennes. Les bactéries colorées positivement à la coloration de Gram possèdent une membrane plasmique et une paroi épaisse de peptidoglycanes tandis que les bactéries Gram – possèdent une couche de peptidoglycanes plus fine cernées de deux bicouches lipidiques. La principale différence entre le phylum des Firmicutes et celui des Actinobacteria réside dans la proportion de Guanine et de Cytosine dans leur génome, assez faible chez les Firmicutes et plus élevée chez les Actinobacteria.

Les Firmicutes sont subdivisés en cinq classes d'après le Catalogue of Life 2019 (339), dont la plus représentée dans les échantillons ruminiaux est la classe Clostridia (environ 90% des Firmicutes) qui compte l'ordre des Clostridiales dont les deux familles les plus représentées sont les Lachnospiraceae et les Ruminococcaceae (275, 334, 340). La classe des Bacilli qui compte les ordres des Bacillales et des Lactobacillales est la seconde classe de Firmicutes représentée dans le rumen (325, 338).

iii) *Les Bacteroidetes*

Les Bacteroidetes sont des bactéries Gram – en forme de bâtonnets retrouvés dans de très nombreuses espèces en tant que bactéries commensales du tube digestif. Le Catalogue of Life 2019 les subdivise en cinq classes dont la plus représentée dans les écosystèmes ruminiaux est la classe des Bacteroidia qui ne compte que l'ordre des Bacteroidales au sein duquel la famille la plus représentée est la famille des Prevotellaceae (341) et en particulier le genre Prevotella qui, à lui seul, représente près de la moitié des Bacteroidetes du rumen (275) et pouvant représenter jusqu'à plus de 10 à 30% des bactéries ruminales (143, 275, 330, 342). La proportion de Bacteroidetes peut même être plus importante comme dans l'étude de Lettat et al. (2012) (325) dans laquelle les brebis étaient en subacidose ruminale.

iv) *Les Proteobacteria*

Le phylum Proteobacteria regroupe des bactéries très protéiformes, c'est d'ailleurs cette caractéristique qui a donné son nom au phylum en référence au dieu grec Protée capable de multiples métamorphoses. Ces bactéries Gram – sont, pour la plupart mobiles grâce à la présence d'un flagelle, ce qui explique partiellement leur potentielle pathogénicité (332), mais certaines ne sont pas mobiles. Elles sont retrouvées dans de très nombreux environnements du fait du caractère micro-aérophile ou anaérobie facultative de certaines d'entre elles. Leur représentant le plus connu est *Escherichia coli*, une des bactéries les plus représentées dans le tractus digestif des humains.

Les Proteobacteria sont subdivisés en six classes mais seules cinq sont dotées de plus d'un représentant à l'heure actuelle (339, 343). Ces cinq classes, dont la nomenclature se compose des cinq premières lettres de l'alphabet grec, en préfixe à -proteobacteria, sont toutes présentes dans l'écosystème ruminal (275, 318). La plus représentée au sein du rumen est la classe des Gammaproteobacteria qui représente entre les deux-tiers et les trois-quarts des Proteobacteria selon les publications (275, 334) et qui regroupe les Aeromonadales comprenant la famille des Aeromonadaceae et la famille des Succinivibrionaceae (320, 330, 338) ou les Enterobacteriales qui compte pour seule famille les Enterobacteriaceae (330). Parmi les Alphaproteobacteria, le

genre *Phenylobacterium* (appartenant à la famille des Caulobacteraceae, de la l'ordre Caulobacterales) est le plus représenté d'après Kim et al. (2011) (275), parmi les Betaprotobacteria, c'est le genre *Aquabacterium* (famille des Comamonadaceae, ordre des Burkholderiales) (275, 330), parmi les Deltaproteobacteria, c'est le genre *Desulfovibrio* (famille des Desulfovibrionaceae, ordre des Desulfovibrionales); la classe des Epsilonproteobacteria, quant à elle, est assez peu représentée (275).

Les Proteobacteria, en proportion plus faible que les deux phyla les plus représentés, sont soumis à de fortes influences, notamment alimentaires. Ainsi l'étude de Belanche et al. (2019) a montré qu'au sein de la famille des Succinovibrionaceae, le genre *Ruminobacter* était plutôt favorisé par une alimentation riche en fourrages et le genre *Succinivibrio* par une alimentation riche en concentrés (320).

b) Les archées

Contrairement aux bactéries, les archées ne possèdent pas de peptidoglycane dans leur paroi mais de la pseudomuréine (dans le cas des genres *Methanobrevibacter* et *Methanobacterium*), ou d'autres hétéropolysaccharides ou protéines (344).

Les archées sont divisées en deux phyla dans le Catalogue of Life (339) : les Euryarchaeota et les Crenarchaeota mais seul le phylum des Euryarchaeota est retrouvé abondamment dans le rumen, tandis que les Crenarchaeota sont plus fréquemment trouvées dans les milieux extrêmes (275). Cependant l'étude métabolomique de Deusch et al. (2017) a identifié des protéines provenant de Crenarchaeota au sein du rumen (341).

Le phylum Euryarchaeota se subdivise en 8 classes, puis en 10 ordres (la majorité des classes ne comptent qu'un ordre avec pour unique exception la classe des Methanomicrobia subdivisée en 3 ordres) et en 29 familles répertoriées actuellement d'après le Catalogue of Life 2019 (339).

Toutes les classes d'Euryarchaeota ne sont pas représentées dans le rumen des ruminants. Ainsi, la grande majorité des séquences obtenues dans les diverses études appartiennent à 3 classes : Methanobacteria, Methanomicrobia et Thermoplasma (317, 341, 345, 346).

La quantité d'archées et la proportion des différentes classes d'archées sont assez stables d'après la méta-analyse de Henderson et al. (328) probablement du fait de leurs rôles métaboliques peu divers et leur diversité inférieure à celle des bactéries. Cependant elles peuvent dépendre de nombreux paramètres notamment du site de prélèvement dans le rumen, avec une abondance plus importante sur les particules et l'épithélium que dans la partie fluide

(347). La méthode de séquençage utilisée peut également avoir une incidence, ainsi dans l'étude de Snelling et al. (2014), certaines méthodes de séquençages ne permettaient pas d'identifier d'archées méthanogènes appartenant au phylum Thermoplasma tandis que d'autres indiquaient que ces dernières représentaient jusqu'à 13% de l'échantillon (348).

La revue de Naz Faridi et Khan (2019) avance que la communauté des archées méthanogènes ruminales des vaches et des chèvres est dominée par la classe Methanobacteriales tandis que celle des ovins serait dominée par la classe Methanomicrobiales (345). Cette affirmation est portée notamment par l'étude de Yanagita et al. (2000) dans laquelle sur les $2 \text{ à } 3 \times 10^8$ archées identifiées, 54% étaient assimilables à l'espèce *Methanomicrobium mobile* (appartenant à la classe des Methanomicrobiales), les autres archées étant globalement assimilables aux espèces *Methanobrevibacter ruminantium* et *Methanobacter smithii* (appartenant à la classe des Methanobacteriales) (322).

Enfin l'alimentation joue un rôle dans l'abondance et dans la diversité des archées méthanogènes du rumen avec une diversité supérieure pour les brebis au pâturage par rapport aux brebis nourries au foin et/ou aux concentrés (349).

Au sein du rumen, les populations d'archées semblent en interaction avec les autres microorganismes notamment avec les protozoaires (317, 344).

c) Les protozoaires

Il convient de noter que nous emploierons le terme « protozoaire » tout au long de cette thèse pour nous inscrire dans la continuité de la littérature scientifique mais que ce terme, qui a servi à désigner de très nombreux rangs taxonomiques au cours de l'histoire, est aujourd'hui un abus de langage lorsqu'il s'agit des microorganismes du rumen qui n'appartiennent pas, à proprement parler, au phylum Protozoa actuel.

Au cours de l'histoire, ce qui est actuellement considéré comme « protozoaire » a d'abord été classé parmi les animaux quand seuls deux règnes avaient été introduits : Animalia et Plantae, les bactéries et les champignons étaient à cette époque considérés comme appartenant au règne végétal justifiant l'appellation de « flore ruminale ». Dans le courant du XIX^{ème} siècle, le phylum du règne animal appelé Protozoa a été élevé d'un cran en termes de rang taxonomique devenant le troisième règne (350). Les règnes Fungi et Bacteria sont venus s'ajouter aux précédents dans la première moitié du XX^{ème} siècle puis Bacteria s'est subdivisé en Bacteria et Archaeobacteria à la suite des travaux de Woese et Fox (285) comme évoqué à la partie 2.I.C.3.a. Cependant ce n'est qu'en 1981 qu'apparaît le règne Chromista dans lequel les

chloroplastes incorporés lors de l'évolution se trouvent dans le lumen du réticulum endoplasmique granuleux ce qui les différencie des plantes grâce aux travaux de Cavalier-Smith et ses collaborateurs (351). C'est dans ce règne que se trouvent les microorganismes ruminiaux autrefois qualifiés de protozoaires.

Cependant, du fait de l'instabilité actuelle de la classification et de l'absence de correspondance nette entre les données taxonomiques et les données plus anciennes obtenues par identification directe qui est encore à ce jour le *Gold Standard* (352), nous conserverons dans ce paragraphe les noms de familles et de genres retrouvés dans la littérature jusqu'à ce jour.

La grande majorité des protozoaires du rumen appartiennent à deux familles : les Isotrichidae (comprenant les genres *Isotricha* et *Dastrycha*) et les Ophryoscolecidae (comprenant les genres *Entodinium*, *Epidinium*, *Diplodinium*, *Ophryoscolex* et *Polyplastron* notamment) (352, 353).

Les proportions des différents genres varient selon la méthode de mesure avec une sous-estimation probable des petits ciliés comme ceux du genre *Entodinium* et une sur-estimation des ciliés de grande taille comme ceux du genre *Epidinium* dont le volume est cinq fois plus important que celui des précédents (354).

L'espèce animale a également un impact important sur les proportions observées. Ainsi, dans l'étude menée par Henderson et al. (2015) sur une grande variété de ruminants, quelques genres comme *Entodinium* ou *Epidinium* étaient présents dans plus de 90% des échantillons quelque soit l'espèce ou la localisation géographique mais quelques genres comme *Enoplastron* ou *Ophryoscolex* étaient préférentiellement retrouvés chez des ovins et des bovins respectivement (328). De même, dans l'étude de Kittelman et al. (2015), les genres *Ostracodinium*, *Charonina* et *Metadinium* étaient préférentiellement retrouvés dans les échantillons issus du prélèvement sur bovin et les genres *Eudiplodinium* et *Dastrycha* plutôt dans les échantillons issus du prélèvement sur ovin (354).

L'alimentation est un des facteurs majoritaires d'influence sur les proportions des différents protozoaires dans le rumen. Ainsi, dans l'étude de Skillman et al. (2006), les ovins nourris avec une forte proportion de concentrés avaient une proportion de protozoaires appartenant au genre *Entodinium* de 95-99% (271) tandis que dans l'étude de Saro et al. (2013), l'augmentation de la quantité de fourrage diminue la proportion du genre *Entodinium* au profit des autres ciliés (355). Ces résultats sont confirmés par la méta-analyse de Belanche et al. (2019) (320).

Les nombreuses études de défaunation qui ont été réalisées dans le cadre des études sur la méthanogenèse ont montré que priver les ruminants de leurs protozoaires n'avait pas d'impact sur leur santé (352) et leur rôle est encore aujourd'hui controversé. La défaunation est associée avec une diminution de la digestibilité de la matière organique probablement due à la perte des endoglucanases et des xylanases synthétisées par les larges protozoaires de la famille des Ophryoscolicidae (*Epidinium*, *Polyplastron*, *Eudiplodinium*) entraînant une chute de la dégradabilité des NDF (Neutral Detergent Fiber, globalement représentatives des glucides pariétaux hors pectines) (352). Par ailleurs la disparition des protozoaires entraîne une chute de la quantité d'archées méthanogènes et l'augmentation de la diversité de celles-ci (356).

L'effet le plus important reporté par la méta-analyse de Newbold et al. (2015) est la diminution de l'abondance de certaines bactéries fibrolytiques, laissant supposer une collaboration symbiotique entre microorganismes fibrolytiques et la diminution plus drastique encore des champignons anaérobies (-92%) (352).

d) Les champignons

L'intégralité des champignons qui peuplent le rumen sont des champignons anaérobies stricts, qui possèdent par conséquent un hydrogénosome en lieu et place des mitochondries. Ils appartiennent presque tous à la classe Neocallimastigomycetes (embranchement Chytridiomycota dans le Catalogue of Life 2019 (339)). 6 genres ont été répertoriés par Fliégrova et al. (2015) : *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Orpinomyces* et *Cyllamyces* (357).

Ces champignons, capables de développer des réseaux de rhizoïdes afin de pénétrer les substrats végétaux, possèdent l'arsenal enzymatique nécessaire à la dégradation des glucides pariétaux. Leur apparence en microscopie explique qu'ils aient longtemps été classés parmi les protozoaires flagellés (357).

À nouveau, l'espèce de ruminant semble avoir une importance dans les proportions des différents genres suscités avec une dominance d'*Anaeromyces* et *Orpinomyces* dans le rumen des bovins (358) et de *Neocallimastix*, et *Caecomyces* dans celui des ovins (327). Cet effet espèce doit cependant être considéré avec précaution puisqu'il peut être confondu avec un effet régime tel que démontré par Belanche et al. (2019) avec une plus forte proportion de *Neocallimastix* et d'*Anaeromyces* chez les ovins nourris avec des rations riches en concentrés et une plus forte proportion de champignons appartenant aux embranchements Ascomycota et

Basidiomycota ainsi qu'aux genres *Orpinomyces*, *Feramyces* et *Pecoramyces* de l'embranchement Chytridiomycota chez les ovins au pâturage (320).

II) Relations entre le parasitisme et le microbiote des ovins

A) Leviers d'action de l'infestation parasitaire sur le microbiote

L'infestation parasitaire peut avoir des effets directs et indirects sur le microbiote de l'animal parasité. D'une part, l'infestation parasitaire est responsable d'une diminution de l'ingestion (359) d'aliment dont on a vu précédemment qu'elle était responsable de modifications importantes du microbiote, notamment bactérien (338). D'autre part, l'action pathogène de certains parasites modifie l'environnement digestif dans une certaine mesure et la modification des conditions physico-chimiques entraîne des changements d'abondances et de diversité microbiennes (359–361). Par ailleurs, en se nourrissant dans le tube digestif, les vers ingèrent certains microorganismes.

La modification du microbiote par l'infestation parasitaire n'est pas spécifique aux ruminants et elle a été particulièrement étudiée en médecine humaine où de très nombreuses tentatives d'expliquer des maladies à l'aide des proportions et abondances de microorganismes digestifs fleurissent depuis les deux dernières décennies (362). De même une étude menée par Li et al. (2012) montre que l'infestation de cochons par *Trichuris suis* explique 13% de la variabilité en termes de composition et 26% de la variabilité en termes d'activité du microbiote du côlon proximal (363).

Le parasitisme peut avoir une action sur le microbiote à plusieurs niveaux du tube digestif et il est légitime de penser que ces actions pourraient être réciproques et que le microbiote ait un rôle à jouer dans l'établissement et la reproduction des parasites au sein de l'hôte.

B) Infestation par *Haemonchus contortus* et microbiote abomasal ovin

L'infestation par *Haemonchus contortus* est associée avec une augmentation du pH abomasal chez les ruminants infestés. Ainsi, dans l'étude menée par Li et al. (2016), le pH abomasal de chèvres infestées avec 5000 larves L3 était de 4,5 contre 3 pour les chèvres non infestées (359). Le même phénomène a été observé avec les moutons de l'étude d'El-Ashram et al. (2017)(364). Or, l'augmentation du pH abomasal a été corrélée avec une augmentation de la densité bactérienne au sein de l'abomasum (361, 364, 365). Au contraire la population archéale semble moindre lorsque le pH abomasal augmente (359, 364). L'étude de Li et al. (2016) montre une augmentation de la proportion de bactéries appartenant au phylum Actinobacteria dans la caillette des animaux infestés par rapport aux animaux contrôles (359) ce qui semble en accord avec l'étude contemporaine de Tirabassi et al. (2016) dans laquelle les brebis sélectionnées pour

leur sensibilité à l'infestation connaissent eux-aussi cette augmentation de proportion des bactéries appartenant au phylum Actinobacteria contrairement aux animaux sélectionnés pour leur résistance moins sévèrement infestés (366). La sévérité de l'infestation était également associée à une chute de la proportion de Firmicutes et de Bacteroidetes au profit des Proteobacteria dans cette même étude (366) rapprochant le microbiote des ovins de celui des parasites récupérés dans la caillette d'animaux infestés. Ce rapprochement semble logique étant donné que les vers, bien que se nourrissant de sang, ingèrent également du fluide abomasal (367, 368).

Enfin l'étude de El-Ashram et al. (2017) indique que l'infestation par *Haemonchus contortus* est responsable d'une augmentation de la diversité alpha exprimée par le nombre d'espèces observées, le Chao-1 ou les indices de Shannon et Simpson par rapport aux contrôles en particulier dans les premiers jours de l'infestation (364).

C) Infestation par *Haemonchus contortus* et microbiote intestinal ovin

Une étude réalisée par Al-Mamun (2017) sur la flore fécale de brebis infestées ou non par *Haemonchus contortus* a montré des différences de réponses du microbiote à l'infestation selon les animaux catégorisés à partir de leur EFO et de leur hématoците comme sensible ou résistants (369). Les modifications de microbiote fécal étaient plus importantes chez les animaux portant une lourde charge parasitaire que chez les animaux dont la charge parasitaire était moindre. Par ailleurs, les animaux sensibles et résistants étaient séparés par une analyse multivariée et la composition du microbiote fécal des animaux sensibles ressemblait, après infestation, davantage à celui des animaux résistants avant infestation. Ainsi, avant infestation, les moutons, qui après infestation auraient une lourde charge parasitaire (moutons sensibles) présentaient davantage de Bacteroidetes et surtout de Proteobacteria et moins de Firmicutes que les moutons résistants. La composition du microbiote fécal est probablement plus proche de celle du tractus digestif distal que de celle du rumen (265) mais on retrouve dans les parties distales du tube digestif les tendances qui se dégageaient déjà dans l'abomasum (364, 369).

Comme cela avait été observé par Li et al. (2016) sur les caillettes de chèvres, l'infestation parasitaire semble augmenter la diversité du microbiote fécal des ovins. Cela est probablement dû à une instabilité laissant des niches vacantes pour l'installation de bactéries non classiquement retrouvées (369).

D) Infestation par *Haemonchus contortus* et microbiote ruminal ovin

Si l'on s'attendait à ce que le microbiote abomasal soit impacté par l'infestation par *Haemonchus contortus* et que le microbiote fécal soit affecté lui-aussi en conséquence, les modifications du microbiote ruminal sont plus difficilement explicables par la biologie du parasite. En effet, au sein du rumen, le parasite se trouve à l'état de larve L3 engainée dans l'exuvie de la larve L2, elle ne se nourrit pas et ne sort de l'exuvie que peu de temps avant la sortie du rumen. On peut de fait supposer que l'effet du parasite sur le microbiote soit limité. Cela justifie la très faible quantité d'articles publiés sur ce sujet (41, 42).

En revanche, il n'est pas aberrant d'envisager que le microbiote pourrait, lui, avoir un rôle à jouer dans le cycle de vie du parasite en défavorisant le dégainement de la larve L3 par exemple (41, 42).

L'étude d'El-Ashram et al. (2017) (367) montre une augmentation passagère du pH ruminal pendant les premiers jours post-infestation en lien avec une augmentation transitoire de la proportion de Firmicutes à 7 jours post-infestation et une diminution concomitante et probablement liée de la proportion de Bacteroidetes. Les Proteobacteria, quant à eux, connaissent une augmentation de leur proportion relative importante représentant jusqu'à 15% des bactéries ruminales des animaux infestés (364) 50 jours post-infestation. L'infestation parasitaire s'accompagne d'une diminution de l'abondance des bactéries et des archées méthanogènes au niveau du rumen dans cette même étude.

Il existerait des interactions multiples entre pH ruminal, dégainement des larves L3 et microbiote mais ces interactions n'ont pas été investiguées à ce jour.

L'objectif de la partie expérimentale de cette thèse est de rechercher un lien entre le microbiote ruminal et la résistance à l'infestation parasitaire sur des animaux en période péri-partum, donc de relâchement immunitaire recevant une ration couvrant ou non leurs besoins en protéines.

Partie 3 : Étude de l'impact de la sélection génétique pour la résistance à *Haemonchus contortus* sur le microbiote ruminal de brebis périparturientes et sur son activité.

I) Présentation de l'étude

L'étude que j'ai menée dans le cadre de cette thèse fait partie du projet européen SusTradeOff dont le principal but est de comprendre l'allocation des protéines entre la production et la réponse immunitaire chez les moutons en fonction de leur génétique, de leur stade de production, de leur statut vaccinal et parasitaire et de la quantité de protéines présentes dans leur ration. En particulier, notre étude a été menée en parallèle d'un essai visant à établir la répartition de l'allocation protéique entre la production et la réponse immunitaire autour de la gestation chez des brebis sélectionnés génétiquement pour leur résistance ou leur sensibilité à l'infestation par *Haemonchus contortus* et recevant une ration plus ou moins riche en protéines.

Nous avons profité de cet essai pour essayer d'évaluer l'impact de la sélection génétique pour la résistance aux helminthes et de la quantité de protéines de la ration sur le microbiote ruminal et son activité afin de mieux comprendre la mise en place de ladite résistance et à terme d'affiner la sélection.

II) Matériel et Méthodes

A) Éthique des essais sur animaux

Les animaux ont été utilisés conformément au décret 2013|118, dans un établissement utilisateur agréé et après une autorisation du projet par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sur avis d'un Comité d'Éthique en Expérimentation Animale, référencée sous le numéro APAFIS#12413-2017120116111851 v5.

B) Animaux

A l'issue d'une première phase visant à sélectionner des brebis primipares selon leur résistance génétique à *Haemonchus contortus* (un nématode hématophage de la famille des Trichostrongylidae), 48 brebis gestantes, choisies par rapport à leur taille de portée (2 ou 3 agneaux) et leur résistance (R, n= 24) ou leur sensibilité (S, n= 24) à *Haemonchus contortus*, ont été réparties en deux lots recevant une ration couvrant 70-80% de leur apport recommandé en protéines (LP, n= 24) ou 120-130% de leur apport recommandé en protéines (HP, n= 24) (Tableau 8) selon les recommandations INRA 2007 (227). La répartition en lots a été faite de façon à avoir un même nombre d'agneaux par portée en moyenne et un même poids vif dans

les différents lots au démarrage de l'essai. Les animaux étaient hébergés sur le site de La Sapinière appartenant à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).

Tableau 8: Répartition des animaux en fonction de leur lignée de provenance et du niveau protéique de leur ration selon les recommandations INRA 2007 (227).

Lignée/Régime	120% des apports recommandés en PDI (HP)	70% des apports recommandés en PDI (LP)
Résistante (R)	12	12
Sensible (S)	12	12

C) Régimes

La composition des régimes est détaillée dans les Tableaux 9 et 10 (des précisions sur les ingrédients figurent en Annexe 1). Les rations ont été adaptées aux besoins nutritionnels des animaux aux différentes périodes. Les animaux ont ainsi consommé trois régimes différents selon que les brebis étaient gestantes, en préparation à l'agnelage (2 semaines avant la mise-bas) ou en début de lactation. Les 3 rations ont été formulées pour couvrir les besoins des animaux, à l'exception des protéines pour le groupe LP, et pour que les rations des groupes LP et HP ne diffèrent que par leur taux de couverture des besoins en protéines. Les concentrés ont été distribués à l'aide d'un distributeur automatique de concentrés (DAC). Les quantités présentées dans le Tableau 9 sont des quantités estimées. Les consommations effectives sont en cours de traitement et seront corrélées aux mesures réalisées sur les animaux dans une étude ultérieure.

D) Infestation

La première infestation (J0) a été faite avec 2000 larves L3 puis les animaux ont été infestés avec 1000 larves L3 d'*Haemonchus contortus* toutes les semaines jusqu'à J52 soit 8 infestations au total (Figure 39). Les larves ont été cultivées à partir d'œufs récupérés par dissection de femelles *Haemonchus contortus* puis comptés de façon indépendante sur lame de Mac Master par trois expérimentateurs. *Haemonchus contortus* est un parasite de la caillette des ruminants. La contamination naturelle se fait également par ingestion de larves L3, lesquelles vont perdre leur exuvie dans le rumen avant d'entrer dans la caillette où elles mueront en larves L4 avant de s'enkyster (hypobiose) ou de muer en larves L5 puis en adultes.

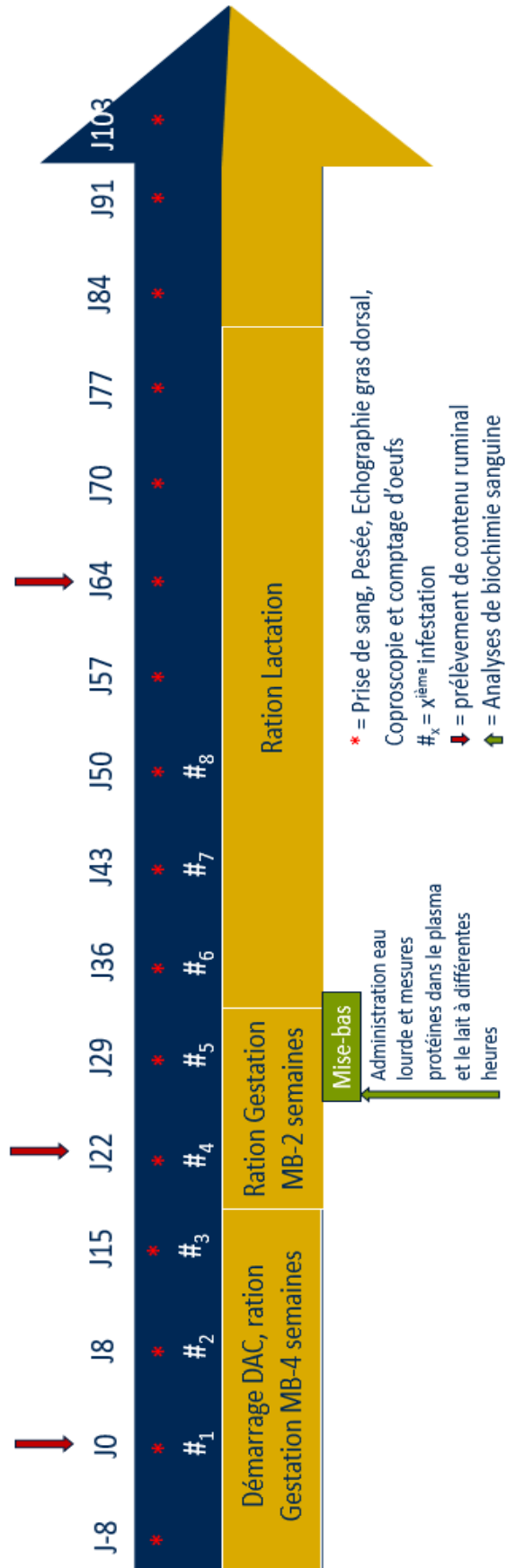


Figure 39: Schéma explicatif du protocole expérimental.

Tableau 9: Constitution des six différents régimes utilisés au cours du protocole (apports estimés d'après INRA 2007) (227).

Période	Composition	Rations 120% des apports recommandés en PDI (HP)	Rations 70% des apports recommandés en PDI (LP)
4 semaines avant Mise-Bas (durée : 31 jours)	Estimation consommation Paille/Concentrés (kg)	0,7 / 1,030	0,7 / 0,995
	Couverture effective des besoins en PDI (% apports recommandés)	120	72
	% fourrages dans la ration	41	41
2 semaines avant Mise-Bas (durée : 14 jours)	Estimation consommation Paille/Concentrés (kg)	0,67 / 1,790	0,67 / 1,792
	Couverture effective des besoins en PDI (% apports recommandés)	124	83
	% fourrages dans la ration	27	27
Début de Lactation (durée : 42 jours)	Estimation consommation Paille/Concentrés (kg)	0,93 / 2,454	0,93 / 2,558
	Couverture effective des besoins en PDI (% apports recommandés)	126	75
	% fourrages dans la ration	27	27

Tableau 10 : Composition nutritionnelle des concentrés (% massique de la matière sèche).

Période	Rations 120% des apports recommandés en PDI (HP)	Rations 70% des apports recommandés en PDI (LP)
4 semaines avant Mise-Bas (durée : 31 jours)	Protéines brutes (27,9) Matières grasses (1,6) Cellulose brute (4,9) Cendres brutes (6,8)	Protéines brutes (14,5) Matières grasses (1,7) Cellulose brute (4,8) Cendres brutes (5,4)
2 semaines avant Mise-Bas (durée : 14 jours)	Protéines brutes (20,9) Matières grasses (1,7) Cellulose brute (5) Cendres brutes (4,8)	Protéines brutes (13,4) Matières grasses (1,7) Cellulose brute (4,9) Cendres brutes (4)
Début de Lactation (durée : 42 jours)	Protéines brutes (17,9) Matières grasses (1,7) Cellulose brute (4,9) Cendres brutes (5)	Protéines brutes (11,1) Matières grasses (1,7) Cellulose brute (4,9) Cendres brutes (4,4)

E) Prélèvements et mesures

Des prélèvements de fèces ont été réalisés toutes les semaines entre le début de l'expérience noté (J0) et la fin de l'expérience 15 semaines plus tard (J103). En parallèle de cela des prélèvements de sang ont également été réalisés toutes les semaines afin de mesurer l'hématocrite des animaux. Trois prélèvements de contenu ruminal ont été réalisés par voie orale, à l'aide d'une sonde gastro-œsophagienne et d'une pompe. Le premier prélèvement a été fait au démarrage de l'expérimentation (J0), le 2^{ème} en fin de gestation à J22 soit juste avant la 4^{ème} infestation et enfin le 3^{ème} à J64 en début de lactation. Les prélèvements de contenu ruminal ont été répartis ainsi : 2 fois 5 mL dans 2 tubes en polypropylène contenant 0,2mL d'une solution à 25% (v/v) d'acide sulfurique concentré, pour la mesure des paramètres fermentaires (AGV et N-NH₃), et 2 fois 1 mL dans des microtubes de 2mL certifiés sans ADNase ni ARNase pour la caractérisation du microbiote ruminal. Après prélèvement les tubes ont été congelés immédiatement et conservés à -20°C pour les AGV et N-NH₃ et à -80°C pour le microbiote.

Par ailleurs, chaque semaine, les animaux étaient pesés et leur épaisseur de gras dorsal était mesurée par échographie. Enfin, une administration par voie orale d'une dose d'eau lourde (²H₂O) a été réalisée à J19 ainsi qu'au moment de l'agnelage. Après cette administration, des prélèvements sanguins réguliers 6h, 12h, 24h, deux jours, quatre jours et huit jours sur tube EDTA ont été effectués afin de suivre la synthèse de novo de protéines incorporant le deutérium à partir des protéines alimentaires. Après l'agnelage, des prélèvements de lait ont été réalisés en même temps que les prélèvements de plasma. À J19 et à l'agnelage, un prélèvement de sang sur héparine a été réalisé pour préciser le statut métabolique des animaux.

F) Dosages sanguins

Les dosages sanguins ont été réalisés à la Royal (Dick) School of Veterinary Studies à Édimbourg avec un analyseur AU480 (Beckman Coulter, Brea, États-Unis d'Amérique). Le bêta-hydroxybutyrate (BOHB), synthétisé dans le foie à partir d'acétyl-coenzyme A (AcétylCoA) en cas de déficit énergétique a été dosé pour préciser le statut énergétique des animaux. L'urée, l'albumine et les protéines totales sanguines ont été mesurées afin d'évaluer le statut protéique. Les globulines ont été déduites de la concentration en protéines totales et de celle de l'albumine par simple soustraction.

G) Coproscopies

Des coproscopies ont été réalisées au laboratoire de Parasitologie de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) à partir des matières fécales recueillies. Les œufs de nématodes ont été comptés d'après la méthode décrite en Figure 11.

H) Étude du contenu ruminal

1) Évaluation des produits de fermentation microbienne

Les AGV du contenu ruminal ont été dosés avec un chromatographe en phase gazeuse (7890A, Agilent Technologies, Santa-Clara, États-Unis d'Amérique) muni d'un détecteur à ionisation de flamme, après préparation des échantillons. Une centrifugation des échantillons à 2880 g à 4°C pendant 20 minutes a tout d'abord permis d'éliminer les particules grossières. Puis 1 mL de surnageant a été transféré dans un microtube contenant 200 µL d'acide métaphosphorique à 25% (p/v) avant d'être centrifugé à 20 000 g à 4°C pendant 15 min. Ensuite, 100 µL du surnageant ainsi obtenu ont été transférés dans un flacon d'injection contenant 75 µL d'étalon interne (acide 4-méthylvalérique à 0,2% (v/v)), et 900 µL d'eau ultrapure. La séparation a été réalisée à l'aide d'une colonne en DB-FFAP (réf. 125-3232, Agilent Technologies, Santa-Clara, États-Unis d'Amérique) avec un injecteur à 250°C et à débit de diazote constant (4mL/min).

La concentration en azote ammoniacal (N-NH₃) dans le contenu ruminal a été mesurée par spectrophotométrie à 660 nm après réaction avec du salicylate de sodium et formation d'un indophénol bleu en milieu alcalin et fournisseur d'ions chlore (dichloroisocyanurate de sodium), d'après la méthode de Verdouw (370). Après décongélation les échantillons ont été centrifugés à 2880 g à 4°C pendant 20 min avant que le surnageant ne soit prélevé et dilué au 20^{ème}. Enfin, une analyse colorimétrique sur un spectrophotomètre (SAN++, Skalar, Pays-Bas) en continu à flux segmenté a été réalisée.

