



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: <https://oatao.univ-toulouse.fr/27498/>

Vézignol, Thomas . *Comparaison de la composition du microbiote ruminal de brebis de race Lacaune, issues de deux lignées divergentes selon leur persistance laitière : étude sur trois lactations successives*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2020, 108 p.

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

ANNÉE 2020 THÈSE : 2020 – TOU 3 – 4090

---

# COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE RUMINAL DE BREBIS DE RACE LACAUNE, ISSUES DE DEUX LIGNÉES DIVERGENTES SELON LEUR PERSISTANCE LAITIÈRE : ÉTUDE SUR TROIS LACTATIONS SUCCESSIVES

---

THÈSE

pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLÔME D'ÉTAT

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

par

**Thomas VÉZIGNOL**

Né le 24 février 1996 à PÉRIGUEUX (24)

---

**Directeur de thèse : Mme. Annabelle MEYNADIER**

---

**JURY**

PRÉSIDENT :

**M. Alexis VALENTIN**

Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Annabelle MEYNADIER**

Professeure à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**M. Gilles FOUCRAS**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITÉ :

**Mme Christel MARIE-ETANCELIN**

Ingénieure de recherche à l'Institut National de Recherche pour  
l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement de TOULOUSE  
Laboratoire GenPhySE

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

**Directeur**: Professeur Pierre SANS

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie - 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**, (Emérite) - *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- 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**, *Zootechne*
- 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*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- M. **RABOISSON Didier**, *Médecine de population et Économie de la santé animale*

#### PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

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

#### MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
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**, *Immunologie- Bactériologie-Pathologie infectieuse*  
Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et Industrie des aliments*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophtalmologie vétérinaire et comparée*  
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*  
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. **LHERMIE Guillaume**, *Economie de la santé animale*  
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*  
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire – Maladies animales réglementées*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### CHARGES D'ENSEIGNEMENT CONTRACTUELS

- M. **BOLON Pierrick**, *Production et pathologie aviaire*  
M. **LEYNAUD Vincent**, *Médecine interne*  
Mme **ROBIN Marie-Claire**, *Ophtalmologie*  
Mme **TOUSSAIN Marion**, *Pathologie des équidés*

**ENSEIGNANT DE PREMIERE ANNEE COMMUNE AUX ETUDES VETERINAIRES**

Mme **GAUCHARD Cécile**, *Biologie-écologie-santé*

**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*

M. **TOUITOU Florian**, *Alimentation animale*

## REMERCIEMENTS

### **A Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN**

Professeur des Universités  
Praticien Hospitalier au CHU de TOULOUSE  
*Zoologie - Parasitologie*

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.  
Hommages respectueux.

### **A Mme le Professeur Annabelle MEYNADIER**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
*Alimentation*

Qui m'a confié ce travail, pour sa gentillesse et sa disponibilité.  
Sincères remerciements.

### **A Monsieur le Professeur Gilles FOUCRAS**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
*Pathologie des ruminants*

Qui a aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse.  
Sincères remerciements.

### **A Madame Christel MARIE-ETANCELIN**

Ingénieure de recherche à l'Institut National de Recherche  
pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement de TOULOUSE  
*Laboratoire GenPhySE*

Pour son aide lors de la rédaction de ce travail.  
Sincères remerciements.

## Table des matières

REMERCIEMENTS .....	5
Table des matières .....	6
Table des figures .....	8
Table des tableaux .....	10
Liste des abréviations .....	11
INTRODUCTION.....	12
PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
I – Production de lait de brebis dans le bassin de Roquefort.....	14
A- La filière Roquefort dans son contexte.....	14
B- La conduite d'élevage des brebis Lacaune .....	17
C- Le lait de brebis : produit de l'éleveur, matière première du fabricant fromager.....	19
II- Le rumen des ovins.....	25
A- Anatomie du rumen des ovins .....	25
B- Motilité ruminale .....	30
C- Conditions physico-chimiques ruminales.....	30
D- Le microbiote ruminal .....	32
III- Liens établis entre microbiote ruminal et productions animales.....	47
A- Outils de l'évaluation de la relation entre composition du microbiote ruminal et productions animales.....	47
B- Composition du microbiote ruminal et performance.....	48
C- Modification de la composition du lait selon le microbiote ruminal.....	51
D- Lien entre génétique de l'hôte, productions animales, et composition du microbiote ruminal. ....	55

DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE .....	59
I- Présentation de l'étude .....	60
II- Matériels et méthodes.....	60
A- Animaux .....	60
B- Plan expérimental et prélèvements .....	60
C- Analyse statistique.....	65
III- Résultats .....	66
A- Vérification de la qualité du jeu de données.....	66
B- Analyse de la diversité du microbiote bactérien.....	69
C- Etude de l'effet de la lignée et du rang de lactation sur la composition du microbiote.....	74
IV- Discussion .....	88
A- Effet de la lignée sur les variables étudiées.....	88
B- Effet du rang de lactation sur les variables étudiées.....	88
C- Biais d'étude subis par l'analyse de nos résultats.....	89
 CONCLUSION .....	 90
 ANNEXES .....	 91
Bibliographie.....	99

## Table des figures

Figure 1 - Aire géographique de l'AOP Roquefort (INAO 2017) .....	14
Figure 2 - Période d'allaitement-traite des agneaux en bergerie, GAEC de Courbière (Assac, 81).....	17
Figure 3 - Représentation simplifiée du principal système de production en brebis laitières Lacaune (Inra, 2018).....	18
Figure 4 - Production de lait, teneur en matières grasses et protéiques du lait de brebis Lacaune au cours de la période de traite exclusive (Inra, 2018).....	20
Figure 5 - Principales opérations de la fabrication du fromage de Roquefort (Confédération Générale des Producteurs de Lait de Brebis et des Industriels de Roquefort, 2017).....	23
Figure 6 - Caves du Combalou (Confédération Générale des Producteurs de Lait de Brebis et des Industriels de Roquefort, 2017).....	24
Figure 7 - Conformation intérieure et topographie du rumen et du réticulum de l'ovin (Barone, 1996).....	26
Figure 8 - Aspect externe des estomacs de l'ovin (Barone, 1996).....	27
Figure 9 - Aspect interne des estomacs de l'ovin (Barone, 1996).....	28
Figure 10- Cellules réticulaires de l'ovin (Jarrige, Ruckebusch, 1995).....	29
Figure 11 - Stratification du contenu ruminal (Sadet, 2008).....	30
Figure 12 - Processus des méthodes indépendantes des cultures possibles pour étudier la structure et le fonctionnement du microbiote des animaux de rente (Deusch et al., 2015).....	32
Figure 13 - Arbre phylogénétique des principaux taxons bactériens présents dans le rumen, (selon Michelland (2009) et Sadet (2008), réalisé à l'aide de l'outil Lifemap de de Vienne (2016)).....	34
Figure 14 - Modèle proposé par (Shabat et al., 2016) pour expliquer les différences d'efficacité alimentaire chez les ruminants .....	49
Figure 15 - Corrélation entre l'efficacité des paramètres et l'abondance des taxons bactériens (Jami et al., 2014).....	52
Figure 16 - Corrélation entre l'efficacité des paramètres et l'abondance des taxons bactériens (Indugu et al., 2017).....	54
Figure 17 - Analyse d'héritabilité basée sur la matrice de parenté génétique (GRM) de 39 OTU microbiens significativement corrélés au génotype animal (Wallace et al., 2019) .....	57
Figure 18 - Etapes du pipeline FROGS pour nettoyer un séquençage et obtenir des OTUs .....	62
Figure 19 - Erreurs au cours des étapes du process de séquençage et correction par le pre-process ....	62
Figure 20 - Schématisation de la conservation des séquences à 3 erreurs de bases près, lors du Clustering .....	63
Figure 21 - Schéma explicatif de l'obtention d'une chimère .....	64
Figure 22 - Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de leur lignée.....	67
Figure 23 - Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de leur rang de lactation.....	68
Figure 24 - Boxplots de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal des agneaux en fonction des lignées PERS- et PERS+ .....	69
Figure 25 - Graphique en nuage de points représentant la $\beta$ -diversité (Bray-Curtis) du microbiote ruminal en fonction des lignées PERS- et PERS+ .....	70
Figure 26 - Boxplots de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal des agneaux en fonction des rangs de lactation 1, 2 et 3 .....	71
Figure 27 - Graphique en nuage de points représentant la $\beta$ -diversité (Bray-Curtis) du microbiote ruminal en fonction des rangs de lactation 1, 2 et 3 .....	72

Figure 28 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction de la lignée .....	74
Figure 29 - Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction des lignées PERS- et PERS+, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes .....	76
Figure 30 – Boxplots de la distribution des abondances relatives des genres <i>NK4A214 group</i> (fig a.), et <i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i> (fig. b.) et <i>Acetitomaculum</i> (fig. c.) selon la lignée (* P-value < 0.05 ; ** P-value < 0.01 ; *** P-value <0.001).....	77
Figure 31 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des familles en fonction de la lignée.....	78
Figure 32–Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des familles en fonction des lignées PERS- et PERS+, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes .....	79
Figure 33 - Boxplots de la distribution des abondances relatives des familles <i>Rikenellaceae</i> (fig. a.), <i>Oscillospiraceae</i> (fig. b.), <i>F082</i> (fig. c.) et <i>Lachnospiraceae</i> (fig. d.) selon la lignée (* P-value < 0.05 ; ** P-value < 0.01 ; *** P-value <0.001).....	80
Figure 34 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction du rang de lactation.....	81
Figure 35 - Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction des rangs de lactation 1,2 et 3, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes .....	82
Figure 36 – Boxplots de la distribution des abondances relatives des genres <i>unknown genus</i> de la famille <i>Bacteroidales RF16 group</i> (fig. a.) et <i>Lachnospiraceae NK3A20 group</i> (fig. b.) selon le rang de lactation (* P-value < 0.05 ; ** P-value < 0.01 ; *** P-value <0.001) .....	83
Figure 37 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des familles en fonction du rang de lactation.....	84
Figure 38 - Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction des rangs de lactation 1,2 et 3, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes .....	85
Figure 39 - Boxplots de la distribution des abondances relatives des familles <i>Bacteroidales RF16 group</i> (fig. a.), <i>Ruminococcaceae</i> (fig.b.), <i>Lachnospiraceae</i> (fig. c.) et <i>Muribaculaceae</i> (fig. d.) selon le rang de lactation (* P-value < 0.05 ; ** P-value < 0.01 ; *** P-value <0.001) .....	86

## Table des tableaux

Tableau 1 - AOP Roquefort : principaux points à contrôler du cahier des charges et leurs méthodes d'évaluation (partie 1).....	15
Tableau 2 - AOP Roquefort : principaux points à contrôler du cahier des charges et leurs méthodes d'évaluation (partie 2).....	16
Tableau 3 - Composition chimique moyenne des laits crus de brebis et de vache en g/kg (Debiesse O, 2000).....	19
Tableau 4 – Propriétés physico-chimiques du rumen, (adapté de Puniya et al., 2015 ; Jarrige, Ruckebusch, 1995).....	31
Tableau 5 - Composition du microbiote ruminal (Puniya et al., 2015).....	33
Tableau 6 – Abondances relatives de taxa sélectionnés, identifiés par pyroséquençage 454 du contenu ruminal (phases liquide et solide) ou du fluide ruminal (phase liquide) (Castro-Carrera et al., 2014)	35
Tableau 7 - Substrats et produits des principales espèces bactériennes ruminales (Dehority, 2003 ; Chaumeton Justine, 2018).....	39
Tableau 8 - Estimations des héritabilités pour les caractères sur la lactation totale de brebis en première lactation (Barillet, Boichard, 1987).....	55
Tableau 9 - Tableaux croisés du nombre d'individus entre les groupes .....	66
Tableau 10 - Résultat de l'analyse PERMANOVA de la diversité (Bray-Curtis) du microbiote ruminal en fonction des différents paramètres étudiés .....	73

## Liste des abréviations

**ADG** : Average Daily Gain  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**AG** : Acide Gras  
**AGI** : Acide Gras Insaturé  
**AGS** : Acide Gras Saturé  
**AGV** : Acide Gras Volatil  
**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché  
**ANOVA** : Analysis Of Variance  
**AOP** : Appellation d'Origine Protégée  
**ARLA** : Acidose Ruminale Lactique Aiguë  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ARNr** : Acide RiboNucléique ribosomal  
**ARSA** : Acidose Ruminale SubAiguë  
**CCS** : Concentration en Cellules Somatiques  
**DMI** : Dry Matter Intake  
**ECM** : Energy-Calculated Milk  
**FROGS** : Find, Rapidly, Otus with Galaxy Solutions  
**GFE** : Gross Feed Efficiency  
**GMQ** : Gain Moyen Quotidien  
**IMIC** : Intervalle Mise-bas – 1<sup>er</sup> Contrôle laitier  
**MAT** : Matière Azotée Totale  
**MG** : Matière Grasse  
**MP** : Matière Protéique  
**MST** : Matière Sèche Totale  
**NEC** : Note d'État Corporel  
**NMDS** : Non-metric MultiDimensional Scaling  
**OTU** : Unité Taxonomique Opérationnelle  
**PEAR** : Résidu de Post-Extraction d'Algues  
**PERMANOVA** : Permutational Analysis Of Variance  
**PCA** : Principal Component Analysis  
**RFI** : Residual Feed Intake  
**sPLS-DA** : sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis  
**TP** : Taux Protéique  
**TB** : Taux Butyreux  
**UFC** : Unité Formant Colonie

## INTRODUCTION

Les ruminants sont des herbivores qui peuvent valoriser l'appareil végétatif aérien de plantes à faibles valeurs énergétiques. Cela a conduit l'Homme à les domestiquer, afin de tirer parti de cet avantage, pour produire de la viande, du lait, du cuir ou encore de la laine. Les ovins de race Lacaune sont un parfait exemple de cette valorisation, puisqu'ils sont à l'origine d'un produit fleuron de la gastronomie française : le Roquefort. C'est toute une filière économique qui dépend de ce fromage, ancrée dans un territoire bien particulier.

Cette faculté est notamment possible grâce à leurs pré-estomacs non sécrétant, et en particulier le plus vaste : le rumen. Il réunit des conditions physico-chimiques particulières permettant l'existence et le fonctionnement d'un microbiote spécifique, constitué de bactéries, d'archées méthanogènes, de protozoaires, de champignons et de virus. Ces micro-organismes ruminants peuvent dégrader entre autres les fibres végétales et produire des acides gras volatils (principalement les acides acétique (C2), propionique (C3) et butyrique (C4)), des protéines microbiennes et des vitamines, qui constituent des nutriments permettant l'entretien, la croissance et la production de l'hôte.

Les méthodes d'étude des communautés microbiennes ont récemment vu l'apparition de nouveaux outils, remplaçant les techniques classiques de cultures et de caractérisation. Ces anciennes méthodes sont fiables pour caractériser les propriétés physiologiques de micro-organismes. Cependant, elles possèdent de nombreux inconvénients quand il s'agit de communautés microbiennes, car par définition elles ne reflètent pas les conditions *in vivo*. C'est pourquoi la métagénomique, comprenant des méthodes de séquençages basées sur l'ARN ribosomal 16S, est désormais préférée pour décrire précisément la composition du microbiote ruminal.

Les applications de la connaissance détaillée du microbiote sont multiples. Il s'agit par exemple de chercher à réduire la production de méthane par leur biais, de comprendre des pathologies telles que l'acidose ruminale, ou encore d'améliorer les productions animales. Si ce dernier sujet a déjà été étudié, très peu de travaux portent sur les ovins laitiers, et à notre connaissance aucune étude n'a été réalisée sur plusieurs lactations. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail.

Dans un premier temps, nous présenterons une brève synthèse bibliographique afin de présenter rapidement le contexte de la production de Roquefort, décrire les caractéristiques anatomiques et physico-chimiques du rumen et son microbiote. Les avancées en termes de connaissances du lien entre le microbiote ruminal et les caractères de production seront également exposées, tout en discutant de leur héritabilité.

Dans un second temps, nous exposerons l'étude expérimentale menée, dans l'optique de comparer le microbiote ruminal de deux lignées divergentes de brebis Lacaune, sur trois lactations successives, et discuterons de nos résultats.

**PREMIÈRE PARTIE :**  
**ÉTUDE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# I – Production de lait de brebis dans le bassin de Roquefort

## A- La filière Roquefort dans son contexte

Plus grand pôle d'élevage ovin laitier de France, l'aire géographique de l'AOP Roquefort (Appellation d'Origine Protégée) s'étend sur les départements de l'Aveyron, du Tarn, de la Lozère, du Gard, de l'Hérault et de l'Aude, au travers de plus de 500 communes (Figure 1). Elle était constituée en 2019 de 675 000 brebis Lacaune réparties sur 1 530 fermes.

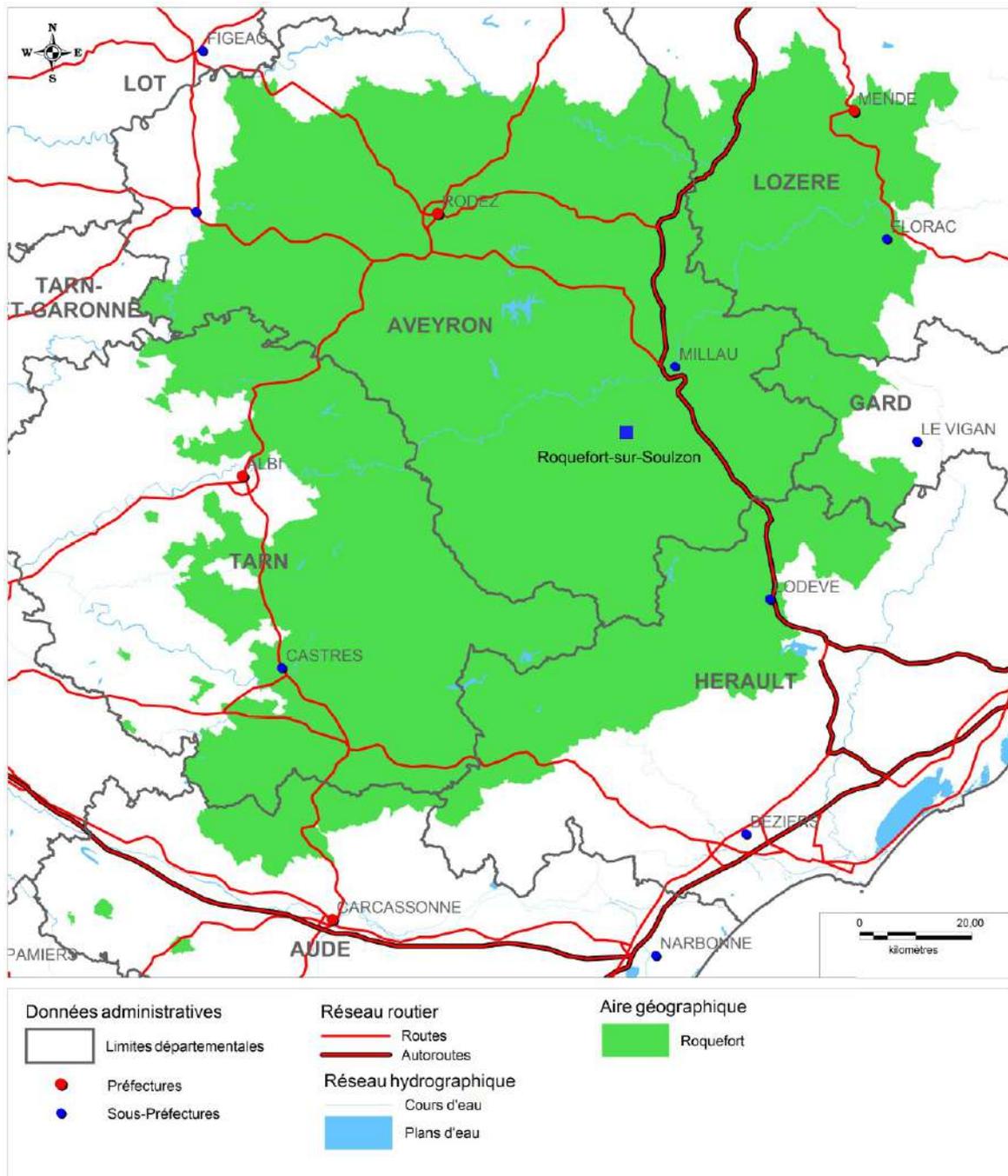


Figure 1 - Aire géographique de l'AOP Roquefort (INAO 2017)

Roquefort est la plus ancienne des appellations fromagères françaises, puisqu'elle a été obtenue en 1925. La Confédération générale des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort regroupe l'ensemble des acteurs de cette filière depuis 1930, autour de laquelle gravitent 4 500 emplois. 16 200 tonnes de fromages ont été produites en 2019, dont le quart a été exporté dans plus de 80 pays. Conçu à partir de lait cru de brebis, il est affiné dans les caves de la montagne du Combalou, situées dans la commune de Roquefort-sur-Soulzon.

La qualité et l'authenticité du fromage sont garanties par un cahier des charges qui encadre la production du lait mais aussi sa transformation (Tableaux 1 et 2).

Tableau 1 - AOP Roquefort : principaux points à contrôler du cahier des charges et leurs méthodes d'évaluation (partie 1)

		PRINCIPAUX POINTS A CONTROLER	VALEURS DE REFERENCE	METHODES D'EVALUATION
<b>EXPLOITATION LAITIÈRE</b>	Localisation de la production du lait de brebis		Liste des communes de l'aire géographique définie par le présent cahier des charges	Documentaire et/ou visuel
	Race de la brebis		Race Lacaune	Visuel et/ou documentaire
	Mode d'élevage	Stabulation permanente exclusive	Interdit	Visuel et/ou documentaire
		Elevage hors-sol	Interdit	Visuel et/ou documentaire
	Alimentation du troupeau	Pâturage	Obligatoire et quotidien en période de disponibilité d'herbe, dès que les conditions climatiques le permettent	Visuel et/ou documentaire
		Achats extérieurs à l'exploitation de fourrages, céréales et aliments complémentaires (hors paille et moutures à façon ou équivalent)	Limités à 200 kilogrammes de matière sèche maximum/brebis/an	Documentaire
		Provenance de l'alimentation des brebis	Au moins aux trois quarts de l'aire géographique de production (évaluée en matière sèche)	Documentaire
	Nature du lait livré		Lait de brebis	Documentaire et/ou analytique

Tableau 2 - AOP Roquefort : principaux points à contrôler du cahier des charges et leurs méthodes d'évaluation (partie 2)

	PRINCIPAUX POINTS A CONTROLER		VALEURS DE REFERENCE	METHODES D'EVALUATION
<b>A TELIER DE FABRICATION</b>	Affectation du site de fabrication		Interdiction de la pénétration, réception ou présence de tout lait autre que le lait de brebis et de tout produit fromager provenant d'un autre lait que du lait de brebis	Documentaire et/ou visuel et/ou analytique
	Localisation de la fabrication des fromages		Liste des communes de l'aire géographique définie par le présent cahier des charges	Documentaire et/ou visuel
	Nature du lait mis en fabrication		Exclusivement du lait de brebis correspondant aux conditions de production définies par le présent cahier des charges	Visuel et/ou analytique et/ou documentaire
	Caractéristiques du lait de brebis mis en fabrication		Lait cru et entier, non normalisé en protéines et matières grasses	Visuel, documentaire et/ou analytique
	Nature du <i>Penicillium</i>		<i>Penicillium roqueforti</i> (souches traditionnelles isolées dans le microclimat des caves de la zone délimitée à la commune de Roquefort-sur-Soulzon)	Documentaire
<b>CAVE FRIGO CONDITIONNEMENT</b>	Localisation des caves		Présence dans la zone des éboulis de la montagne du Combalou (commune de Roquefort-sur-Soulzon), délimitée par le jugement du TGI de Millau du 12 juillet 1961	Documentaire et/ou visuel
	Caractéristiques des caves		Caves parcourues naturellement par les courants d'air frais et humide provenant des fleurines de la montagne du Combalou	Visuel
	Localisation des opérations de maturation, stockage, découpage, conditionnement, préemballage et emballage des fromages		Exclusivement dans la commune de Roquefort-sur-Soulzon	Documentaire et/ou visuel
	Durée d'affinage (exposition à nu) dans les caves		Deux semaines minimum	Documentaire et/ou visuel
	Durée d'affinage puis maturation		Au moins 90 jours à compter du jour de fabrication	Documentaire et/ou visuel
<b>FROMAGE</b>	Caractéristiques physiques du fromage	Forme	Cylindrique	Visuel
		Dimensions	19 à 20 centimètres de diamètre et 8,5 à 11,5 centimètres de hauteur	Mesure
		Poids	2,5 à 3 kilogrammes	Mesure
	Caractéristiques analytiques du fromage	Teneur en matière grasse	Supérieure ou égale à 52 % de l'extrait sec	Analytique
		Teneur en matière sèche	Supérieure ou égale à 55 %	Analytique
Caractéristiques organoleptiques du fromage		Avis conforme de la Commission Organoleptique	Organoleptique	

Si sur les 170 millions de litres de lait produits chaque année dans ce bassin de production, 46 % sont ensuite transformés en Roquefort, des transformations diverses existent :

- 25 % en fromage pour salade de type feta,
- 9 % en pâtes pressées (pécora),
- 4 % en différentes spécialités (pérails),
- 8 % vendus à l'export,
- 0,18 % transformés en poudre,
- 4 % en pâtes pressées Pyrénées,
- 2 % sont consacrés à de nouveaux produits et à des essais.