2) Étude du microbiote ruminal

L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit « ZR-96 Soil Microbe DNA Kit » (Zymo Research, Irvine, États-Unis d'Amérique). Après décongélation, 85 µL de phase liquide de rumen ont été prélevés et introduits dans un puits de lyse dans lequel ont été ajoutés 400 µL de « BashingBead Buffer » avant broyage à l'aide de microbilles pendant 15 min à 30 Hz dans un broyeur MM400 (Retsch, Haan, Allemagne). À la sortie du broyeur les échantillons ont été centrifugés à 4500 g pendant 5 min avant transfert de 230 µL de surnageant dans une plaque 96-puits dont les puits avaient été préalablement chargés avec 750 µL de « Genomic Lysis Buffer ». Cette nouvelle plaque a été agitée puis centrifugée à 4500g pendant 5 minutes. Le surnageant a alors été transféré dans une plaque « Silicon-ATM Plate » montée sur une plaque

de récupération. L'ensemble a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 4500 g. Ensuite 200 µL de « DNA Pre Wash Buffer » ont été ajoutés aux puits de la « Silicon-A™ Plate » qui a ensuite été centrifugée à 3000g pendant 5 min avant adjonction de 500 µL de « DNA Wash Buffer » et une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. Enfin, 50 µL de « DNA Elution Buffer » ont été ajoutés à la plaque qui a été centrifugée à exactement 3500 g pendant 3 min. Enfin la « Silicon-A™ Plate » a été montée sur « Silicon-A HRC™ Plate » préalablement réhydratée, elle-même montée sur une « Elution Plate » pour élution finale par centrifugation à 3500 g pendant 3 min.

Par la suite, l'« Elution Plate » a été centrifugée pendant 1 min à 1000 g. Après une dilution au 100^{ème} dans de l'eau pour préparation injectable, une seconde centrifugation de 1 min à 1000 g a été réalisée puis 1 µL de solution contenant l'ADN a été ajouté à 49 µL de mix pour PCR1 MiSeq. Les amorces utilisées permettaient la polymérisation d'une partie ciblée du gène de l'ARN 16S - afin de n'avoir que des bactéries - plus précisément la région hypervariable V3-V4 (5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG, « forward » et 5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT, reverse » ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, États-Unis d'Amérique). La plaque a ensuite été placée dans un Thermocycleur « Uno-96 » (OZYME, Saint-Cyr-l'École, France) avec le programme suivant : 30 cycles de trois étapes d'une minute (dénaturation à 94°C, hybridation à 65°C, extension à 72°C). À l'issue de la PCR, la plaque 96-puits a été centrifugée une minute pour faire retomber la condensation.

La présence et la qualité de l'ADN ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose avec tampon TBE (Tris, Borate, EDTA). Les échantillons ont ensuite été apportés à la plateforme de séquençage GeT-PlaGE de Toulouse. Une deuxième PCR a alors été réalisée sur les échantillons en utilisant des amorces contenant des séquences marquant nos différents échantillons et agissant donc comme un code-barres spécifique à chaque échantillon. À l'issue de cette polymérisation en chaîne l'ensemble des échantillons a été groupé et séquencé sur un séquenceur Miseq^{MC} d'Illumina® (San Diego, États-Unis d'Amérique).

I) Analyse bio-informatique

Les lectures obtenues de 250 nucléotides chacune ont été traitées à l'aide du logiciel FROGS (371). Une première étape consiste à assembler les lectures obtenues avec les amorces « forward » et « reverse » afin d'obtenir des séquences plus longues. Puis une deuxième étape supprime les séquences ne contenant pas les bonnes amorces, celles contenant des bases ambiguës dues à des défauts de séquençage et les séquences ne correspondant pas aux longueurs attendues. Ces deux étapes sont qualifiées de Pré-Process.

L'étape suivante consiste en l'agglomération des séquences en clusters en fonction de leur degré d'identité par Swarm (372) qui présente l'avantage de ne pas être influencé par l'ordre de lecture des séquences et de ne pas avoir de seuil arbitraire (Figure 40).

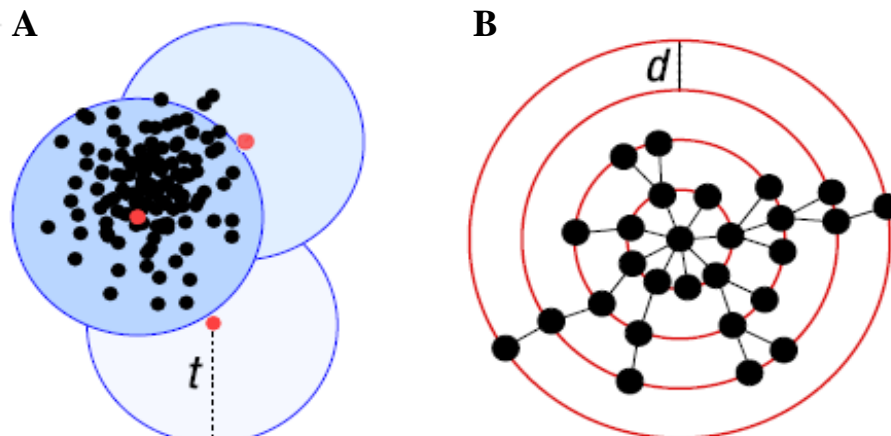


Figure 40 : (A) Méthode classique de clustering reposant sur une distance seuil à partir d'un centroïde calculé à partir des séquences ; (B) Méthode Swarm développée par Mahé et al. (372) reposant sur la constitution pas-à-pas d'un réseau à partir de différences simples entre séquences.

Cette constitution de clusters permet de réduire les artefacts inhérents aux méthodes utilisées. S'ensuit une étape de nettoyage des chimères, c'est-à-dire des séquences pour lesquelles un fragment d'ADN dont la polymérisation n'a pas abouti sert d'amorce au cycle suivant (Figure 41). Plusieurs méthodes existent pour l'élimination des chimères. Il est possible par exemple de comparer la séquence avec les séquences d'une base de données et de fixer un seuil à partir duquel si une séquence ressemble plus à un assemblage d'éléments de la base de données qu'à une entité simple, elle sera considérée comme chimère (373). L'approche utilisée par FROGS consiste en une validation croisée, une séquence ressemblant à une chimère ne sera considérée

comme chimère que si les fragments composants l'hybride appartiennent à des séquences effectivement présentes dans l'échantillon (371).

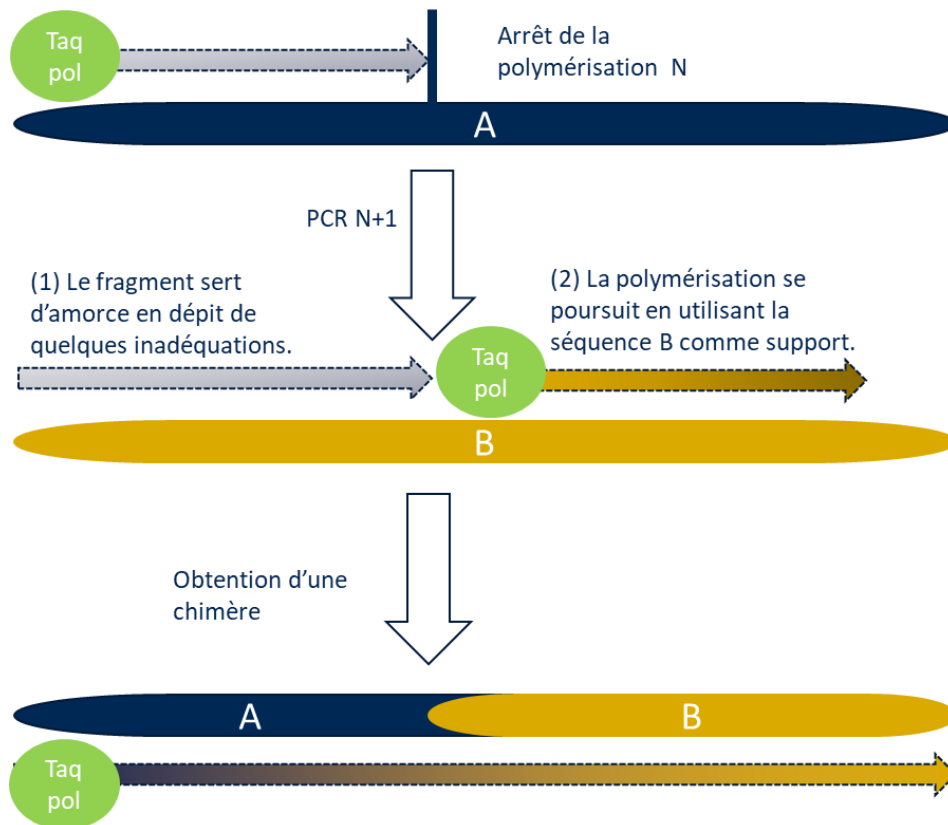


Figure 41 : Schéma explicatif de la chimérisation lors d'une polymérisation en chaîne.

L'application de filtres sur les clusters permet de se débarrasser de l'excès de singletons de séquences ou de clusters inhérent aux techniques de polymérisation et de séquençage. Il existe plusieurs façons de limiter les erreurs. Bokulich et al. (374) recommandent l'utilisation d'un seuil à 0,005%. Cela signifie que des clusters représentés par moins de 0,005% du total des séquences seront supprimés et considérés comme artéfactuels. Cette filtration élimine une grande majorité des clusters. D'autres filtres sont également appliqués, notamment la présence du cluster dans une banque de contaminants identifiés ou la présence du cluster dans un unique échantillon.

Enfin les clusters obtenus sont affiliés grâce aux données taxonomiques contenues dans la banque de données SILVA (version 132) (Figure 41). Ils sont alors qualifiés d'Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU).

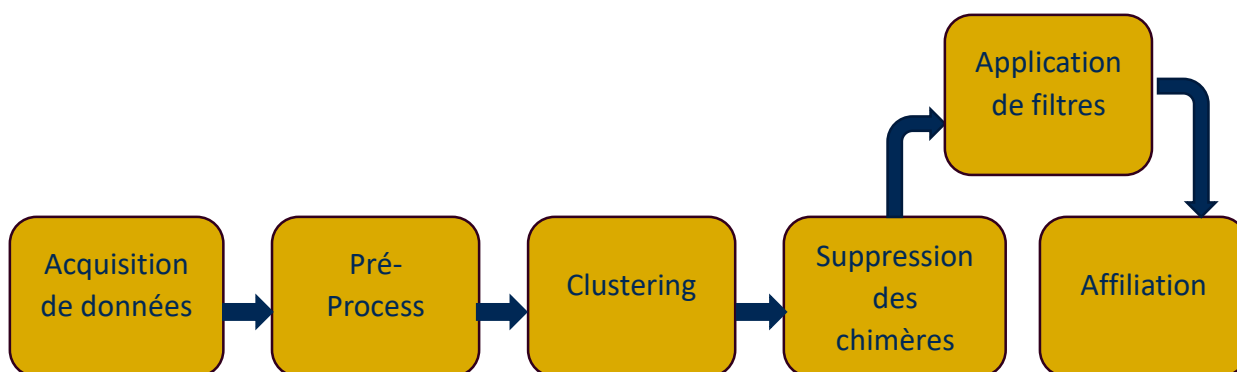


Figure 42: Représentation du pipeline utilisé dans le logiciel FROGS.

La version détaillée de ce pipeline ayant été publiée dans l'article d'Escudié et al. (2018) figure en Annexe 3 (371).

J) Analyses biostatistiques

Les concentrations en AGV mesurées ont été ramenées à des proportions molaires représentant un profil molaire en AGV. De la même manière les clusters identifiés après le séquençage ont été exprimés en abondances relatives et les analyses statistiques sur le microbiote ont été effectuées sur des abondances relatives au total des clusters observés pour un échantillon afin de normaliser les résultats.

Des indices d'alpha-diversité ont été calculés à l'aide de la fonction diversity du package Vegan de R. L'indice de Gini-Simpson (Figure 41) a été privilégié car il permet d'exprimer la diversité en donnant une importance plus importante aux clusters majoritaires contrairement à l'indice de Shannon qui risquerait d'être biaisé par le filtre de Bokulich. Cet indice permet également de classer les diversités par ordre croissant contrairement à l'indice de Simpson qui décroît à mesure que la diversité augmente.

$$\text{Indice de Gini - Simpson} = {}^2H = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

P_i : probabilité d'obtention du taxon i

S : nombre de taxons total de l'environnement

Figure 43 : Formule de l'indice d'alpha-diversité de Gini-Simpson.

Les différents produits des fermentations ruminales, ainsi que les abondances relatives des différents niveaux taxonomiques ont été analysés à l'aide d'un modèle linéaire à effet mixte avec l'animal en effet aléatoire niché dans l'effet lignée (Figure 4) afin de prendre en compte les mesures multiples. Les modèles ont été soumis à des ANOVA de type 3, le modèle a été réduit au maximum en ôtant les paramètres non significatifs. Lors des comparaisons entre deux niveaux d'un unique facteur, des tests de Student ont été réalisés.

$$Y = \text{lmer}(\text{Lignée} * \text{Période} * \text{Teneur protéique de la ration} + (1|\text{Animal})/\text{Lignée})$$

Figure 44 : Modèle Linéaire employé pour les analyses de métabolites microbiens et les abondances relatives en différents niveaux taxonomiques.

Une Analyse en Composantes Principales parcimonieuse (sPCA pour sparse Principal Component Analysis) et une Régression des moindres carrés partiels discriminante (sPLS-DA pour sparse Partial Least-Square Discriminant Analysis) ont été réalisées à l'aide du package MixOmics de R pour avoir une vision globale des populations microbiennes prélevées dans les jus de rumens. Ces deux analyses ont été choisies au regard du nombre d'observations (OTU) par rapport au nombre d'échantillons. Ainsi, en choisissant les analyses parcimonieuses, les composantes deviennent des combinaisons linéaires d'un nombre plus restreint de variables explicatives aux dépens de la stricte orthogonalité de ces composantes ce qui permet de renforcer la variabilité expliquée par ces composantes. La régression PLS (Partial Least Squares) permet de maximiser la part de variation attribuable à une variable explicative donnée. L'utilisation d'une régression PLS discriminante (PLS-DA) est adaptée à l'explication d'une variable qualitative à plusieurs niveaux (transformée en autant de variables indicatives) par un grand nombre de variables explicatives.

Les graphiques ont été obtenus par utilisation du package ggplot dans le logiciel R.

III) Résultats

A) Vérifications du modèle expérimental

1) Divergence des lignées

Pour vérifier l'exploitabilité des résultats obtenus au cours de l'expérimentation, il nous fallait d'abord nous assurer de la divergence réelle des individus appartenant aux lignées résistante et sensible. Les données d'hématocrite et l'excrétion fécale d'œufs ont été récoltées dans le cadre de la thèse universitaire de Sophie Aguerre (non publié).

Les résultats issus du comptage d'œufs de nématodes dans les fèces révèlent une différence significative attendue des lignées à partir de J56 et jusqu'à J103 (Figure 45). Aucun œuf n'a été observé avant l'infestation ni dans les premiers jours suivant celle-ci. L'apport en protéines n'a pas d'effet significatif sur l'excrétion d'œufs hormis une excrétion plus précoce chez les animaux sensibles nourris avec une ration couvrant seulement 70% de leur apports recommandés en PDI par rapport aux animaux sensibles dont les apports recommandés étaient couverts à 120%. Les hématocrites des brebis prélevées toutes les semaines révèlent une différence significative entre les deux lignées au cours de l'infestation à partir de J56 (Figure 46) témoignant d'une meilleure résilience des animaux de la lignée résistante (R). En effet, le retour à une valeur subnormale de l'hématocrite est plus rapide pour les animaux de la lignée R que pour les animaux de la lignée S. À partir de J70, l'hématocrite des animaux de la lignée S se rapproche de celui des animaux de la lignée R et on peut supposer que la différence s'estompe avec le temps post-infestation.

Les mesures d'albuminémie réalisées sur les prélèvements sanguins peuvent également permettre d'obtenir un aperçu de la résilience des animaux. *Haemonchus contortus* se nourrit de sang et est responsable de fuites protéiques au niveau abomasal ce qui oblige l'organisme des ovins à compenser par augmentation de la synthèse d'albumine. En l'occurrence, aucune différence n'a été observée entre les deux lignées en termes d'albumine, ni pendant la gestation ($p=0,34$) ni au moment de l'agnelage ($p=0,93$).

Au départ du projet aucune différence n'existait en termes de poids corporel entre les brebis des deux lignées, cette absence de différence significative entre les lignées s'est maintenue tout au long de la gestation et de la lactation. Aucune différence significative n'a été observée entre les lignées quant au poids de portée estimé par soustraction entre la dernière pesée pré-agnelage et la pesée suivant immédiatement l'agnelage ($p=0,4$).

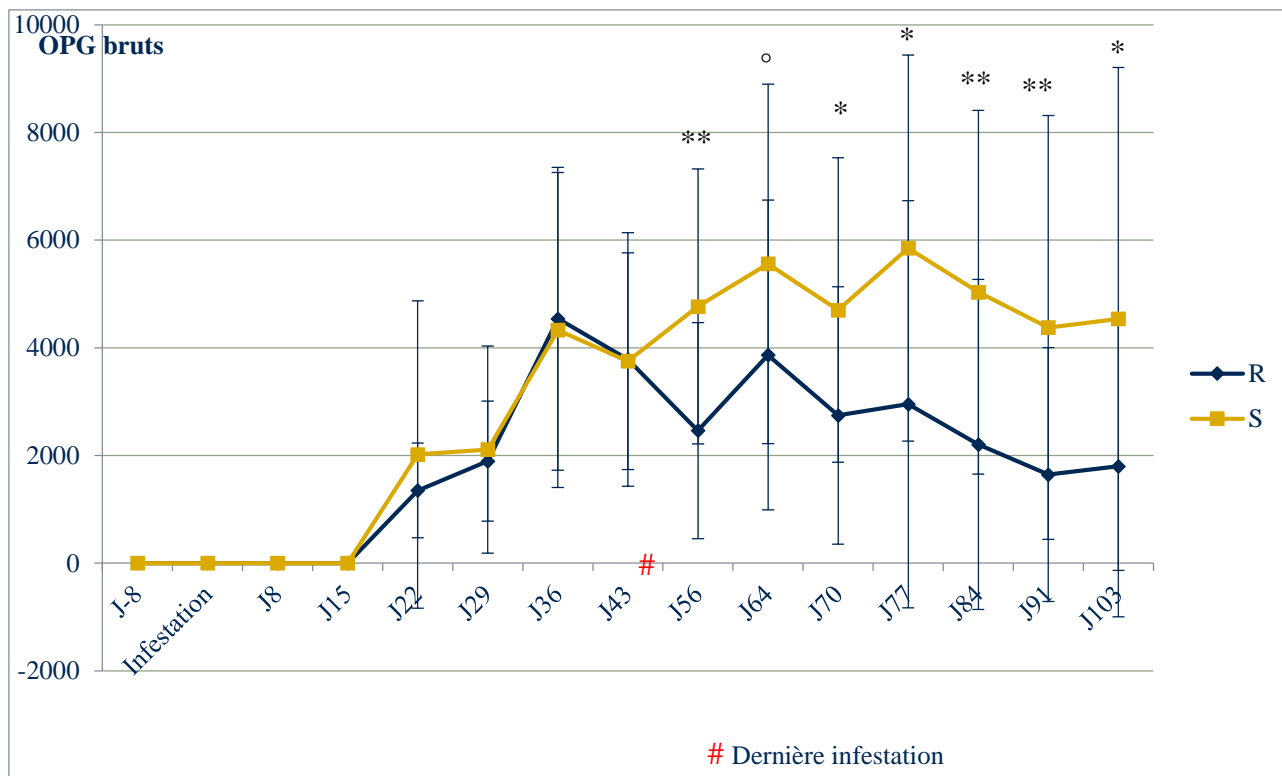


Figure 45 : Excrétion fécale d'oeufs de nématodes chez les brebis génétiquement sélectionnées pour leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) à l'infestation par *Haemonchus contortus* ($^{\circ}p < 0,1$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$)

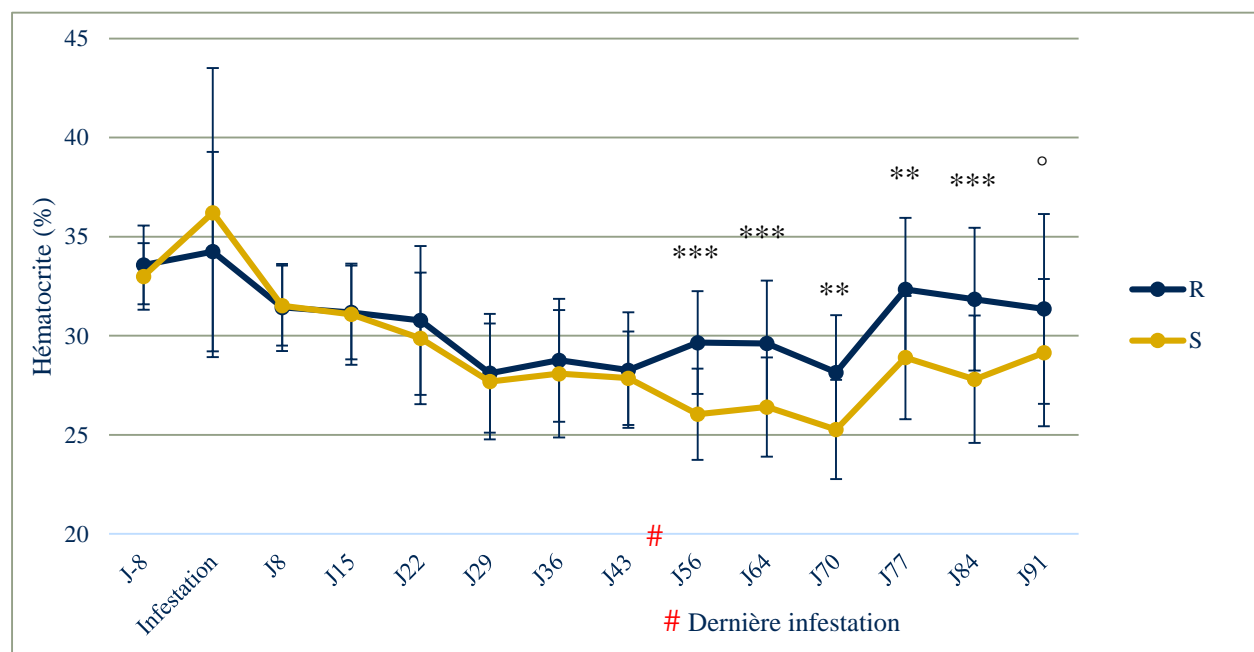


Figure 46 : Hématocrite des brebis génétiquement sélectionnées pour leur résistance (R) ou leur sensibilité (S) à *Haemonchus contortus* ($^{\circ}p < 0,1$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$)

2) Effets de la ration sur les paramètres sanguins

Les différentes rations utilisées au cours de cette expérimentation ont été calculées de façon à être iso-énergétiques, contenir la même proportion de fibres et ne varier que pour le pourcentage de couverture des besoins protéiques. Les analyses métaboliques réalisées sur prélèvements sanguins peuvent permettre d'objectiver la réelle différence induite par les rations que ce soit concernant la balance énergétique avec le BOHB (Figure 47) ou protéique avec les protéines totales sanguines (Figure 48), l'albuminémie (Figure 49) et l'urée sanguine (Figure 50).

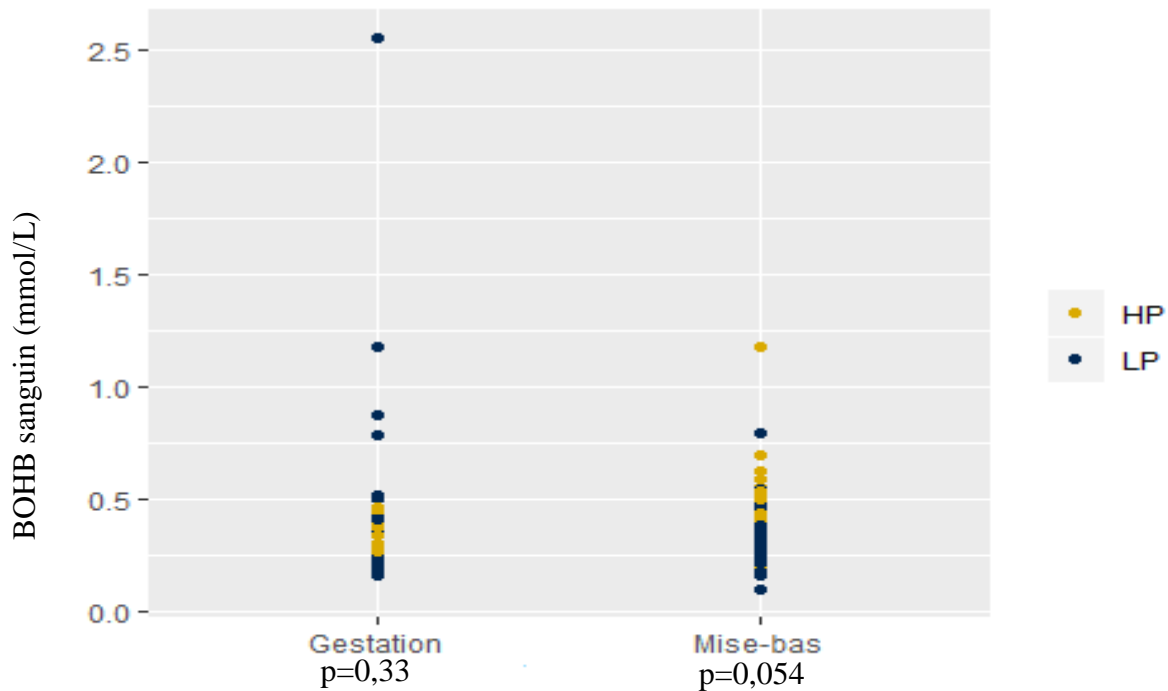


Figure 47 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur la concentration sanguine en bêta-hydroxybutyrate (BOHB) pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues de tests de Student entre rations à chaque date de prélèvement.

Malgré la présence d'une mesure largement supérieure aux autres parmi les individus recevant la ration LP pendant la gestation il n'y a aucune différence statistiquement significative quant à la concentration sanguine en BOHB à cette période. En revanche, au moment de la mise-bas une tendance semble émerger avec une concentration sanguine plus importante en BOHB chez les animaux recevant la ration HP que chez les animaux recevant la ration LP. Par ailleurs, seuls les animaux recevant la ration HP présentent une différence significative entre les deux périodes ($p=0,002$) avec une augmentation de la concentration en bêta-hydroxybutyrate au moment de la mise-bas.

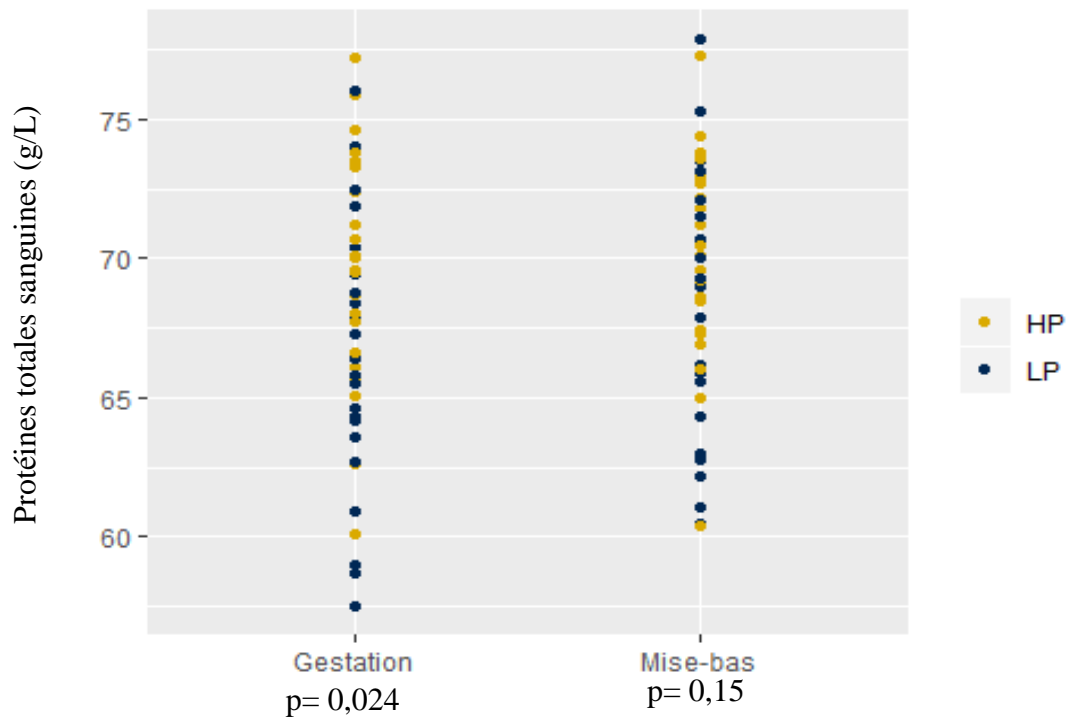


Figure 48 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur la concentration en protéines totales sanguines pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues d'un test de Student entre rations à chaque date de prélèvement.

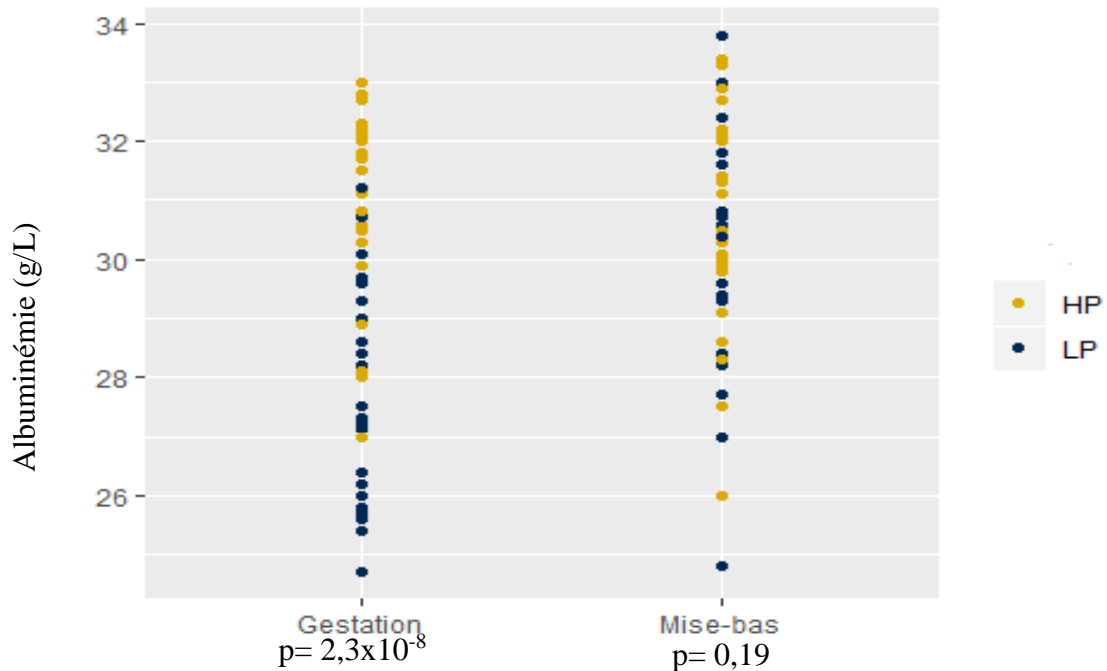


Figure 49 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur l'albuminémie pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues d'un test de Student entre rations à chaque date de prélèvement.

La différence entre les concentrations en protéines totales sanguines entre les deux rations n'est significative que sur le prélèvement réalisé pendant la gestation. Aucune différence significative n'a été identifiée entre les deux dates de prélèvements quelle que soit la ration distribuée. Parmi ces protéines l'albumine a été dosée et les résultats sont présentés en Figure 49.

L'albuminémie, qui peut parfois servir de critère diagnostique ou pronostique de l'infestation parasitaire est significativement différente entre les deux rations lors du prélèvement réalisé au cours de la gestation. En revanche lors du prélèvement réalisé à la mise-bas aucune différence significative associée à la ration n'a été mise en évidence. L'albuminémie des animaux recevant la ration HP ne diffère pas entre les deux prélèvements ($p=0,28$) tandis que l'albuminémie des animaux recevant la ration LP a augmenté jusqu'à des valeurs subnormales (375) et non significativement différentes de celle des animaux recevant la ration HP au moment de la mise-bas.

L'urémie peut être dosée pour évaluer l'excès d'apport protéique alimentaire en situation d'équilibre entre les apports et les besoins énergétiques (Figure 48). En effet, c'est sous cette forme que l'azote excédentaire absorbé sous forme d'ammoniac au niveau du rumen est transformé au niveau du foie (376). En cas de balance énergétique négative et de néoglucogénèse intense cette mesure peut être faussée par l'azote issu de la désamination des acides aminés pour utilisation des squelettes carbonés.

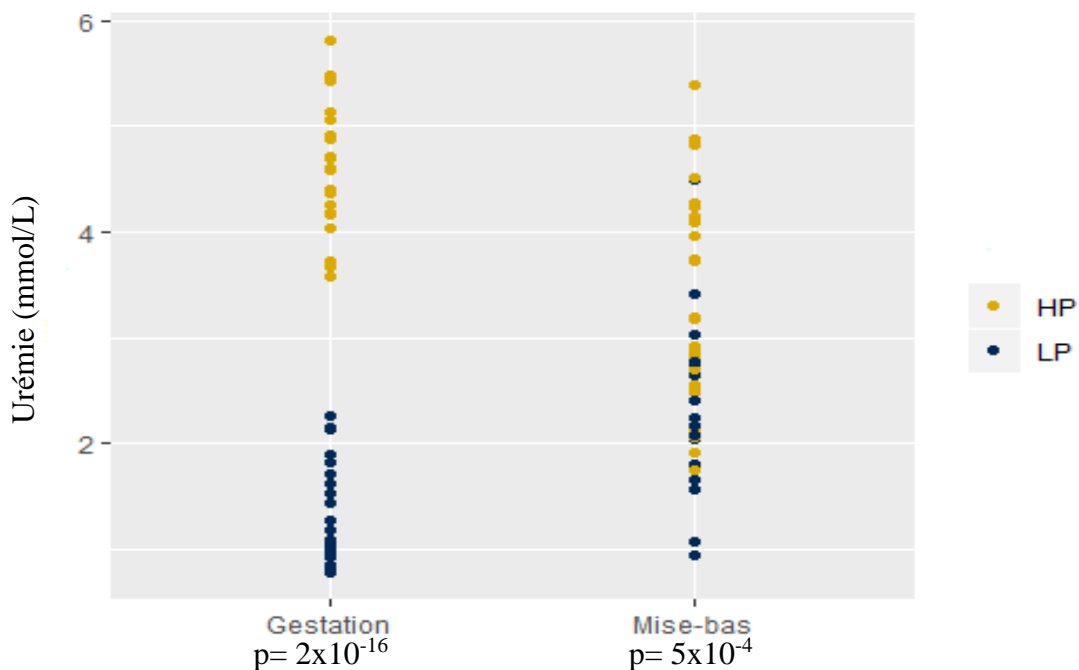


Figure 50 : Effet du taux de couverture des besoins protéiques de la ration sur l'urémie pendant la gestation et au moment de la mise-bas. Les p-values présentées sont issues d'un test de Student entre rations à chaque date de prélèvement.

Les valeurs d'urémie relevées au cours de la gestation sont clairement distinctes pendant la gestation avec des valeurs subnormales à normales chez les animaux recevant la ration LP et des valeurs normales à légèrement supérieures aux valeurs usuelles chez les animaux recevant la ration HP (377).

3) Effet de la ration sur les paramètres de production

Les différences de masses corporelles entre les animaux appartenant aux différents groupes sont représentées en Figure 49.

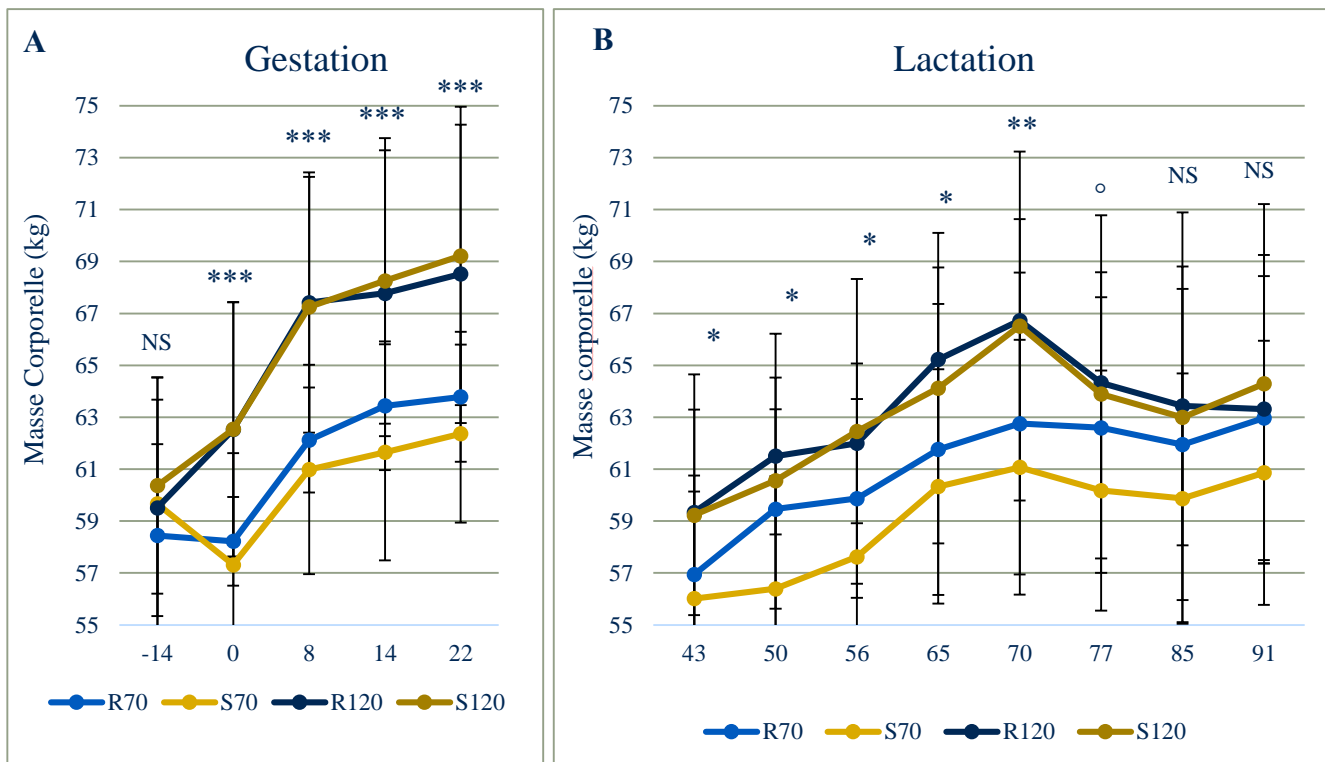


Figure 49 : Impact de la couverture des besoins protéiques par la ration sur l'évolution de la masse corporelle des brebis au cours de la gestation (A) et de la lactation (B) ($^{\circ}p < 0,1$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes avant la mise en place des rations différenciées (jour -14 sur la Figure 49). En revanche dès le début de l'expérimentation, alors que les animaux avaient reçu une ration différente depuis une semaine, des différences significatives sont apparues entre les animaux recevant la ration couvrant 120% de leurs besoins protéiques et la ration conçue pour couvrir 70% de ceux-ci. Comme expliqué *supra*, la lignée n'a pas eu d'impact sur cette différence.

Une diminution de la différence entre les animaux recevant la ration HP et ceux recevant la ration LP est survenue entre la fin de gestation et le début de lactation. Au cours de la lactation, les différences se sont amenuisées jusqu'à ne plus être significative à partir de J77.

B) Étude de la communauté bactérienne ruminale

1) Résultats du séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S des bactéries ruminales

Les trois séquençages réalisés aux différentes périodes ont révélé 10 phyla bactériens en proportions diverses mais toujours dominés par deux phyla majoritaires Firmicutes et Bacteroidetes (Figure 50 et Figure 51).

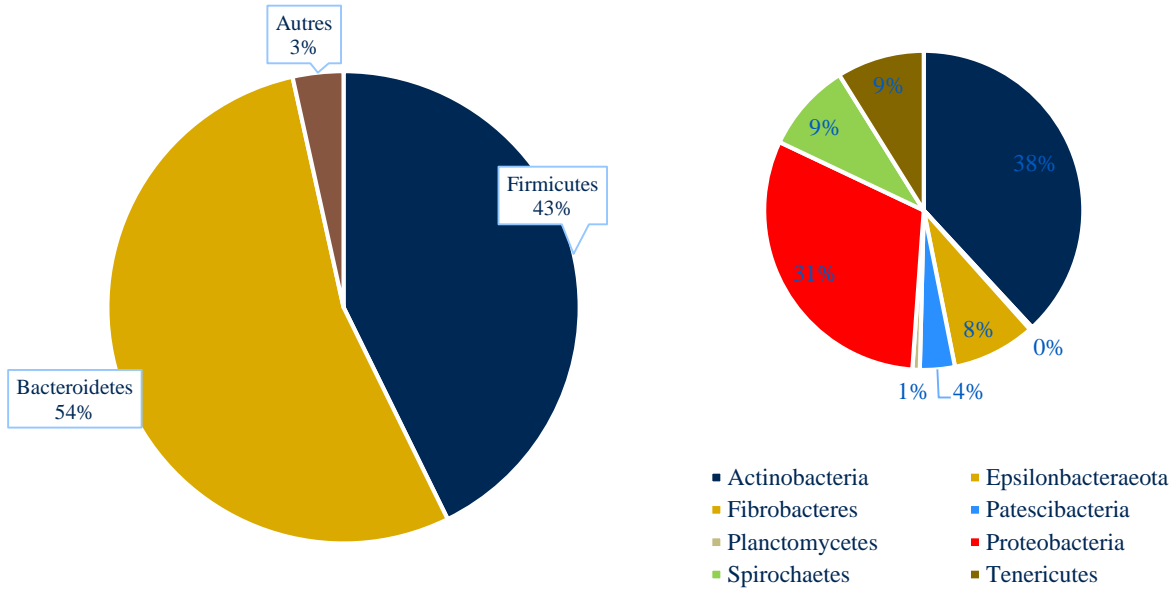


Figure 52 : Proportions relatives des différents phyla bactériens obtenus par séquençage des échantillons prélevés sur les ovins avant la première infestation parasitaire.

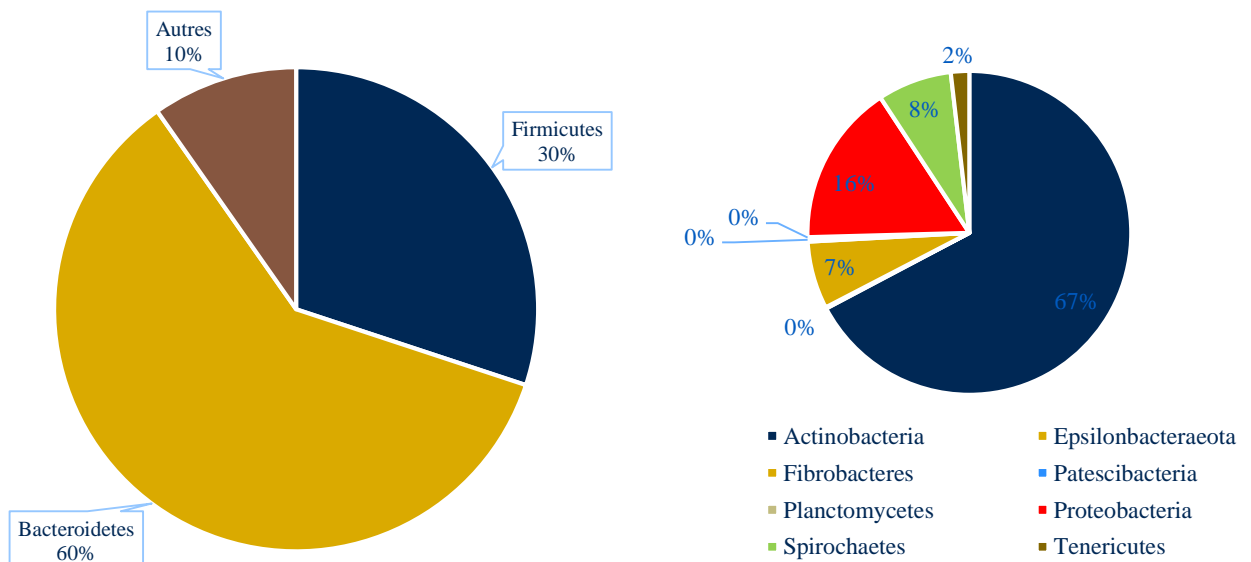


Figure 51 : Proportions des différents phyla bactériens obtenus par séquençage de la combinaison des deuxième et troisième prélèvements réalisés sur individus infestés par *Haemonchus contortus*.

La proportion relative de Bacteroidetes ne varie pas réellement entre les individus indemnes et les individus parasités mais on constate une diminution de la proportion relative de Firmicutes et une augmentation de la proportion relative des autres phyla, en particulier des Actinobacteria qui représentent près de 6% des bactéries des individus infestés.

La confrontation des données de séquençage avec la base SILVA (version 132) a permis d'identifier les espèces de certaines séquences mais la majorité d'entre elles n'ont pas été affiliées jusqu'à ce rang taxonomique (Tableau 11).

Tableau 11 : Affiliation des séquences obtenues sur l'ensemble des trois prélèvements de contenu ruminal.

Rang taxonomique	Nombre de clades à ce rang	% de séquences non affiliées à ce rang
Phylum	10	0
Classe	17	0
Ordre	27	0,02
Famille	47	0,16
Genre	263	0,63
Espèce	75	90,9

Les abondances relatives des phyla, classes et ordres ont été analysées à l'aide du modèle linéaire mixte décrit en Figure 42. L'effet de la lignée n'est significatif que pour la classe des Alphaproteobacteria ($p < 0,01$) et en particulier pour l'ordre des Sphingomonadales ($p < 0,01$) pour lequel on observe une augmentation dans la lignée sensible, en particulier lorsque les animaux étaient nourris avec la ration LP. L'effet du niveau protéique de la ration est observé pour la classe MVP-15 appartenant au phylum des Spirochaetes ($p < 0,1$). La majeure partie de la variation expliquée par le modèle est attribuable à l'effet période qui affecte presque tous les taxons (Tableau 13).

Des tests de Student réalisés au sein des différents jours de prélèvement ont révélé une différence significative dans les abondances relatives des Actinobacteria à J22 : ce phylum représentait 8,72% des séquences des animaux nourris avec la ration LP et moins d'1% des séquences des animaux nourris avec la ration HP. Les différences significatives pour les phyla Patascibacteria et Planctomycetes concernent un nombre si restreint de séquence que leur reproductibilité est à mettre en doute.

Une différence significative émerge à J64 dans le phylum Proteobacteria entre les animaux nourris avec la ration LP et ceux nourris avec la ration HP, cependant la largeur des écarts-types invite à la prudence bien que les premiers aient six fois plus de Proteobacteria que les seconds en proportion.

Tableau 12 : Proportions relatives des différents taxons bactériens en fonction du niveau protéique de la ration et au cours des différents périodes de prélèvement : Moyenne +/- (Écart-type standard).

	J0			J22			J64		
	LP	HP	P _{ration}	LP	HP	P _{ration}	LP	HP	P _{ration}
Actinobacteria	1,41 (1,1)	1,33 (0,67)	0,77	8,72 (11,64)	0,91 (1,22)	0,001	7,83 (7,86)	8,17 (6,05)	0,87
Bacteroidetes	54,13 (5,27)	52,53 (6,64)	0,36	59,47 (17,72)	63,62 (7,4)	0,28	53,00 (8,17)	57,85 (8,30)	0,05
Epsilonbacteria	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)	0,21	0,02 (0,05)	0,01 (0,02)	0,25	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)	0,50
Fibrobacteres	0,31 (0,28)	0,27 (0,23)	0,61	0,69 (1,59)	1,08 (2,21)	0,49	0,22 (0,29)	0,59 (1,07)	0,13
Firmicutes	42,24 (5,33)	44,17 (6,62)	0,28	28,64 (9,57)	32,66 (7,36)	0,11	33,97 (8,81)	32,08 (7,29)	0,42
Patescibacteria	0,12 (0,09)	0,13 (0,06)	0,58	0,01 (0,02)	0,04 (0,04)	0,002	0,08 (0,26)	0,02 (0,03)	0,23
Planctomycetes	0,03 (0,03)	0,03 (0,02)	0,64	0 (0)	0,02 (0,04)	0,012	0 (0)	0 (0)	Non existante
Proteobacteria	1,13 (1,0)	0,95 (0,56)	0,44	0,80 (0,78)	0,57 (0,32)	0,17	4,56 (9,37)	0,73 (0,96)	0,043
Spirochaetes	0,3 (0,16)	0,31 (0,15)	0,91	1,39 (2,47)	0,79 (0,58)	0,23	0,28 (0,37)	0,45 (0,57)	0,24
Tenericutes	0,33 (0,19)	0,27 (0,13)	0,20	0,26 (0,45)	0,30 (0,34)	0,72	0,05 (0,07)	0,11 (0,17)	0,13

Tableau 13 : Significativité des différences d'abondances relatives des différents phyla entre les périodes de prélèvement.

	J0 vs J22	J0 vs J64	J22 vs J64
Actinobacteria	0,016	1,9x10 ⁻⁹	0,030
Bacteroidetes	0,00011	0,12	0,0085
Epsilonbacteria	0,27	0,10	0,046
Fibrobacteres	0,032	0,29	0,12
Firmicutes	1,2x10 ⁻¹²	2x10 ⁻¹⁰	0,21
Patescibacteria	1,3x10 ⁻¹¹	0,0070	0,45
Planctomycetes	0,0066	2,4x10 ⁻¹²	0,0085
Proteobacteria	0,013	0,13	0,061
Spirochaetes	0,0033	0,40	0,0087
Tenericutes	0,77	2,5x10 ⁻¹⁰	1x10 ⁻⁴

2) Analyse multivariée de la communauté bactérienne ruminale

a) Analyse en Composantes Principales

L'Analyse en composantes principales (PCA) des différents échantillons prélevés sur les brebis révèle que les deux composantes principales expliquent respectivement 16% et 5% de la variabilité observée. L'utilisation graphique de couleurs pour repérer les échantillons permet de mettre en évidence une absence de discrimination des échantillons prélevés sur les brebis de lignées différentes (Figure 51).

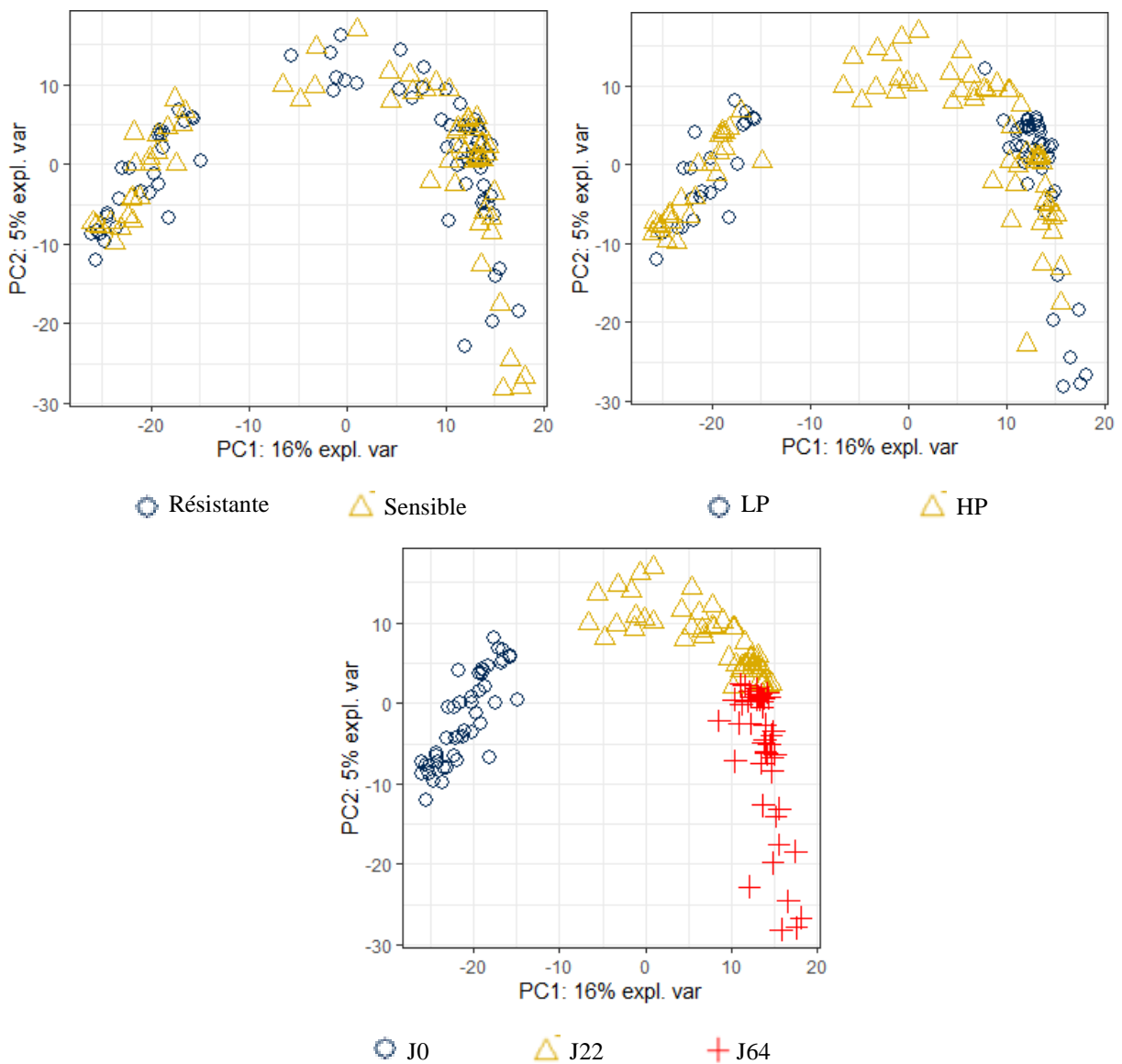


Figure 53 : Représentation graphique en deux dimensions de l'Analyse en Composantes Principales réalisée à partir des échantillons en distinguant : (A) les lignées résistante et sensible ; (B) les rations ; (C) les jours de prélèvement.

Les différents jours de prélèvement sont clairement séparés par la PCA avec une différence entre J0 et les deux autres jours expliquée par la première des composantes principales et une différence entre J22 et J64 expliquée par la deuxième des composantes principales.

À J0 et J64, la PCA ne permet pas de différencier les individus recevant la ration LP des individus recevant la ration HP. En revanche à J22, les deux groupes sont séparés. Les brebis recevant la ration HP semblent avoir un microbiote plus proche des brebis à J0 à la fois d'après la première et d'après la deuxième composante tandis que les brebis recevant la ration LP semblent avoir une composition de l'écosystème bactérien ruminal plus proche de celle des brebis à J64.

L'observation des composantes principales en PCA non parcimonieuse est peu révélatrice puisque la variabilité est diluée entre les multiples termes composant la combinaison linéaire de chaque composante principale. La réalisation d'une analyse parcimonieuse (sPCA) permet de donner plus d'importance aux termes les plus explicatifs de la variabilité.

En l'occurrence, les clusters les plus explicatifs de la première composante sont en grande partie des bactéries appartenant au phylum Firmicutes et aux familles Christensenellaceae, Ruminococcaceae et Lachnospiraceae ce qui est en accord avec le Tableau 13.

Les clusters les plus explicatifs de la seconde composante appartiennent également pour la plupart au phylum Firmicutes bien que l'Analyse de Variance n'ait pas révélé de différence entre les prélèvements réalisés à J22 et à J64 pour ce phylum.

L'Analyse en composantes principales ne permettant pas de maximiser la variabilité expliquée par un des paramètres expérimentaux, nous avons également réalisé une sPLS-DA qui, elle, le permet.

b) Régression des moindres carrés partiels parcimonieuse

En sPLS-DA, à nouveau, la lignée et le niveau protéique de la ration ne permettent pas d'expliquer la variabilité de la structure de la communauté bactérienne entre les individus. En effet, l'évaluation des performances des sPLS-DA utilisant comme paramètre discriminant la lignée ou le niveau protéique donnent des taux d'erreur importants et une discrimination très faible.

L'application de cette analyse à la discrimination des rations à J22 permet de faire ressortir quelques clusters essentiellement dans la première composante qui est la plus discriminante entre les deux rations (Figure 52). Les clusters majoritairement impliqués dans la première des composantes appartiennent aux phyla Bacteroidetes (en particulier des Prevotallaceae), Firmicutes (en particulier dans les familles Family XIII, Lachnospiraceae et Ruminococcaceae) et Proteobacteria, le cluster portant la plus grande part de variabilité appartenant à la famille des Desulfovibrionaceae au sein de ce dernier phylum.

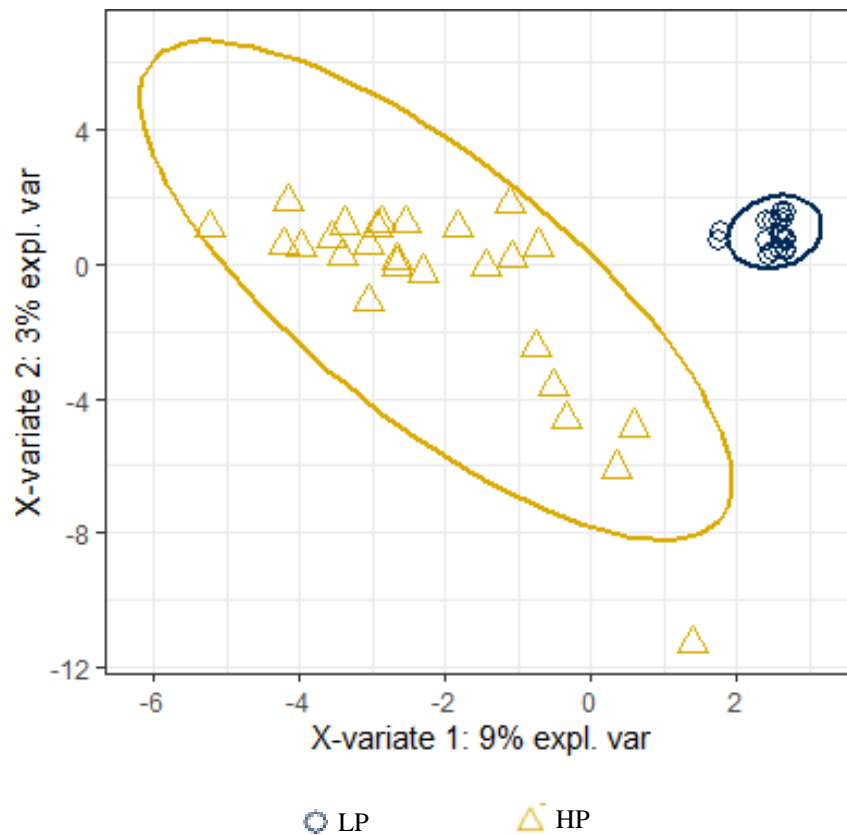


Figure 54 : Régression des moindres carrés partiels parcimonieuse discriminante sur les données de séquençage obtenues à partir du prélèvement réalisé à J22 et discriminée sur la ration distribuée.

3) Étude de la diversité bactérienne

L'analyse du nombre de séquences obtenues par séquençage révèle une différence significative entre les trois jours de prélèvements avec une augmentation du nombre de séquences moyen au cours de l'expérimentation. Ainsi en moyenne, près de 15 000 séquences ont été récupérées à J0, près de 20 000 à J22 et environ 22 000 à J64 (Figure 53).

Au contraire, la richesse spécifique des échantillons diminue au cours du temps. En effet, davantage de clusters différents ont été observés à J0, en dépit du nombre de séquences réduit qu'à J22 ou J64. Les richesses spécifiques de ces deux derniers jours de prélèvement ne diffèrent pas statistiquement (Figure 53).

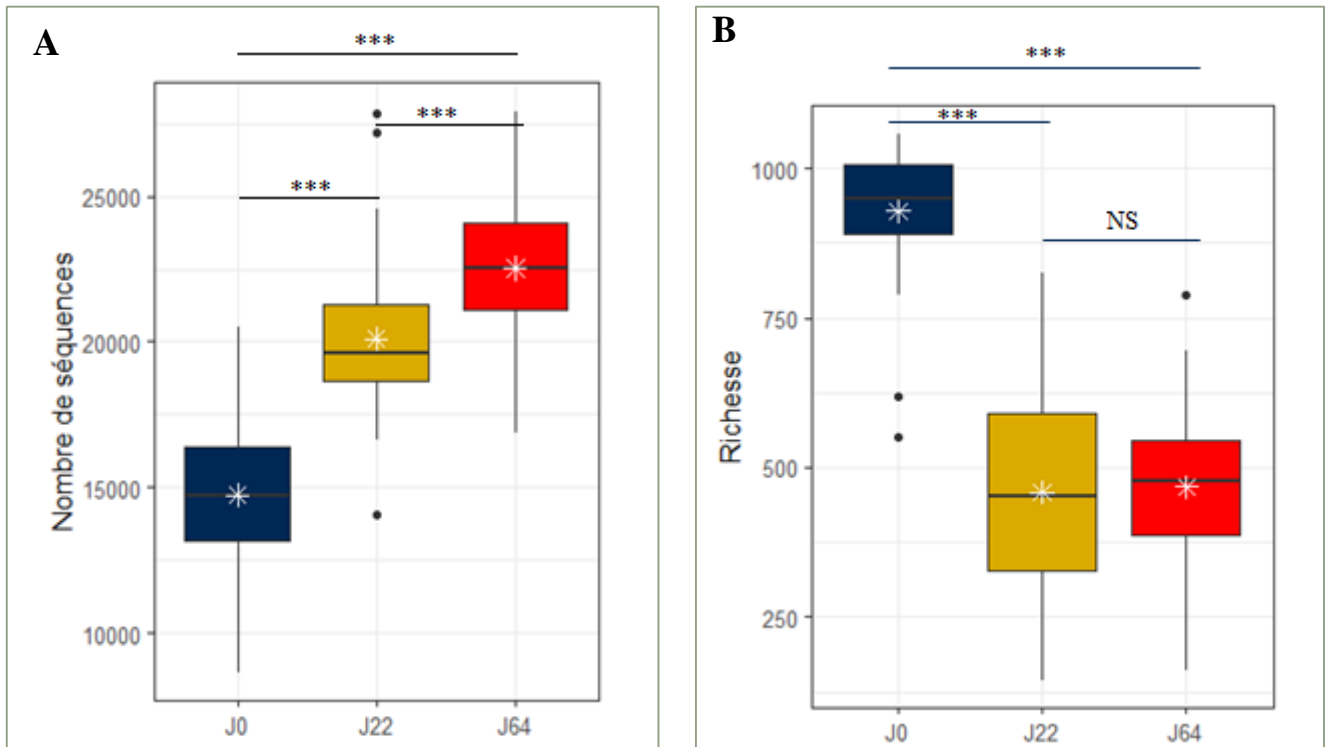


Figure 55 : (A) Nombre de séquences obtenues par séquençage à J0, J22, J64 ; (B) Richesse des échantillons prélevés à J0, J22, J64. Les étoiles représentent les moyennes, ^{NS}p>0,1 ; ***p<0,001.

Du fait de ces résultats, les analyses concernant la lignée ou le niveau de couverture des besoins protéiques par la ration seront réalisées au sein de chaque jour de prélèvement et pas en temps qu'effet global sur l'intégralité de l'expérimentation. En première période l'indice de Gini-Simpson est approximativement égal à 1. Il diminue au cours de l'expérimentation à l'instar de la richesse avec des valeurs significativement différentes à chaque jour de prélèvement. En revanche, au sein des jours de prélèvement la lignée n'a pas d'impact significatif sur l'indice de Gini-Simpson (Figure 54) ni sur l'indice de Shannon (non représenté).

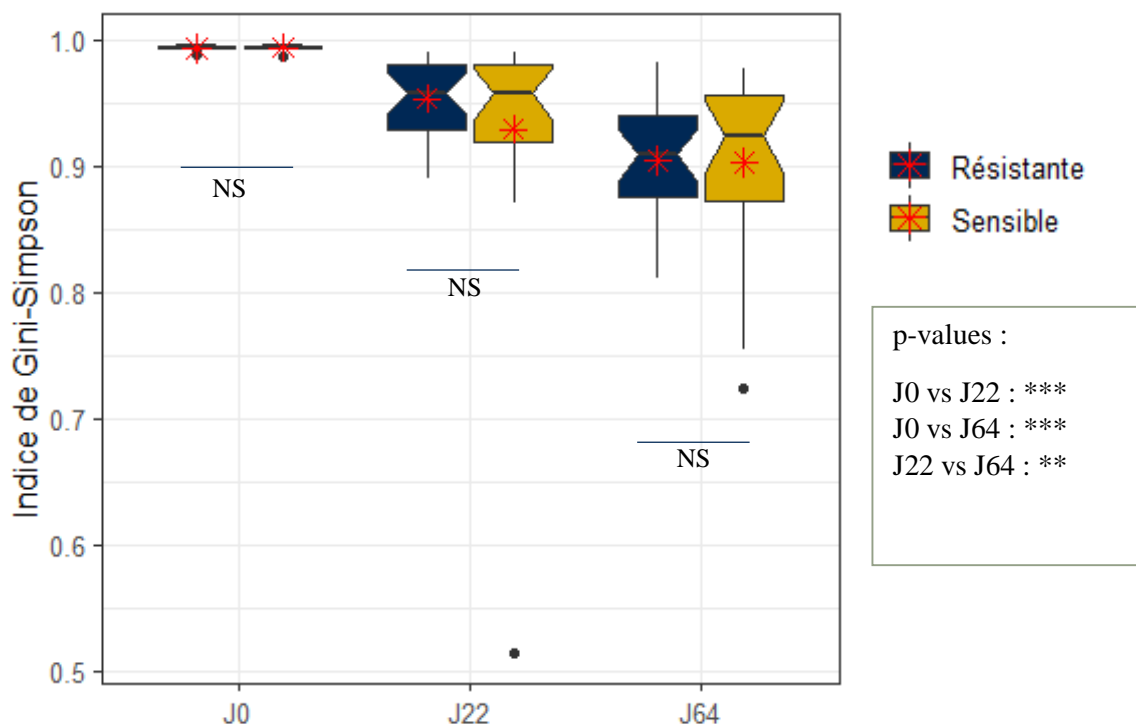


Figure 56 : Indice de Gini-Simpson en fonction de la lignée des individus prélevés. (^{NS} $p > 0,1$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Deux échantillons, l'un à J22 et l'autre à J64, tous deux appartenant à la lignée sensible et au groupe LP ont des valeurs d'indices de Gini-Simpson (Figure 54 et Figure 55) et de Shannon (non présenté) sensiblement inférieures à celles des autres échantillons. L'examen du nombre de séquences obtenues dans ces échantillons ne révèle pas de différence particulière et la richesse spécifique de ces échantillons bien qu'inférieure à la moyenne n'est pas la richesse minimale observée et ne dénote pas statistiquement des autres. Cette différence s'explique par conséquent par la répartition des séquences avec une équitabilité réduite pour ces échantillons avec respectivement 69% et 70% des clusters représentés par un cluster pour la valeur isolée à J22 (69% pour un cluster appartenant au genre *Prevotella* 1, espèce non identifiée) et 2 clusters pour la valeur isolée à J64 (37% pour un cluster appartenant au genre *Succinivibrio*, espèce non identifiée et 33% pour un cluster appartenant au genre *Prevotella* 1, espèce non identifiée).