### **B- La conduite d'élevage des brebis Lacaune**

Si les conditions d'élevages peuvent beaucoup varier entre les différentes exploitations ovines de la zone géographique de Roquefort, la physiologie de la brebis impose certaines pratiques agricoles. Le principal système de production en brebis laitière Roquefort s'organise comme suit :

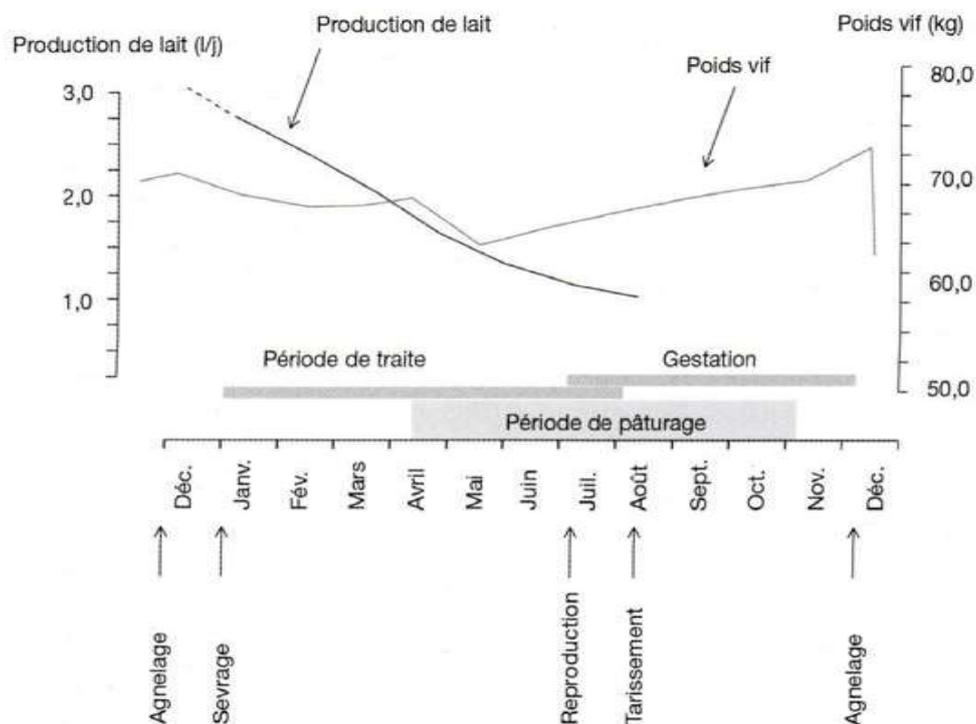
- Les mises-bas s'étalent de novembre à février, en bergerie, avec des box d'agnelage individuels. Suit un mois d'allaitement-traité (Figure 2).



Figure 2 - Période d'allaitement-traité des agneaux en bergerie, GAEC de Courbière (Assac, 81)

- Une fois les agneaux sevrés, ils sont vendus pour l'engraissement dans des ateliers spécialisés. Les agnelles de renouvellement sont séparées de leurs mères, et sont élevées en parallèle jusqu'à l'âge de 7-8 mois. Les brebis sont mises à la traite deux fois par jour (matin et soir), Leur nourriture est constituée de concentrés (distribués au tapis ou en salle de traite) et de fourrages, au moins aux trois quarts issus de l'aire géographique de production. La ration est calculée pour couvrir les besoins de la majorité des brebis, et une complémentation à la salle de traite peut avoir lieu pour les meilleures productrices. Pour une production de 3 L de lait par jour, la ration journalière peut s'apparenter à 6 kg de ray-grass italien, 1 kg de foin de luzerne, 0,5 kg d'orge et 0,5 kg de correcteur azoté 40 % de MAT.
- Aux beaux jours, les animaux passent la journée en pâturage.
- Au début de l'été, les agnelles de renouvellement et les brebis sont mises à la reproduction. Si un peu moins de la moitié des éleveurs optent directement pour la stratégie de la monte naturelle, la plupart commencent par des inséminations artificielles. Un flushing peut être réalisé pour les animaux ayant une Note d'Etat Corporel (NEC) trop faible.
- En été intervient également le tarissement. Une partie des éleveurs passent en monotraite pour effectuer une transition plus douce, technique qui en contrepartie sort le lait de la filière Roquefort.
- Au début de l'hiver les animaux sont rentrés en bergerie. Ils y passeront les mauvais jours, en attendant la mise-bas.

La figure 3 reprend l'ensemble de ces éléments de façon graphique.



**C- Le lait de brebis : produit de l'éleveur, matière première du fabricant fromager**  
(Debiesse O, 2000)

**1- Composition élémentaire du lait de brebis**

Le lait de brebis est, au même titre que le lait d'autres mammifères, constitué d'éléments chimiques (matières azotées, matière grasse, lactose, matières salines) et biologiques (microflore lactique et non lactique, cellules).

La composition moyenne du lait cru de brebis est décrite dans le tableau 3. Quantitativement, l'élément le plus important est l'eau. Le lait de brebis est en moyenne deux fois plus riche en matière grasse que le lait de vache ou de chèvre, et presque deux fois plus riche en matières azotées totales. Sa teneur en lactose est cependant équivalente ou inférieure à celle de lait de vache. Enfin, des enzymes (lipase, protéase, catalase, peroxydase, réductase, lactase, phosphatase), des minéraux (calcium, phosphore) et des vitamines (B1, B2, B9, A et E) entrent également dans sa composition. Les teneurs de ces éléments varient au cours du stade de lactation comme le montre la figure 4.

Tableau 3 - Composition chimique moyenne des laits crus de brebis et de vache en g/kg (Debiesse O, 2000)

		Lait de brebis	Lait de vache
<b>Eau</b>		812	873
<b>MST</b> (Matière Sèche Totale)		188	129
	MG (Matière Grasse)	75	38
	MAT (Matière Azotée Totale)	57	34
	Caséine	44,7	26
	Protéines solubles	9,6	4
	Glucides	46	48
	Matières minérales	10	9

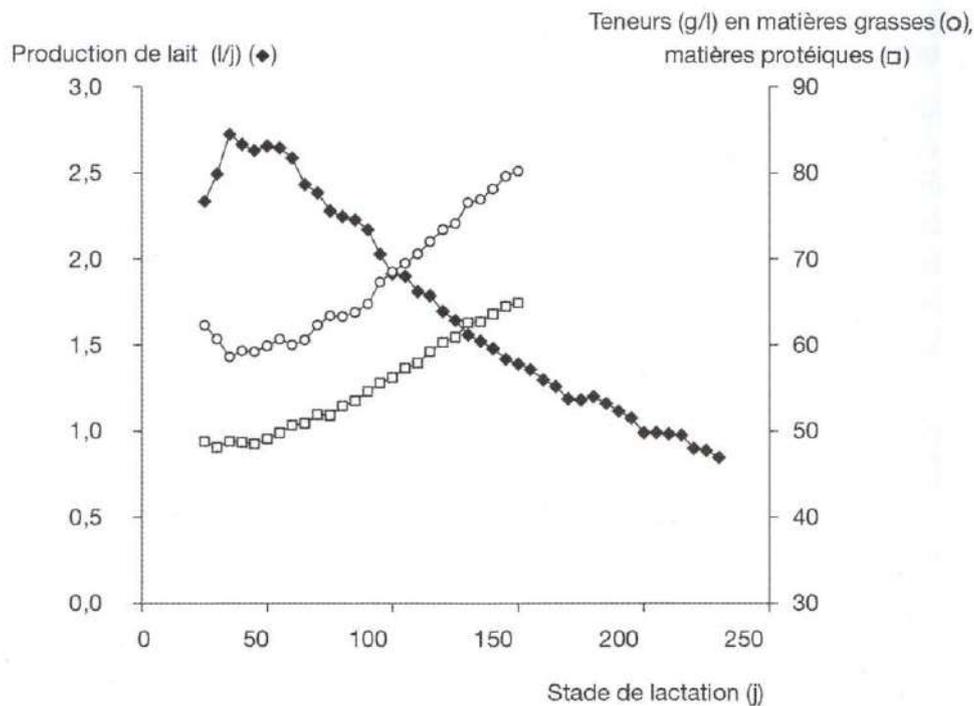


Figure 4 - Production de lait, teneur en matières grasses et protéiques du lait de brebis Lacaune au cours de la période de traite exclusive (Inra, 2018)

Sauf en cas d'infection de la mamelle, le lait de brebis est normalement pauvre en bactéries, à la sortie de la mamelle. Il peut cependant se contaminer au cours des différentes manipulations, pendant et après la traite, avec des éléments du microbiote environnemental, qui peuvent être néfastes pour le consommateur (par exemple *Listeria monocytogenes*, à l'origine de septicémies, de méningo-encéphalites et d'avortements chez l'Homme) ou pour la transformation en fromage (par exemple les entérobactéries, antagonistes de la flore lactique), mais aussi qui peuvent être nécessaires (appelées bactéries lactiques).

Enfin, des constituants cellulaires peuvent être présents dans le lait de brebis, d'origine sanguine (leucocytes de type macrophages, lymphocytes ou polynucléaires neutrophiles) et mammaire (cellules épithéliales des canaux galactophores et de lactocytes), marqueurs d'une éventuelle inflammation en cas d'une présence importante.

## 2- Critères de qualité pour la production laitière

Si le prix moyen du lait de brebis était de 967 €/1 000 L pour la campagne 2018 (Pôle Économie et Prospective des Chambres d'Agriculture d'Occitanie, Chargés d'études Cerfrance Région Occitanie, 2020), des variations sont appliquées selon sa composition et sa qualité. Les critères utilisés sont encadrés par l'article L654-30 du Code rural et de la pêche maritime (2000), tout comme pour le lait de vache et de chèvre.

Les critères pris en compte pour le paiement du lait de brebis ont alors été définis par des conventions interprofessionnelles entre éleveurs et laiteries de Roquefort, comme celle établie entre l'INRAE La Fage et la Société des Caves de Roquefort pour l'année laitière 2019/2020.

Deux volets sont établis :

- la composition chimique : « Le litre de lait est payé en fonction de sa teneur en matière grasse (MG) et en matière protéique (MP) :
  - o détermination par classe d'une valeur pour le gramme de M.G. et d'une valeur pour le gramme de M.P. ;
  - o affectation de cette valeur aux taux moyens de chaque producteur ;
  - o calcul d'un prix de base du lait par classe. »
- La qualité microbiologique du lait, évaluée par le calcul de la moyenne arithmétique des prélèvements :
  - o qualité bactériologique (flore totale, germes *Escherichia coli*, germes de Staphylocoques);
  - o qualité butyrique ;
  - o dénombrement cellulaire ;
  - o recherche d'inhibiteurs bactériens (traces d'antibiotiques)

Un grade est alors établi en fonction des résultats, conditionnant le prix d'achat du lait.

### ***3- Critères de qualité pour la production fromagère***

Si le lait doit être de suffisamment bonne qualité pour être payé au prix le plus élevé possible, ce sont des critères différents qui permettront aux entreprises fromagères de le transformer en Roquefort. Plus il est riche en matières grasses et protéiques, plus il permettra un rendement important. On passe ainsi de 13 L de lait nécessaires à la production d'un fromage en début de saison à 11 L en fin de saison. Ces variations rendent plus difficile la manipulation du fromage et la production d'un produit standardisé, identique tout au long de la campagne de production.

La qualité technologique de la matière première lait est alors essentiellement liée à son aptitude à la transformation en fromage, mais aussi à son innocuité pour le consommateur.

L'entreprise fromagère réalise plusieurs analyses en laiterie pour éviter l'utilisation de lait de mauvaise qualité dans la fabrication de fromage, et repérer son origine afin de conseiller les éleveurs dans l'amélioration de sa qualité.

Les substances inhibitrices des activités biologiques des micro-organismes peuvent altérer la transformation du lait en fromage. Il s'agit principalement d'antibiotiques, issus de traitements parentéraux, de soins de plaies de trayons, ou encore de traitements intra-mammaires. Leur présence témoigne de leur mauvaise utilisation (délai d'attente non respecté, utilisation hors AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), surdosage) ou d'une mauvaise identification des animaux traités. Les micro-organismes, indispensables au bon déroulement de la fabrication d'un fromage fermenté comme le Roquefort, peuvent être inhibés par de faibles concentrations en antibiotiques. Une insuffisance de coagulation, la perturbation du développement des arômes ou une prolifération de certaines bactéries nuisibles, sont des conséquences possibles.

La qualité bactériologique du lait est primordiale, surtout dans le cas ici présent d'une transformation de lait cru, sans traitement thermique. La teneur globale en germes est alors évaluée par un test à la résazurine, et un dénombrement des coliformes est effectué. Ces derniers peuvent être à l'origine d'un défaut d'acidification par compétition avec les bactéries lactiques, et ainsi entraîner des gonflements précoces de la pâte et des défauts de saveurs.

Un niveau cellulaire élevé d'un lait de citerne peut avoir des effets néfastes sur les qualités organoleptiques des fromages en raison d'un potentiel enzymatique important. Pour lutter contre ce facteur, les entreprises fromagères de Roquefort ont par exemple soutenu un projet d'information, afin de présenter aux éleveurs les différents outils de dépistage des mammites sub-cliniques et chroniques de la brebis laitière. Les sélectionneurs ont aussi contribué à cet objectif, avec un travail de sélections de brebis ayant des faibles taux cellulaires dans leur lait.