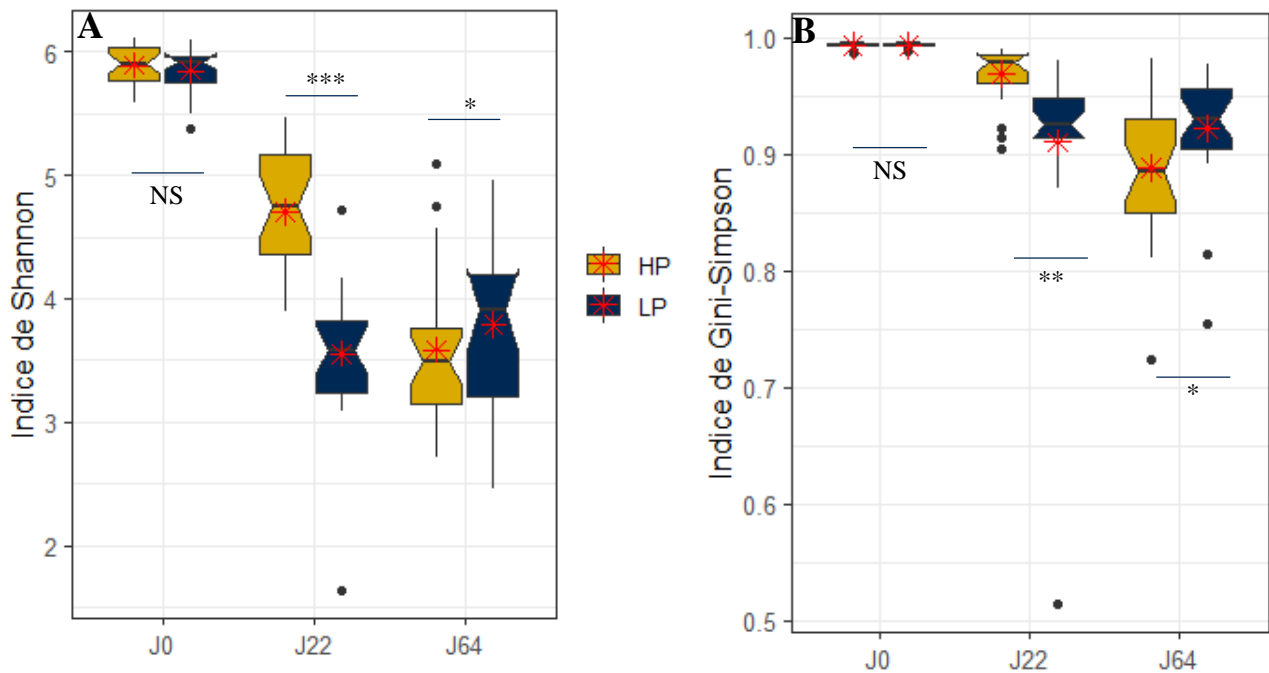


Figure 57 : (A) Indices d'alpha-diversité en fonction de la couverture des besoins protéiques par la ration : (A) Indice de Shannon, (B) Indice de Simpson.

Les indices de Shannon et Simpson donnent approximativement les mêmes résultats. Aucune différence n'est observée à J0 alors que les animaux recevaient leurs rations respectives depuis une semaine environ. À J22, les animaux recevant une ration plus riche en protéines présentent une alpha-diversité ruminale plus importante que les animaux recevant la ration LP et cette différence est plus marquée encore avec l'indice de Shannon qu'avec l'indice de Simpson. À J64, au contraire, les animaux recevant la ration HP présentent une alpha-diversité ruminale inférieure à celle des animaux recevant la ration LP. Cette différence est statistiquement moins significative et la grande variabilité au sein des groupes ainsi que la présence de plusieurs valeurs isolées incitent à la prudence.

C) Étude des métabolites microbiens du contenu ruminal

1) Concentration ruminale en azote ammoniacal

La concentration en azote ammoniacal (N-NH₃) dans le contenu ruminal est significativement différente entre les périodes ($p < 0,001$) et entre les rations ($p < 0,01$). L'interaction de ces deux paramètres est elle-aussi significative ($p < 0,001$) dans le modèle développé en Figure 42. La lignée quant à elle n'a pas d'effet sur la concentration ruminale en N-NH₃.

À J0, aucune différence n'est observée entre les 4 groupes. Lors des deux prélèvements suivants, deux groupes se séparent clairement (Figure 56) avec une augmentation de la concentration en N-NH₃ dans le rumen des animaux nourris avec la ration HP par rapport aux animaux nourris avec la ration à J22 et, dans une moindre mesure à J64.



Figure 58: Concentration en ammoniac (mg N-NH₃/L) dans le rumen de brebis péri-parturientes en fonction de leur lignée (résistante (R) ou sensible (S) aux helminthes) et du niveau protéique de leur ration (120% des besoins (HP) ou 70% (LP)). (HP vs LP : *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; ^{NS} $p > 0,1$)

2) Concentration en acides gras volatils dans le contenu ruminal

L'analyse statistique de la concentration en AGV ne permet pas de mettre en évidence une différence quelconque entre les deux lignées.

En revanche, elle montre une diminution significative au cours du temps de la concentration totale de ceux-ci (Figure 57). Cette diminution de la concentration des AGV est présente pour tous les éléments dosés à l'exception du valérate, de l'isovalérate, et de l'isobutyrate, acides minoritaires, dont les concentrations augmentent en deuxième période dans le contenu du rumen des animaux (Figure 58).

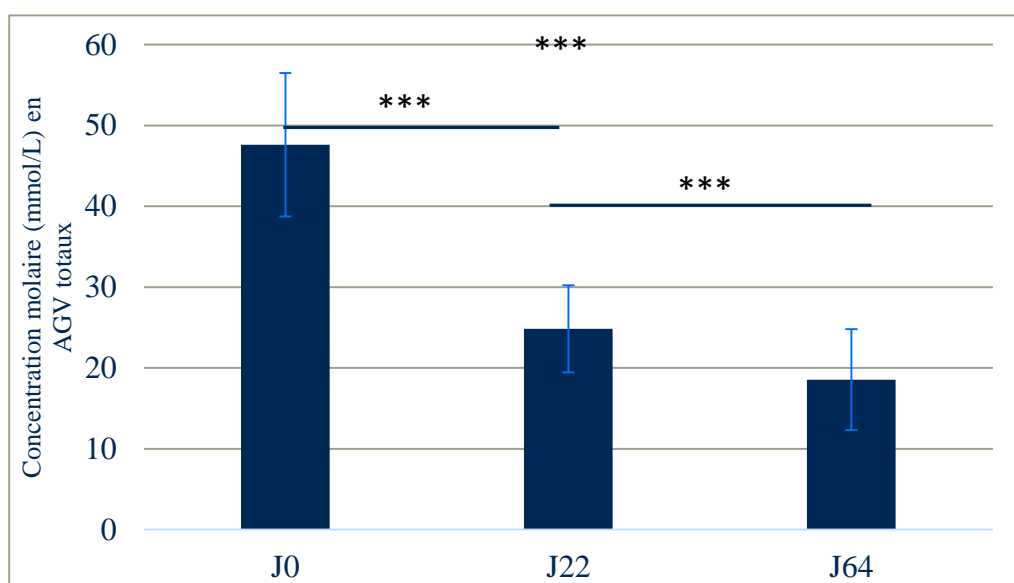


Figure 59 : Évolution de la concentration molaire (mmol/L) en AGV totaux dosés par chromatographie en phase gazeuse en fonction du jour de prélèvement (***) ($p < 0,001$).

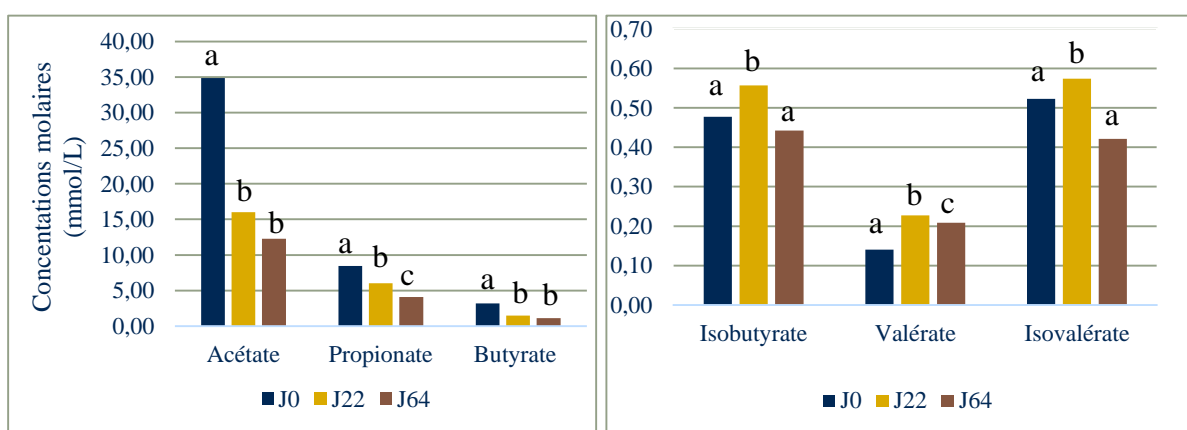


Figure 60 : Évolution de la concentration molaire en différents AGV dosés par chromatographie en phase gazeuse en fonction du jour de prélèvement. Deux périodes diffèrent significativement ($p < 0,05$) si deux lettres différentes leur sont attribuées.

Un effet du niveau protéique de la ration a été mis en évidence sauf pour l'acétate (Tableau 14). L'interaction entre le niveau protéique de la ration et la date de prélèvement est également significative pour tous les AGV sauf l'acétate. Ainsi, les acides gras à chaîne courte ramifiée présentent une légère diminution de concentration au cours du temps pour le groupe recevant une ration LP tandis que dans le groupe recevant la ration HP, les concentrations en ces acides gras sont augmentées à J22 (fin de gestation). Les concentrations en valérate dans le rumen augmentent au cours du temps chez les brebis avec la ration HP alors que les concentrations en cet acide gras sont augmentées à J22 (fin de gestation) pour les brebis recevant la ration LP, conduisant à une différence significative entre les rations LP et HP uniquement à J22.

Tableau 14 : Significativité des différents paramètres du modèle mixte appliqué aux proportions molaires des AGV dosés par chromatographie (*** $p < 0,001$), ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, NS $p > 0,05$).

	Lignée	Niveau protéique de la ration	Période	Niveau Protéique × Période
Acétate	NS	NS	***	NS
Propionate	NS	*	***	*
Butyrate	NS	•	***	*
Valérate	NS	**	**	**
Isobutyrate	NS	***	***	**
Isovalérate	NS	***	***	***

Pour étudier si les variations de concentrations molaires en AGV ont un retentissement sur le profil en AGV dans le contenu ruminal, les proportions molaires des différents acides gras volatils ont été calculées et analysées. Les interactions ont été représentées dans la Figure 59.

Tableau 15 : Significativité des différents paramètres du modèle mixte appliqué aux proportions molaires des AGV dosés par chromatographie (*** $p < 0,001$), ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, NS $p > 0,05$).

	Lignée	Niveau protéique de la ration	Période	Interactions
Acétate	NS	NS	***	NS
Propionate	NS	***	***	Niveau protéique × Période = ***
Butyrate	NS	*	NS	NS
Valérate	NS	***	**	Niveau protéique × Période = ** Lignée × Niveau protéique × Période = *
Isobutyrate	NS	**	***	NS
Isovalérate	NS	***	***	Niveau protéique × Période = *

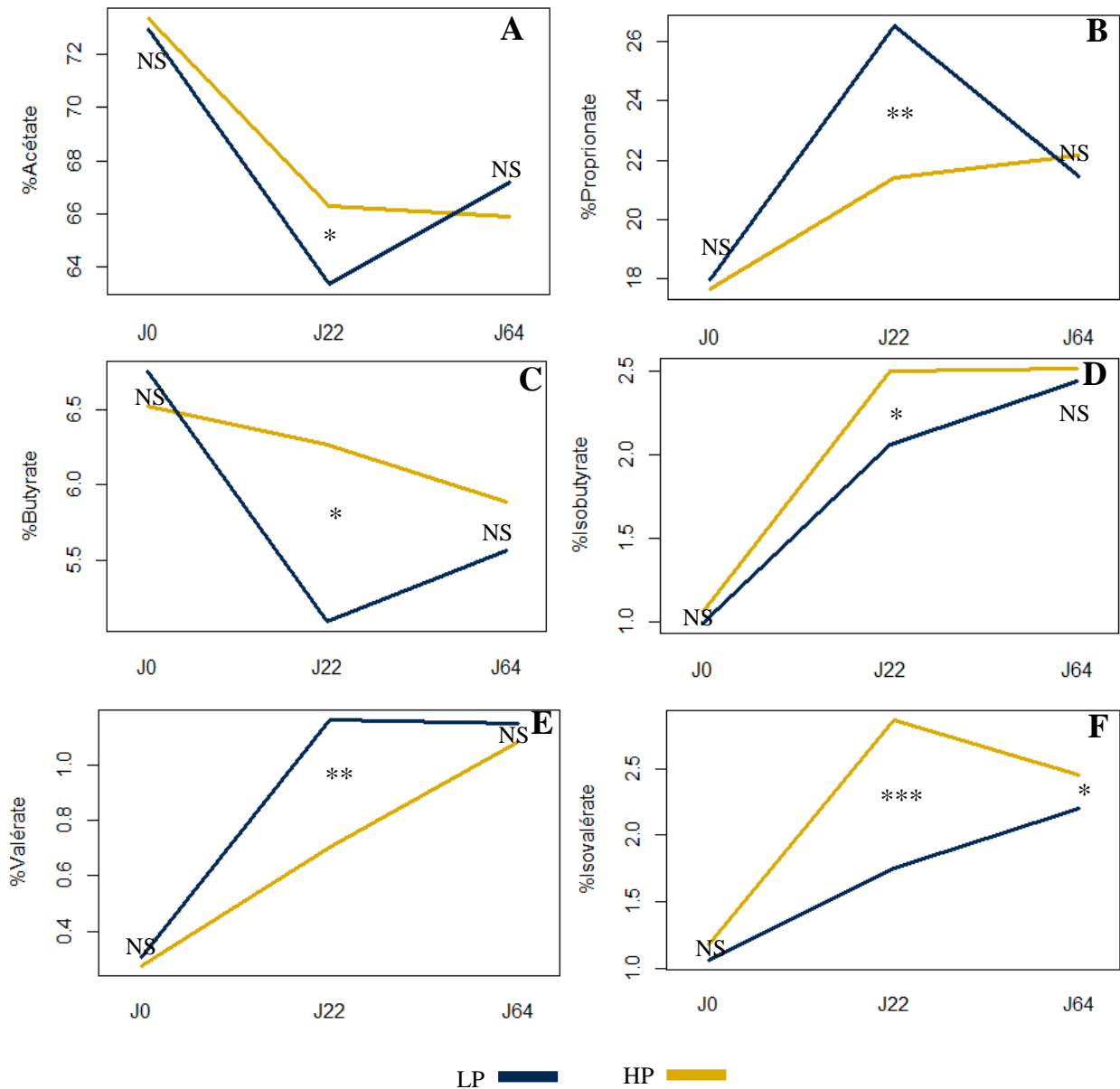


Figure 61 : Évolution des proportions molaires (%AGV totaux) des acides gras volatils à J0, J22 et J64(3) en fonction du niveau protéique des rations avec lesquels les animaux sont nourris, respectivement une couverture de 120% (HP) et 70% (LP) du besoin PDI : (A) Acétate, (B) Propionate, (C) Butyrate, (D) Isobutyrate, (E) Valérate et (F) Isovalérate (*** $p < 0,001$), ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, $p < 0,1$, ^{NS} $p > 0,1$).

La lignée n'a pas d'effet sur les profils en AGV des contenus ruminiaux à l'exception du paramètre d'interaction Lignée × Niveau Protéique × Période pour le valérate (Tableau 15).

Le niveau protéique de la ration a un effet significatif sur la proportion des AGV dans le rumen en particulier à J22. Les proportions de propionate et de valérate sont légèrement plus importantes chez les animaux recevant la ration LP que chez les animaux recevant la ration HP. Pour les autres AGV, les proportions chez les animaux recevant la ration LP sont plus faibles que chez ceux recevant la ration HP (Figure 59).

La concentration absolue en acétate est divisée par trois au cours de l'expérimentation (Figure 58) ce qui a pour effet de diminuer de façon significative sa proportion (Figure 59). L'isobutyrate, le valérate et l'isovalérate, quant à eux, voient leurs proportions augmenter au cours du temps. L'interaction entre le niveau de protéines de la ration et la période de prélèvement est moins marquée que pour les concentrations absolues.

Enfin, le rapport C2/C3 (c'est-à-dire acétate/propionate) chute fortement entre J0 et J22 ($p < 0,001$) puis se stabilise entre J22 et J64 ($p > 0,1$) (Figure 60).

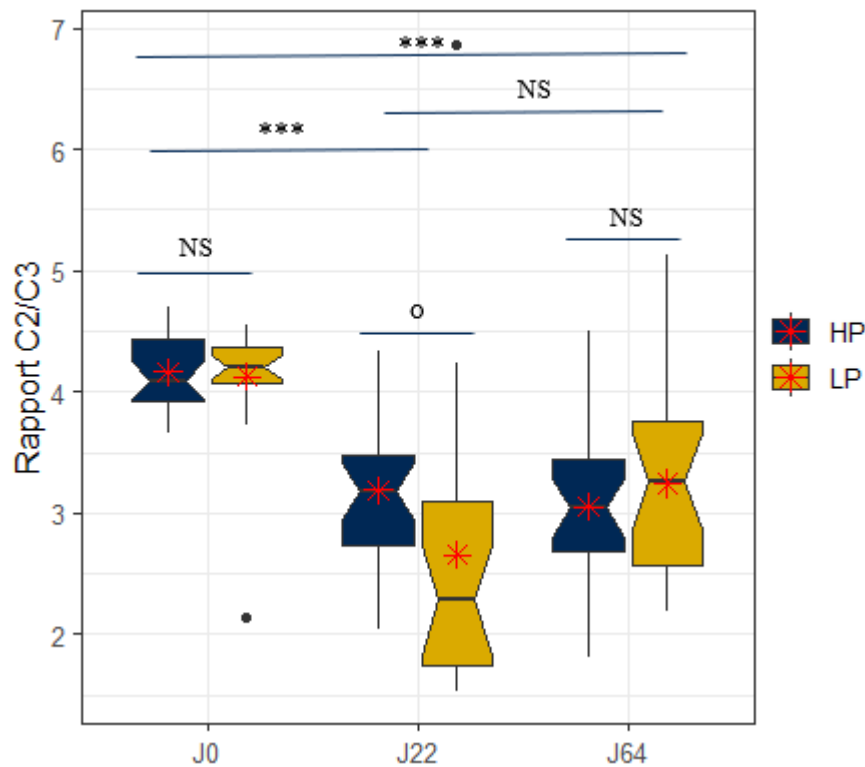


Figure 62 : Évolution du rapport acétate/propionate (C2/C3) à J0, J22 et J64 en fonction du niveau protéique des rations avec lesquelles les animaux sont nourris (** $p < 0,001$; $^{\circ}$ $p < 0,1$; NS $p > 0,1$).

IV) Discussion

A) Validation du modèle expérimental

1) Divergence des lignées

Les différences observées en matière d'excrétion fécale d'œufs et d'hématocrite valident la divergence des deux lignées et par conséquent la réussite de la sélection génétique. L'apparition des premiers œufs à J22 quelle que soit la lignée est cohérente avec la littérature. En effet, d'après Dakkak et Dorchie (1984), la période prépatente (c'est-à-dire la période séparant l'ingestion de larves infestantes et l'excrétion des premiers œufs) d'*Haemonchus contortus* peut être de 16 jours (42) mais la majorité des études décrivent une période prépatente de 17-21 jours (44, 45).

Il semble que les deux lignées ne divergent pas immédiatement et la différence entre les brebis sensibles et résistantes en termes d'excrétion fécale d'œufs n'est significative qu'à partir du 56^{ème} jour après infestation, de même que la différence d'hématocrite. La plupart des études sur la réponse de l'hôte au parasitisme par *Haemonchus contortus* utilisent un nombre de larves infestantes bien supérieur au nôtre (42) et on peut imaginer qu'il a fallu plusieurs infestations successives pour déclencher une réponse différente des animaux et donc pouvoir différencier les deux lignées par rapport à celle-ci. L'hématocrite des brebis résistantes remonte plus rapidement après arrêt des infestations que celui des brebis sensibles, et les nombres d'œufs maximal (respectivement 6000 œufs par gramme et 4000 œufs par gramme) et au palier (respectivement 4000 œufs par gramme et 2000 œufs par gramme) sont tous deux plus faibles chez les brebis résistantes que chez les brebis sensibles.

2) *Divergence de ration*

Les analyses sanguines ont été réalisées à J19, soit 4 semaines après l'introduction de la première ration différenciée entre les groupes et à l'agnelage alors que les animaux consommaient la deuxième ration présentée dans le Tableau 9.

Les différents paramètres sanguins mesurés comme reflets de l'apport alimentaire de protéines montrent une différence plus importante entre les deux rations au premier prélèvement qu'au second. En particulier les résultats significatifs ($p < 0,05$) à très significatifs ($p < 0,001$) concernant les protéines totales et l'albumine en première période ne le sont plus au second prélèvement. L'urémie, quant à elle, permet encore de différencier les deux rations lors du second prélèvement.

La principale hypothèse explicative de ce phénomène est la restriction moins importante en protéines de la deuxième ration par rapport à la première avec une couverture de 83% des besoins protéiques estimés par le système INRA 2007 (227) dans la ration correspondant au second prélèvement contre 72% pour celle correspondant au premier prélèvement (Tableau 9). Ainsi, l'albuminémie étant relativement bien régulée physiologiquement, une carence moindre peut résulter en sa normalisation (377).

L'amointrissement de l'écart d'apport entre les deux rations explique le chevauchement des valeurs d'urémie observés au second prélèvement, c'est-à-dire à la mise-bas, sur la Figure 48. Cependant, cet amointrissement est moins important que pour les autres paramètres. Cela tient au fait que les apports en protéines digestibles dans l'intestin (PDI) calculés pour les rations LP et HP ne dépendent pas du même facteur limitant, respectivement les protéines digestibles dans

l'intestin permises par l'énergie de la ration (PDIE) pour la ration HP et les protéines digestibles dans l'intestin permises par l'azote de la ration (PDIN) pour la ration LP (227). Ainsi l'excès d'azote de la ration HP est absorbé sous forme d'ammoniac et métabolisé en urée au niveau du foie résultant en une augmentation de l'urémie aux marges hautes des valeurs usuelles (377).

L'absence de différence concernant la concentration sanguine de bêta-hydroxybutyrate à J19 est un bon moyen de se rendre compte que les rations sont iso-énergétiques. La légère augmentation du bêta-hydroxybutyrate au moment de la mise-bas pour les animaux recevant la ration HP peut être due à la mobilisation de la graisse sur des animaux plus en état, par exemple pour la synthèse d'urée à partir de l'excès ammoniacal sanguin.

B) Étude de la communauté bactérienne ruminale

Ni l'analyse en composantes principales parcimonieuse, ni la régression PLS discriminante parcimonieuse ne sont parvenues à mettre en évidence une différence de communauté bactérienne ruminale entre les animaux des deux lignées. Les indices de Shannon et de Gini-Simpson calculés à partir des données de séquençage n'ont pas non plus permis d'identifier de différence entre les deux lignées

Si l'analyse en composantes principales n'a pas permis de distancier réellement les deux rations, elle a permis de montrer une légère différence au prélèvement réalisé à J22. Cette différence essentiellement visible sur la composante 1 de la Figure 52. Par ailleurs l'utilisation des indices d'alpha-diversité révèle une différence significative entre les deux rations à J22 et J64 mais pas à J0. Deux paramètres peuvent expliquer l'absence de différence d'alpha-diversité entre les deux rations à J0. D'une part, les brebis n'avaient une ration stabilisée que depuis une semaine, contrairement aux trois semaines souvent requises pour obtenir une stabilisation du microbiote ; d'autre part, la gestion d'un épisode d'acidose ruminale suite à la mise au DAC, par l'adjonction de foin et de carbonate de sodium, a altéré la différence entre les deux rations au démarrage.

La ration des animaux ayant été adaptée à J19, les résultats obtenus à J22 sont à la fois représentatifs de la première ration distribuée aux animaux et de la deuxième qu'ils recevaient alors depuis 3 jours. À J22, les animaux recevant la ration HP présentent une alpha-diversité ruminale plus élevée que celle des animaux recevant la ration LP et cette différence est plus importante en prenant en compte l'indice de Shannon que l'indice de Gini-Simpson ce qui tend à laisser penser qu'elle est imputable à des clusters présents en faible abondance comme expliqué dans la Partie 2 au I.C.3.b.ii. L'étude de Belanche (2012) montre également une tendance à la diminution de la diversité microbienne lorsque les animaux reçoivent une ration

pauvre en protéines et en fibres ce qui est ici observé à J22 (378) cependant la faible quantité d'articles traitant de la diversité bactérienne en fonction du niveau protéique de la ration ne permet pas d'affirmer avec certitude cette tendance. Par ailleurs, on observe une inversion de cette différence au dernier jour de prélèvement (J64) pour lequel l'alpha-diversité des échantillons de contenu ruminal prélevés sur les animaux recevant la ration HP est inférieure à celle des échantillons prélevés sur les animaux recevant la ration LP. Cette inversion est probablement due à la diminution de la diversité pour la ration HP entre J22 et J64 beaucoup plus modérée. L'importante variabilité des alpha-diversités en troisième période pour la ration HP incite à être prudents quant à l'interprétation qu'on peut faire de la différence entre les rations, si significative soit-elle et il semble que les alpha-diversité à J64 soient assez comparables entre les rations.

La littérature est en accord avec notre étude concernant la diminution de la diversité microbienne lors du passage d'une ration riche en fourrages à une ration plus riche en concentrés (378). De plus, les taxons majoritaires identifiés à la suite du séquençage sont en accord avec les données de la littérature notamment avec la méta-analyse de Henderson et al (2015) mettant en évidence que si les régimes et les milieux influent sur la composition bactérienne du rumen, les phyla majoritaires sont relativement constants, même entre différentes espèces de ruminants (Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria) (328).

Une analyse approfondie des différents effets fixes aux échelles Phylum/Classe/Ordre révèle une différence significative d'abondance relative entre les deux lignées uniquement pour la classe des Alphaproteobacteria et plus particulièrement pour l'ordre des Sphingomonadales mais de nombreuses interactions existent également pour ces deux phyla rendant difficile l'interprétation de l'effet lignée. La majorité des phyla analysés sont en proportions significativement différentes selon le jour de prélèvement, ce qui peut s'expliquer par les changements de rations opérés, rendus obligatoires par l'évolution du stade physiologique des animaux. En effet, une ration plus riche en concentrés a tendance à favoriser les bactéries amylolytiques et on observe souvent une diminution des Firmicutes et Fibrobacteres au profit des Bacteroidetes et Proteobacteria lors de la transition d'une ration riche en fourrage à une ration riche en amidon (328, 378, 379). Ces résultats ont également été observés dans notre étude avec un basculement notable des Firmicutes vers les Bacteroidetes (Figure 49) et une augmentation marginale mais marquée chez certains individus des Proteobacteria. La proportion de Fibrobacteres est restée constante contrairement à l'évolution attendue.

Un effet du parasitisme pourrait également être mis en cause dans les modifications des abondances relatives des bactéries dans le contenu ruminal. En effet, à J0 les animaux n'étaient pas parasités tandis qu'à J22 et J64 ils avaient reçu respectivement 2 et 8 doses infestantes. Cependant la littérature ne semble pas indiquer que le parasitisme soit à l'origine d'une modification d'alpha-diversité (365) bien qu'il puisse être à l'origine de modifications de l'environnement ruminal notamment d'une hausse de pH (364). L'augmentation des Actinobacteria rapportée dans la littérature en association avec le parasitisme (359, 366) a été retrouvée dans notre étude. Sans témoin négatif au parasitisme, l'effet de celui-ci ne peut être clairement identifié et caractérisé et restera confondu avec l'évolution du stade physiologique des animaux et des rations qui s'y adaptent.

C) Étude des métabolites microbiens du rumen

La sélection génétique sur la résistance aux helminthes n'a pas eu d'influence sur les fermentations ruminales des brebis. En effet, quelle que soit leur lignée, les brebis présentent une concentration en N-NH₃, une concentration en AGV totaux et un profil en AGV similaires. La période de prélèvement a eu une importance significative et quantitativement importante sur les paramètres fermentaires du rumen des brebis. Les effets observés étaient attendus et sont pour la plupart explicables par les rations distribuées et nécessairement adaptées au stade physiologique des animaux.

L'étude du rapport C2/C3, c'est-à-dire acétate/propionate, est un reflet de l'activité microbienne plutôt amylolytique (favorisant la production de propionate à partir de glucides cytoplasmiques) ou fibrolytique (favorisant la production d'acétate à partir de glucides pariétaux). On s'attend donc, en observant la répartition fourrages/concentrés dans les trois rations distribuées aux animaux à constater une diminution de ce rapport à mesure que la part des concentrés augmente en période 2 et 3. Ainsi, la diminution de la proportion relative d'acétate au profit du propionate est concomitante avec le passage d'une ration contenant 41% de fourrages à une ration contenant seulement 27% de fourrages. Penner et al. (380) ont également mis en évidence une diminution du rapport C2/C3 de 3,98 dans une ration à faible teneur en concentrés (8% de la matière sèche) à 2,36 dans une ration contenant beaucoup de concentrés (64% de la matière sèche ingérée). Il est admis que la proportion des fibres dans une ration est directement corrélée avec le rapport acétate/propionate (C2/C3). Outre l'augmentation de la part de glucides fermentescibles dans les rations riches en concentrés, la dégradabilité de l'amidon d'orge est élevée si bien qu'un pic d'AGV survient plus rapidement après repas, contribuant à une acidification du rumen qui sélectionne les bactéries amylolytiques. La taille des particules est à

prendre en compte également. En effet, une ration plus fibreuse est à l'origine d'une salivation plus importante et donc d'un apport plus important de salive contenant des substances tampon dans le rumen. On peut donc supposer que la diminution de la proportion de fourrages au profit de concentrés sera responsable d'une acidification ruminale par ces différents moyens. Le pH ruminal n'ayant pas été mesuré, cette explication reste une hypothèse.

On aurait pu s'attendre à ce que l'augmentation de l'ingestion liée au changement de stade physiologique des animaux se retrouve au niveau des concentrations ruminales en produits de fermentation puisque une augmentation de la matière organique ingérée implique souvent une augmentation de ces produits surtout si la ration s'enrichit en glucides fermentescibles (381). Cependant, la diminution de la concentration en AGV totaux au cours du temps peut être expliquée par plusieurs paramètres dont le principal est inhérent à la manipulation, les prélèvements n'ayant pas été réalisés au même moment par rapport au dernier repas. A J22 les animaux sont restés à jeun une heure de plus qu'à J0 (entre 13 et 14 heures en moyenne). À J64, une heure supplémentaire de jeûne est venue s'ajouter. Le phénomène d'absorption des AGV dans le rumen est un processus complexe. Comme tout phénomène de diffusion il dépend d'un gradient, ici un gradient rumen/sang, qui peut être plus important si la consommation d'aliment augmente comme dans le cadre de l'augmentation de la capacité d'ingestion en début de lactation et si l'aliment est plus concentré. Il dépend également des capacités absorbatives, c'est-à-dire de la surface d'absorption et du nombre d'unités absorbatives, à savoir les papilles ruminales. De fait on peut imaginer que pendant la première période de prélèvement, soit 8 jours après l'instauration d'une ration riche en concentrés, les animaux n'avaient pas encore atteint leur capacité maximale d'absorption – le développement des papilles ruminales étant un phénomène adaptatif assez long (382) – ce qui pourrait expliquer une concentration en AGV plus importante à J0 par rapport à J22 et J64. Enfin il dépend de la forme sous laquelle se trouve la molécule que l'on souhaite faire diffuser, de son caractère ionique, de sa taille, de son hydrophilie.

Ainsi d'autres paramètres ont pu influencer l'absorption des AGV et contribuer aux différences observées. Le stade physiologique des animaux a pu avoir un effet sur leur capacité d'ingestion et sur le métabolisme épithélial (261, 381). Le parasitisme et le changement de ration, notamment la modification de la proportion de fourrages et de concentrés, ont pu entraîner une modification du pH ruminal (380) qui peut être à l'origine de modifications morpho-anatomiques du rumen avec par exemple une augmentation de la surface d'absorption, un développement plus important des papilles ruminales (381, 382), une augmentation de la

fraction d'AGV absorbés par unité de temps à la fois par augmentation de la proportion de la forme protonée qui diffuse passivement suivant le gradient de concentration (383, 384) mais aussi par l'augmentation des échanges antiport entre les formes ionisées des AGV et des monocarbonates (385, 386). Certaines modifications au niveau du profil en AGV sont explicables par le fait que la fraction d'absorption d'une molécule dépend de son ionisation (donc du pH) et de la longueur de la chaîne carbonée (381). Cependant les différences observées entre les deux niveaux protéiques à l'échelle de chaque AGV ne devraient pas être expliquées par ces paramètres puisqu'en dehors des apports protéiques, la proportion de fourrages est la même et le stade physiologique des brebis aussi. Une hypothèse concernant l'augmentation des concentrations molaires en isovalérate, valérate et isobutyrate dans le groupe ayant reçu une ration couvrant 120% des apports en protéines est que ces acides proviennent de la désamination des acides aminés, notamment ceux ramifiés, par les bactéries lorsque les glucides viennent à manquer dans le rumen (387). Ce résultat a en effet été retrouvé également dans l'étude de Higginbotham et al en 1989 sur des vaches laitières recevant des rations plus ou moins riches en protéines (388) et plus récemment par Belanche en 2012 (378). Il est également envisageable que des changements de proportions de bactéries amylolytiques (souvent protéolytiques) et fibrolytiques (réalisant plutôt la protéosynthèse à partir d'ammoniac) puissent impacter le recyclage des acides gras à chaîne courte ramifiée, résultant en une augmentation concomitante de ces acides et du N-NH₃.

La première période de prélèvement ne révèle pas de différence significative entre les deux rations distribuées aux animaux que ce soit au niveau des AGV ou du N-NH₃. Cette absence de différence entre les régimes à J0 peut s'expliquer par le remplacement de la paille par du foin dans la ration suite à un épisode d'acidose survenu après la mise des brebis au distributeur automatique de concentrés faussant les rations pendant les premiers jours.

Par la suite, comme attendu, les brebis nourries avec une ration couvrant 120% des apports recommandés en protéines ont présenté une concentration supérieure en N-NH₃ dans leur rumen et ce indépendamment de la lignée à laquelle elles appartenaient. Cet effet est à la fois dû à un apport plus important de PDI et à une limitation des PDI par les PDIN chez les animaux recevant la ration LP et par les PDIE chez les animaux recevant la ration HP (sauf en troisième période). En effet, schématiquement, lorsqu'on augmente la différence PDIN-PDIE, on donne de l'azote qui ne permettra pas de synthèse protéique par les bactéries donc on augmente la concentration en N-NH₃ du rumen. On peut aussi émettre l'hypothèse que les brebis recevant les rations de fin de gestation (J22) et début de lactation (J64), plus riches en concentrés ont

inhibé les bactéries fibrolytiques, consommatrices du NH₃ produit par les bactéries amylolytiques. Cette hypothèse est soutenue par les rapports C2/C3 observés, cohérents avec une communauté bactérienne plutôt amylolytique (379). Le fait que les prélèvements aient été réalisés plus éloignés du dernier repas à J64 qu'à J22 a pu permettre aux bactéries d'utiliser l'azote dans une plus ample mesure également, quelques études ayant montré une désynchronisation entre les apports énergétiques et l'utilisation d'azote lors de la consommation de rations riches en amidon (378).

Conclusion :

La sélection génétique pour la résistance à *Haemonchus contortus* a été efficace tant du point de vue de la résistance que de la résilience au parasite. En revanche, elle n'a pas eu d'effet sur le microbiote ruminal ni sur l'activité de celui-ci mesurée par dosage des produits bactériens principaux, à savoir les AGV et le N-NH₃.

Ces résultats suggèrent une absence d'effet de la lignée sur l'efficacité de la digestion ruminale des animaux, les quantités d'AGV (représentant près de 70% de l'énergie obtenue par digestion) et de N-NH₃ ne différant pas en fonction des lignées. Comme nous nous y attendions, la période de prélèvement a eu l'effet le plus important et cela est imputable en grande partie aux changements de rations imposés par l'évolution du statut physiologique des brebis.

L'ajout d'un témoin négatif à l'infestation parasitaire aurait pu permettre de comparer les animaux infestés et non-infestés des deux lignées pour déterminer la part de variation attribuable au parasitisme au sein des multiples facteurs de variation entre les périodes de prélèvement qui affectent grandement le microbiote ruminal.

L'analyse des paramètres zootechniques sur les performances des brebis en termes de croissance des brebis primipares, de poids des agneaux à la naissance et de leur croissance en période d'allaitement permettront de vérifier l'impact de la sélection génétique opérée sur l'efficacité alimentaire des animaux, et objectiver un éventuel effet de la sélection génétique au niveau métabolique. L'investigation de la réponse immunitaire des animaux pourra permettre de savoir si les différences de performances observées sont explicables par un « coût métabolique » de la lutte contre le parasite au niveau immunitaire.

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 **Florian TOUITOU** intitulée « **Impact de la sélection génétique sur la résistance à *Haemonchus contortus* et de l'apport alimentaire de protéines sur le microbiote ruminal et l'efficacité alimentaire de brebis gestantes et allaitantes** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18/11/2019
Docteur Annabelle MEYNADIER
Maître de Conférences
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pierre SANS

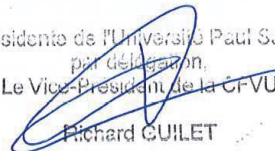


Vu :
Le Président du jury :
Professeur Alexis VALENTIN



Vu et autorisation de l'impression :
Présidente de l'Université Paul Sabatier
Madame Régine ANDRE-OBRECHT

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



M. Florian TOUITOU
a été admis(e) sur concours en : 2014
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 18/07/2018
a validé son année d'approfondissement le : 16/07/2019
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Bibliographie :

1. CLUTTON-BROCK, Juliet. *A Natural History of Domesticated Mammals*. 2nd ed. Cambridge University Press, 1999. ISBN 0-521-63495-4.
2. CHESSA, B., PEREIRA, F., ARNAUD, F., AMORIM, A., GOYACHE, F., MAINLAND, I., KAO, R. R., PEMBERTON, J. M., BERALDI, D., STEAR, M. J., ALBERTI, A., PITTAU, M., IANNUZZI, L., BANABAZI, M. H., KAZWALA, R. R., ZHANG, Y.-p., ARRANZ, J. J., ALI, B. A., WANG, Z., UZUN, M., DIONE, M. M., OLSAKER, I., HOLM, L.-E., SAARMA, U., AHMAD, S., MARZANOV, N., EYTHORSDDOTTIR, E., HOLLAND, M. J., AJMONE-MARSAN, P., BRUFORD, M. W., KANTANEN, J., SPENCER, T. E. et PALMARINI, M. Revealing the History of Sheep Domestication Using Retrovirus Integrations. *Science*. 24 avril 2009. Vol. 324, n° 5926, pp. 532-536. DOI 10.1126/science.1170587.
3. PEDROSA, Susana, UZUN, Metehan, ARRANZ, Juan-José, GUTIÉRREZ-GIL, Beatriz, SAN PRIMITIVO, Fermín et BAYÓN, Yolanda. Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 22 octobre 2005. Vol. 272, n° 1577, pp. 2211-2217. DOI 10.1098/rspb.2005.3204.
4. MEADOWS, Jennifer R. S., CEMAL, Ibrahim, KARACA, Orhan, GOOTWINE, Elisha et KIJJAS, James W. Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. *Genetics*. mars 2007. Vol. 175, n° 3, pp. 1371-1379. DOI 10.1534/genetics.106.068353.
5. PULINA, G., MILÁN, M.J., LAVÍN, M.P., THEODORIDIS, A., MORIN, E., CAPOTE, J., THOMAS, D.L., FRANCESCONI, A.H.D. et CAJA, G. Invited review: Current production trends, farm structures, and economics of the dairy sheep and goat sectors. *Journal of Dairy Science*. août 2018. Vol. 101, n° 8, pp. 6715-6729. DOI 10.3168/jds.2017-14015.
6. GILBERT, Marius, NICOLAS, Gaëlle, CINARDI, Giusepina, VAN BOECKEL, Thomas P., VANWAMBEKE, Sophie O., WINT, G. R. William et ROBINSON, Timothy P. Global distribution data for cattle, buffaloes, horses, sheep, goats, pigs, chickens and ducks in 2010. *Scientific Data*. 30 octobre 2018. Vol. 5, pp. 180227. DOI 10.1038/sdata.2018.227.
7. Les petits ruminants et leurs productions laitières dans la région méditerranéenne. *Livestock Production Science*. octobre 1991. Vol. 29, n° 2-3, pp. 259-260. DOI 10.1016/0301-6226(91)90078-5.
8. BARILLET, Francis, LAGRIFFOUL, Gilles, MARNET, Pierre-Guy, LARROQUE, Helene, RUPP, Rachel, PORTES, David, BOCQUIER, Francois et ASTRUC, Jean-Michel. Objectifs de sélection et stratégie raisonnée de mise en oeuvre à l'échelle des populations de brebis laitières françaises. . 2016. pp. 23.
9. LAPUYADE, Marie-Anne. *Agreste Infos rapides - Ovins n°2019-76* [en ligne]. mars 2019. Disponible à l'adresse : http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/2019_035_InforapOvinsv2.pdf
10. INTERBEV. *L'essentiel de la filière ovine française* [en ligne]. 2017. Disponible à l'adresse : http://www.inn-ovin.fr/wp-content/uploads/2017/08/LIVRET-VIANDES-OVINE-2017_web.pdf

11. LAGRIFFOUL, G, MORIN, E, HASSOUN, P et LEGARTO, J. Panorama de la production de lait de brebis en France et son évolution depuis 50 ans. . 2016. pp. 12.
12. BELLET, Vincent, BATAILLE, Jean-François, CAILLEAU, Louis-Marie, VENINEAUX-DELVALLE, Catherine, JOUSSEINS, Carole, SAGET, Gilles, SERVIÈRE, Gérard et TCHAKERIAN, Edmond. ANALYSE DU COUT DE PRODUCTION EN ELEVAGE OVIN VIANDE - Repères nationaux 2013. . pp. 40.
13. MORIN, Emmanuel, CASSIGNOL, Clothilde et FRAYSSE, Joël. *La production de lait de brebis en France, diversité des systèmes d'exploitation*. 2004. ISBN 2-84148-108-5.
14. BENOIT, Marc et LAIGNEL, Gabriel. Constraints under organic farming on French sheepmeat production: a legal and economic point of view with an emphasis on farming systems and veterinary aspects. *Veterinary Research*. septembre 2002. Vol. 33, n° 5, pp. 613-624. DOI 10.1051/vetres:2002042.
15. AUGAS, Nathalie, BELLET, Vincent, CLÉNET, Gilles, FRICHET, Laurent, GOUËDARD, Alain, GRIFFAULT, Béatrice et MIGNÉ, Stéphane. Résultats 2015 des exploitations ovines viande de l'Ouest SYNTHÈSE REGIONALE INOSYS-RESEAUX D'ELEVAGE -POITOU-CHARENTES, PAYS DE LA LOIRE ET BRETAGNE. . 2015. pp. 32.
16. MCLEOD, R.S. Costs of major parasites to the Australian livestock industries. *International Journal for Parasitology*. novembre 1995. Vol. 25, n° 11, pp. 1363-1367. DOI 10.1016/0020-7519(95)00071-9.
17. LANE, Joe, JUBB, Tristan, SHEPARD, Richard, WEBB-WARE, John et FORDYCE, Geoffry. Priority list of endemic diseases for the red meat industries. *Meat & Livestock Australia Limited*. 2015. pp. 282.
18. SACKETT, David et HOLMES, Phil. *Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers*. avril 2006. Meat & Livestock Australia (MLA) Limited : Sydney.
19. GORSKI, Pawel. Prevalence of protozoan and helminth internal parasite infections in goat and sheep flocks in Poland. . pp. 7.
20. THOMAS, P.L., DOWNEY, N.E. et DREADON, R.S. Mortality in lambs due to enterotoxaemia associated with heavy infestations of *Moniezia expansa*. *New Zealand Veterinary Journal*. décembre 1956. Vol. 4, n° 4, pp. 161-165. DOI 10.1080/00480169.1956.33240.
21. MAVROT, Fabien. *Livestock Nematode Infection in a Changing World: Investigating the European Situation* [en ligne]. 2016. University of Zurich. [Consulté le 17 juillet 2019]. Disponible à l'adresse : <http://www.zora.uzh.ch/125799>
22. CABARET, Jacques. *Parasitisme helminthique en élevage biologique ovin, réalité et moyens de contrôle*. 2004. INRA Prod. Anim.
23. IDRIS, Ahmad, MOORS, Eva, SOHNREY, Birgit et GAULY, Matthias. Gastrointestinal nematode infections in German sheep. *Parasitology Research*. avril 2012. Vol. 110, n° 4, pp. 1453-1459. DOI 10.1007/s00436-011-2648-1.

24. DOMKE, Atle V. Meling, CHARTIER, Christophe, GJERDE, Bjørn, LEINE, Nils, VATN, Synnøve et STUEN, Snorre. Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Veterinary Parasitology*. mai 2013. Vol. 194, n° 1, pp. 40-48. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.12.023.
25. MARTÍNEZ-VALLADARES, María, ROBLES-PÉREZ, David, MARTÍNEZ-PÉREZ, Jose Manuel, CORDERO-PÉREZ, Coral, FAMULARO, Ma del Rosario, FERNÁNDEZ-PATO, Nélica, GONZÁLEZ-LANZA, Camino, CASTAÑÓN-ORDÓÑEZ, Luciano et ROJO-VÁZQUEZ, Francisco A. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasites & Vectors*. 2013. Vol. 6, n° 1, pp. 282. DOI 10.1186/1756-3305-6-282.
26. O'CONNOR, Lauren J., WALKDEN-BROWN, Stephen W. et KAHN, Lewis P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. novembre 2006. Vol. 142, n° 1-2, pp. 1-15. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.08.035.
27. ASMARE, Kassahun, SHEFERAW, Desie, ARAGAW, Kassaye, ABERA, Mesele, SIBHAT, Berhanu, HAILE, Aynalem, KIARA, Henry, SZONYI, Barbara, SKJERVE, Eystein et WIELAND, Barbara. Gastrointestinal nematode infection in small ruminants in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*. août 2016. Vol. 160, pp. 68-77. DOI 10.1016/j.actatropica.2016.04.016.
28. PANDEY, Vs, OUHELLI, H, DAKKAR, A et CABARET, J. Epidemiology of gastrointestinal helminths of sheep in the Rabat area of Morocco. . pp. 9.
29. SANTOS, Michelle C., SILVA, Bruna F. et AMARANTE, Alessandro F.T. Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. septembre 2012. Vol. 188, n° 3-4, pp. 277-284. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.03.056.
30. MORGAN, E.R. et VAN DIJK, J. Climate and the epidemiology of gastrointestinal nematode infections of sheep in Europe. *Veterinary Parasitology*. septembre 2012. Vol. 189, n° 1, pp. 8-14. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.03.028.
31. KENYON, F., SARGISON, N.D., SKUCE, P.J. et JACKSON, F. Sheep helminth parasitic disease in south eastern Scotland arising as a possible consequence of climate change. *Veterinary Parasitology*. août 2009. Vol. 163, n° 4, pp. 293-297. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.03.027.
32. The dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Australian Veterinary Journal*. janvier 2003. Vol. 81, n° 1-2, pp. 57-57. DOI 10.1111/j.1751-0813.2003.tb11433.x.
33. ROEBER, Florian, JEX, Aaron R. et GASSER, Robin B. 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. DOI 10.1016/j.biotechadv.2013.01.008.
34. SACCAREAU, Mathilde, SALLÉ, Guillaume, ROBERT-GRANIÉ, Christèle, DUCHEMIN, Tom, JACQUIET, Philippe, BLANCHARD, Alexandra, CABARET, Jacques et MORENO, Carole R. Meta-analysis of the parasitic phase traits of *Haemonchus contortus*

infection in sheep. *Parasites & Vectors* [en ligne]. décembre 2017. Vol. 10, n° 1. [Consulté le 18 juillet 2019]. DOI 10.1186/s13071-017-2131-7. Disponible à l'adresse : <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2131-7>

35. CABARET, J., GASNIER, N. et JACQUIET, P. 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. DOI 10.1051/parasite/1998052137.
36. COYNE, Michael J. et SMITH, Gary. The development and mortality of the free-living stages of *Haemonchus contortus* in laboratory culture. *International Journal for Parasitology*. août 1992. Vol. 22, n° 5, pp. 641-650. DOI 10.1016/0020-7519(92)90013-B.
37. JASMER, Douglas P, WESCOIR, RICHARD B et CRANE', Andjohn W. Influence of Cold Temperatures upon Development and Survival of Eggs of Washington Isolates of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta*. . 2011. pp. 4.
38. SMITH, G. The population biology of the free-living phase of *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. octobre 1990. Vol. 101, n° 2, pp. 309-316. DOI 10.1017/S003118200006337X.
39. MCKENNA, P.B. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Veterinary Parasitology*. décembre 1998. Vol. 80, n° 2, pp. 167-172. DOI 10.1016/S0304-4017(98)00203-9.
40. CHEAH, T. S. et RAJAMANICKAM, C. Epidemiology of gastro-intestinal nematodes of sheep in wet tropical conditions in Malaysia. *Tropical Animal Health and Production*. août 1997. Vol. 29, n° 3, pp. 165-173. DOI 10.1007/BF02633015.
41. HERTZBERG, H., HUWYLER, U., KOHLER, L., REHBEIN, St et WANNER, M. Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*. juillet 2002. Vol. 125, n° 1, pp. 65-70. DOI 10.1017/S0031182002001816.
42. DAKKAK, A et DORCHIES, Ph. Cinétique des populations des vers de différents stades évolutifs de *Haemochus contortus* et leur distribution chez le mouton après infestation expérimentale unique. *Annales de Recherche Vétérinaire*. 1984. Vol. 15, n° 4, pp. 475-482.
43. EMERY, David L., HUNT, Peter W. et LE JAMBRE, Leo F. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*. novembre 2016. Vol. 46, n° 12, pp. 755-769. DOI 10.1016/j.ijpara.2016.07.001.
44. DINEEN, J. K. et WAGLAND, B. M. The dynamics of the host–parasite relationship. *Parasitology*. novembre 1966. Vol. 56, n° 04, pp. 665. DOI 10.1017/S0031182000071699.
45. COADWELL, W. J. et WARD, P. F. V. Observations on the development of *Haemonchus contortus* in young sheep given a single infection. *Parasitology*. décembre 1975. Vol. 71, n° 03, pp. 505. DOI 10.1017/S0031182000047260.
46. ABBOTT, K.A., TAYLOR, M et STUBBINGS, L.A. *Sustainable Worm Control Strategies for Sheep 4th Edition*. 2012. SCOPS.
47. GONZÁLEZ-GARDUÑO, R., MENDOZA-DE GIVES, P., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., AGUILAR-MARCELINO, L., TORRES-HERNÁNDEZ, G., OJEDA-ROBERTOS, N.F. et TORRES-ACOSTA, J.F.J. Influence of the physiological stage of Blackbelly sheep on

immunological behaviour against gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*. octobre 2018. Vol. 193, pp. 20-26. DOI 10.1016/j.exppara.2018.08.003.

48. BESIER, R.B., KAHN, L.P., SARGISON, N.D. et VAN WYK, J.A. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier, 2016. pp. 181-238. [Consulté le 22 juillet 2019]. ISBN 978-0-12-810395-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X16300240>
49. H CLARK, C, K KIESEL, G et H GOBY, C. Measurements of blood loss caused by *Haemonchus contortus* infection in sheep. *American journal of veterinary research*. 1962. Vol. 23, pp. 977-80.
50. CHERMETTE, René. L'haemonchose ovine et ses particularités : importance et situation actuelle en France. *Point Vétérinaire*. 1982. Vol. 13, n° 65, pp. 21-28.
51. DARGIE, J.D. et ALLONBY, E.W. Pathophysiology of single and challenge infections of *Haemonchus contortus* in Merino sheep: Studies on red cell kinetics and the "self-cure" phenomenon. *International Journal for Parasitology*. avril 1975. Vol. 5, n° 2, pp. 147-157. DOI 10.1016/0020-7519(75)90021-1.
52. ALBERS, G. A. A., GRAY, G. D., JAMBRE, L. F. Le, BARGER, I. A. et BARKER, J. S. F. The effect of *Haemonchus contortus* infection on haematological parameters in young Merino sheep and its significance for productivity. *Animal Science*. février 1990. Vol. 50, n° 1, pp. 99-109. DOI 10.1017/S0003356100004505.
53. QAMAR, Muhammad Fiaz, MAQBOOL, Azhar et AHMAD, Nisar. ECONOMIC LOSSES DUE TO HAEMONCHOSIS IN SHEEP AND GOATS. . 2011. pp. 4.
54. ROWE, J. B., NOLAN, J. V., DE CHANEET, G., TELANI, E. et HOLMES, P. H. The effect of haemonchosis and blood loss into the abomasum on digestion in sheep. *British Journal of Nutrition*. janvier 1988. Vol. 59, n° 1, pp. 125-139. DOI 10.1079/BJN19880016.
55. BESIER, R.B., KAHN, L.P., SARGISON, N.D. et VAN WYK, J.A. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier, 2016. pp. 95-143. [Consulté le 28 octobre 2019]. ISBN 978-0-12-810395-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X16300227>
56. VAN WYK, Jan A. et BATH, Gareth F. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*. septembre 2002. Vol. 33, n° 5, pp. 509-529. DOI 10.1051/vetres:2002036.
57. VATTA, A.F, LETTY, B.A, VAN DER LINDE, M.J, VAN WIJK, E.F, HANSEN, J.W et KRECEK, R.C. Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. in goats farmed under resource-poor conditions in South Africa using an eye colour chart developed for sheep. *Veterinary Parasitology*. juillet 2001. Vol. 99, n° 1, pp. 1-14. DOI 10.1016/S0304-4017(01)00446-0.
58. KAPLAN, R.M, BURKE, J.M, TERRILL, T.H, MILLER, J.E, GETZ, W.R, MOBINI, S, VALENCIA, E, WILLIAMS, M.J, WILLIAMSON, L.H, LARSEN, M et VATTA, A.F.

Validation of the FAMACHA© eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. *Veterinary Parasitology*. août 2004. Vol. 123, n° 1-2, pp. 105-120. DOI 10.1016/j.vetpar.2004.06.005.

59. RAYNAUD, J.-P., WILLIAM, G. et BRUNAUT, G. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*. 1970. Vol. 45, n° 3, pp. 321-342. DOI 10.1051/parasite/1970453321.

60. BONNEFONT, Marie et CANELLAS, Amandine. *Optimisation des outils de diagnostic des strongyloses gastro-intestinales des ovins*. 2014. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse-ENVT.

61. SHAW, D. J. et DOBSON, A. P. Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. *Parasitology*. janvier 1995. Vol. 111, n° S1, pp. S111-S133. DOI 10.1017/S0031182000075855.

62. BOAG, B., HACKETT, C.A. et TOPHAM, P.B. The use of Taylor's power law to describe the aggregated distribution of gastro-intestinal nematodes of sheep. *International Journal for Parasitology*. mai 1992. Vol. 22, n° 3, pp. 267-270. DOI 10.1016/S0020-7519(05)80003-7.

63. BISHOP, S. C. et STEAR, M. J. The use of a gamma-type function to assess the relationship between the number of adult *Teladorsagia circumcincta* and total egg output. *Parasitology*. octobre 2000. Vol. 121, n° 4, pp. 435-440. DOI 10.1017/S0031182099006526.

64. STEAR, M. J., ABUAGOB, O., BENOTHMAN, M., BISHOP, S. C., INNOCENT, G., KERR, A. et MITCHELL, S. Variation among faecal egg counts following natural nematode infection in Scottish Blackface lambs. *Parasitology*. 6 octobre 2005. Vol. 132, n° 02, pp. 275. DOI 10.1017/S0031182005009029.

65. HENDRIX, Charles M et ROBINSON, Ed. *Diagnostic parasitology for veterinary technicians*. 2014. ISBN 978-0-323-29125-5.

66. RINALDI, L., VENEZIANO, V., MORGOGNONE, M.E., PENNACCHIO, S., SANTANIELLO, M., SCHIOPPI, M., MUSELLA, V., FEDELE, V. et CRINGOLI, G. Is gastrointestinal strongyle faecal egg count influenced by hour of sample collection and worm burden in goats? *Veterinary Parasitology*. juillet 2009. Vol. 163, n° 1-2, pp. 81-86. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.03.043.

67. GONZÁLEZ-GARDUÑO, Roberto, MENDOZA-DE GIVES, Pedro et TORRES-HERNÁNDEZ, Glafiro. Variability in the fecal egg count and the parasitic burden of hair sheep after grazing in nematode infected paddocks. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. avril 2013. Vol. 33, n° 4, pp. 469-475. DOI 10.1590/S0100-736X2013000400010.

68. BÉLANGER, Denise, COCKBURN, Amanda M., LÉBOEUF, Anne et VILLENEUVE, Alain. *Gestion intégrée du parasitisme gastro-intestinal chez les moutons*. 2007. Centre d'expertise en production ovine du Québec.

69. EYSKER, M et W PLOEGER, H. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*. 2000. Vol. 120 Suppl, pp. S109-19. DOI 10.1017/S0031182099005752.

70. BERGHEN, P., HILDERSON, H., VERCRUYSSSE, J. et DORNY, P. Evaluation of pepsinogen, gastrin and antibody response in diagnosing ostertagiasis. *Veterinary Parasitology*. février 1993. Vol. 46, n° 1-4, pp. 175-195. DOI 10.1016/0304-4017(93)90057-T.
71. ZARLENGA, D.S., HOBERG, E.P. et TUO, W. The Identification of Haemonchus Species and Diagnosis of Haemonchosis. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier, 2016. pp. 145-180. [Consulté le 26 juillet 2019]. ISBN 978-0-12-810395-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X16300239>
72. HOSTE, H. Alternative methods for the sustainable control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. . N° 67, pp. 6.
73. LACEY, E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*. avril 1990. Vol. 6, n° 4, pp. 112-115. DOI 10.1016/0169-4758(90)90227-U.
74. PAUTRIC-THOMAS, Séverine. Données récentes sur la résistance sur la Résistance aux Anthelminthiques des Strongles Gastro-Intestinaux des Ruminants. . 2003. pp. 100.
75. JACQUIET, Philippe. *Les strongyloses gastro-intestinales des Ruminants*. 2014.
76. PAGE, Stephen W. Antiparasitic drugs. *SELECTIVE TOXICITY*. pp. 63.
77. *Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires*. 2019. Le Point Vétérinaire.
78. HARRIS, Ben G. Levamisole: mode of action. *Biochemical Society Transactions*. février 1987. Vol. 15, n° 1, pp. 61.1-61. DOI 10.1042/bst0150061.
79. MARTIN, R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*. juillet 1997. Vol. 154, n° 1, pp. 11-34. DOI 10.1016/S1090-0233(05)80005-X.
80. MARTIN, R. J. et ROBERTSON, A. P. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. *Parasitology*. août 2007. Vol. 134, n° 8, pp. 1093-1104. DOI 10.1017/S0031182007000029.
81. BOGAN, J.A, MARRINER, S.E et GALBRAITH, E.A. Pharmacokinetics of levamisole in sheep. *Research in Veterinary Science*. 1982. Vol. 32, pp. 124-126.
82. MOHAMMED-ALI, N. A. K. et BOGAN, J. A. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxcyclosanide. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. juin 1987. Vol. 10, n° 2, pp. 127-133. DOI 10.1111/j.1365-2885.1987.tb00089.x.
83. VEILLET, François. *Le Closantel : synthèse bibliographique*. 2001. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, École Nationale Vétérinaire de Toulouse-ENVT.
84. DORCHIES, Ph et DUCOS DE LAHITTE, J. Etude de l'activité résiduelle du closantel sur Haemonchus contortus chez l'agneau. *Rev. Med. Vet.* 1988. N° 139, pp. 529-532.
85. DUPUY, Jacques, SUTRA, Jean-François, ALVINERIE, Michel, RINALDI, Laura, VENEZIANO, Vincenzo, MEZZINO, Laura, PENNACCHIO, Saverio et CRINGOLI,

Giuseppe. Plasma and milk kinetic of eprinomectin and moxidectin in lactating water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Parasitology*. novembre 2008. Vol. 157, n° 3-4, pp. 284-290. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.07.027.

86. KAMINSKY, Ronald, DUCRAY, Pierre, JUNG, Martin, CLOVER, Ralph, RUFENER, Lucien, BOUVIER, Jacques, WEBER, Sandra Schorderet, WENGER, Andre, WIELAND-BERGHAUSEN, Susanne, GOEBEL, Thomas, GAUVRY, Noelle, PAUTRAT, François, SKRIPSKY, Thomas, FROELICH, Olivier, KOMOIN-OKA, Clarisse, WESTLUND, Bethany, SLUDER, Ann et MÄSER, Pascal. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. mars 2008. Vol. 452, n° 7184, pp. 176-180. DOI 10.1038/nature06722.

87. KAMINSKY, R., GAUVRY, N., SCHORDERET WEBER, S., SKRIPSKY, T., BOUVIER, J., WENGER, A., SCHROEDER, F., DESAULES, Y., HOTZ, R., GOEBEL, T., HOSKING, B. C., PAUTRAT, F., WIELAND-BERGHAUSEN, S. et DUCRAY, P. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*. septembre 2008. Vol. 103, n° 4, pp. 931-939. DOI 10.1007/s00436-008-1080-7.

88. ABONGWA, Melanie, MARJANOVIC, Djordje S., TIPTON, James G., ZHENG, Fudan, MARTIN, Richard J., TRAILOVIC, Sasa M. et ROBERTSON, Alan P. Monepantel is a non-competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors from *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. avril 2018. Vol. 8, n° 1, pp. 36-42. DOI 10.1016/j.ijpddr.2017.12.001.

89. HAFSI, F., CHINA, B. et GHALMI, F. Le monepantel, un nouvel anthelmintique efficace contre les nématodes gastro-intestinaux des ovins. *Ann. Méd. Vét.* 2012. N° 156, pp. 66-76.

90. KELLY, J.D. et HALL, C.A. Resistance of Animal Helminths to Anthelmintics. In : *Advances in Pharmacology* [en ligne]. Elsevier, 1979. pp. 89-128. [Consulté le 4 août 2019]. ISBN 978-0-12-032916-8. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1054358908602434>

91. PLOEGER, H.W. et EVERTS, R.R. Alarming levels of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*. octobre 2018. Vol. 262, pp. 11-15. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.09.007.

92. KOTZE, A.C. et PRICHARD, R.K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier, 2016. pp. 397-428. [Consulté le 4 août 2019]. ISBN 978-0-12-810395-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X16300124>

93. JAMES, Catherine E., HUDSON, Amanda L. et DAVEY, Mary W. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends in Parasitology*. juillet 2009. Vol. 25, n° 7, pp. 328-335. DOI 10.1016/j.pt.2009.04.004.

94. PARAUD, C., MARCOTTY, T., LESPINE, A., SUTRA, J.F., PORS, I. et DEVOS, I. Cross-resistance to moxidectin and ivermectin on a meat sheep farm in France. *Veterinary Parasitology*. août 2016. Vol. 226, pp. 88-92. DOI 10.1016/j.vetpar.2016.06.033.

95. GHISI, Marc, KAMINSKY, Ronald et MÄSER, Pascal. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*. mars 2007. Vol. 144, n° 3-4, pp. 313-320. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.10.003.
96. JACQUIET, Philippe, FIDELLE, Francis, LEPETITCOLIN, Elisabeth, PRIVAT, Simon, GAILLAC, Christie, BERGEAUD, Jean-Paul et HOSTE, Hervé. État des lieux de la résistance aux anthelminthiques en France chez les ovins. . Vol. 7, pp. 7.
97. KAPLAN, Ray M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. octobre 2004. Vol. 20, n° 10, pp. 477-481. DOI 10.1016/j.pt.2004.08.001.
98. VAN WYK, J.A., GERBER, H.M. et ALVES, R.M. Slight resistance to the residual effect of closantel in a field strain of *Haemonchus contortus* which showed an increased resistance after one selection in the laboratory. *Onderstepoort J Vet Res*. 1982. Vol. 49, n° 4, pp. 257-261.
99. HOSKING, Barry C., KAMINSKY, Ronald, SAGER, Heinz, ROLFE, Peter F. et SEEWALD, Wolfgang. A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*. janvier 2010. Vol. 106, n° 2, pp. 529-532. DOI 10.1007/s00436-009-1636-1.
100. KAMINSKY, Ronald, BAPST, Beatrice, STEIN, Philip A., STREHLAU, Guenther A., ALLAN, Brooke A., HOSKING, Barry C., ROLFE, Peter F. et SAGER, Heinz. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitology Research*. juillet 2011. Vol. 109, n° 1, pp. 19-23. DOI 10.1007/s00436-010-2216-0.
101. SCOTT, I., POMROY, W.E., KENYON, P.R., SMITH, G., ADLINGTON, B. et MOSS, A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*. novembre 2013. Vol. 198, n° 1-2, pp. 166-171. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.07.037.
102. MEDEROS, América E, RAMOS, Zully et BANCHERO, Georgette E. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors* [en ligne]. décembre 2014. Vol. 7, n° 1. [Consulté le 5 août 2019]. DOI 10.1186/s13071-014-0598-z. Disponible à l'adresse : <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-014-0598-z>
103. SALES, Narelle et LOVE, Stephen. Resistance of *Haemonchus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel / abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. *Veterinary Parasitology*. septembre 2016. Vol. 228, pp. 193-196. DOI 10.1016/j.vetpar.2016.08.016.
104. MUCHIUT, Sebastián Manuel, FERNÁNDEZ, Alicia Silvina, STEFFAN, Pedro Eduardo, RIVA, Eliana et FIEL, César Alberto. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Veterinary Parasitology*. avril 2018. Vol. 254, pp. 43-48. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.03.004.

105. CABARET, J., BENOIT, M., LAIGNEL, G. et NICOURT, C. Current management of farms and internal parasites by conventional and organic meat sheep French farmers and acceptance of targeted selective treatments. *Veterinary Parasitology*. septembre 2009. Vol. 164, n° 1, pp. 21-29. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.04.018.
106. TORRES-ACOSTA, J.F.J. et HOSTE, H. 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. DOI 10.1016/j.smallrumres.2008.03.009.
107. MCKELLAR, Q.A. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*. novembre 1997. Vol. 72, n° 3-4, pp. 413-435. DOI 10.1016/S0304-4017(97)00108-8.
108. WAGIL, Marta, BIAŁK-BIELIŃSKA, Anna, PUCKOWSKI, Alan, WYCHODNIK, Katarzyna, MASZKOWSKA, Joanna, MULKIEWICZ, Ewa, KUMIRSKA, Jolanta, STEPNOWSKI, Piotr et STOLTE, Stefan. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*. février 2015. Vol. 22, n° 4, pp. 2566-2573. DOI 10.1007/s11356-014-3497-0.
109. LUMARET, Jean-Pierre et NASSERA, Kadiri. *Ecotoxicité : les traitements antiparasitaires persistants, bioaccumulables et toxiques (PBT). Définitions et effets environnementaux*. 2018. Journées Nationales GTV -Nantes.
110. CROZIER, Alan, JAGANATH, Indu B. et CLIFFORD, Michael N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In : CROZIER, Alan, CLIFFORD, Michael N. et ASHIHARA, Hiroshi (éd.), *Plant Secondary Metabolites* [en ligne]. Oxford, UK : Blackwell Publishing Ltd, 2006. pp. 1-24. [Consulté le 14 août 2019]. ISBN 978-0-470-98855-8. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470988558.ch1>
111. HASLAM, Edwin. Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense? A reappraisal. *Journal of Chemical Ecology*. octobre 1988. Vol. 14, n° 10, pp. 1789-1805. DOI 10.1007/BF01013477.
112. KHANBABAEI, Karamali et VAN REE, Teunis. Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*. 11 décembre 2001. Vol. 18, n° 6, pp. 641-649. DOI 10.1039/b101061l.
113. BRUNET, S., AUFRERE, J., EL BABILI, F., FOURASTE, I. et HOSTE, H. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*. août 2007. Vol. 134, n° 9, pp. 1253-1262. DOI 10.1017/S0031182007002533.
114. HOSTE, Hervé, TORRES-ACOSTA, Juan-Felipe, ALONSO-DIAZ, Miguel Angel, BRUNET, Séverine, SANDOVAL-CASTRO, Carlos et HOUZANGBE ADOTE, Sylvie. Identification of bioactive plants for the control of GIN. *Tropical Biomedicine*. 2008. Vol. 25, n° 1, pp. 56-72.
115. OLIVEIRA, Andreia F., COSTA JUNIOR, Livio M., LIMA, Aldilene S., SILVA, Carolina R., RIBEIRO, Maria N.S., MESQUISTA, José W.C., ROCHA, Cláudia Q., TANGERINA, Marcelo M.P. et VILEGAS, Wagner. Anthelmintic activity of plant extracts from Brazilian savanna. *Veterinary Parasitology*. mars 2017. Vol. 236, pp. 121-127. DOI 10.1016/j.vetpar.2017.02.005.