En ce qui concerne la qualité sanitaire du lait, elle constitue un double enjeu : produire des fromages de qualité, conformes à la réglementation pour pouvoir maintenir leur commercialisation, et éviter les accidents alimentaires dont les répercussions pourraient être considérables. Les risques sanitaires considérés mineurs sont dus à *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, tandis que *L. monocytogenes* représente un risque majeur. Des contrôles sur le lait et/ou sur le fromage en sortie de cave, permettent de contrôler ces risques.

#### **4- Transformation du lait de brebis en Roquefort**

Le lait, stocké dans un tank à une température comprise entre 8 et 10 degrés Celsius, est acheminé par les collecteurs dans l'une des 7 fromageries : Société des Caves et des Producteurs Réunis de Roquefort, Fromageries Papillon, Etablissements Gabriel Coulet SA, Les Fromageries Occitanes, Entreprise Vernières Frères, SARL Yves Combes ou Etablissements Carles. A son arrivée, il est analysé et conduit dans des cuves en acier inoxydable, où il est réchauffé entre 28 et 34°C. Il s'agit de la température d'emprésurage, dans le cadre d'un cycle de fabrication immédiate. Il peut aussi être refroidi à 5°C dans le cas d'une fabrication différée, pour un maximum de 38h, comme l'indique le cahier des charges de l'AOP. Une fois réchauffé, on y ajoute la présure animale, les ferments lactiques et le *Penicilium roqueforti*, éléments indispensables à la transformation. Deux heures après le mélange, une lyre est utilisée pour trancher le caillé alors formé, et obtenir des petits cubes. Après un repos de 20 minutes de l'ensemble, un léger brassage permet de séparer les grains de caillé du lactosérum, aussi appelé « petit lait ». On moule ensuite les « pains » de Roquefort qui sont égouttés, pendant environ 2 jours, à une température comprise entre 16 et 20°C. Ces pains sont retournés régulièrement, puis vient l'étape du salage, consistant en une imprégnation de sel marin sec des faces et du talon du fromage, étalée sur 5 jours. Le brossage consiste alors à enlever l'excédent de sel. Ils peuvent alors être acheminés dans les caves, pour l'affinage. L'ensemble de ces étapes est repris par la figure 5.

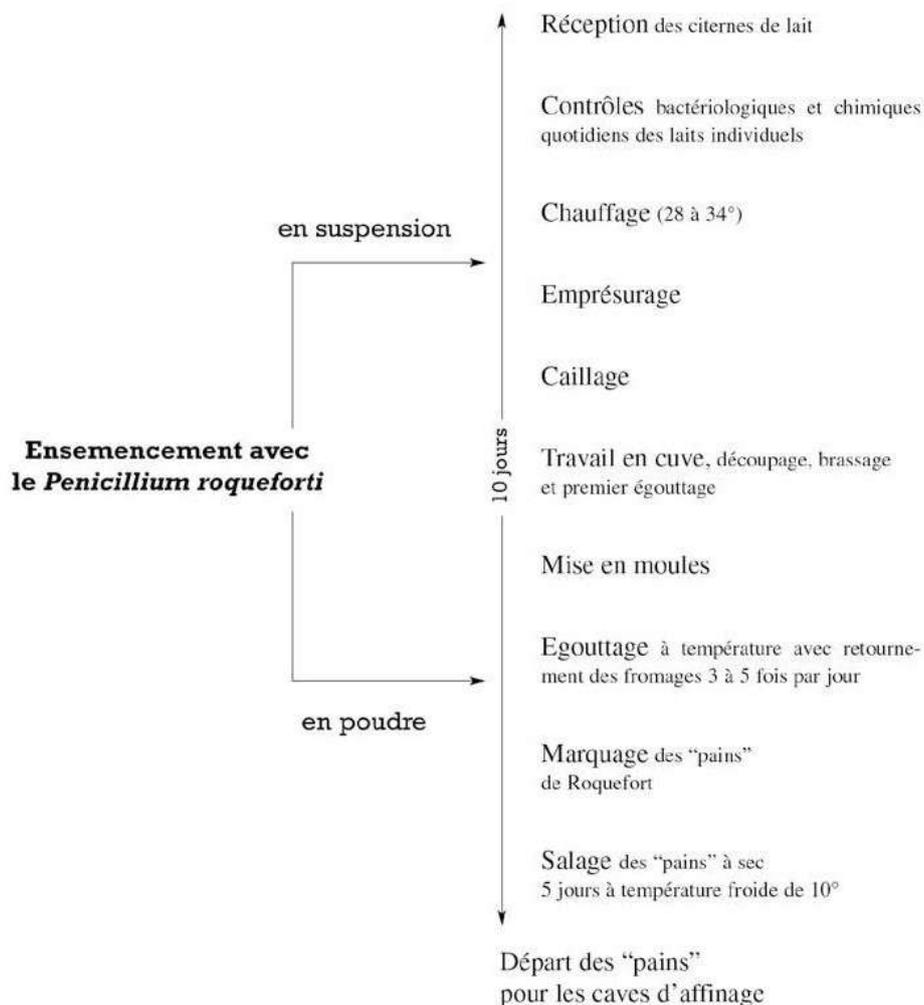


Figure 5 - Principales opérations de la fabrication du fromage de Roquefort (Confédération Générale des Producteurs de Lait de Brebis et des Industriels de Roquefort, 2017)

C'est au départ de la laiterie ou à leur arrivée aux caves que les pains sont percés sur toute leur hauteur d'une quarantaine de « cheminées », nécessaires pour expulser le gaz carbonique issu de la fermentation et favoriser le développement du *P. roqueforti*. Mais au préalable, ils subissent un certain nombre de contrôles, par le biais de prélèvements, pour vérifier, par exemple, le taux de sel et l'acidité du caillé. Les fromages sont disposés sur chant pour favoriser la circulation de l'air sur de longues travées, dans une atmosphère saturée d'humidité. Les caves sont aménagées dans l'éboulis de la roche du Combalou (Figure 6), et bénéficient d'une constance de température et d'hygrométrie grâce aux fleurines, des failles ventilantes, idéales pour le développement du *P. roqueforti*. Les quelques milliers de pains entreposés élèvent la température de la cave par leur maturation, et le Chef de Cave, garant de l'affinage, joue sur l'ouverture des fleurines pour refroidir les lieux. 14 jours après son arrivée, le Roquefort est plombé, c'est-à-dire que chaque pain est conditionné dans un emballage protecteur, ralentissant son évolution : il s'agit de la maturation. Ce n'est qu'après un minimum de trois mois dont 14 jours de cave minimum, que le fromage peut être commercialisé, après un contrôle du Chef de Cave, qui mesure l'onctuosité, la coloration, la forme des veinures, et le goût.

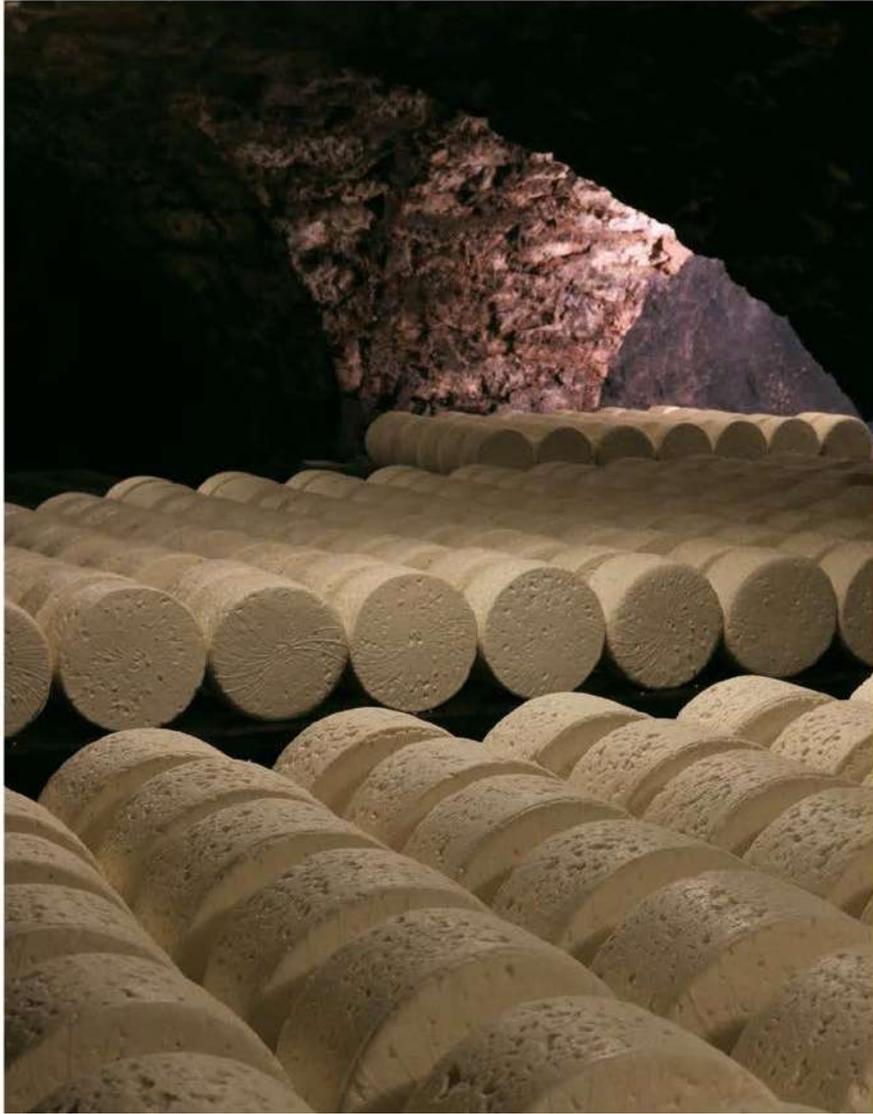


Figure 6 - Caves du Combalou (Confédération Générale des Producteurs de Lait de Brebis et des Industriels de Roquefort, 2017)

## II- Le rumen des ovins

### A- Anatomie du rumen des ovins

Le rumen est le plus grand des quatre estomacs des ruminants, les autres étant le réticulum (ou réseau), l'omasum (ou feuillet) et l'abomasum (ou caillette). Son nom peut être associé au réseau sous le terme réticulo-rumen.

Les ovins et bovins ont un rumen similaire sauf par la taille, celui des moutons ayant un volume utile de 9 à 18 litres (Jarrige, Ruckebusch, 1995). Il occupe les parties gauche et ventrale de l'abdomen (Figure 7). Son extrémité crâniale reçoit la terminaison de l'œsophage via le cardia et communique avec le réticulum, alors que l'extrémité caudale est fermée en cul-de-sac.

Son aspect externe est représenté sur la figure 8. Les deux sillons longitudinaux, unis par un profond sillon transversal à chaque extrémité de l'organe, marquent à l'extérieur la division de celui-ci en deux vastes compartiments largement communicants : le sac dorsal (*Saccus dorsalis*), légèrement sur la gauche, et le sac ventral (*Saccus ventralis*), qui s'étend plus loin vers la droite. Le sac ventral est plus développé que le dorsal chez l'ovin.

A l'intérieur (Figure 9), l'orifice faisant communiquer les deux sacs est appelé ostium intraruminal, dont la bordure est formée par les piliers, qui correspondent aux sillons de l'extérieur : le pilier caudal, le plus volumineux, qui sépare l'entrée des deux culs-de-sac caudaux, et le pilier crânial, moins épais mais plus saillant. Dorsalement et crânialement à ce second pilier s'étend l'atrium du rumen, dont la cavité communique largement avec celle du sac dorsal. L'atrium, lui, communique également avec le réticulum via l'ostium rumino-réticulaire.