116. BARRAU, E., FABRE, N., FOURASTE, I. et HOSTE, H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus* : role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology*. 16 juin 2005. Vol. 131, n° 04, pp. 531. DOI 10.1017/S0031182005008024.
117. HOSTE, Hervé, JACKSON, Frank, ATHANASIADOU, Spiridoula, THAMSBORG, Stig. M. et HOSKIN, Simone O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. juin 2006. Vol. 22, n° 6, pp. 253-261. DOI 10.1016/j.pt.2006.04.004.
118. ATHANASIADOU, S, KYRIAZAKIS, I, JACKSON, F et COOP, R.L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology*. août 2001. Vol. 99, n° 3, pp. 205-219. DOI 10.1016/S0304-4017(01)00467-8.
119. LE BOURVELLEC, C. et RENARD, C.M.G.C. Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. mars 2012. Vol. 52, n° 3, pp. 213-248. DOI 10.1080/10408398.2010.499808.
120. MIN, B.R., POMROY, W.E., HART, S.P. et SAHLU, T. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Research*. mars 2004. Vol. 51, n° 3, pp. 279-283. DOI 10.1016/S0921-4488(03)00204-9.
121. MIN, B.R, BARRY, T.N, ATTWOOD, G.T et MCNABB, W.C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*. avril 2003. Vol. 106, n° 1-4, pp. 3-19. DOI 10.1016/S0377-8401(03)00041-5.
122. ALAEDDINE, Ferial. Études moléculaires de la surface des nématodes. *Thèse Universitaire de Biologie, Université de Neuchâtel-Département de Parasitologie*. 2000.
123. QUIJADA, Jessica, FRYGANAS, Christos, ROPIAK, Honorata M., RAMSAY, Aina, MUELLER-HARVEY, Irene et HOSTE, Hervé. Anthelmintic Activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from Small Ruminants Are Influenced by Structural Features of Condensed Tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 22 juillet 2015. Vol. 63, n° 28, pp. 6346-6354. DOI 10.1021/acs.jafc.5b00831.
124. DESRUES, Olivier, MUELLER-HARVEY, Irene, PELLIKAAN, Wilbert F., ENEMARK, Heidi L. et THAMSBORG, Stig M. Condensed Tannins in the Gastrointestinal Tract of Cattle after Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Intake and Their Possible Relationship with Anthelmintic Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 22 février 2017. Vol. 65, n° 7, pp. 1420-1427. DOI 10.1021/acs.jafc.6b05830.
125. 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. 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. DOI 10.1016/j.vetpar.2015.06.026.
126. DUBOIS, O., ALLANIC, C., CHARVET, C. L., GUÉGNARD, F., FÉVRIER, H., THÉRY-KONÉ, I., CORTET, J., KOCH, C., BOUVIER, F., FASSIER, T., MARCON, D.,

MAGNIN-ROBERT, J. B., PEINEAU, N., COURTOT, E., HUAU, C., MEYNADIER, A., ENGUEHARD-GUEIFFIER, C., NEVEU, C., BOUDESOCQUE-DELAYE, L. et SALLÉ, G. Lupin (*Lupinus* spp.) seeds exert anthelmintic activity associated with their alkaloid content. *Scientific Reports* [en ligne]. décembre 2019. Vol. 9, n° 1. [Consulté le 2 septembre 2019]. DOI 10.1038/s41598-019-45654-6. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/s41598-019-45654-6>

127. CHARVET, Claude L., GUÉGNARD, Fabrice, COURTOT, Elise, CORTET, Jacques et NEVEU, Cedric. Nicotine-sensitive acetylcholine receptors are relevant pharmacological targets for the control of multidrug resistant parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. décembre 2018. Vol. 8, n° 3, pp. 540-549. DOI 10.1016/j.ijpddr.2018.11.003.

128. LEE, Stephen T., COOK, Daniel, PANTER, Kip E., GARDNER, Dale R., RALPHS, Michael H., MOTTERAM, Ernie S., PFISTER, James A. et GAY, Clive C. Lupine Induced “Crooked Calf Disease” in Washington and Oregon: Identification of the Alkaloid Profiles in *Lupinus sulfureus*, *Lupinus leucophyllus*, and *Lupinus sericeus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. décembre 2007. Vol. 55, n° 26, pp. 10649-10655. DOI 10.1021/jf0723110.

129. GRZYBEK, Maciej, KUKULA-KOCH, Wirginia, STRACHECKA, Aneta, JAWORSKA, Aleksandra, PHIRI, Andrew, PALEOLOG, Jerzy et TOMCZUK, Krzysztof. Evaluation of Anthelmintic Activity and Composition of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Extracts—In Vitro and in Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 1 septembre 2016. Vol. 17, n° 9, pp. 1456. DOI 10.3390/ijms17091456.

130. MARIE-MAGDELEINE, C., HOSTE, H., MAHIEU, M., VARO, H. et ARCHIMEDE, H. In vitro effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. avril 2009. Vol. 161, n° 1-2, pp. 99-105. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.12.008.

131. MICHEL, J.F. The Epidemiology and Control of Some Nematode Infections of Grazing Animals. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier, 1969. pp. 211-282. [Consulté le 2 septembre 2019]. ISBN 978-0-12-031707-3. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08604364>

132. WALLER, Peter J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology*. mars 2006. Vol. 126, n° 3-4, pp. 277-289. DOI 10.1016/j.anifeedsci.2005.08.007.

133. THAMSBORG, S.M., JØRGENSEN, R.J., WALLER, P.J. et NANSEN, P. The influence of stocking rate on gastrointestinal nematode infections of sheep over a 2-year grazing period. *Veterinary Parasitology*. décembre 1996. Vol. 67, n° 3-4, pp. 207-224. DOI 10.1016/S0304-4017(96)01045-X.

134. MAHIEU, Maurice. Effects of stocking rates on gastrointestinal nematode infection levels in a goat/cattle rotational stocking system. *Veterinary Parasitology*. novembre 2013. Vol. 198, n° 1-2, pp. 136-144. DOI 10.1016/j.vetpar.2013.08.029.

135. MORLEY, F.H.W. et DONALD, A.D. Farm management and systems of helminth control. *Veterinary Parasitology*. janvier 1980. Vol. 6, n° 1-3, pp. 105-134.

- DOI 10.1016/0304-4017(80)90040-0. Morley, F.H.W. and Donald, A.D., 1980. Farm management and systems of helminth control. *Vet. Parasitol.*, 6: 105--134.
136. HOSTE, H, GUITARD, JP et PONS, JC. Pâturage mixte entre ovins et bovins : Intérêt dans la gestion des strongyloses gastrointestinales. *Alter Agri*. 2003. N° 61, pp. 20-23.
137. BRITO, Daiana Lima, DALLAGO, Bruno Stéfano Lima, LOUVANDINI, Helder, SANTOS, Viviane Rodrigues Verdolin dos, TORRES, Sonia Emília Figueirêdo de Araújo, GOMES, Edgard Franco, AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do, MELO, Cristiano Barros de et MCMANUS, Concepta Margaret. Effect of alternate and simultaneous grazing on endoparasite infection in sheep and cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. décembre 2013. Vol. 22, n° 4, pp. 485-494. DOI 10.1590/S1984-29612013000400007.
138. VAN WYK, Jan A. Integrated worm control as a strategy in the control of gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. *Journal of the South African Veterinary Association*. 1990. Vol. 61, n° 3, pp. 141-145.
139. DUDDINGTON, C. L. Nematode-destroying Fungi in Agricultural Soils. *Nature*. mars 1954. Vol. 173, n° 4402, pp. 500-501. DOI 10.1038/173500a0.
140. LI, Guohong, ZHANG, Keqin, XU, Jianping, DONG, Jinyan et LIU, Yajun. Nematicidal Substances from Fungi. *Recent Patents on Biotechnology*. 1 novembre 2007. Vol. 1, n° 3, pp. 212-233. DOI 10.2174/187220807782330165.
141. MENDOZA-DE GIVES, Pedro et VAZQUEZ-PRATS, Victor M. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Veterinary Parasitology*. novembre 1994. Vol. 55, n° 3, pp. 197-203. DOI 10.1016/0304-4017(93)00646-G.
142. MENDOZA DE GIVES, P., FLORES CRESPO, J., HERRERA RODRIGUEZ, D., VAZQUEZ PRATS, V., LIEBANO HERNANDEZ, E. et ONTIVEROS FERNANDEZ, G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. *Journal of Helminthology*. décembre 1998. Vol. 72, n° 4, pp. 343-347. DOI 10.1017/S0022149X00016710.
143. WANG, Bo-Bo, WANG, Feng-Hui, XU, Qiang, WANG, Kang-Ying, XUE, Yu-Jia, REN, Rui, ZENG, Jia-Qing, LIU, Yang, ZHANG, Hai-Yan, WANG, Hai-Yu, CAI, Bin, CAI, Kui-Zheng et CAO, Xin. *In vitro* and *in vivo* studies of the native isolates of nematophagous fungi from China against the larvae of trichostrongylides. *Journal of Basic Microbiology*. mars 2017. Vol. 57, n° 3, pp. 265-275. DOI 10.1002/jobm.201600620.
144. ROCHA, R.A., ARAÚJO, J.V. et AMARANTE, A.F.T. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. *Journal of Helminthology*. décembre 2007. Vol. 81, n° 4, pp. 387-392. DOI 10.1017/S0022149X07853697.
145. OJEDA-ROBERTOS, Nadia F, TORRES-ACOSTA, Juan FJ, AYALA-BURGOS, Armín J, SANDOVAL-CASTRO, Carlos A, VALERO-COSS, Rosa O et MENDOZA-DE-GIVES, Pedro. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in ruminants: in vitro

and in vivo studies. *BMC Veterinary Research*. 2009. Vol. 5, n° 1, pp. 46. DOI 10.1186/1746-6148-5-46.

146. OJEDA-ROBERTOS, Nadia Florencia, TORRES-ACOSTA, Juan Felipe de Jesus, AGUILAR-CABALLERO, Armando Jacinto, AYALA-BURGOS, Armín, COB-GALERA, Ligia Amira, SANDOVAL-CASTRO, Carlos Alfredo, BARRIENTOS-MEDINA, Roberto Carlos et MENDOZA DE GIVES, Pedro. Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*. décembre 2008. Vol. 158, n° 4, pp. 329-335. DOI 10.1016/j.vetpar.2008.08.022.

147. MENDOZA-DE GIVES, Pedro, ZAPATA NIETO, Claudia, LIÉBANO HERNÁNDEZ, Enrique, LÓPEZ ARELLANO, María Eugenia, RODRÍGUEZ, David Herrera et GARDUÑO, Roberto González. Biological Control of Gastrointestinal Parasitic Nematodes Using *Duddingtonia flagrans* in Sheep under Natural Conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*. octobre 2006. Vol. 1081, n° 1, pp. 355-359. DOI 10.1196/annals.1373.050.

148. BUSKE, Rodrigo, SANTURIO, Janio Morais, DE OLIVEIRA, Clarissa Vasconcelos, BIANCHINI, Liziane Aita, DA SILVA, José Henrique Souza et DE LA RUE, Mario Luiz. In vitro influence of temperature on the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology Research*. février 2013. Vol. 112, n° 2, pp. 473-478. DOI 10.1007/s00436-012-3156-7.

149. AGUILAR-MARCELINO, L., MENDOZA-DE-GIVES, P., TORRES-HERNÁNDEZ, G., LÓPEZ-ARELLANO, M.E., BECERRIL-PÉREZ, C.M., ORIHUELA-TRUJILLO, A., TORRES-ACOSTA, J.F.J. et OLMEDO-JUÁREZ, A. Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal of Helminthology*. novembre 2017. Vol. 91, n° 6, pp. 665-671. DOI 10.1017/S0022149X1600081X.

150. SAUMELL, C.A., FERNÁNDEZ, A.S., ECHEVARRIA, F., GONÇALVES, I., IGLESIAS, L., SAGÜES, M.F. et RODRÍGUEZ, E.M. Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *Journal of Helminthology*. novembre 2016. Vol. 90, n° 6, pp. 706-711. DOI 10.1017/S0022149X1500098X.

151. HEALEY, Kevin, LAWLOR, Chris, KNOX, Malcolm R., CHAMBERS, Michael, LAMB, Jane et GROVES, Peter. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Pasture larval studies in horses, cattle and goats. *Veterinary Parasitology*. juillet 2018. Vol. 258, pp. 124-132. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.06.017.

152. YOUSSEF, Loubna, WERNET, Valentin, HENSEL, Nicole, YU, Xi, HILDEBRAND, Heinz-Georg, SCHRECKENBERGER, Birgit, KRIEGLER, Marius, HETZER, Birgit, FRANKINO, Phillip, DILLIN, Andrew et FISCHER, Reinhard. Intercellular communication is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. FREITAG, Michael (éd.), *PLOS Genetics*. 27 mars 2019. Vol. 15, n° 3, pp. e1008029. DOI 10.1371/journal.pgen.1008029.

153. TIAN, Baoyu, YANG, Jinkui et ZHANG, Ke-Qin. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects: Nematophagous bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. août 2007. Vol. 61, n° 2, pp. 197-213. DOI 10.1111/j.1574-6941.2007.00349.x.
154. SCHESSER, John H. Commercial Formulations of *Bacillus thuringiensis* for Control of Indian Meal Moth. *Applied and Environmental Microbiology*. octobre 1976. Vol. 32, n° 4, pp. 508-510.
155. LOUDHAIEF, Rihab. Effets des bioinsecticides à base de *Bacillus thuringiensis* sur la physiologie intestinale de la Drosophile. . pp. 213.
156. SINOTT, M.C., CUNHA FILHO, N.A., CASTRO, L.L.D., LORENZON, L.B., PINTO, N.B., CAPELLA, G.A. et LEITE, F.P.L. *Bacillus* spp. toxicity against *Haemonchus contortus* larvae in sheep fecal cultures. *Experimental Parasitology*. octobre 2012. Vol. 132, n° 2, pp. 103-108. DOI 10.1016/j.exppara.2012.05.015.
157. PALMA, Leopoldo, MUÑOZ, Delia, BERRY, Colin, MURILLO, Jesús et CABALLERO, Primitivo. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*. 11 décembre 2014. Vol. 6, n° 12, pp. 3296-3325. DOI 10.3390/toxins6123296.
158. WEI, J.-Z., HALE, K., CARTA, L., PLATZER, E., WONG, C., FANG, S.-C. et AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 4 mars 2003. Vol. 100, n° 5, pp. 2760-2765. DOI 10.1073/pnas.0538072100.
159. KOTZE, A.C., O'GRADY, J., GOUGH, J.M., PEARSON, R., BAGNALL, N.H., KEMP, D.H. et AKHURST, R.J. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*. août 2005. Vol. 35, n° 9, pp. 1013-1022. DOI 10.1016/j.ijpara.2005.03.010.
160. SIEGEL, Joel P. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*- Based Insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*. janvier 2001. Vol. 77, n° 1, pp. 13-21. DOI 10.1006/jipa.2000.5000.
161. LÓPEZ, Maria E., FLORES, Jaime, MENDOZA, Pedro, VÁZQUEZ, Victor, LIÉBANO, Enrique, BRAVO, Alejandra, HERRERA, David, GODÍNES, Elena, VARGAS, Patricia et ZAMUDIO, Fabian. Use of *Bacillus thuringiensis* Toxin as an Alternative Method of Control against *Haemonchus contortus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. octobre 2006. Vol. 1081, n° 1, pp. 347-354. DOI 10.1196/annals.1373.049.
162. O'GRADY, J., AKHURST, R.J. et KOTZE, A.C. The requirement for early exposure of *Haemonchus contortus* larvae to *Bacillus thuringiensis* for effective inhibition of larval development. *Veterinary Parasitology*. novembre 2007. Vol. 150, n° 1-2, pp. 97-103. DOI 10.1016/j.vetpar.2007.09.012.
163. DE LARA, Ana Paula De Souza Stori, LORENZON, Lucas Bigolin, VIANNA, Ana Muñoz, SANTOS, Francisco Denis Souza, PINTO, Luciano Silva, AIRES BERNE, Maria Elisabeth et LEITE, Fábio Pereira Leivas. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. octobre 2016. Vol. 143, n° 12, pp. 1665-1671. DOI 10.1017/S0031182016001451.

164. PAGE, Antony P., ROBERTS, Mark, FÉLIX, Marie-Anne, PICKARD, Derek, PAGE, Andrew et WEIR, William. The golden death bacillus *Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. *BMC Biology* [en ligne]. décembre 2019. Vol. 17, n° 1. [Consulté le 9 septembre 2019]. DOI 10.1186/s12915-019-0632-x. Disponible à l'adresse : <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-019-0632-x>
165. D'ALEXIS, S., LORANGER-MERCIRIS, G., MAHIEU, M. et BOVAL, M. Influence of earthworms on development of the free-living stages of gastrointestinal nematodes in goat faeces. *Veterinary Parasitology*. juillet 2009. Vol. 163, n° 1-2, pp. 171-174. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.03.056.
166. SILVA, Manoel Eduardo da, URIOSTEGUI, Miguel Angel Mercado, MILLÁN-OROZCO, Jair, GIVES, Pedro Mendoza de, HERNÁNDEZ, Enrique Liébano, BRAGA, Fabio Ribeiro et ARAÚJO, Jackson Victor de. Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 26 janvier 2017. Vol. 26, n° 1, pp. 92-95. DOI 10.1590/s1984-29612016091.
167. ANDRE, Jean, VILLENAVE, Cécile, CHARPENTIER, Fabienne, BERNIER, Nicolas, LAVELLE, Patrick, PONGE, Jean-François, DEROUARD, Laurent, PASHANASI, Beto et ROSSI, Jean-Pierre. Effects of Earthworms on Soil Organic Matter and Nutrient Dynamics at a Landscape Scale over Decades. In : EDWARDS, Clive (éd.), *Earthworm Ecology* [en ligne]. CRC Press, 2004. pp. 145-160. [Consulté le 6 septembre 2019]. ISBN 978-0-8493-1819-1. Disponible à l'adresse : <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9781420039719.pt4>
168. LACROUX, Caroline. Régulation des populations de Nématodes gastro-intestinaux (*Haemonchus contortus* et *Trichostrongylus colubriformis*) dans deux races ovines, INRA 401 et Barbados Black Belly. . pp. 234.
169. MORENO-ROMIEUX, C., SALLE, G., JACQUIET, P., BLANCHARD, A., CHYLINSKI, C., CABARET, J., FRANÇOIS, D., SACCAREAU, M., ASTRUC, J.M., BAMBOU, J.C. et MANDONNET, N. Genetic resistance to gastro-intestinal parasites of small ruminants: A challenge for sustainable production on pastures. *Renc. Rech. Ruminants*. 2015. Vol. 22, pp. 8.
170. STEAR, M.J., BAIRDEN, K., DUNCAN, J.L. et MURRAY, Max. A comparison of the responses to repeated experimental infections with *Haemonchus contortus* among Scottish Blackface lambs. *Veterinary Parasitology*. novembre 1995. Vol. 60, n° 1-2, pp. 69-81. DOI 10.1016/0304-4017(94)00776-9.
171. COLDITZ, I.G. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livestock Production Science*. juillet 2002. Vol. 75, n° 3, pp. 257-268. DOI 10.1016/S0301-6226(01)00320-7.
172. SHARPE, C., THORNTON, D. J. et GRENCIS, R. K. A sticky end for gastrointestinal helminths; the role of the mucus barrier. *Parasite Immunology*. avril 2018. Vol. 40, n° 4, pp. e12517. DOI 10.1111/pim.12517.
173. SIMPSON, H.V., UMAIR, S., HOANG, V.C. et SAVOIAN, M.S. Histochemical study of the effects on abomasal mucins of *Haemonchus contortus* or *Teladorsagia*

circumcincta infection in lambs. *Veterinary Parasitology*. août 2016. Vol. 226, pp. 210-221. DOI 10.1016/j.vetpar.2016.06.026.

174. INGHAM, Aaron, REVERTER, Antonio, WINDON, Ross, HUNT, Peter et MENZIES, Moira. Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. *International Journal for Parasitology*. mars 2008. Vol. 38, n° 3-4, pp. 431-442. DOI 10.1016/j.ijpara.2007.07.012.

175. ISHIKAWA, N., SHI, B.-B., KHAN, A. I. et NAWA, Y. Reserpine-induced sulphomucin production by goblet cells in the jejunum of rats and its significance in the establishment of intestinal helminths. *Parasite Immunology*. novembre 1995. Vol. 17, n° 11, pp. 581-586. DOI 10.1111/j.1365-3024.1995.tb01001.x.

176. TSUBOKAWA, Daigo, NAKAMURA, Takeshi, GOSO, Yukinobu, TAKANO, Yuko, KURIHARA, Makoto et ISHIHARA, Kazuhiko. Nippostrongylus brasiliensis: Increase of sialomucins reacting with anti-mucin monoclonal antibody HCM31 in rat small intestinal mucosa with primary infection and reinfection. *Experimental Parasitology*. décembre 2009. Vol. 123, n° 4, pp. 319-325. DOI 10.1016/j.exppara.2009.08.008.

177. VALLANCE, B. A., BLENNERHASSETT, P. A. et COLLINS, S. M. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1 février 1997. Vol. 272, n° 2, pp. G321-G327. DOI 10.1152/ajpgi.1997.272.2.G321.

178. MACKINNON, K.M., BURTON, J.L., ZAJAC, A.M. et NOTTER, D.R. Microarray analysis reveals difference in gene expression profiles of hair and wool sheep infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. août 2009. Vol. 130, n° 3-4, pp. 210-220. DOI 10.1016/j.vetimm.2009.02.013.

179. RAINBIRD, M. A, MACMILLAN, D. et MEEUSEN, E. N. T. Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvar: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5: *Parasite Immunology*. *Parasite Immunology*. février 1998. Vol. 20, n° 2, pp. 93-103. DOI 10.1046/j.1365-3024.1998.00132.x.

180. MEEUSEN, E.N.T et BALIC, A. Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? *Parasitology Today*. mars 2000. Vol. 16, n° 3, pp. 95-101. DOI 10.1016/S0169-4758(99)01607-5.

181. ALBA-HURTADO, Fernando et MUÑOZ-GUZMÁN, Marco Antonio. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *BioMed Research International*. 2013. Vol. 2013, pp. 1-11. DOI 10.1155/2013/162158.

182. SUCHITRA, Sajja et JOSHI, Paritosh. Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. avril 2005. Vol. 1722, n° 3, pp. 293-303. DOI 10.1016/j.bbagen.2004.12.020.

183. SAHOO, S., MURUGAVEL, S., DEVI, I. K., VEDAMURTHY, G. V., GUPTA, S. C., SINGH, B. P. et JOSHI, P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of the parasitic nematode *Haemonchus contortus* binds to complement C3 and inhibits its activity. *Parasite Immunology*. décembre 2013. Vol. 35, n° 12, pp. 457-467. DOI 10.1111/pim.12058.

184. HOHENHAUS, M.A. et OUTERIDGE, P.M. The immunogenetics of resistance to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* parasites in sheep. *British Veterinary Journal*. mars 1995. Vol. 151, n° 2, pp. 119-140. DOI 10.1016/S0007-1935(95)80004-2.
185. MEEUSEN, Els N.T., BALIC, Adam et BOWLES, Vernon. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. octobre 2005. Vol. 108, n° 1-2, pp. 121-125. DOI 10.1016/j.vetimm.2005.07.002.
186. MOSMANN, T R, CHERWINSKI, H, BOND, M W, GIEDLIN, M A et COFFMAN, L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. . pp. 11.
187. PAUL, William E. et SEDER, Robert A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. janvier 1994. Vol. 76, n° 2, pp. 241-251. DOI 10.1016/0092-8674(94)90332-8.
188. GILL, H S et WATSON, D L. Monoclonal antibody to CD4 + T cells abrogates genetic resistance to *Haemonchus contortus* in sheep. . pp. 7.
189. KARANU, Francis N, MCGUIRE, TRAVIS C, DAVIS, William C, BESSER, Thomas E et JASMER, Douglas P. CD4+ T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunology*. 1997. Vol. 19, n° 10, pp. 11.
190. MCRAE, K. M., STEAR, M. J., GOOD, B. et KEANE, O. M. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunology*. décembre 2015. Vol. 37, n° 12, pp. 605-613. DOI 10.1111/pim.12290.
191. AMARANTE, A.F.T., BRICARELLO, P.A., HUNTLEY, J.F., MAZZOLIN, L.P. et GOMES, J.C. Relationship of abomasal histology and parasite-specific immunoglobulin A with the resistance to *Haemonchus contortus* infection in three breeds of sheep. *Veterinary Parasitology*. mars 2005. Vol. 128, n° 1-2, pp. 99-107. DOI 10.1016/j.vetpar.2004.11.021.
192. TEREFE, G., LACROUX, C., PRÉVOT, F., GRISEZ, C., BERGEAUD, J.P., BLEUART, C., DORCHIES, P., FOUCRAS, G. et JACQUIET, P. Eosinophils in *Haemonchus contortus*-infected resistant and susceptible breeds of sheep: Abomasal tissue recruitment and in vitro functional state. *Veterinary Parasitology*. octobre 2009. Vol. 165, n° 1-2, pp. 161-164. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.06.041.
193. MUGAMBI, J.M., BAIN, R.K., WANYANGU, S.W., IHIGA, M.A., DUNCAN, J.L., MURRAY, M. et STEAR, M.J. Resistance of four sheep breeds to natural and subsequent artificial *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Parasitology*. mai 1997. Vol. 69, n° 3-4, pp. 265-273. DOI 10.1016/S0304-4017(96)01128-4.
194. BISSET, S.A., VLASSOFF, A., DOUCH, P.G.C., JONAS, W.E., WEST, C.J. et GREEN, R.S. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Veterinary Parasitology*. février 1996. Vol. 61, n° 3-4, pp. 249-263. DOI 10.1016/0304-4017(95)00836-5.

195. BAHIRATHAN, M., MILLER, J.E., BARRAS, S.R. et KEARNEY, M.T. Susceptibility of Suffolk and Gulf Coast Native suckling lambs to naturally acquired strongylate nematode infection. *Veterinary Parasitology*. octobre 1996. Vol. 65, n° 3-4, pp. 259-268. DOI 10.1016/S0304-4017(96)00969-7.
196. GRUNER, L., AUMONT, G., GETACHEW, T., BRUNEL, J.C., PERY, C., COGNIÉ, Y. et GUÉRIN, Y. Experimental infection of Black Belly and INRA 401 straight and crossbred sheep with trichostrongyle nematode parasites. *Veterinary Parasitology*. octobre 2003. Vol. 116, n° 3, pp. 239-249. DOI 10.1016/j.vetpar.2003.07.005.
197. COURTNEY, C.H., PARKER, C.F., MCCLURE, K.E. et HERD, R.P. Resistance of exotic and domestic lambs to experimental infection with *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. février 1985. Vol. 15, n° 1, pp. 101-109. DOI 10.1016/0020-7519(85)90107-9.
198. BARGER, I.A. Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *International Journal for Parasitology*. juillet 1993. Vol. 23, n° 4, pp. 463-469. DOI 10.1016/0020-7519(93)90034-V.
199. GAULY, M., SCHACKERT, M., HOFFMANN, B. et ERHARDT, G. Influence of sex on the resistance of sheep lambs to an experimental *Haemonchus contortus* infection. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. mai 2006. Vol. 113, n° 5, pp. 178-181.
200. SHAW, K.L., NOLAN, J.V., LYNCH, J.J., COVERDALE, O.R. et GILL, H.S. Effects of Weaning, Supplementation and Gender on Acquired Immunity to *Haemonchus contortus* in Lambs. *International Journal for Parasitology*. 1995. Vol. 25, n° 3, pp. 381-387.
201. DÍAZ H, Aguilar et CASTRO KE, Nava. Endocrine Immune Interactions in the Host-Parasite Relationship: Steroid Hormones as Immune Regulators in Parasite Infections. *Journal of Steroids & Hormonal Science* [en ligne]. 2015. Vol. 06, n° 03. [Consulté le 13 septembre 2019]. DOI 10.4172/2157-7536.1000165. Disponible à l'adresse : <https://www.omicsonline.org/open-access/endocrine-immune-interactions-in-the-hostparasite-relationship-steroidhormones-as-immune-regulators-in-parasite-infections-2157-7536-1000165.php?aid=66321>
202. KIYOTA, M, KORENAGA, M et NAWA, Y. Effect of Androgen on the Expression of the Sex Difference in Susceptibility to infection with *Strongyloides ratti* in C57BL/6 mice. . pp. 13.
203. SARGISON, N.D., JACKSON, F. et GILLEARD, J.S. Effects of age and immune suppression of sheep on fecundity, hatching and larval feeding of different strains of *Haemonchus contortus*. *The Veterinary Journal*. septembre 2011. Vol. 189, n° 3, pp. 296-301. DOI 10.1016/j.tvjl.2010.08.001.
204. MANTON, V.J.A, PEACOCK, R., POYNTER, D., SILVERMAN, P.H. et TERRY, R.J. The Influence of Age on Naturally Acquired Resistance to *Haemonchus contortus* in Lambs. *Research in Veterinary Science*. 1962. N° 3, pp. 308-315.
205. VERVELDE, L., KOOYMAN, F.N.J., VAN LEEUWEN, M.A.W., SCHALLIG, H.D.F.H., MACKELLAR, A., HUNTLEY, J.F. et CORNELISSEN, A.W.C.A. Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory

proteins. *Parasite Immunology*. août 2001. Vol. 23, n° 8, pp. 419-426. DOI 10.1046/j.1365-3024.2001.00391.x.

206. COURTNEY, C H et GESSNER, R. The Periparturient Rise in Fecal Egg Counts in three strains of Florida Native Ewes and its value in predicting Resistance of Lambs to *Haemonchus contortus*. . pp. 5.

207. GIBBS, H.C. et BARGER, I.A. *Haemonchus contortus* and other trichostrongylid infections in parturient, lactating and dry ewes. *Veterinary Parasitology*. novembre 1986. Vol. 22, n° 1-2, pp. 57-66. DOI 10.1016/0304-4017(86)90007-5.

208. ROMERO-ESCOBEDO, Eliseo, TORRES-HERNÁNDEZ, Glafiro, BECERRIL-PÉREZ, Carlos Miguel, ALARCÓN-ZUÑIGA, Baldomero, APODACA-SARABIA, Carlos Antonio et DÍAZ-RIVERA, Pablo. A comparison of Criollo and Suffolk ewes for resistance to *Haemonchus contortus* during the periparturient period. *Journal of Applied Animal Research*. janvier 2018. Vol. 46, n° 1, pp. 17-23. DOI 10.1080/09712119.2016.1252378.

209. BEASLEY, A.M., KAHN, L.P. et WINDON, R.G. The periparturient relaxation of immunity in Merino ewes infected with *Trichostrongylus colubriformis*: Parasitological and immunological responses. *Veterinary Parasitology*. février 2010. Vol. 168, n° 1-2, pp. 60-70. DOI 10.1016/j.vetpar.2009.08.028.

210. BEASLEY, A.M., KAHN, L.P. et WINDON, R.G. The influence of reproductive physiology and nutrient supply on the periparturient relaxation of immunity to the gastrointestinal nematode *Trichostrongylus colubriformis* in Merino ewes. *Veterinary Parasitology*. septembre 2012. Vol. 188, n° 3-4, pp. 306-324. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.03.022.

211. ROY, N. C., BERMINGHAM, E. N., SUTHERLAND, I. A. et MCNABB, W. C. Nematodes and nutrient partitioning. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 2003. Vol. 43, n° 12, pp. 1419. DOI 10.1071/EA02224.

212. MAHIEU, Maurice et AUMONT, Gilles. Periparturient rise in Martinik Hair Sheep and perspectives for gastrointestinal nematode control. *Tropical Animal Health and Production*. 27 août 2007. Vol. 39, n° 6, pp. 387-390. DOI 10.1007/s11250-007-9029-x.

213. URQUHART, G. M., JARRETT, W. F., JENNINGS, F. W., MCINTYRE, W. I., MULLIGAN, W. et SHARP, N. C. Immunity to *Haemonchus contortus* infection. Failure of x-irradiated larvae to immunize young lambs. *American Journal of Veterinary Research*. novembre 1966. Vol. 27, n° 121, pp. 1641-1643.

214. VAN STIJN, Caroline M.W., VAN DEN BROEK, Marloes, VERVELDE, Lonneke, ALVAREZ, Richard A., CUMMINGS, Richard D., TEFSSEN, Boris et DIE, Irma van. Vaccination-induced IgG response to Gal α 1-3GalNAc glycan epitopes in lambs protected against *Haemonchus contortus* challenge infection. *International Journal for Parasitology*. février 2010. Vol. 40, n° 2, pp. 215-222. DOI 10.1016/j.ijpara.2009.07.009.

215. NISBET, A.J., MEEUSEN, E.N., GONZÁLEZ, J.F. et PIEDRAFITA, D.M. Immunity to *Haemonchus contortus* and Vaccine Development. In : *Advances in Parasitology* [en ligne]. Elsevier, 2016. pp. 353-396. [Consulté le 16 septembre 2019]. ISBN 978-0-12-810395-1. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X16300112>

216. KNOX, David P., REDMOND, Diane L., NEWLANDS, George F., SKUCE, Philip J., PETTIT, Dan et SMITH, W.David. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*. septembre 2003. Vol. 33, n° 11, pp. 1129-1137. DOI 10.1016/S0020-7519(03)00167-X.
217. NEWTON, S.E et MUNN, E.A. The Development of Vaccines against Gastrointestinal Nematode Parasites, Particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*. mars 1999. Vol. 15, n° 3, pp. 116-122. DOI 10.1016/S0169-4758(99)01399-X.
218. TEIXEIRA, Marcel, MATOS, Antônio Francisco Igor Magalhães, ALBUQUERQUE, Fernando Henrique M. A., BASSETTO, Cesar Cristiano, SMITH, William David et MONTEIRO, Jomar Patrício. Strategic vaccination of hair sheep against *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. août 2019. Vol. 118, n° 8, pp. 2383-2388. DOI 10.1007/s00436-019-06367-x.
219. SMITH, W.D. et ZARLENGA, D.S. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*. juillet 2006. Vol. 139, n° 4, pp. 347-359. DOI 10.1016/j.vetpar.2006.04.024.
220. BASSETTO, C.C., PICHARILLO, M.É., NEWLANDS, G.F.J., SMITH, W.D., FERNANDES, S., SIQUEIRA, E.R. et AMARANTE, A.F.T. Attempts to vaccinate ewes and their lambs against natural infection with *Haemonchus contortus* in a tropical environment. *International Journal for Parasitology*. décembre 2014. Vol. 44, n° 14, pp. 1049-1054. DOI 10.1016/j.ijpara.2014.07.007.
221. VANHOY, Grace, CARMAN, Michelle, HABING, Greg, LAKRITZ, Jeffrey, HINDS, C. Austin, NIEHAUS, Andrew, KAPLAN, Ray M. et MARSH, Antoinette E. Safety and serologic response to a *Haemonchus contortus* vaccine in alpacas. *Veterinary Parasitology*. mars 2018. Vol. 252, pp. 180-186. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.02.014.
222. COOP, Robert L et KYRIAZAKIS, Ilias. 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. DOI 10.1016/S1471-4922(01)01900-6.
223. COOP, R.L. et KYRIAZAKIS, I. Nutrition–parasite interaction. *Veterinary Parasitology*. août 1999. Vol. 84, n° 3-4, pp. 187-204. DOI 10.1016/S0304-4017(99)00070-9.
224. HOUDIJK, J.G.M, KYRIAZAKIS, I, JACKSON, F, HUNTLEY, J.F et COOP, R.L. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? *Veterinary Parasitology*. juillet 2000. Vol. 91, n° 1-2, pp. 43-62. DOI 10.1016/S0304-4017(00)00255-7.
225. WALLACE, D. S., BAIRDEN, K., DUNCAN, J. L., ECKERSALL, P. D., FISHWICK, G., GILL, M., HOLMES, P. H., MCKELLAR, Q. A., MURRAY, M., PARKINS, J. J. et STEAR, M. J. The influence of dietary supplementation with urea on resilience and resistance to infection with *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. janvier 1998. Vol. 116, n° 1, pp. 67-72. DOI 10.1017/S0031182097001947.
226. ROCHA, R.A., BRICARELLO, P.A., SILVA, M.B., HOUDIJK, J.G.M., ALMEIDA, F.A., CARDIA, D.F.F. et AMARANTE, A.F.T. Influence of protein supplementation during late pregnancy and lactation on the resistance of Santa Ines and Ile de France ewes to

- Haemonchus contortus. *Veterinary Parasitology*. septembre 2011. Vol. 181, n° 2-4, pp. 229-238. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.03.055.
227. INRA. *Alimentation des Ruminants*. Éditions Quæ. Versailles, France, [sans date].
228. VALDERRÁBANO, J. et URIARTE, J. Effect of nutrition in early pregnancy on the periparturient relaxation of immunity to gastro-intestinal parasitism in prolific ewes. *Animal Science*. juin 2003. Vol. 76, n° 3, pp. 481-489. DOI 10.1017/S1357729800058707.
229. KIDANE, Alemayehu, HOUDIJK, Jos, ATHANASIADOU, Spiridoula, TOLKAMP, Bert et KYRIAZAKIS, Ilias. Nutritional sensitivity of periparturient resistance to nematode parasites in two breeds of sheep with different nutrient demands. *British Journal of Nutrition*. novembre 2010. Vol. 104, n° 10, pp. 1477-1486. DOI 10.1017/S0007114510002503.
230. GUO, Zhengyu, GONZÁLEZ, Jorge Francisco, HERNANDEZ, Julia N., MCNEILLY, Tom N., CORRIPIO-MIYAR, Yolanda, FREW, David, MORRISON, Tyler, YU, Peng et LI, Robert W. Possible mechanisms of host resistance to *Haemonchus contortus* infection in sheep breeds native to the Canary Islands. *Scientific Reports* [en ligne]. septembre 2016. Vol. 6, n° 1. [Consulté le 10 septembre 2019]. DOI 10.1038/srep26200. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/srep26200>
231. DOYLE, E.K., KAHN, L.P. et MCCLURE, S.J. Rumen function and digestion of Merino sheep divergently selected for genetic difference in resistance to *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. juin 2011. Vol. 179, n° 1-3, pp. 130-136. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.01.063.
232. WINDON, R.G. Selective breeding for the control of nematodiasis in sheep: -EN- -FR- -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 1 juin 1990. Vol. 9, n° 2, pp. 555-576. DOI 10.20506/rst.9.2.496.
233. ATLIJA, Marina, ARRANZ, Juan-Jose, MARTINEZ-VALLADARES, María et GUTIÉRREZ-GIL, Beatriz. Detection and replication of QTL underlying resistance to gastrointestinal nematodes in adult sheep using the ovine 50K SNP array. *Genetics Selection Evolution* [en ligne]. décembre 2016. Vol. 48, n° 1. [Consulté le 21 septembre 2019]. DOI 10.1186/s12711-016-0182-4. Disponible à l'adresse : <http://www.gsejournal.org/content/48/1/4>
234. GUNIA, M., PHOCAS, F., GOURDINE, J.-L., BIJMA, P. et MANDONNET, N. Simulated selection responses for breeding programs including resistance and resilience to parasites in Creole goats^{1,2}. *Journal of Animal Science*. 1 février 2013. Vol. 91, n° 2, pp. 572-581. DOI 10.2527/jas.2011-5071.
235. AL KALALDEH, Mohammad, GIBSON, John, LEE, Sang Hong, GONDRO, Cedric et VAN DER WERF, Julius H. J. Detection of genomic regions underlying resistance to gastrointestinal parasites in Australian sheep. *Genetics Selection Evolution* [en ligne]. décembre 2019. Vol. 51, n° 1. [Consulté le 21 septembre 2019]. DOI 10.1186/s12711-019-0479-1. Disponible à l'adresse : <https://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12711-019-0479-1>
236. BENAVIDES, Magda Vieira, SONSTEGARD, Tad S. et VAN TASSELL, Curtis. Genomic Regions Associated with Sheep Resistance to Gastrointestinal Nematodes. *Trends in Parasitology*. juin 2016. Vol. 32, n° 6, pp. 470-480. DOI 10.1016/j.pt.2016.03.007.

237. ÁLVAREZ, Isabel, FERNÁNDEZ, Iván, SOUDRÉ, Albert, TRAORÉ, Amadou, PÉREZ-PARDAL, Lucía, SANOU, Moumouni, TAPSOBA, Stephane A. R., MENÉNDEZ-ARIAS, Nuria A. et GOYACHE, Félix. Identification of genomic regions and candidate genes of functional importance for gastrointestinal parasite resistance traits in Djallonké sheep of Burkina Faso. *Archives Animal Breeding*. 5 juin 2019. Vol. 62, n° 1, pp. 313-323. DOI 10.5194/aab-62-313-2019.
238. BISHOP, S.C. et MORRIS, C.A. Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research*. juin 2007. Vol. 70, n° 1, pp. 48-59. DOI 10.1016/j.smallrumres.2007.01.006.
239. MILLER, J. E. et HOROHOV, D. W. Immunological aspects of nematode parasite control in sheep1. *Journal of Animal Science*. 1 avril 2006. Vol. 84, n° suppl_13, pp. E124-E132. DOI 10.2527/2006.8413_supplE124x.
240. XU, Shizhong. Theoretical Basis of the Beavis Effect. *Genetics Society of America*. 2003. pp. 10.
241. VERRIER, E., BRABANT, P. et GALLAIS, A. *Faits et Concepts de Base en Génétique Quantitative*. 2001. Institut National Agronomique Paris-Grignon.
242. CONOVER, David O., DUFFY, Tara A. et HICE, Lyndie A. The Covariance between Genetic and Environmental Influences across Ecological Gradients: Reassessing the Evolutionary Significance of Countergradient and Cogradient Variation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. juin 2009. Vol. 1168, n° 1, pp. 100-129. DOI 10.1111/j.1749-6632.2009.04575.x.
243. ALBERS, G.A.A., GRAY, G.D., PIPER, L.R., BARKER, J.S.F., JAMBRE, L.F. Le et BARGER, I.A. The genetics of resistance and resilience to *Haemonchus contortus* infection in young merino sheep. *International Journal for Parasitology*. octobre 1987. Vol. 17, n° 7, pp. 1355-1363. DOI 10.1016/0020-7519(87)90103-2.
244. WOOLASTON, R. R. et PIPER, L. R. Selection of Merino sheep for resistance to *Haemonchus contortus* : genetic variation. *Animal Science*. juin 1996. Vol. 62, n° 3, pp. 451-460. DOI 10.1017/S1357729800014995.
245. JACQUIET, P., FIDELLE, Francis, GRISEZ, C., PRÉVOT, F., LIÉNARD, E., BERGEAUD, J.P., SICARD, S., BARILLET, Francis et ASTRUC, J.M. Sélection sur phénotypes de la résistance aux strongles gastro-intestinaux en centre d'élevage de béliers. *Renc. Rech. Ruminants*. 2011. N° 18, pp. 343-345.
246. BISSET, S. A., MORRIS, C. A., SQUIRE, D. R., HICKEY, S. M. et WHEELER, M. Genetics of resilience to nematode parasites in Romney sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. décembre 1994. Vol. 37, n° 4, pp. 521-534. DOI 10.1080/00288233.1994.9513091.
247. DOYLE, E.K., KAHN, L.P. et MCCLURE, S.J. Nutrient partitioning of Merino sheep divergently selected for genetic difference in resistance to *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. septembre 2014. Vol. 205, n° 1-2, pp. 175-185. DOI 10.1016/j.vetpar.2014.06.028.

248. DOYLE, E.K., KAHN, L.P., MCCLURE, S.J. et LEA, J.M. Voluntary feed intake and diet selection of Merino sheep divergently selected for genetic difference in resistance to *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. mai 2011. Vol. 177, n° 3-4, pp. 316-323. DOI 10.1016/j.vetpar.2011.01.043.
249. ASSENZA, Fabrizio, ELSÉN, Jean-Michel, LEGARRA, Andrés, CARRÉ, Clément, SALLÉ, Guillaume, ROBERT-GRANIÉ, Christèle et MORENO, Carole R. Genetic parameters for growth and faecal worm egg count following *Haemonchus contortus* experimental infestations using pedigree and molecular information. *Genetics Selection Evolution*. 2014. Vol. 46, n° 1, pp. 13. DOI 10.1186/1297-9686-46-13.
250. MCMANUS, Concepta, PAIM, Tiago do Prado, DE MELO, Cristiano Barros, BRASIL, Bruno S. A. F. et PAIVA, Samuel R. Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock. *Parasite*. 2014. Vol. 21, pp. 56. DOI 10.1051/parasite/2014055.
251. GUNIA, M., PHOCAS, F., ARQUET, R., ALEXANDRE, G. et MANDONNET, N. Genetic parameters for body weight, reproduction, and parasite resistance traits in the Creole goat1. *Journal of Animal Science*. 1 novembre 2011. Vol. 89, n° 11, pp. 3443-3451. DOI 10.2527/jas.2011-3872.
252. WALLER, Peter J. et THAMSBORG, Stig M. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology*. octobre 2004. Vol. 20, n° 10, pp. 493-497. DOI 10.1016/j.pt.2004.07.012.
253. GRUNER, Lucas, SAUVÉ, Christine, BOULARD, Chantal et CALAMEL, Maurice. Analysis of the relationship between land use and the parasitism of sheep during their transhumance. *Animal Research*. mai 2006. Vol. 55, n° 3, pp. 177-188. DOI 10.1051/animres:2006009.
254. HOSTE, H, CABARET, J et GROSMOND, G. Alternatives aux traitements anthelminthiques en élevage biologique des ruminants. *INRA Productions Animales*. 2009. N° 3, pp. 10.
255. EYSKER, M., BOERSEMA, J.H., CORNELISSEN, J.B.W.J. et KOOYMAN, F.N.J. Efficacy of Michel's 'dose and move' system against *Dictyocaulus viviparus* infections in cattle using moxidectin as anthelmintic. *Veterinary Parasitology*. mai 1995. Vol. 58, n° 1-2, pp. 49-60. DOI 10.1016/0304-4017(94)00712-L.
256. HECKER, J.F., BUDTZ-OLSEN, O.E et OSTWALD, M. The Rumen as a Water Store in Sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1964. Vol. 15, pp. 961-968.
257. PURSER, D. B. et MOIR, R. J. Rumen Volume as a Factor Involved in Individual Sheep Differences. *Journal of Animal Science*. 1 mai 1966. Vol. 25, n° 2, pp. 509-515. DOI 10.2527/jas1966.252509x.
258. GOOPY, John P., DONALDSON, Alastair, HEGARTY, Roger, VERCOE, Philip E., HAYNES, Fay, BARNETT, Mark et ODDY, V. Hutton. Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *British Journal of Nutrition*. 28 février 2014. Vol. 111, n° 4, pp. 578-585. DOI 10.1017/S0007114513002936.

259. THIVEND, P., FONTY, G., JOUANY, J. P., DURAND, Michelle et GOUET, Ph. Le fermenteur rumen. *Reproduction Nutrition Développement*. 1985. Vol. 25, n° 4B, pp. 729-753. DOI 10.1051/rnd:19850601.
260. BOEHMER, B.H., PYE, T.A. et WETTEMANN, R.P. Ruminal temperature as a measure of body temperature of beef cows and relationship with ambient temperature. *The Professional Animal Scientist*. août 2015. Vol. 31, n° 4, pp. 387-393. DOI 10.15232/pas.2014-01336.
261. BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*. avril 1990. Vol. 70, n° 2, pp. 567-590. DOI 10.1152/physrev.1990.70.2.567.
262. INRA. *ALIMENTATION DES RUMINANTS*. Éditions Quae. 2018.
263. COTTA, Michael A. Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminal Bacteria. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 1988. Vol. 54, pp. 5.
264. WALLACE, Rj. The proteolytic systems of ruminal microorganisms. . pp. 9.
265. DOUGLAS, J.-L., WORGAN, H.J., EASTON, G.L., PORET, L., WOLF, B.T., EDWARDS, A., DAVIES, E., ROSS, D. et MCEWAN, N.R. Microbial diversity in the digestive tract of two different breeds of sheep. *Journal of Applied Microbiology*. mai 2016. Vol. 120, n° 5, pp. 1382-1389. DOI 10.1111/jam.13060. Aims: This work aims to determine the factors which play a role in establishing the microbial population throughout the digestive tract in ruminants and is necessary to enhance our understanding of microbial establishment and activity.
266. PEREA, K., PERZ, K., OLIVO, S. K., WILLIAMS, A., LACHMAN, M., ISHAQ, S. L., THOMSON, J. et YEOMAN, C. J. Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota. *Journal of Animal Science*. 2017. Vol. 95, n° 6, pp. 2585. DOI 10.2527/jas2016.1222.
267. SHABAT, Sheerli Kruger Ben, SASSON, Goor, DORON-FAIGENBOIM, Adi, DURMAN, Thomer, YAACOBY, Shamay, BERG MILLER, Margret E, WHITE, Bryan A, SHTERZER, Naama et MIZRAHI, Itzhak. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME Journal*. décembre 2016. Vol. 10, n° 12, pp. 2958-2972. DOI 10.1038/ismej.2016.62.
268. KITTELMANN, Sandra, PINARES-PATIÑO, Cesar S., SEEDORF, Henning, KIRK, Michelle R., GANESH, Siva, MCEWAN, John C. et JANSSEN, Peter H. Two Different Bacterial Community Types Are Linked with the Low-Methane Emission Trait in Sheep. SMIDT, Hauke (éd.), *PLoS ONE*. 31 juillet 2014. Vol. 9, n° 7, pp. e103171. DOI 10.1371/journal.pone.0103171.
269. SHI, Weibing, MOON, Christina D., LEAHY, Sinead C., KANG, Dongwan, FROULA, Jeff, KITTELMANN, Sandra, FAN, Christina, DEUTSCH, Samuel, GAGIC, Dragana, SEEDORF, Henning, KELLY, William J., ATUA, Renee, SANG, Carrie, SONI, Priya, LI, Dong, PINARES-PATIÑO, Cesar S., MCEWAN, John C., JANSSEN, Peter H., CHEN, Feng, VISEL, Axel, WANG, Zhong, ATTWOOD, Graeme T. et RUBIN, Edward M. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen

microbiome. *Genome Research*. septembre 2014. Vol. 24, n° 9, pp. 1517-1525.
DOI 10.1101/gr.168245.113.

270. HUWS, Sharon A., KIM, Eun J., KINGSTON-SMITH, Alison H., LEE, Michael R.F., MUETZEL, Stefan M., COOKSON, Alan R., NEWBOLD, Charles J., WALLACE, R. John et SCOLLAN, Nigel D. Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts: Fatty acid content of rumen microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*. septembre 2009. Vol. 69, n° 3, pp. 461-471. DOI 10.1111/j.1574-6941.2009.00717.x.

271. SKILLMAN, L. C., TOOVEY, A. F., WILLIAMS, A. J. et WRIGHT, A.-D. G. Development and Validation of a Real-Time PCR Method To Quantify Rumen Protozoa and Examination of Variability between Entodinium Populations in Sheep Offered a Hay-Based Diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 1 janvier 2006. Vol. 72, n° 1, pp. 200-206. DOI 10.1128/AEM.72.1.200-206.2006.

272. BAKER, Frank. Normal Rumen Microflora and Microfauna of Cattle. *Nature*. février 1942. Vol. 149, n° 3773, pp. 220-220. DOI 10.1038/149220a0.

273. KOIKE, S., HANDA, Y., GOTO, H., SAKAI, K., MIYAGAWA, E., MATSUI, H., ITO, S. et KOBAYASHI, Y. Molecular Monitoring and Isolation of Previously Uncultured Bacterial Strains from the Sheep Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 mars 2010. Vol. 76, n° 6, pp. 1887-1894. DOI 10.1128/AEM.02606-09.

274. TAJIMA, Kiyoshi, AMINOV, Roustam I, NAGAMINE, Takafumi, OGATA, Koretsugu, NAKAMURA, Mutsumi, MATSUI, Hiroki et BENNO, Yoshimi. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology*. 1999. pp. 11.

275. KIM, Minseok, MORRISON, Mark et YU, Zhongtang. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes: Status of microbial census in rumen. *FEMS Microbiology Ecology*. avril 2011. Vol. 76, n° 1, pp. 49-63. DOI 10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x.

276. STIVERSON, Jill, MORRISON, Mark et YU, Zhongtang. Populations of Select Cultured and Uncultured Bacteria in the Rumen of Sheep and the Effect of Diets and Ruminal Fractions. *International Journal of Microbiology*. 2011. Vol. 2011, pp. 1-8. DOI 10.1155/2011/750613.

277. ZEHAVI, Tamar, PROBST, Maraike et MIZRAHI, Itzhak. Insights Into Culturomics of the Rumen Microbiome. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 29 août 2018. Vol. 9. [Consulté le 11 octobre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2018.01999. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01999/full>

278. WADE, William. Unculturable bacteria : the uncharacterized organisms that cause oral infections. . 2002. Vol. 95, pp. 3.

279. AMANN, Rudolf I, LUDWIG, Wolfgang et SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *MICROBIOL. REV.* 1995. Vol. 59, pp. 33.

280. CHAUCHEYRAS-DURAND, Frédérique et OSSA, Faisury. REVIEW: The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist*. février 2014. Vol. 30, n° 1, pp. 1-12. DOI 10.15232/S1080-7446(15)30076-0.
281. ZUCKERKANDL, Emile et PAULING, Linus. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*. mars 1965. Vol. 8, n° 2, pp. 357-366. DOI 10.1016/0022-5193(65)90083-4.
282. PACE, Norman R., STAHL, David A., LANE, David J. et OLSEN, Gary J. The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In : MARSHALL, K. C. (éd.), *Advances in Microbial Ecology* [en ligne]. Boston, MA : Springer US, 1986. pp. 1-55. [Consulté le 18 mars 2019]. ISBN 978-1-4757-0613-0. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-0611-6_1
283. AVERNER, M.J et PACE, N.R. The Nucleotide Sequence of Marsupial 5S Ribosomal Ribonucleic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*. juillet 1972. Vol. 247, n° 14, pp. 4491-4493.
284. STAHL, David A. Characterization of a Yellowstone Hot Spring Microbial Community by 5S rRNA Sequences. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 1985. Vol. 49, pp. 6.
285. WOESE, C. R. et FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 novembre 1977. Vol. 74, n° 11, pp. 5088-5090. DOI 10.1073/pnas.74.11.5088.
286. TRINGE, Susannah G et HUGENHOLTZ, Philip. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology*. octobre 2008. Vol. 11, n° 5, pp. 442-446. DOI 10.1016/j.mib.2008.09.011.
287. MARCON, Eric. Mesures de la Biodiversité. . 2015. pp. 284.
288. MCINTOSH, Robert P. An Index of Diversity and the Relation of Certain Concepts to Diversity. *Ecology*. mai 1967. Vol. 48, n° 3, pp. 392-404. DOI 10.2307/1932674.
289. LANDE, Russell. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. *Oikos*. mai 1996. Vol. 76, n° 1, pp. 5. DOI 10.2307/3545743.
290. WHITTAKER, R H. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*. juillet 1960. Vol. 30, n° 3, pp. 279-338.
291. CHIU, Chun-Huo, WANG, Yi-Ting, WALTHER, Bruno A. et CHAO, Anne. An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good-turing frequency formula: An Improved Nonparametric Lower Bound of Species Richness. *Biometrics*. septembre 2014. Vol. 70, n° 3, pp. 671-682. DOI 10.1111/biom.12200.
292. MAO, Chang Xuan et COLWELL, Robert K. Estimation of Species Richness : Mixture Models, the Role of Rare Species, and Inferential Challenges. *Ecology*. mai 2005. Vol. 86, n° 5, pp. 1143-1153. DOI 10.1890/04-1078.
293. CLENCH, H.K. How to make regional lists of Butterflies : some thoughts. *Journal of the Lepidopterists' Society*. 1979. Vol. 33, n° 4, pp. 216-231.

294. SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. *Nature*. avril 1949. Vol. 163, n° 4148, pp. 688-688. DOI 10.1038/163688a0.
295. SHANNON, C.E. A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*. 1948. Vol. 27, pp. 379-423.
296. TUOMISTO, Hanna. A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 2. Quantifying beta diversity and related phenomena. *Ecography*. février 2010. Vol. 33, n° 1, pp. 23-45. DOI 10.1111/j.1600-0587.2009.06148.x.
297. POLLOCK, Jolinda, GLENDINNING, Laura, WISEDCHANWET, Trong et WATSON, Mick. The Madness of Microbiome: Attempting To Find Consensus “Best Practice” for 16S Microbiome Studies. LIU, Shuang-Jiang (éd.), *Applied and Environmental Microbiology* [en ligne]. 2 février 2018. Vol. 84, n° 7. [Consulté le 10 octobre 2019]. DOI 10.1128/AEM.02627-17. Disponible à l’adresse : <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02627-17>
298. HU, Fan, XUE, Yanfeng, GUO, Changzheng, LIU, Junhua et MAO, Shengyong. The response of ruminal fermentation, epithelium-associated microbiota, and epithelial barrier function to severe feed restriction in pregnant ewes. *Journal of Animal Science*. 29 septembre 2018. Vol. 96, n° 10, pp. 4293-4305. DOI 10.1093/jas/sky306.
299. JEONG, Soo, CHO, Kye Man, SHIN, Eun Chule, LIM, Woo Jin, HONG, Su Young, CHOI, Byoung Rock, KANG, Jung Mi, LEE, Sun Mi, KIM, Yong Hee, KIM, Hoon et YUN, Han Dae. 16S rDNA Analysis of Bacterial Diversity in Three Fractions of Cow Rumens. . 2006. pp. 10.
300. LAUBER, Christian L., ZHOU, Nicholas, GORDON, Jeffrey I., KNIGHT, Rob et FIERER, Noah. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples: Influence of short-term storage conditions on microbiota. *FEMS Microbiology Letters*. 25 mars 2010. Vol. 307, n° 1, pp. 80-86. DOI 10.1111/j.1574-6968.2010.01965.x.
301. FOUHY, Fiona, DEANE, Jennifer, REA, Mary C., O’SULLIVAN, Órla, ROSS, R. Paul, O’CALLAGHAN, Grace, PLANT, Barry J. et STANTON, Catherine. The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations. NEU, Josef (éd.), *PLOS ONE*. 6 mars 2015. Vol. 10, n° 3, pp. e0119355. DOI 10.1371/journal.pone.0119355.
302. BAHL, Martin Iain, BERGSTRÖM, Anders et LICHT, Tine Rask. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*. avril 2012. Vol. 329, n° 2, pp. 193-197. DOI 10.1111/j.1574-6968.2012.02523.x.
303. MCKAIN, Nest, GENÇ, Buğra, SNELLING, Timothy J. et WALLACE, R. John. Differential recovery of bacterial and archaeal 16S rRNA genes from ruminal digesta in response to glycerol as cryoprotectant. *Journal of Microbiological Methods*. décembre 2013. Vol. 95, n° 3, pp. 381-383. DOI 10.1016/j.mimet.2013.10.009.
304. MARTINEZ-FERNANDEZ, Gonzalo, DENMAN, Stuart E. et MCSWEENEY, Christopher S. Sample Processing Methods Impacts on Rumens Microbiome. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 30 avril 2019. Vol. 10. [Consulté le 10 octobre 2019].

DOI 10.3389/fmicb.2019.00861. Disponible à l'adresse :
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00861/full>

305. YU, Zhongtang et MORRISON, Mark. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*. mai 2004. Vol. 36, n° 5, pp. 808-812. DOI 10.2144/04365ST04.

306. HENDERSON, Gemma, COX, Faith, KITTELMANN, Sandra, MIRI, Vahideh Heidarian, ZETHOF, Michael, NOEL, Samantha J., WAGHORN, Garry C. et JANSSEN, Peter H. Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. BERTILSSON, Stefan (éd.), *PLoS ONE*. 11 septembre 2013. Vol. 8, n° 9, pp. e74787. DOI 10.1371/journal.pone.0074787.

307. HANSHEW, Alissa S., MASON, Charles J., RAFFA, Kenneth F. et CURRIE, Cameron R. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*. novembre 2013. Vol. 95, n° 2, pp. 149-155. DOI 10.1016/j.mimet.2013.08.007.

308. AMIKAM, Dorit, GLASER, Gad et RAZIN, Shmuel. Mycoplasmas (Mollicutes) Have a Low Number of rRNA Genes. . 1984. Vol. 158, n° 1, pp. 376-378.

309. JARVIS, Erich D, WIDOM, Russell L, LA FAUCI, Giuseppe, SETOGUCHI, Yoshiko, RICHTER, Inga R et RUDNER, Rivka. Chromosomal Organization of rRNA Operons in *Bacillus subtilis*. . 1988. pp. 11.

310. LOUCA, Stilianos, DOEBELI, Michael et PARFREY, Laura Wegener. Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem. *Microbiome* [en ligne]. décembre 2018. Vol. 6, n° 1. [Consulté le 10 octobre 2019]. DOI 10.1186/s40168-018-0420-9. Disponible à l'adresse :
<https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0420-9>

311. HESS, M., SCZYRBA, A., EGAN, R., KIM, T.-W., CHOKHAWALA, H., SCHROTH, G., LUO, S., CLARK, D. S., CHEN, F., ZHANG, T., MACKIE, R. I., PENNACCHIO, L. A., TRINGE, S. G., VISEL, A., WOYKE, T., WANG, Z. et RUBIN, E. M. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. *Science*. 28 janvier 2011. Vol. 331, n° 6016, pp. 463-467. DOI 10.1126/science.1200387.

312. HUWS, Sharon A., CREEVEY, Christopher J., OYAMA, Linda B., MIZRAHI, Itzhak, DENMAN, Stuart E., POPOVA, Milka, MUÑOZ-TAMAYO, Rafael, FORANO, Evelyne, WATERS, Sinead M., HESS, Matthias, TAPIO, Ilma, SMIDT, Hauke, KRIZSAN, Sophie J., YÁÑEZ-RUIZ, David R., BELANCHE, Alejandro, GUAN, Leluo, GRUNINGER, Robert J., MCALLISTER, Tim A., NEWBOLD, C. Jamie, ROEHE, Rainer, DEWHURST, Richard J., SNELLING, Tim J., WATSON, Mick, SUEN, Garret, HART, Elizabeth H., KINGSTON-SMITH, Alison H., SCOLLAN, Nigel D., DO PRADO, Rodolpho M., PILAU, Eduardo J., MANTOVANI, Hilario C., ATTWOOD, Graeme T., EDWARDS, Joan E., MCEWAN, Neil R., MORRISSON, Steven, MAYORGA, Olga L., ELLIOTT, Christopher et MORGAVI, Diego P. Addressing Global Ruminant Agricultural Challenges Through Understanding the Rumen Microbiome: Past, Present, and Future. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 25 septembre 2018. Vol. 9. [Consulté le 2 octobre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2018.02161. Disponible à l'adresse :
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02161/full>

313. RUBINO, Francesco, CARBERRY, Ciara, M WATERS, Sinéad, KENNY, David, MCCABE, Matthew S et CREEVEY, Christopher J. Divergent functional isoforms drive niche specialisation for nutrient acquisition and use in rumen microbiome. *The ISME Journal*. avril 2017. Vol. 11, n° 4, pp. 932-944. DOI 10.1038/ismej.2016.172.
314. CSÁRDI, Gábor, FRANKS, Alexander, CHOI, David S, AIROLDI, Edoardo M et DRUMMOND, D Allan. Accounting for Experimental Noise Reveals that mRNA Levels, Amplified by Post-Transcriptional Processes, Largely Determine Steady-State Protein Levels in Yeast. *PLOS Genetics*. 2015. pp. 32.
315. WILMES, Paul et BOND, Philip L. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. *Environmental Microbiology*. septembre 2004. Vol. 6, n° 9, pp. 911-920. DOI 10.1111/j.1462-2920.2004.00687.x.
316. SNELLING, Timothy J. et WALLACE, R. John. The rumen microbial metaproteome as revealed by SDS-PAGE. *BMC Microbiology* [en ligne]. décembre 2017. Vol. 17, n° 1. [Consulté le 2 octobre 2019]. DOI 10.1186/s12866-016-0917-y. Disponible à l'adresse : <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-016-0917-y>
317. JANSSEN, P. H. et KIRS, M. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 juin 2008. Vol. 74, n° 12, pp. 3619-3625. DOI 10.1128/AEM.02812-07.
318. MCSWEENEY, Chris et MACKIE, Rod. Micro-Organisms and Ruminant Digestion : State of Knowledge, Trends and Future Prospects. *Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture*. septembre 2012. pp. 62.
319. ZHOU, Mi, PENG, Yong-Jia, CHEN, Yanhong, KLINGER, Christen M., OBA, Masahito, LIU, Jian-Xin et GUAN, Le Luo. Assessment of microbiome changes after rumen transfaunation: implications on improving feed efficiency in beef cattle. *Microbiome* [en ligne]. décembre 2018. Vol. 6, n° 1. [Consulté le 30 septembre 2019]. DOI 10.1186/s40168-018-0447-y. Disponible à l'adresse : <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0447-y>
320. BELANCHE, Alejandro, KINGSTON-SMITH, Alison H., GRIFFITH, Gareth W. et NEWBOLD, Charles J. A Multi-Kingdom Study Reveals the Plasticity of the Rumen Microbiota in Response to a Shift From Non-grazing to Grazing Diets in Sheep. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 11 février 2019. Vol. 10. [Consulté le 11 octobre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2019.00122. Disponible à l'adresse : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00122/full>
321. PEI, Cai-Xia, LIU, Qiang, DONG, Chang-Sheng, LI, HongQuan, JIANG, Jun-Bing et GAO, Wen-Jun. Diversity and abundance of the bacterial 16S rRNA gene sequences in forestomach of alpacas (*Lama pacos*) and sheep (*Ovis aries*). *Anaerobe*. août 2010. Vol. 16, n° 4, pp. 426-432. DOI 10.1016/j.anaerobe.2010.06.004.
322. YANAGITA, Kazuhiro, KAMAGATA, Yoichi, KAWAHARASAKI, Mamoru, SUZUKI, Toshihiko, NAKAMURA, Yutaka et MINATO, Hajime. Phylogenetic Analysis of Methanogens in Sheep Rumen Ecosystem and Detection of *Methanomicrobium mobile* by

Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. janvier 2000. Vol. 64, n° 8, pp. 1737-1742. DOI 10.1271/bbb.64.1737.

323. SINGH, K.M., PANDYA, P.R., TRIPATHI, A.K., PATEL, G.R., PARNERKAR, S., KOTHARI, R.K. et JOSHI, C.G. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta Gene*. décembre 2014. Vol. 2, pp. 191-199. DOI 10.1016/j.mgene.2014.01.001.

324. GU, Min-Jung, ALAM, Md. Jahangir, KIM, Seon-Ho, JEON, Che-Ok, CHANG, Moon-Baek, OH, Young-Kyoon, LEE, Sang-Cheol et LEE, Sang-Suk. Analysis of methanogenic archaeal communities of rumen fluid and rumen particles from Korean black goats: METHANOGENIC ARCHAEA OF KOREAN BLACK GOATS. *Animal Science Journal*. octobre 2011. Vol. 82, n° 5, pp. 663-672. DOI 10.1111/j.1740-0929.2011.00890.x.