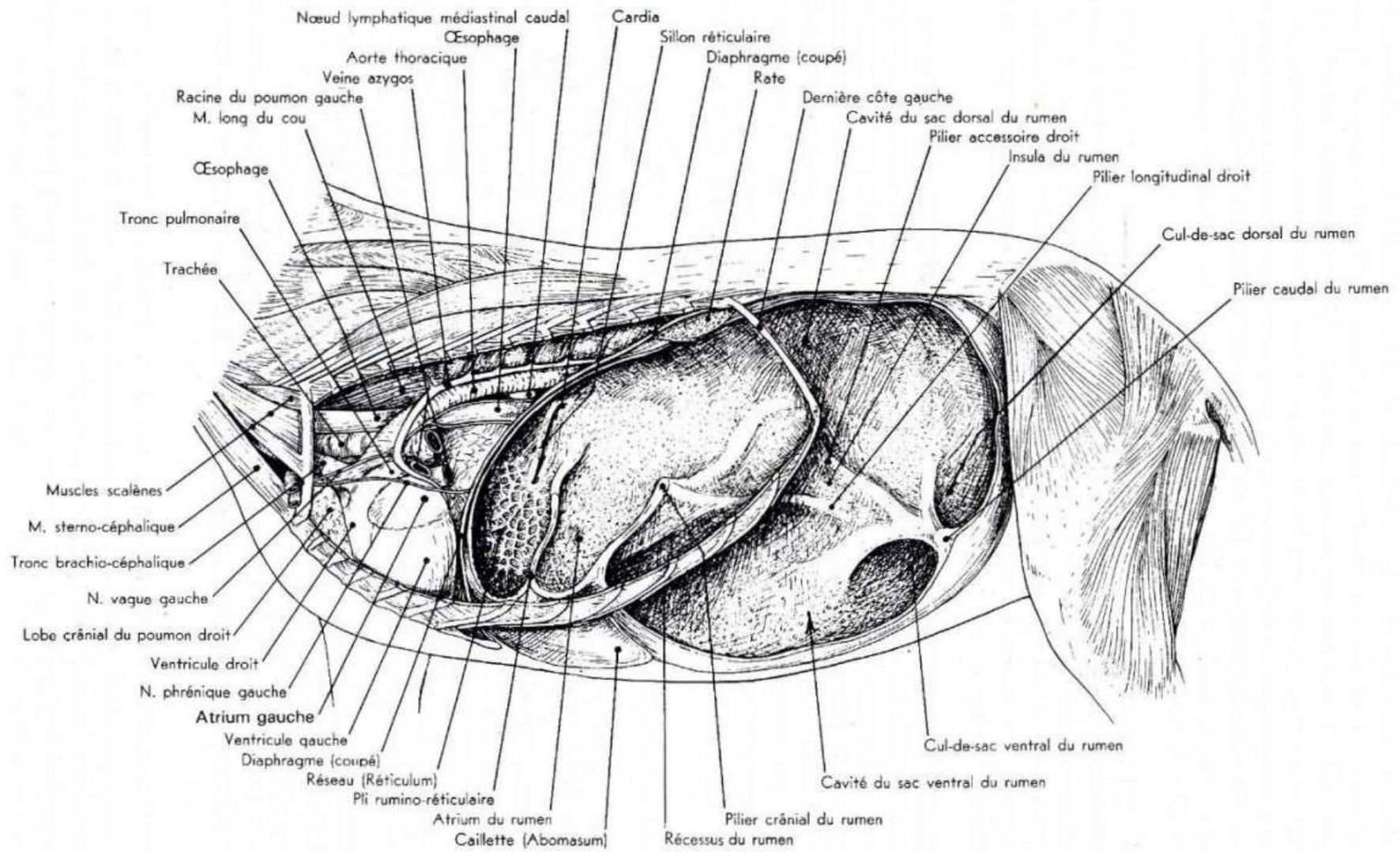


Figure 7 - Conformation intérieure et topographie du rumen et du réticulum de l'ovine (Barone, 1996)

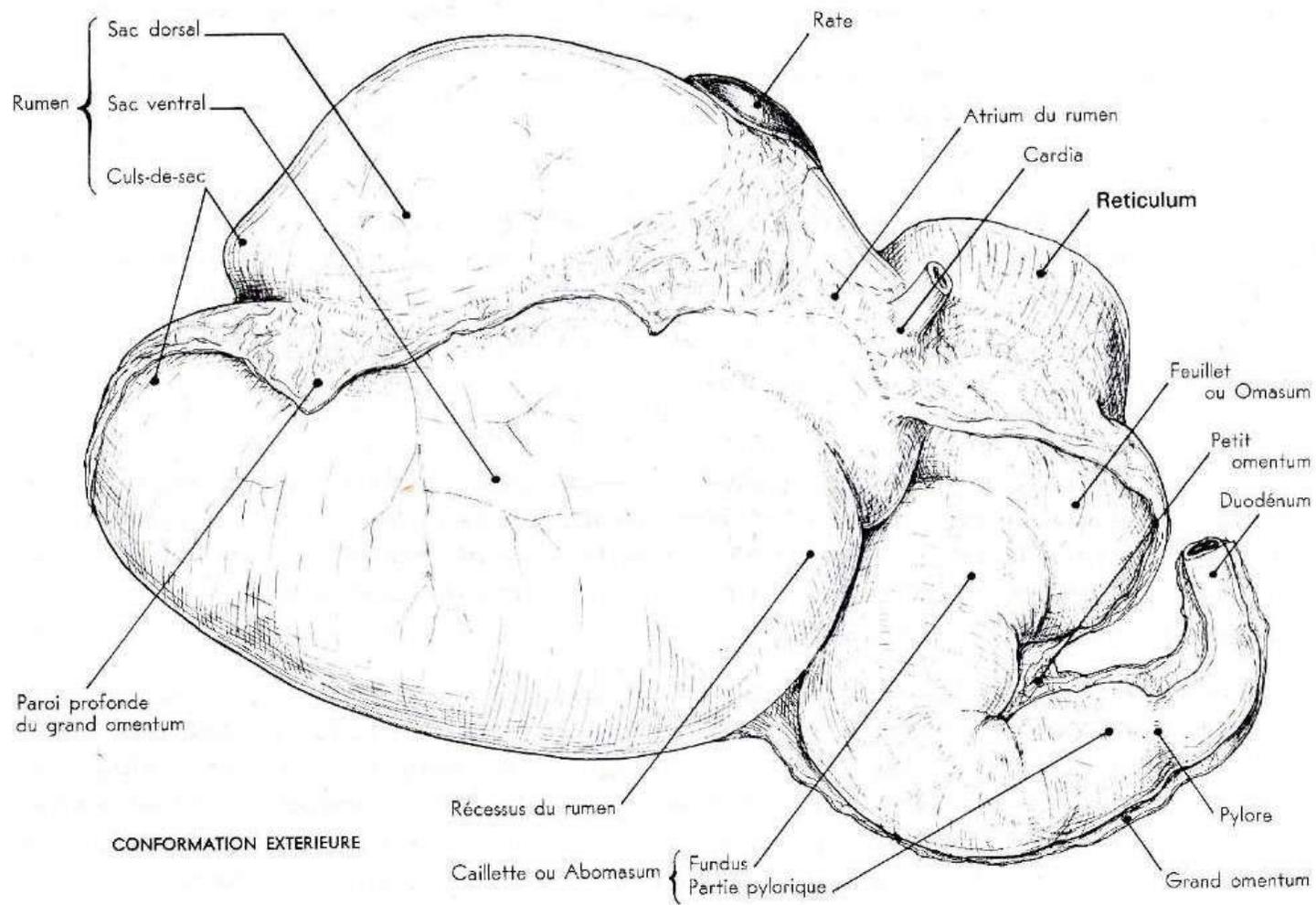


Figure 8 - Aspect externe des estomacs de l'ovin (Barone, 1996)

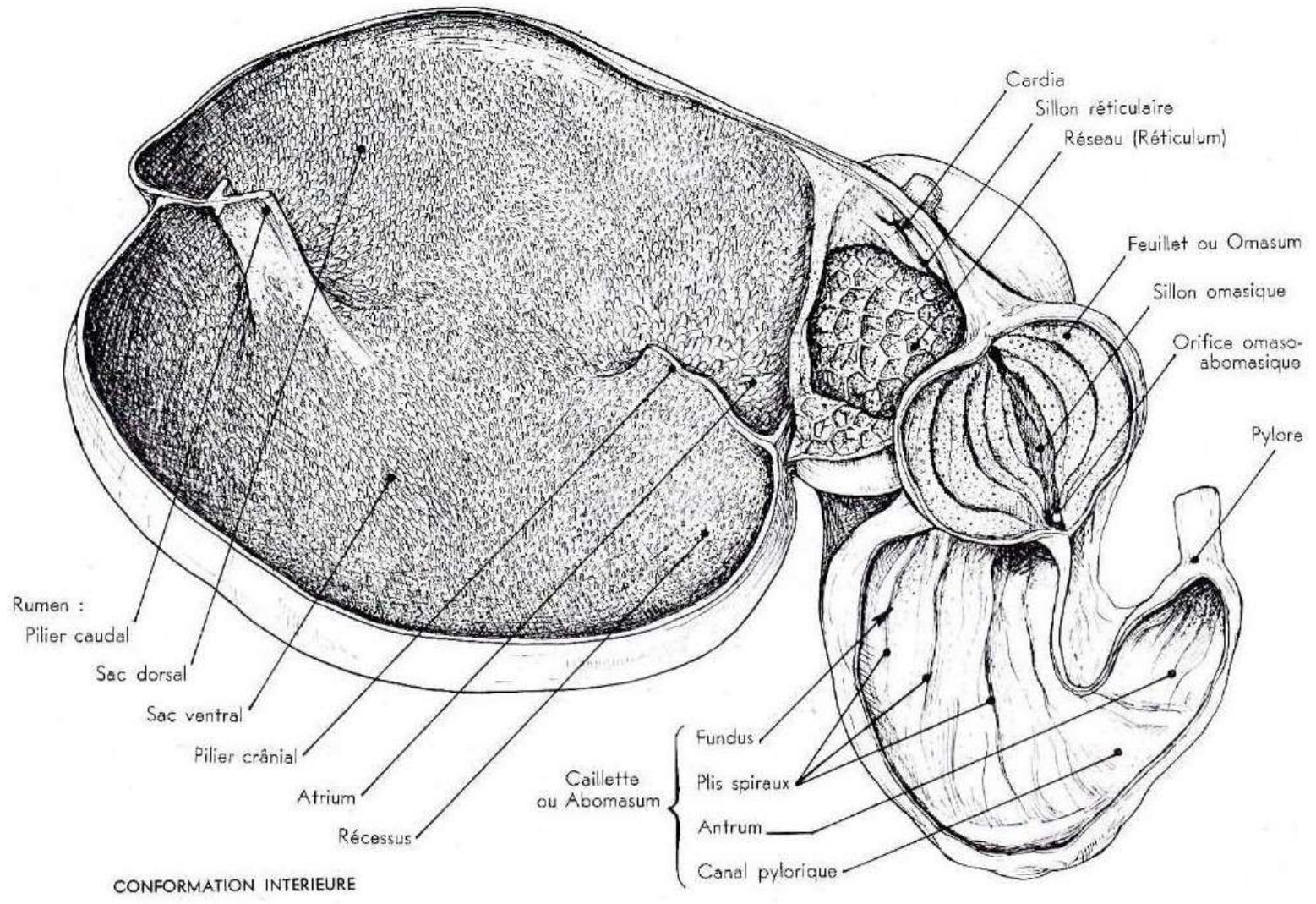
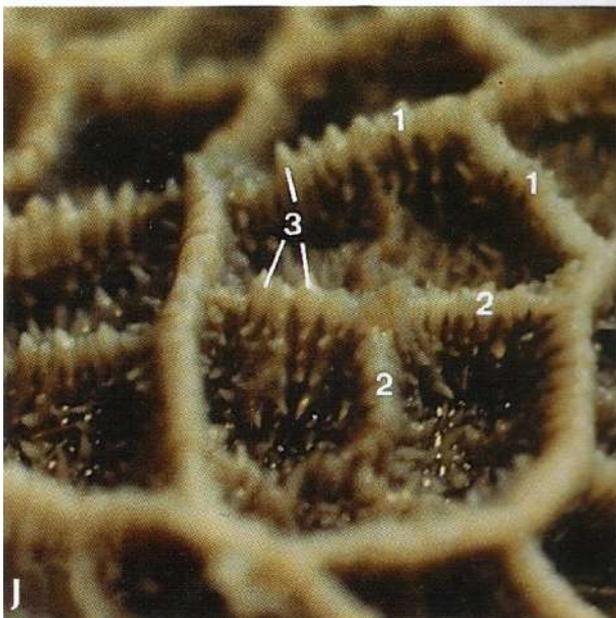


Figure 9 - Aspect interne des estomacs de l'ovin (Barone, 1996)

La structure de sa paroi est constituée de quatre composants habituels :

- une séreuse, enveloppant toute la surface excepté les zones d'adhérence,
- une musculuse épaisse en deux plans, formée de fibres lisses et de quelques fibres squelettiques au voisinage du cardia. Elle assure la contractilité du rumen,
- la sous-muqueuse, formée d'un conjonctif lâche et assez peu abondant,
- la muqueuse, qui n'est édifiée que d'une *Muscularis mucosae* très mince et discontinue et qui se prolonge néanmoins par quelques faisceaux dans l'axe des papilles. La *Propria mucosae* est épaisse, résistante, mais absolument dépourvue de glandes, contrairement aux monogastriques. Elle contient un riche réseau de veinules et de capillaires, capables d'absorber les produits de la digestion microbienne. L'épithélium est stratifié, pavimenteux, avec une couche superficielle nettement kératinisée. La muqueuse ruminale est riche de papilles détormorphes (*Papillae ruminis*). Les plus typiques sont répandues dans le sac ventral et les culs-de-sac caudaux, et ont un aspect foliacé : étranglées à leur base, elles sont élargies à leur sommet et aplaties. Chaque papille est constituée d'une lamelle de conjonctive issue de la *Propria mucosae*, revêtue par l'épithélium et portant sur ses faces et ses bords de petites papilles secondaires (micropapilles), noyées dans l'épaisseur de celui-ci. Elles sont bien moins nombreuses et bien moins développées dans le sac dorsal, au plafond duquel elles se réduisent même à de simples tubercules mais où elles n'ont guère de contact avec les aliments en raison de l'accumulation de gaz dans cette région. Enfin, au niveau des piliers, la muqueuse du rumen est rêche, plissée et ridée, dépourvue de papilles. Globalement les papilles des ovins sont tout de même moins développées et moins abondantes que chez les bovins, et les plus longues ne font que trois ou quatre millimètres (Figure 10).