325. LETTAT, Abderzak, NOZIÈRE, Pierre, SILBERBERG, Mathieu, MORGAVI, Diego P, BERGER, Claudette et MARTIN, Cécile. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiology*. 2012. Vol. 12, n° 1, pp. 142. DOI 10.1186/1471-2180-12-142.

326. BELANCHE, A., BALCELLS, J., DE LA FUENTE, G., YAÑEZ-RUÍZ, D. R., FONDEVILA, M. et CALLEJA, L. Description of development of rumen ecosystem by PCR assay in milk-fed, weaned and finished lambs in an intensive fattening system: Description of rumen ecosystem by PCR assay. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. octobre 2010. Vol. 94, n° 5, pp. 648-658. DOI 10.1111/j.1439-0396.2009.00952.x.

327. LWIN, Khin Ohnmar, HAYAKAWA, Mika, BAN-TOKUDA, Tomomi et MATSUI, Hiroki. Real-Time PCR Assays for Monitoring Anaerobic Fungal Biomass and Population Size in the Rumen. *Current Microbiology*. avril 2011. Vol. 62, n° 4, pp. 1147-1151. DOI 10.1007/s00284-010-9843-7.

328. GLOBAL RUMEN CENSUS COLLABORATORS, HENDERSON, Gemma, COX, Faith, GANESH, Siva, JONKER, Arjan, YOUNG, Wayne et JANSSEN, Peter H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports* [en ligne]. novembre 2015. Vol. 5, n° 1. [Consulté le 22 février 2019]. DOI 10.1038/srep14567. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/srep14567>

329. CASTRO-CARRERA, T., TORAL, P.G., FRUTOS, P., MCEWAN, N.R., HERVÁS, G., ABECIA, L., PINLOCHE, E., GIRDWOOD, S.E. et BELENGUER, A. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *Journal of Dairy Science*. mars 2014. Vol. 97, n° 3, pp. 1661-1669. DOI 10.3168/jds.2013-7243.

330. LOPES, Lucas Dantas, DE SOUZA LIMA, André Oliveira, TAKETANI, Rodrigo Gouvêa, DARIAS, Phillip, DA SILVA, Lília Raquel Fé, ROMAGNOLI, Emiliana Manesco, LOUVANDINI, Helder, ABDALLA, Adibe Luiz et MENDES, Rodrigo. Exploring the sheep rumen microbiome for carbohydrate-active enzymes. *Antonie van Leeuwenhoek*. juillet 2015. Vol. 108, n° 1, pp. 15-30. DOI 10.1007/s10482-015-0459-6.

331. SESHADRI, Rekha, ATTWOOD, Graeme T, TEH, Koon Hoong, LAMBIE, Suzanne C, COOKSON, Adrian L, ELOE-FADROSH, Emiley A, PAVLOPOULOS, Georgios A, HADJITHOMAS, Michalis, VARGHESE, Neha J, PAEZ-ESPINO, David, PERRY, Rechelle, HENDERSON, Gemma, CREEVEY, Christopher J, TERRAPON, Nicolas, LAPEBIE, Pascal, DRULA, Elodie, LOMBARD, Vincent, RUBIN, Edward, KYRPIDES, Nikos C, HENRISSAT, Bernard, WOYKE, Tanja, IVANOVA, Natalia N et KELLY, William J. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. *Nature Biotechnology*. avril 2018. Vol. 36, n° 4, pp. 359-367. DOI 10.1038/nbt.4110.
332. SADET-BOURGETEAU, S., MARTIN, C. et MORGAVI, D.P. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Veterinary Microbiology*. novembre 2010. Vol. 146, n° 1-2, pp. 98-104. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.04.029.
333. YU, Zhongtang, YU, Marie et MORRISON, Mark. Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environmental Microbiology*. avril 2006. Vol. 8, n° 4, pp. 603-611. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00933.x.
334. BRULC, Jennifer M., ANTONOPOULOS, Dionysios A., BERG MILLER, Margret E., WILSON, Melissa K., YANNARELL, Anthony C., DINSDALE, Elizabeth A., EDWARDS, Robert E., FRANK, Edward D., EMERSON, Joanne B., WACKLIN, Pirjo, COUTINHO, Pedro M., HENRISSAT, Bernard, NELSON, Karen E. et WHITE, Bryan A. Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 10 février 2009. Vol. 106, n° 6, pp. 1948-1953. DOI 10.1073/pnas.0806191105.
335. HUANG, Jinqiang, LI, Yongjuan et LUO, Yuzhu. Bacterial community in the rumen of Tibetan sheep and Gansu alpine fine-wool sheep grazing on the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2017. Vol. 63, n° 2, pp. 122-130. DOI 10.2323/jgam.2016.08.003.
336. CHEN, Yanhong, PENNER, Gregory B., LI, Meiju, OBA, Masahito et GUAN, Le Luo. Changes in Bacterial Diversity Associated with Epithelial Tissue in the Beef Cow Rumen during the Transition to a High-Grain Diet. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 août 2011. Vol. 77, n° 16, pp. 5770-5781. DOI 10.1128/AEM.00375-11.
337. ELLISON, M. J., CONANT, G. C., COCKRUM, R. R., AUSTIN, K. J., TRUONG, H., BECCHI, M., LAMBERSON, W. R. et CAMMACK, K. M. Diet Alters Both the Structure and Taxonomy of the Ovine Gut Microbial Ecosystem. *DNA Research*. 1 avril 2014. Vol. 21, n° 2, pp. 115-125. DOI 10.1093/dnares/dst044.
338. WANG, Yaoyue, CAO, Pinghua, WANG, Lei, ZHAO, Zhaoyan, CHEN, Yulin et YANG, Yuxin. Bacterial community diversity associated with different levels of dietary nutrition in the rumen of sheep. *Applied Microbiology and Biotechnology*. mai 2017. Vol. 101, n° 9, pp. 3717-3728. DOI 10.1007/s00253-017-8144-5.
339. ROSKOV, Y., OWER, G., ORRELL, T., NICOLSON, D., BAILLY, N., KIRK, P.M., BOURGOIN, T., DEWALT, R.E., DECOCK, W., NIEUKERKEN, E., VAN ZARUCCHI, J. et PENEV, L. *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019* [en ligne]. 2019.

[Consulté le 18 octobre 2019]. Species 2000: Naturalis. Disponible à l'adresse : www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019

340. DEUSCH, Simon, CAMARINHA-SILVA, Amélia, CONRAD, Jürgen, BEIFUSS, Uwe, RODEHUTSCORD, Markus et SEIFERT, Jana. A Structural and Functional Elucidation of the Rumen Microbiome Influenced by Various Diets and Microenvironments. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 24 août 2017. Vol. 8. [Consulté le 15 octobre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2017.01605. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01605/full>

341. DEUSCH, Simon, CAMARINHA-SILVA, Amélia, CONRAD, Jürgen, BEIFUSS, Uwe, RODEHUTSCORD, Markus et SEIFERT, Jana. A Structural and Functional Elucidation of the Rumen Microbiome Influenced by Various Diets and Microenvironments. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 24 août 2017. Vol. 8. [Consulté le 11 octobre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2017.01605. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01605/full>

342. WANG, Weimin, LI, Chong, LI, Fadi, WANG, Xiaojuan, ZHANG, Xiaoxue, LIU, Ting, NIAN, Fang, YUE, Xiangpeng, LI, Fei, PAN, Xiangyu, LA, Yongfu, MO, Futao, WANG, Fangbin et LI, Baosheng. Effects of early feeding on the host rumen transcriptome and bacterial diversity in lambs. *Scientific Reports* [en ligne]. octobre 2016. Vol. 6, n° 1. [Consulté le 15 février 2019]. DOI 10.1038/srep32479. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/srep32479>

343. EMERSON, David, FLEMING, Emily J. et MCBETH, Joyce M. Iron-Oxidizing Bacteria: An Environmental and Genomic Perspective. *Annual Review of Microbiology*. 13 octobre 2010. Vol. 64, n° 1, pp. 561-583. DOI 10.1146/annurev.micro.112408.134208.

344. HOOK, Sarah E., WRIGHT, André-Denis G. et MCBRIDE, Brian W. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. *Archaea*. 2010. Vol. 2010, pp. 1-11. DOI 10.1155/2010/945785.

345. NAZ FARIDI, Farah et KHAN, Saba. Methanogenic Diversity and Taxonomy in the Gastro Intestinal Tract of Ruminants. In : *Extremophilic Microbes and Metabolites - Diversity, Bioprospecting and Biotechnological Applications* [en ligne]. IntechOpen, 2019. [Consulté le 21 octobre 2019]. Disponible à l'adresse : <https://www.intechopen.com/online-first/methanogenic-diversity-and-taxonomy-in-the-gastro-intestinal-tract-of-ruminants>

346. JEYANATHAN, Jeyamalar, KIRS, Marek, RONIMUS, Ron S., HOSKIN, Simone O. et JANSSEN, Peter H. Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets: Rumen methanogen community. *FEMS Microbiology Ecology*. mai 2011. Vol. 76, n° 2, pp. 311-326. DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01056.x.

347. PEI, Cai-Xia, MAO, Sheng-Yong, CHENG, Yan-Fen et ZHU, Wei-Yun. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *animal*. janvier 2010. Vol. 4, n° 1, pp. 20-29. DOI 10.1017/S1751731109990681.

348. SNELLING, Timothy J., GENÇ, Buğra, MCKAIN, Nest, WATSON, Mick, WATERS, Sinéad M., CREEVEY, Christopher J. et WALLACE, R. John. Diversity and

Community Composition of Methanogenic Archaea in the Rumen of Scottish Upland Sheep Assessed by Different Methods. WHITE, Bryan A. (éd.), *PLoS ONE*. 24 septembre 2014. Vol. 9, n° 9, pp. e106491. DOI 10.1371/journal.pone.0106491.

349. WRIGHT, A.-D. G., WILLIAMS, A. J., WINDER, B., CHRISTOPHERSEN, C. T., RODGERS, S. L. et SMITH, K. D. Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. *Applied and Environmental Microbiology*. 1 mars 2004. Vol. 70, n° 3, pp. 1263-1270. DOI 10.1128/AEM.70.3.1263-1270.2004.

350. CAVALIER-SMITH, T. Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. *MICROBIOL. REV.* 1993. Vol. 57, pp. 42.

351. CAVALIER-SMITH, Thomas. Kingdom Chromista and its eight phyla: a new synthesis emphasising periplastid protein targeting, cytoskeletal and periplastid evolution, and ancient divergences. *Protoplasma*. janvier 2018. Vol. 255, n° 1, pp. 297-357. DOI 10.1007/s00709-017-1147-3.

352. NEWBOLD, Charles J., DE LA FUENTE, Gabriel, BELANCHE, Alejandro, RAMOS-MORALES, Eva et MCEWAN, Neil R. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 26 novembre 2015. Vol. 6. [Consulté le 25 octobre 2019]. DOI 10.3389/fmicb.2015.01313. Disponible à l'adresse : <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01313/abstract>

353. WRIGHT, André-Deenis G., DEHORITY, Burk A. et LYNN, Denis H. Phylogeny of the Rumen Ciliates Entodinium, Epidinium and Polyplastron (Litostomatea: Entodiniomorpha) Inferred from Small Subunit Ribosomal RNA Sequences. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. janvier 1997. Vol. 44, n° 1, pp. 61-67. DOI 10.1111/j.1550-7408.1997.tb05693.x.

354. KITTELMANN, Sandra, DEVENTE, Savannah R., KIRK, Michelle R., SEEDORF, Henning, DEHORITY, Burk A. et JANSSEN, Peter H. Phylogeny of Intestinal Ciliates, Including Charonina ventriculi, and Comparison of Microscopy and 18S rRNA Gene Pyrosequencing for Rumen Ciliate Community Structure Analysis. MACFARLANE, G. T. (éd.), *Applied and Environmental Microbiology*. 1 avril 2015. Vol. 81, n° 7, pp. 2433-2444. DOI 10.1128/AEM.03697-14.

355. SARO, C., RANILLA, M.J., TEJIDO, M.L. et CARRO, M.D. Influence of forage type in the diet of sheep on rumen microbiota and fermentation characteristics. *Livestock Science*. février 2014. Vol. 160, pp. 52-59. DOI 10.1016/j.livsci.2013.12.005.

356. OHENE-ADJEI, S., TEATHER, R. M., IVAN, M. et FORSTER, R. J. Postinoculation Protozoan Establishment and Association Patterns of Methanogenic Archaea in the Ovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 15 juillet 2007. Vol. 73, n° 14, pp. 4609-4618. DOI 10.1128/AEM.02687-06.

357. FLIEGEROVA, Katerina, KAERGER, Kerstin, KIRK, Paul et VOIGT, Kerstin. Rumen Fungi. In : PUNIYA, Anil Kumar, SINGH, Rameshwar et KAMRA, Devki Nandan (éd.), *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* [en ligne]. New Delhi : Springer India, 2015. pp. 97-112. [Consulté le 25 octobre 2019]. ISBN 978-81-322-2400-6. Disponible à l'adresse : http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2401-3_7

358. GRIFFITH, G.W., OZKOSE, E., THEODOROU, M.K. et DAVIES, D.R. Diversity of anaerobic fungal populations in cattle revealed by selective enrichment culture using different carbon sources. *Fungal Ecology*. mai 2009. Vol. 2, n° 2, pp. 87-97. DOI 10.1016/j.funeco.2009.01.005.
359. LI, Robert W., LI, Weizhong, SUN, Jiajie, YU, Peng, BALDWIN, Ransom L. et URBAN, Joseph F. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Scientific Reports* [en ligne]. février 2016. Vol. 6, n° 1. [Consulté le 26 octobre 2019]. DOI 10.1038/srep20606. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/srep20606>
360. HONDE, C. et BUENO, L. Haemonchus contortus: Egg laying influenced by abomasal pH in lambs. *Experimental Parasitology*. décembre 1982. Vol. 54, n° 3, pp. 371-378. DOI 10.1016/0014-4894(82)90046-7.
361. SIMCOCK, D. C., JOBLIN, K. N., SCOTT, I., BURGESS, D. M., ROGERS, C. W., POMROY, W. E et SIMPSON, H. V. Hypergastrinaemia, abomasal bacterial population densities and pH in sheep infected with *Ostertagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology*. 1 juillet 1999. Vol. 29, n° 7, pp. 1053-1063. DOI 10.1016/S0020-7519(99)00065-X.
362. 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. Helminth Colonization Is Associated with Increased Diversity of the Gut Microbiota. DAVIES, Stephen John (éd.), *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 22 mai 2014. Vol. 8, n° 5, pp. e2880. DOI 10.1371/journal.pntd.0002880.
363. LI, Robert W., WU, Sitao, LI, Weizhong, NAVARRO, Karl, COUCH, Robin D., HILL, Dolores et URBAN, Joseph F. Alterations in the Porcine Colon Microbiota Induced by the Gastrointestinal Nematode *Trichuris suis*. FANG, F. C. (éd.), *Infection and Immunity*. juin 2012. Vol. 80, n° 6, pp. 2150-2157. DOI 10.1128/IAI.00141-12.
364. EL-ASHRAM, Saeed, AL NASR, Ibrahim, ABOUHAJER, Fathi, EL-KEMARY, Maged, HUANG, Guangping, DINÇEL, Güngör, MEHMOOD, Rashid, HU, Min et SUO, Xun. Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Research Communications*. décembre 2017. Vol. 41, n° 4, pp. 263-277. DOI 10.1007/s11259-017-9698-5.
365. LI, Robert W., WU, Sitao, LI, Weizhong, HUANG, Ying et GASBARRE, Louis C. Metagenome Plasticity of the Bovine Abomasal Microbiota in Immune Animals in Response to *Ostertagia Ostertagi* Infection. AZIZ, Ramy K. (éd.), *PLoS ONE*. 9 septembre 2011. Vol. 6, n° 9, pp. e24417. DOI 10.1371/journal.pone.0024417.
366. 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. 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. DOI 10.5433/1679-0359.2016v37n6p4097.

367. EL-ASHRAM, Saeed et SUO, Xun. Exploring the microbial community (microflora) associated with ovine *Haemonchus contortus* (macroflora) field strains. *Scientific Reports* [en ligne]. décembre 2017. Vol. 7, n° 1. [Consulté le 28 octobre 2019]. DOI 10.1038/s41598-017-00171-2. Disponible à l'adresse : <http://www.nature.com/articles/s41598-017-00171-2>
368. SINNATHAMBY, Gajenathirin, HENDERSON, Gemma, UMAIR, Saleh, JANSSEN, Peter, BLAND, Ross et SIMPSON, Heather. The bacterial community associated with the sheep gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*. BACH, Horacio (éd.), *PLOS ONE*. 8 février 2018. Vol. 13, n° 2, pp. e0192164. DOI 10.1371/journal.pone.0192164.
369. AL MAMUN, Abdullah. Interactions between *Haemonchus contortus* and the gut microbiota of sheep. . 2017. pp. 239.
370. VERDOUW, H., VAN ECHELD, C.J.A. et DEKKERS, E.M.J. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*. janvier 1978. Vol. 12, n° 6, pp. 399-402. DOI 10.1016/0043-1354(78)90107-0.
371. ESCUDIÉ, Frédéric, AUER, Lucas, BERNARD, Maria, MARIADASSOU, Mahendra, CAUQUIL, Laurent, VIDAL, Katia, MAMAN, Sarah, HERNANDEZ-RAQUET, Guillermina, COMBES, Sylvie et PASCAL, Géraldine. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. BERGER, Bonnie (éd.), *Bioinformatics*. 15 avril 2018. Vol. 34, n° 8, pp. 1287-1294. DOI 10.1093/bioinformatics/btx791.
372. MAHÉ, Frédéric, ROGNES, Torbjørn, QUINCE, Christopher, DE VARGAS, Colomban et DUNTHORN, Micah. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*. 25 septembre 2014. Vol. 2, pp. e593. DOI 10.7717/peerj.593.
373. SCHLOSS, Patrick D., GEVERS, Dirk et WESTCOTT, Sarah L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. GILBERT, Jack Anthony (éd.), *PLoS ONE*. 14 décembre 2011. Vol. 6, n° 12, pp. e27310. DOI 10.1371/journal.pone.0027310.
374. BOKULICH, Nicholas A, SUBRAMANIAN, Sathish, FAITH, Jeremiah J, GEVERS, Dirk, GORDON, Jeffrey I, KNIGHT, Rob, MILLS, David A et CAPORASO, J Gregory. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*. janvier 2013. Vol. 10, n° 1, pp. 57-59. DOI 10.1038/nmeth.2276.
375. BADAWI, Harith. Determination of Serum Proteins and Glucose Concentrations in Clinically Normal and Anemic Awassi Sheep. *World s Veterinary Journal*. 2015. Vol. 6, n° 1, pp. 01. DOI 10.5455/wvj.20150246.
376. SYKES, A.R. An assessment of the value of plasma urea nitrogen and albumin concentrations as monitors of the protein status of sheep. *BSAP Occasional Publication*. janvier 1978. Vol. 1, pp. 143-154. DOI 10.1017/S0263967X0000015X.
377. JACKSON, Peter G.G. et COCKCROFT, Peter D. (éd.). Appendix 3: Laboratory Reference Values: Biochemistry. In : JACKSON, Peter G.G. et COCKCROFT, Peter D. (éd.), *Clinical Examination of Farm Animals* [en ligne]. Oxford, UK : Blackwell Science Ltd., 2007. pp. 303-305. [Consulté le 8 novembre 2019]. ISBN 978-0-470-75242-5. Disponible à l'adresse : <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470752425.app3>

378. BELANCHE, Alejandro, DOREAU, Michel, EDWARDS, Joan E., MOORBY, Jon M., PINLOCHE, Eric et NEWBOLD, Charles J. Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation. *The Journal of Nutrition*. 1 septembre 2012. Vol. 142, n° 9, pp. 1684-1692. DOI 10.3945/jn.112.159574.
379. WALLACE, R. J., ONODERA, R. et COTTA, M. A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In : HOBSON, P. N. et STEWART, C. S. (éd.), *The Rumen Microbial Ecosystem* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands, 1997. pp. 283-328. [Consulté le 5 juin 2019]. ISBN 978-94-010-7149-9. Disponible à l'adresse : http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-009-1453-7_7
380. PENNER, G.B., TANIGUCHI, M., GUAN, L.L., BEAUCHEMIN, K.A. et OBA, M. Effect of dietary forage to concentrate ratio on volatile fatty acid absorption and the expression of genes related to volatile fatty acid absorption and metabolism in ruminal tissue. *Journal of Dairy Science*. juin 2009. Vol. 92, n° 6, pp. 2767-2781. DOI 10.3168/jds.2008-1716.
381. DIEHO, K., DIJKSTRA, J., SCHONEWILLE, J.T. et BANNINK, A. Changes in ruminal volatile fatty acid production and absorption rate during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance. *Journal of Dairy Science*. juillet 2016. Vol. 99, n° 7, pp. 5370-5384. DOI 10.3168/jds.2015-10819.
382. WEIGAND, E., YOUNG, J.W. et MCGILLIARD, A.D. Volatile Fatty Acid Metabolism by Rumen Mucosa from Cattle Fed Hay or Grain. *Journal of Dairy Science*. septembre 1975. Vol. 58, n° 9, pp. 1294-1300. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(75)84709-6.
383. STEVENS, Ce et STETTLER, Bk. Factors affecting the transport of volatile fatty acids across rumen epithelium. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. février 1966. Vol. 210, n° 2, pp. 365-372. DOI 10.1152/ajplegacy.1966.210.2.365.
384. KRAMER, T., MICHELBERGER, T., GOERTLER, H. et GOEBEL, G. Absorption of short-chain fatty acids across ruminal epithelium of sheep. *Journal of Comparative Physiology B*. 1996. Vol. 166, n° 4, pp. 262-269. DOI 10.1007/BF00262870.
385. GÄBEL, G., ASCHENBACH, J. R. et MÜLLER, F. Transfer of energy substrates across the ruminal epithelium: implications and limitations. *Animal Health Research Reviews*. juin 2002. Vol. 3, n° 1, pp. 15-30. DOI 10.1079/AHRR200237.
386. ASCHENBACH, J. R., PENNER, G. B., STUMPF, F. et GÄBEL, G. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH12. *Journal of Animal Science*. 1 avril 2011. Vol. 89, n° 4, pp. 1092-1107. DOI 10.2527/jas.2010-3301.
387. ALLISON, Milton J. Production of Branched-Chain Volatile Fatty Acids by Certain Anaerobic Bacteria. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 1978. Vol. 35, pp. 6.
388. HIGGINBOTHAM, G.E., HUBER, J.T., WALLENTINE, M.V., JOHNSTON, N.P. et ANDRUS, D. Influence of Protein Percentage and Degradability on Performance of Lactating Cows During Moderate Temperature. *Journal of Dairy Science*. juillet 1989. Vol. 72, n° 7, pp. 1818-1823. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(89)79298-5.

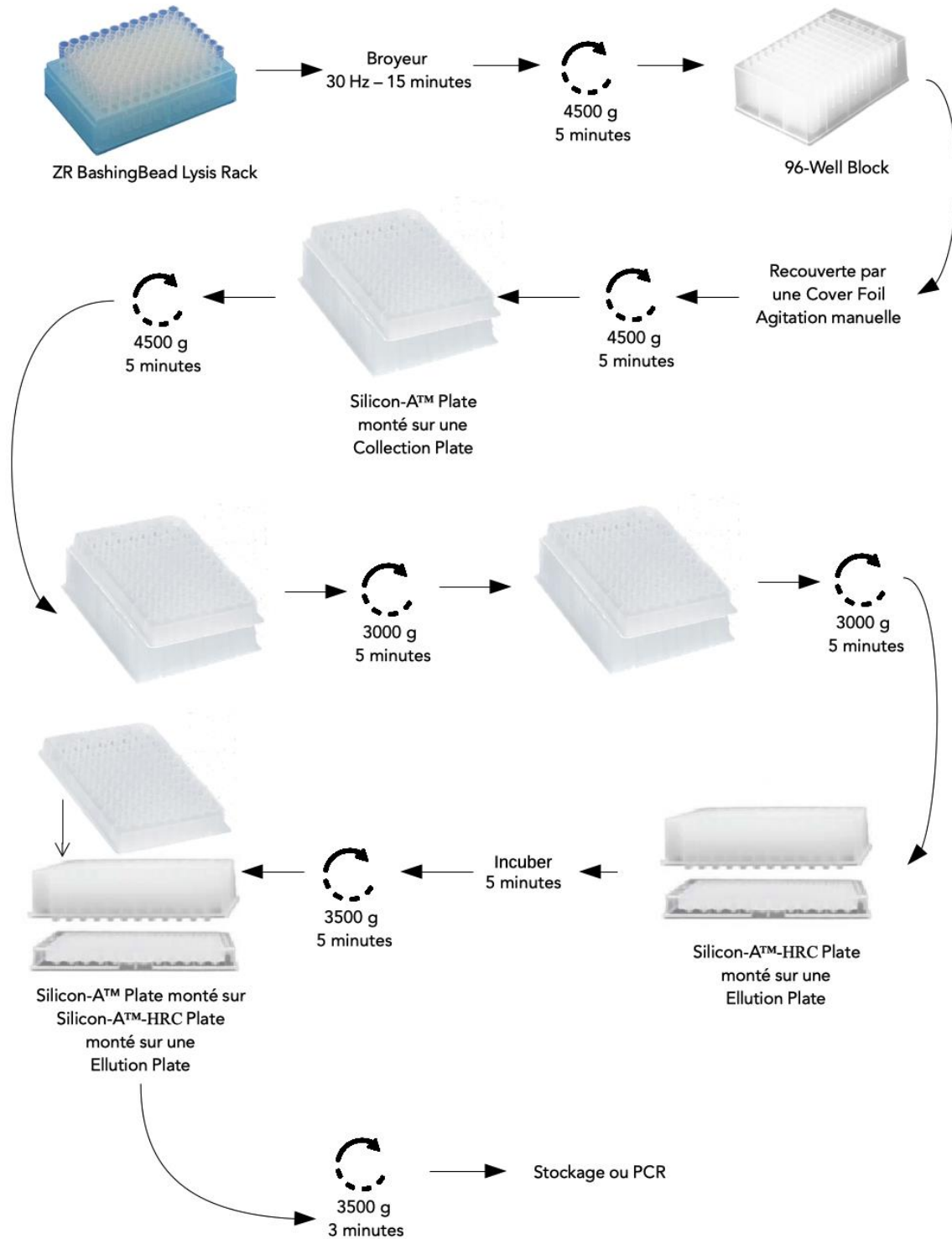
Annexes :

Annexe 1 :

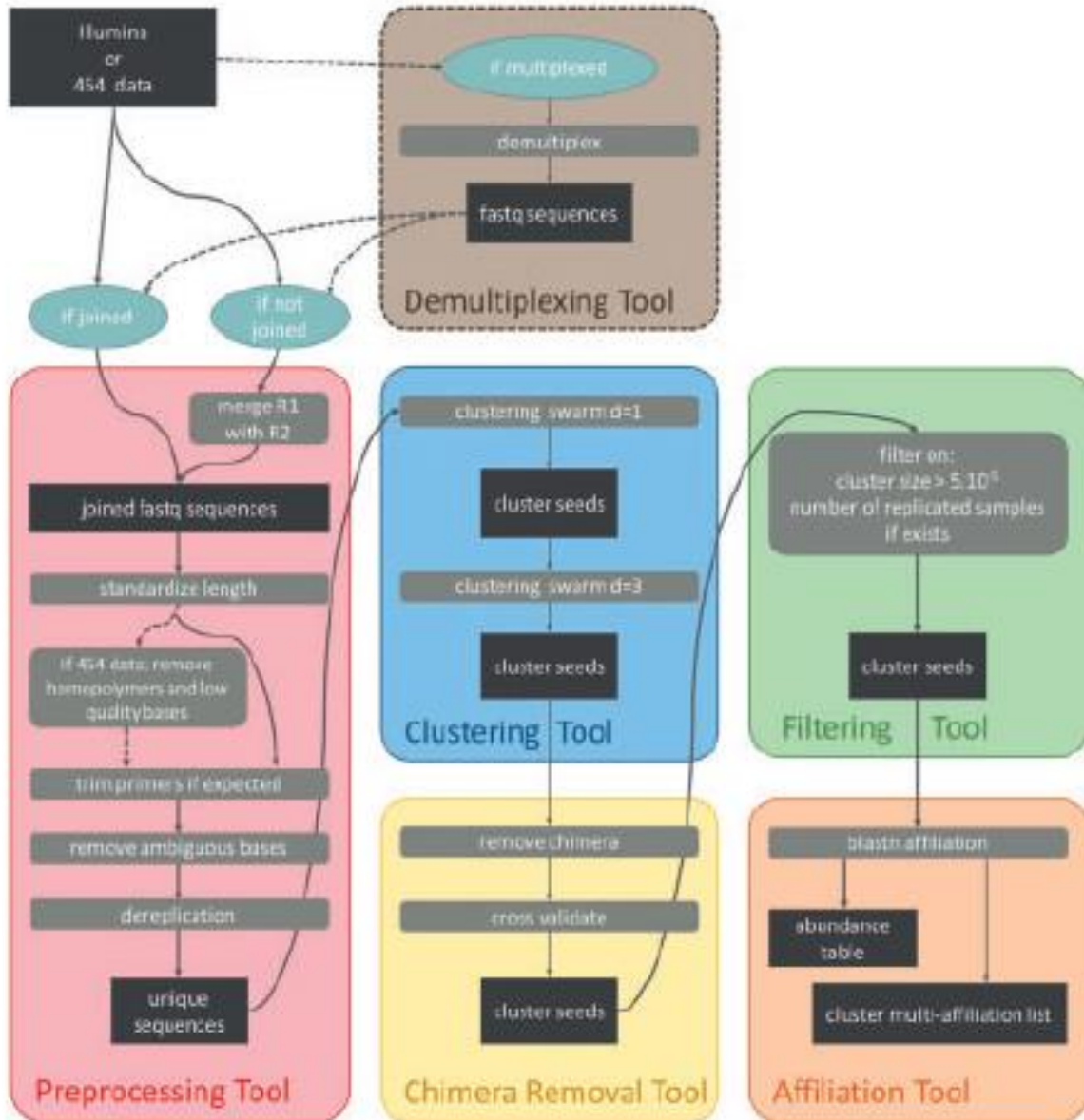
Période	Composition	Rations 120% des apports recommandés en PDI (HP)	Rations 70% des apports recommandés en PDI (LP)
4 semaines avant Mise-Bas (durée : 31 jours)	Ingrédients des concentrés (%MB)	Orge (45,6) Tourteau de soja 48% (48,5) AMV VISEO ZP (1) Bicarbonates (1,9) Liant (3)	Orge (83,4) Tourteau de soja 48% (1,1) AMV VISEO ZP (1,5) Bicarbonates (2) Liant (3)
2 semaines avant Mise-Bas (durée : 14 jours)	Ingrédients des concentrés (%MB)	Orge (67,4) Tourteau de soja 48% (27,9) AMV VISEO ZP (0,6) Bicarbonates (1,1) Liant (3)	Orge (89,6) Tourteau de soja 48% (5,6) AMV VISEO ZP (0,7) Bicarbonates (1,1) Liant (3)
Début de Lactation (durée : 42 jours)	Ingrédients des concentrés (%MB)	Orge (75,2) Tourteau de soja 48% (19,5) AMV VISEO ZP (1,1) Bicarbonates (1,2) Liant (3)	Orge (94,4) Tourteau de soja 48% (0) AMV VISEO ZP (1,4) Bicarbonates (1,2) Liant (3)

Annexe 2 :

EXTRACTION D'ADN AVEC LE KIT « *QUICK-DNA FECAL/SOIL MICROBE 96 KIT* »



Annexe 3 :



Résumé :

Dans un contexte de développement de l'haemonchose ovine dans les élevages européens et d'apparition rapide de résistances aux anthelminthiques après leur mise sur le marché, de nouvelles méthodes de lutte contre l'infestation parasitaire par *Haemonchus contortus*, parasite hématophage de la caillette, et contre ses conséquences pathologiques doivent être envisagées. Parmi ces méthodes, la nutrition et la sélection génétique semblent toutes deux prometteuses. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'éventuel impact de la sélection génétique pour la résistance à *Haemonchus contortus* et de différents niveaux d'apports alimentaires de protéines sur la structure de la communauté bactérienne ruminal et sur l'activité microbienne ruminale. Pour cela, des séquençages et des analyses d'acides gras volatils et d'azote ammoniacal ont été effectuées des prélèvements réalisés en fin de gestation et en début de lactation sur des brebis infestées par *Haemonchus contortus*. Une différence de communauté bactérienne a été mise en évidence entre les animaux non infestés en milieu de gestation et les animaux infestés en fin de gestation et lactation avec une modification différée par l'augmentation de l'apport en protéines par la ration. Le niveau de couverture des besoins protéiques par la ration a également été à l'origine de modifications des concentrations des métabolites étudiés. Les deux lignées sensible et résistante n'ont pas présenté de différence de structure de la communauté bactérienne ou de son activité au cours de l'étude.

Mots-Clés : *Haemonchus contortus*, rumen, microbiote, sélection génétique, nutrition.

Abstract:

While ovine haemonchosis is quickly emerging in European farms concomitantly with the development of resistance to anthelmintic molecules soon after their release on the market, new ways of struggling against the infection by a hematophagous parasite of the ruminants' stomach: *Haemonchus contortus* and against its pathological consequences should be considered. The aim of the present study was to evaluate the potential impact of the genetic selection for the resistance of sheep to *Haemonchus contortus* and of different dietary levels of proteins on the bacteria in the rumen and their activity. Sequencing and Volatile Fatty Acid and Ammonia dosages were done on ruminal samples collected from ewes while they were pregnant and while they were lactating. Bacterial communities were different between infected mid-gestation ewes and end-gestation and lactating ewes. The modification seemed to have been delayed by an increase in dietary protein. The difference in protein needs coverage also had an influence on the concentrations of the measured metabolites. The bacterial communities of the rumen did not differ between the sensitive and the resistant lineages throughout the study.

Keywords: *Haemonchus contortus*, rumen, microbiote, genetic selection, nutrition.