- |                       |
|-----------------------|
| 1- Crêtes primaires   |
| 2- Crêtes secondaires |
| 3- Papilles           |

Figure 10- Cellules réticulaires de l'ovin (Jarrige, Ruckebusch, 1995)

## B- Motilité ruminale

Le reticulo-rumen est animé de mouvements, qui brassent la masse alimentaire et facilitent son ensemencement bactérien. Il en existe deux types :

- la rumination qui permet la régurgitation physiologique du bol alimentaire qui va pouvoir être à nouveau mastiqué et insalivé, puis vidangé vers l'omasum. Ce mouvement suit un cycle qualifié de primaire. Il s'agit d'abord d'une contraction biphasique du réseau puis du sac dorsal dans le sens cranio-caudal et ensuite du cul-de-sac ventral dans le sens cranio-caudal.
- l'éructation, c'est-à-dire l'élimination des gaz de fermentation. Elle semble être amplifiée lors d'une augmentation de la pression intra-ruminale, en particulier au niveau du réseau et du sac cranial (Rousseau, Falempin, 1985). Ce cycle est appelé cycle secondaire, et suit le cycle primaire toutes les 1 à 3 fois (suivant l'importance des fermentations). Il commence par une contraction du sac ventral postérieur puis une contraction simultanée du sac dorsal antérieur et du sac ventral antérieur.

## C- Conditions physico-chimiques ruminales (Jarrige, Ruckebusch, 1995 ; Puniya et al., 2015)

Le rumen assure l'essentiel de la prédigestion que subissent les aliments avant d'atteindre l'abomasum, seul estomac peptique des ruminants. C'est un fermenteur anaérobique strict, où la digestion microbienne se déroule en continu.

Le bol alimentaire se répartit en trois phases dans la cavité ruminale (Figure 11) : en partie ventrale on trouve une phase liquide, en partie intermédiaire une phase solide et en partie dorsale une phase gazeuse. L'eau est le constituant principal du contenu ruminal (85 %), et se trouve principalement dans la phase liquide contenant de fines particules en suspension (particules alimentaires ou bactéries) et des molécules en solution (sels minéraux, petites molécules organiques). Elle est essentielle aux réactions réalisées par les enzymes microbiennes. Cette phase permet l'imbibition des aliments. La phase solide se concentre dans un amas fibreux en partie dorsale du rumen et a pour origine l'ingestion d'aliments. Quant à la phase gazeuse elle comprend majoritairement les gaz issus des fermentations microbiennes, ensuite éliminés par l'éructation.

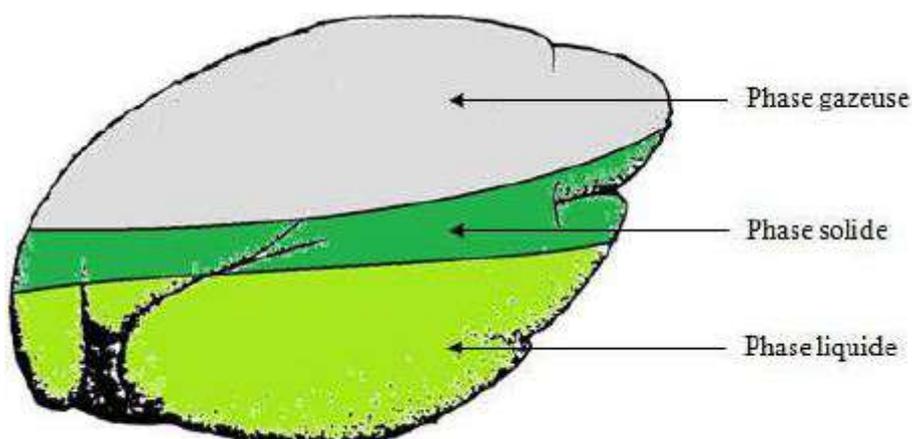


Figure 11 - Stratification du contenu ruminal (Sadet, 2008)

Le pH ruminal est compris entre 5,5 et 7,3 avec une valeur optimale autour de 6. Il varie au cours de la journée mais il varie surtout en fonction du régime alimentaire, car il est la résultante d'un équilibre entre des acides faibles et des bases faibles, issus des fermentations microbiennes et des substances tampons apportées par la salive.

La salive a un pH voisin de 8,6 chez l'ovin. Son excrétion s'étend de 12 à 35 L/j/100 kg de poids vif (soit environ 10 L par jour pour un ovin). Elle est constituée à 99 % d'eau, et contient un mélange de cation et d'anions, permettant de tamponner le pH du contenu ruminal, notamment grâce aux phosphates (52 mEq/L) et bicarbonates (104 mEq/L). L'urée y est présente en quantité importante, représentant 30 à 60 % de l'azote total. Elle contient également une lipase à faible activité, capable uniquement d'hydrolyser certaines chaînes courtes d'acides gras comme l'acide butyrique et certains acides hexanoïques.

La température du rumen, elle, est comprise entre 39 et 41°C, soit environ 1°C au-dessus de la température corporelle. Elle augmente en fonction de l'intensité des fermentations ruminales et est donc maximale dans les heures suivant le repas.

Le rumen abrite donc des conditions physico-chimiques très particulières (Tableau 4) permettant le développement d'un microbiote anaérobie très actif, responsable de la dégradation de matière organique ingérée par la brebis.

Tableau 4 – Propriétés physico-chimiques du rumen, (adapté de Puniya et al., 2015 ; Jarrige, Ruckebusch, 1995)

Taux de matière sèche moyen	10-18 %
Osmolarité	250-350 mOsmol/kg
pH	5,5-6,9 (6,4 en moyenne)
Potentiel oxydo-réducteur	-350 à -400 mV
Température	38-41 °C

La digestion est à la fois mécanique et microbienne mais on ne retrouve pas de traces d'enzymes gastriques de l'hôte dans les compartiments pré-abomasaux. La digestion de la nourriture très riche en fibres est alors essentiellement permise par les micro-organismes ruminiaux. Cette digestion est influencée par le temps de rétention des aliments dans le réticulo-rumen (entre 30 et 50 heures), la mastication, et l'ensemble des paramètres physico-chimiques.

## D- Le microbiote ruminal

Etant donné l'implication du microbiote ruminal dans la physiologie digestive des ruminants et de ce qui en découle, des nombreuses études se sont intéressées à sa structure et son fonctionnement. Des techniques ont donc été développées depuis les années 1960, avec en premier lieu des méthodes d'isolement et de culture *in vitro*. Cette méthode, utilisée pendant plusieurs décennies, a permis d'accroître énormément nos connaissances sur le microbiote ruminal, et en particulier sur les aptitudes physiologiques des micro-organismes (Palleroni, 1997). Cependant, de nombreuses limites découlent de l'utilisation de milieux artificiels (Nocker et al., 2007). Il est en effet impossible de reproduire l'ensemble des niches écologiques et les relations symbiotiques nécessaires pour supporter l'ensemble du spectre de la diversité microbienne. Selon le milieu de culture, certaines souches bactériennes vont se développer plus vite que *in situ*, d'autres moins vite voire pas du tout.

Des approches moléculaires, indépendantes des cultures, ont vu le jour pour pallier les défauts évoqués, notamment les méthodes « Omics », schématisées par la Figure 12. Le gène codant l'ARN ribosomal 16S microbien est un gène de choix pour caractériser les communautés microbiennes et les interactions entre les micro-organismes présents dans le tractus gastro-intestinal, car il est très conservé chez les procaryotes, tout en ayant subi des variations de séquences sur certaines régions.

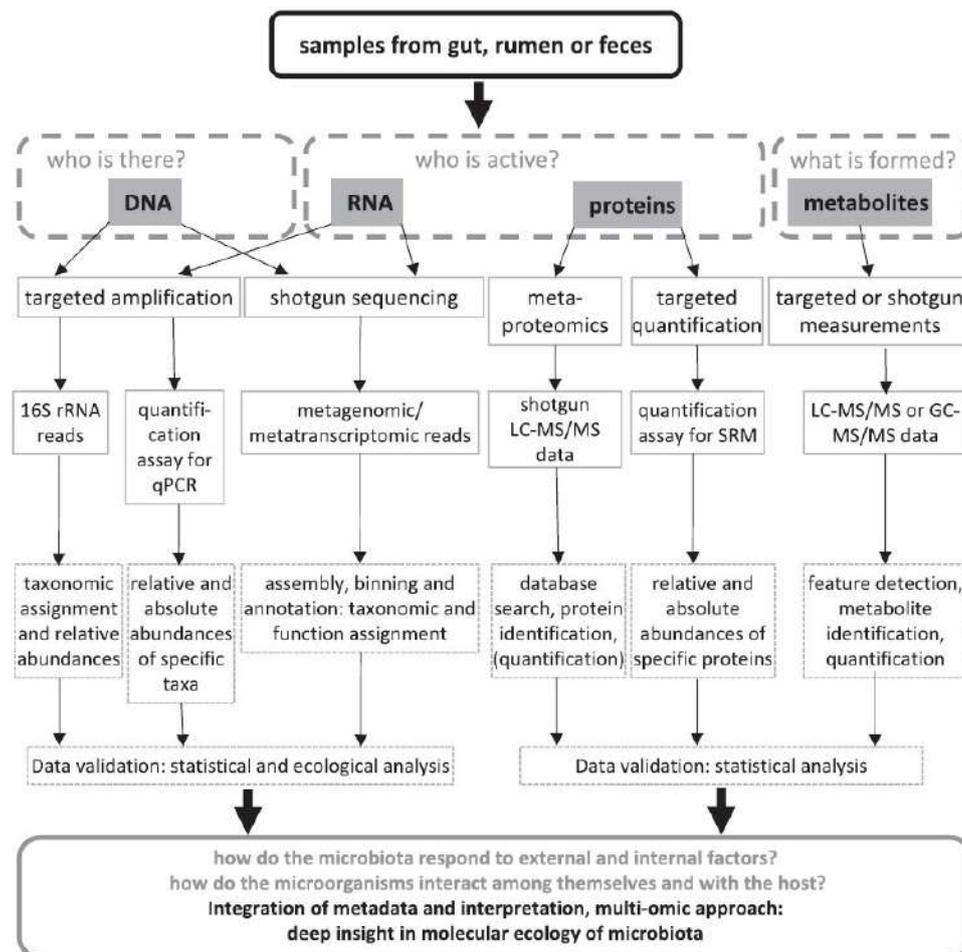


Figure 12 - Processus des méthodes indépendantes des cultures possibles pour étudier la structure et le fonctionnement du microbiote des animaux de rente (Deusch et al., 2015)

Deux méthodes de pyrosequençage, 454 (Roche) et le séquençage par synthèse (Illumina), sont principalement utilisées pour les projets de génomique et de transcriptomique. Un important travail de bio-informatique est ensuite nécessaire au traitement des données brutes récoltées afin d'extraire des tables d'abondance fiables. C'est tout le travail de logiciels tels que FROGS (Find, Rapidly, Otuswith Galaxy Solutions) développé par des chercheurs de l'INRA (Escudie et al., 2015).

Le rumen accueille un microbiote extrêmement dense, diversifié, constitué de bactéries, d'archées, de protozoaires de champignons et de virus. La composition absolue et relative de ce microbiote influence directement les performances digestives et métaboliques de l'animal. C'est essentiellement les bactéries qui tiennent un rôle majeur dans la métabolisation des aliments et la synthèse de protéines et vitamines microbiennes, assurant à l'organisme les ressources nécessaires à la production de viande et de lait.

Tableau 5 - Composition du microbiote ruminal (Puniya et al., 2015)

	Nombre/g de contenu ruminal	Masse (% masse microbienne)
Bactéries	$10^{10}$ - $10^{11}$	40-50
Protozoaires	$10^4$ - $10^6$	40-50
Archées méthanogènes	$10^7$ - $10^8$	2-3
Champignons	$10^3$ - $10^5$	3-4
Bactériophages	$10^8$ - $10^9$	<0.1

### 1- Les bactéries ruminales

Identifiées très tôt par Hungate (1966), les bactéries représentent plus de la moitié de la masse microbienne du rumen, soit entre  $10^{10}$  et  $10^{11}$  bactéries/mL (Mackie et al., 2000) avec plus de 200 espèces (McSweeney et al., 2005), dont une trentaine ne se retrouvent que dans le rumen.

Ces bactéries sont constamment éliminées par prédation par des protozoaires ruminiaux, ou évacués vers le feuillet et le reste du tube digestif. Néanmoins, ces pertes sont compensées par une croissance régulière de la population bactérienne.

Cette population peut être divisée en 4 sous-populations majeures :

- La population de la phase liquide, composée de bactéries planctoniques, détachées des particules alimentaires, consommant les sucres solubles du liquide ruminal. Elle représente 20 à 30 % de la population bactérienne totale.
- La population associée à la phase solide, incluant les bactéries plus ou moins attachées aux particules alimentaires, qui sont fondamentales dans les digestion des aliments (McAllister et al., 1994). C'est environ 75 % de la population bactérienne totale (Koike et al., 2003).
- La population associée à l'épithélium, représente une très faible part, mais est beaucoup plus diverse que les autres sous populations (Malmuthuge et al., 2012). Elle est même considérée comme plus intimement liée à l'activité métabolique de l'hôte que les autres sous populations (Wallace et al., 1979).

- Enfin, la population associée aux eucaryotes est formée des bactéries attachées à la surface des protozoaires ou des spores de champignons représente moins d' 1 % de la population bactérienne totale (Miron et al., 2001).

Les deux premières populations sont les plus documentées. Afin de les étudier plus en détail, plusieurs classifications sont utilisées. La première suit la taxonomie phylogénétique (Figure 13), liée aux homologies et différences du génome bactérien : de nombreuses études ayant porté sur le pyroséquençage de l'ARNr 16S bactérien, ont mis en évidence trois embranchements majoritaires dans le rumen des ovins : *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* (Tableau 6).

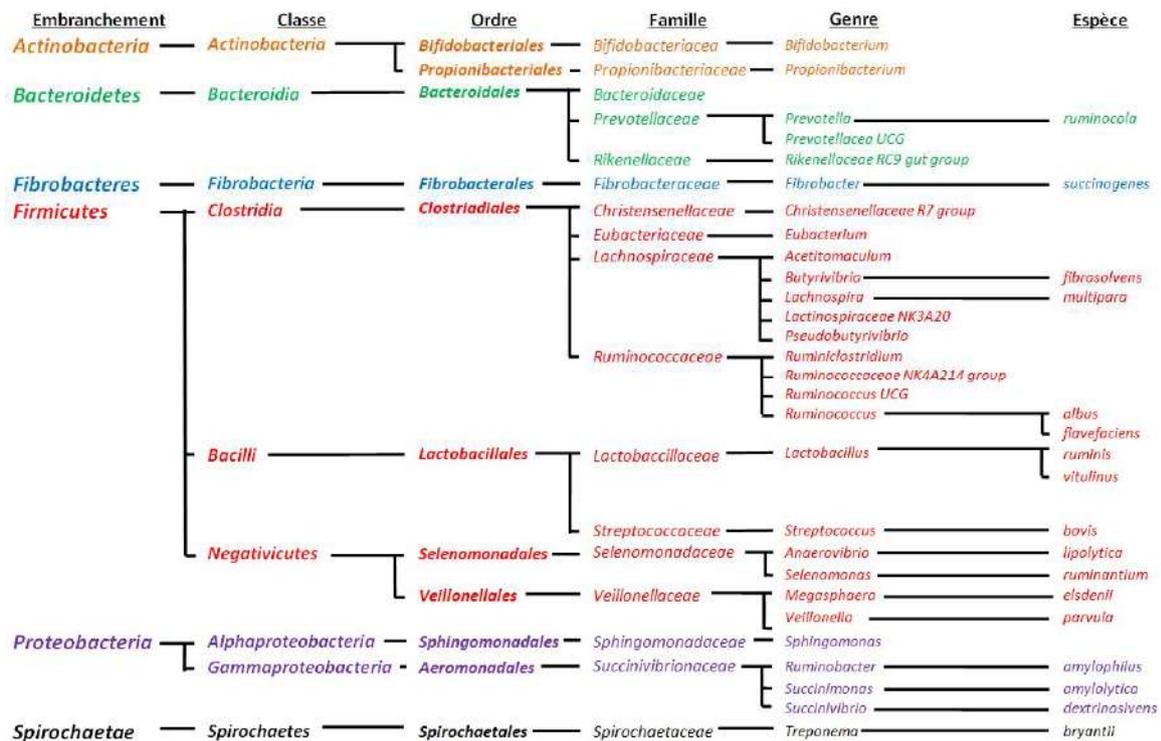


Figure 13 - Arbre phylogénétique des principaux taxons bactériens présents dans le rumen, (selon Michelland (2009) et Sadet (2008), réalisé à l'aide de l'outil Lifemap de de Vienne (2016))

Tableau 6 – Abondances relatives de taxa sélectionnés, identifiés par pyroséquençage 454 du contenu ruminal (phases liquide et solide) ou du fluide ruminal (phase liquide) (Castro-Carrera et al., 2014)

Embranchement	Contenu ruminal	Fluide ruminal
<i>Bacteroidetes</i>	69,2	76,4
<i>Firmicutes</i>	25,9	18,9
<i>Proteobacteria</i>	1,06	1,65
<i>Fibrobacteres</i>	1,48	0,49
<i>Tenericutes</i>	0,82	0,86
<i>Cyanobacteria</i>	0,60	0,72
<i>Spirochaetes</i>	0,53	0,57
<i>Synergistetes</i>	0,15	0,18
<i>Candidate division TM7</i>	0,14	0,09
<i>SR1</i>	0,02	0,01
<i>Actinobacteria</i>	0,005	0,00
<i>Verrucomicrobia</i>	0,004	0,00
<i>Elusimicrobia</i>	0,003	0,01
<i>Fusobacteria</i>	0,00	0,00
<i>Chloroflexi</i>	0,00	0,00

Échantillon de 12 brebis Assaf, ayant une alimentation composée à 40% de fourrage de luzerne et 60% d'un concentré composé de maïs grain, de tourteau de soja, d'orge, de pulpe de betterave, d'un aliment minéral vitaminé, et de mélasse

Les bactéries ruminales peuvent aussi être classées selon des critères morphologiques (forme, mode de groupement, présence ou absence de flagelles, nature de la paroi, mobilité...) ou encore selon des critères physiologiques (substrats, voies métaboliques...). Cette dernière classification permet de distinguer les bactéries dégradant les glucides (les bactéries cellulolytiques, hémicellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques), les bactéries protéolytiques, les bactéries lipolytiques, les bactéries utilisatrices des glucides simples et les bactéries utilisatrices des acides organiques, les bactéries acetogènes, et les bactéries utilisatrices d'acide lactique. L'utilité de cette classification est de regrouper des espèces ayant une unité fonctionnelle au sein du rumen, et de faciliter ainsi la compréhension de la digestion ruminale.

Nous allons nous intéresser aux bactéries du rumen à travers cette dernière méthode de classification.

○ Les bactéries dégradant les glucides :

Deux types de substrats glucidiques sont dégradés par les bactéries : les glucides pariétaux (la cellulose, les hémicelluloses et les pectines) et les glucides cytoplasmiques, l'amidon et les sucres solubles. Une autre molécule est à la fois un produit des fermentations des glucides et un substrat pour ces bactéries : le lactate.

- Les bactéries dégradant les glucides pariétaux (fibrolytiques)

Cette population se développe mieux avec un pH supérieur ou égal à 6,5 et elle produit principalement de l'acide acétique (C2) et de l'acide butyrique (C4).

- Bactéries cellulolytiques

Les trois espèces cellulolytiques majeures du rumen sont :

- *Fibrobacter succinogenes* (anciennement *Bacteroides succinogenes*), qui ne se multiplie qu'en présence de cellulose, cellobiose et glucose, produisant principalement des acides succinique et acétique, mais aussi de l'acide formique.
- *Ruminococcus flavefaciens*, anaérobie et mésophile, qui lorsqu'elle est cultivée sur de la cellulose produit un pigment jaune caractéristique. Elle utilise cellulose et cellobiose, et pour certaines souches le glucose. Les produits finaux sont les acides formique et succinique, avec des traces d'hydrogène et de lactate.
- *Ruminococcus albus*, peut fermenter la cellulose et la cellobiose, mais pas le glucose ou d'autres sucres. Elle produit du dihydrogène, du dioxyde de carbone, de l'éthanol, des acides acétique, formique et lactique comme produits de fermentations majeurs. L'acide succinique n'est pas un de ses produits, ce qui la différencie de *R. flavefaciens*.

Ces trois espèces sont des anaérobies strictes, avec un pH optimal étroit (6-7). Elles possèdent un glycocalyx extracellulaire qui les aide à s'attacher à la cellulose.

- Bactéries dégradant l'hémicellulose

Il y a 4 bactéries principales qui digèrent l'hémicellulose dans le rumen, et qui sont *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *R. flavefaciens*, et *R. albus* (Dehority, 2003) :

- *B. fibrisolvens* : les substrats de cette espèce incluent l'hémicellulose mais n'y sont pas restreints. Elle produit du C<sub>4</sub>, du dihydrogène, du dioxyde de carbone, de l'acide formique, du lactate, de l'éthanol et de faibles quantités de C<sub>2</sub>.
- *P. ruminicola* peut dégrader les hémicelluloses. Cependant ses principaux substrats sont l'amidon et les sucres solubles, et elle produit les acides succinique, formique, acétique et propionique (C<sub>3</sub>) et C<sub>2</sub>.
- Les deux autres ont déjà été décrites.

- Bactéries dégradant la pectine

La pectine est le troisième glucide des parois végétales, présent à des pourcentages bien plus faibles que la cellulose et hémicellulose. Sa fermentation est plus rapide et plus efficace que les autres composés des parois cellulaires végétales. Les produits issus sont riches en C<sub>2</sub> et pauvres en C<sub>4</sub> et lactate. Les principaux fermenteurs sont *B. fibrisolvens*, *P. ruminicola*, *F. succinogenes* (déjà évoquées précédemment), *Lachnospira multiparus*, et *Succinivibrio dextrinosolvens* :

- *L. multiparus* a une très forte activité de dégradation de pectine purifiée, mais est limitée en ce qui concerne la pectine des fourrages. Cependant sa multiplication est augmentée lorsqu'elle est mise en culture avec *Eubacterium limosum*, reflétant une meilleure utilisation des pectines en interaction avec d'autres espèces microbiennes.
- *S. dextrinosolvens* peut fermenter la pectine mais aussi l'arabinose, le xylose, le glucose, le fructose, le galactose, le maltose, le sucrose et les dextrines (Dehority, 2003).
- *P. ruminicola* et *F. succinogenes* sont connues comme hémicellulolytiques, mais jouent un rôle important dans la fermentation de la pectine. Elles produisent du C<sub>2</sub> comme produit prédominant.

- Les bactéries dégradant les glucides cytoplasmiques et le lactate

*Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium* et *P. ruminicola* sont des espèces bactériennes qui digèrent principalement l'amidon. Il existe cependant des espèces bactériennes fibrolytiques avec des souches ayant également une activité amylolytique, comme par exemple *B. fibrosolvans* ou encore *F. succinogenes*.

- *S. bovis* peut rapidement fermenter l'amidon ainsi que de nombreux sucres solubles, et produire de l'acide lactique (Dehority, 2003). Elle se développe quand le potentiel d'oxydoréduction augmente. Elle peut se développer dans une gamme de pH allant de 4,5 à 6,7.
- *R. amylophilus* ne peut fermenter que l'amidon et le maltose, en produisant du C<sub>2</sub>, et des acides formique et succinique.
- L'abondance ruminale de *S. amylolytica* est extrêmement variable, et suit la richesse d'amidon de la ration. Elle transforme amidon, maltose et galactose en acide succinique et en de faibles quantités de C<sub>2</sub> et de C<sub>3</sub>.
- *S. ruminantium* hydrolyse l'amidon, produisant de l'acide lactique, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> (Dehority, 2003), avec pH de croissance optimal compris entre 4,3 et 4,4. Certaines souches peuvent également utiliser le lactate.

Concernant les sucres solubles, ils peuvent être fermentés par de nombreuses bactéries, qu'elles soient fibrolytiques et/ou amylolytiques.

Une alimentation riche en concentrés favorise le développement de ces bactéries, avec un pH ruminal inférieur à 6, qui diminue d'autant plus l'augmentation de la production de lactate. Les bactéries utilisant le lactate ont alors un rôle clé afin maintenir le pH ruminal : c'est le cas de *Veillonella alcalescens*, *Megasphaera elsdenii* et de certaines souches de *S. ruminantium*.

- Les bactéries protéolytiques :

Il n'existe pas de bactérie spécifiquement protéolytique : ce sont en grande partie les bactéries amylolytiques (et certaines bactéries fibrolytiques) qui exercent cette fonction. Près de la moitié des souches bactériennes du rumen possèdent une activité protéolytique à l'égard des protéines extracellulaires (Jarrige, Ruckebusch, 1995).

Les espèces les plus actives et les plus fréquemment trouvées sont *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrosolvans* et *S. ruminantium* (Dehority, 2003). Cependant, ces espèces peuvent selon le régime être remplacées par des espèces sous-dominantes.

Les peptides produits par la protéolyse sont rapidement dégradés dans le rumen. Les acides aminés sont ensuite en grande partie désaminés par *P. ruminicola*, *S. ruminantium* et *M. elsdenii* pour donner de l'ammoniac et différents acides gras volatils.

- Les bactéries agissant dans le métabolisme des lipides :

Les lipides sont soumis à deux types de réaction qui s'enchaînent : la lipolyse des esters d'acides gras (AG) suivie par la biohydrogénation des acides gras insaturés (AGI) en acides gras saturés (AGS).

La lipolyse des triglycérides est principalement réalisée par *Anaerovibrio lipolytica*. En effet cette dernière possède une lipase (Henderson, 1971) capable d'hydrolyser les triglycérides, et ainsi former des acides gras libres et du glycérol. Cette lipase n'est cependant pas efficace sur les galactolipides et les phospholipides, qui peuvent néanmoins être hydrolysés par une estérase, synthétisée par certaines bactéries appartenant au genre *Butyvirbio* (Hazlewood, Dawson, 1979).

Les substrats et produits de principales espèces bactériennes du rumen sont repris dans le Tableau 7.

Tableau 7 - Substrats et produits des principales espèces bactériennes ruminales (Dehority, 2003 ; Chaumeton Justine, 2018)

	Hydrolyse						Substrats de fermentation								Produits de fermentation									
	Cellulose	Hémicellulose	Pectine	Amidon	Protéines	Lipides	Cellobiose	Glucose	Maltose	Saccharose	Galactose	Fructose	Pentoses	Lactate	Acides aminés	Acétate	Propionate	Butyrate	Formate	Succinate	Lactate	Ethanol	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
<i>F. succinogenes</i>	+	+	+	+			+	+	+	+						+	+		+	+				
<i>R. flavefaciens</i>	+	+	+				+						+			+			+	+		+	+	+
<i>R. albus</i>	+	+	+				+						+			+			+	+		+	+	+
<i>B. fibrisolvens</i>	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+				+		+	+			+	+	+
<i>P. ruminicola</i>		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+				
<i>L. multipara</i>			+				+	+		+		+				+					+		+	+
<i>S. bovis</i>			+	+	+		+	+	+	+	+			+		+					+			+
<i>R. amylophilus</i>				+	+				+							+		+	+	+	+			
<i>S. amylolytica</i>				+					+		+					+	+			+				
<i>S. ruminantium</i>				+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+	+
<i>L. ruminis</i>								+													+			
<i>L. vitulinus</i>								+													+			
<i>M. elsdenii</i>								+	+	+		+		+	+	+	+						+	+
<i>V. parvula</i>														+		+								
<i>A. lipolytica</i>						+						+				+	+			+			+	+

La face interne du rumen, recouverte de papilles, est le lieu d'absorption des produits fermentés, spécialement les acides gras volatils. La présence de bactéries associées à la surface épithéliale du rumen a été démontrée assez tôt sur des moutons, par microscopie électronique à balayage (Bauchop et al., 1975). On sait depuis peu que la composition de ce microbiote « épimural » est très distinct du reste de la communauté ruminale (Liu et al., 2016), mais notre connaissance de leurs fonctions reste assez limitée. Il a été démontré que ces bactéries sont impliquées dans le piégeage de l'oxygène, l'hydrolyse de l'urée (Jin et al., 2017) et le recyclage tissulaire (McCowan et al., 1978), et même peut-être dans le métabolisme des acides aminés au niveau de la surface du rumen (Mao et al., 2015). Certaines études tendent à montrer qu'elles jouent également un rôle de protection de l'épithélium ruminal (Hungate, 1966 ; Kamra, 2005). Ces fonctions, distinctes de celles des bactéries du contenu, suggèrent donc un rôle différent de ce microbiote particulier, qui, selon une étude de Chen et al. (2012), pourrait jouer un rôle dans l'expression de certains gènes (en l'occurrence du gène exprimant les récepteurs Toll-like, impliqués dans la réponse inflammatoire épithéliale).

## 2- Les protozoaires

Les protozoaires ruminiaux sont des organismes eucaryotes unicellulaires de 4 à 200 µm de diamètre, soit 20 à 100 fois plus grands que les bactéries mais  $10^4$  fois moins nombreux, représentant jusqu'à la moitié de la masse microbienne (Jarrige, Ruckebusch, 1995).

On distingue parmi les protozoaires les flagellés et les ciliés.

Les connaissances sur les flagellés restent à ce jour limitées. En raison de leur petite taille, leur contribution à la biomasse microbienne ruminale est considérée comme négligeable, malgré des concentrations qui peuvent atteindre  $10^4$  protozoaires/mL.

Plus de 250 espèces de ciliés ont été identifiées dans les rumens des ruminants, avec une concentration allant jusqu'à  $10^5$ /mL. Leur multiplication est assez lente (15-24 h) contrairement aux bactéries. Les ciliés sont soit fixés sur des particules alimentaires, soit dans la phase liquide.

Les protozoaires ciliés sont représentés par deux groupes appartenant à la sous classe des *Trichostomatia* : les Holotriches et les Entodiniomorphes. Les premiers font partie de l'ordre des *Vestibuliferida*. Les seconds appartiennent à l'ordre des *Entodiniomorphida*, sous ordre des *Entodiniomorphina*, famille des *Ophryoscolecidae*. Les principaux genres rencontrés dans le rumen sont le genre *Entodinium* au sein des Entodiniomorphes, et les genres *Isotricha* et *Dasytricha* parmi les Holotriches (Williams, Coleman, 2012).

L'étude des Holotriches a permis de mettre en évidence leur capacité à sécréter des amylases, invertase, pectine esterase et polygalacturonase, en quantités suffisantes pour utiliser pectine, amidon, et sucres solubles comme sources d'énergie. Elles possèdent aussi des enzymes dégradant la cellulose et les hémicelluloses, mais en quantité beaucoup moins importante que les Entodiniomorphes.

Après phagocytose, les Entodiniomorphes sont quant à eux capables de digérer au sein de leurs vacuoles digestives les parois cellulaires et les chloroplastes. Certains ont donc une activité cellulolytique.

Ils jouent un rôle important dans la digestion des fibres et dans la modulation des profils fermentaires. Ils utilisent beaucoup l'amidon et peuvent même le stocker, permettant ainsi de réduire la production

d'acides lors d'une baisse de pH ruminal. Leurs produits sont semblables à ceux des bactéries, en particulier du C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> et H<sub>2</sub>. Les bactéries méthanogènes du rumen y sont d'ailleurs attachées et vivent sur leur surface pour un accès immédiat à H<sub>2</sub>. Certains protozoaires sont capables de protéger les glucides facilement fermentescibles (sucres et amidon) des bactéries pouvant les utiliser (Kamra, 2005). Ainsi, ces sucres sont relâchés lentement pendant la journée, transformés en acides organiques et sont à l'origine d'une source constante d'énergie pour l'animal sous forme d'acides gras à courtes chaînes.

Les ciliés du rumen ont également une activité protéolytique, mais dégradent en majorité des protéines insolubles, en produisant de l'ammoniac et des acides aminés comme produits finaux. Leur métabolisme azoté est essentiellement basé sur l'engloutissement des bactéries, même s'ils possèdent des enzymes capables de digérer les protéines végétales. Cependant, l'utilisation de ces substrats protéiques microbiens réduit la quantité d'acides aminés microbiens disponibles pour la digestion intestinale de l'hôte.

### **3- Les champignons anaérobies**

Selon les études, les champignons représentent de 3 à 20 % de la biomasse ruminale. Leur présence a été établie assez tard car ils ont été confondus avec des protozoaires flagellés jusqu'en 1975 (Orpin, 1975). On trouve principalement trois genres : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomycetes*.

Les champignons du rumen sont considérés comme les dégradeurs de fibres les plus efficaces et jouent un grand rôle dans la dégradation des tissus lignifiés végétaux, à l'aide d'une grande variété d'enzymes hydrolytiques, telles que des cellulases (Barichievich, Calza, 1990), hemicellulases (Novotná et al., 2010 ; Mountfort, Asher, 1989), amylases, amyloglycosidases (Paul et al., 2004), feruloyl, p coumaroyl esterases (Borneman et al., 1990) et pectinases (Kopečný, Hodrová, 1995). Cependant, leur croissance très lente les rend peu présents dans le rumen et ont donc une action mineure à faible, selon le temps de transit.

Ils ont également une activité protéolytique faible et leur contribution à la dégradation des glucides cytoplasmiques est peu connue.

### **4- Les archées**

Les archées méthanogènes sont considérées comme étant les premiers organismes de la planète. Au sein du microbiote ruminal, elles forment une population peu abondante ( $10^8$  à  $10^9$ /g), probablement peu diversifiée et encore peu connue. On sait qu'elles utilisent le H<sub>2</sub> produit par le métabolisme bactérien en conditions anaérobies pour réduire le CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub>. Cette réaction permet de réduire la teneur de dihydrogène, qui en excès inhiberait les fermentations et donc le fonctionnement du rumen. La symbiose entre ciliés et archées méthanogènes peut représenter jusqu'à 37 % de la production de CH<sub>4</sub> du rumen (Finlay et al., 1994). Les Archées ne participent donc pas directement à la digestion ruminale.

## 5- *Bactériophages*

Présents à des concentrations autour de  $10^9$ /mL, les bactériophages (ou virus) forment l'un des composés les plus abondants du rumen (Puniya et al., 2015). Il existe des phages spécifiques pour chacune des bactéries et sont considérés comme pathogènes pour elles. Mais en lysant les cellules, ils permettent de rendre les protéines bactériennes facilement disponibles aux animaux comme source d'acides aminés. Malgré le manque de connaissances à leur sujet, ces phages et leurs enzymes impliquées dans la lyse cellulaire représentent une opportunité pour contrôler les populations d'archées méthanogènes et des autres communautés du rumen. Dans d'autres domaines, de nombreuses études soulignent le fait que le virobiote est souvent omis, à tort, des études des dynamiques des systèmes biologiques complexes (Rohwer, Youle, 2011).

## 6- *Interactions entre ces communautés*

L'arrivée constante d'aliment, le mouvement constant du rumen ainsi que les conditions physico-chimiques particulières permettent à une population dense de micro-organismes de s'y développer et donne lieu à des interactions multiples entre toutes les espèces.

Le réseau biologique du rumen est capable de la dégradation complète de la matière organique ingérée par l'animal, ce qu'aucun simple organisme ne serait capable entièrement. Des éléments alimentaires complexes sont décomposés en sucres simples, transportés et fermentés par d'autres membres de la communauté microbienne, qui vont produire des chaînes d'acides gras, vitamines, et autres cofacteurs bactériens utiles à la dégradation des particules alimentaires.

Le rumen est également le théâtre de relations d'inhibition, comme l'étude de Bernalier et al. (1993) l'a démontré, avec une synthèse d'une protéine inhibitrice de l'activité cellulolytique de certains champignons par *R. flavefaciens*, mais aussi de prédation, notamment de la part des ciliés envers certaines bactéries. Enfin, une étude menée par Erickson et al. (2002) a mis en évidence la présence d'homosérine lactones sous forme acylée dans le rumen, composé chimique intervenant dans la détection quorum bactérien, c'est-à-dire l'aptitude des micro-organismes à réagir selon la densité bactérienne environnante.

## 7- *Facteurs de variation du microbiote ruminal*

Le microbiote ruminal est en renouvellement perpétuel et est soumis à de nombreuses variations, qui peuvent être physiologiques comme pathologiques. Ces variations sont dues à différents facteurs :

- L'alimentation :

L'alimentation est le facteur de variation du microbiote ruminal le plus étudié et le plus important. La composition de l'alimentation fait varier le microbiote en favorisant les populations ayant le plus de substrat à leur disposition. Une transition lente est alors nécessaire lors d'un changement de régime alimentaire, afin de permettre au microbiote de s'adapter. Une corrélation entre alimentation et microbiote ruminal chez les bovins mais aussi chez les ovins a été établie, sur plusieurs points.

De nombreuses études démontrent une plus grande diversité microbienne ruminale chez les ovins ayant une alimentation riche en fourrages, comparativement à un régime riche en concentrés, qui entraîne quant à lui un plus grand nombre d'OTU avec une abondance relative importante. Une alimentation riche en concentrés favorise le développement des bactéries appartenant à l'embranchement des *Bacteroidetes*, en particulier les *Prevotella*. Au contraire, une alimentation riche en fourrages entraîne une augmentation de l'abondance relative de *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *S.dextrinosolvans*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*, et *R. amylophilus* (Ellison et al., 2014 ; 2017 ; Liu et al., 2019).

Chez les bovins des études similaires ont également démontré le lien très étroit entre régime alimentaire et microbiote ruminal, avec des résultats similaires en termes d'évolutions populationnelles (Tajima et al., 2001 ; Renee M. Petri et al., 2013).

Le niveau de nutrition joue aussi un rôle dans l'équilibre du microbiote ruminal. On observe des populations plus abondantes de *Bacteroidetes* et *Proteobacteria* chez les ovins ayant un niveau alimentaire plus élevé, et une baisse de l'abondance des *Firmicutes*. Au niveau des espèces, ce sont les bactéries *P. ruminicola*, *R. flavefaciens*, et *S. dextrinosolvans* qui décuplent lorsque le volume d'alimentation augmente (Wang et al., 2017).

Lors du jeûne, les protozoaires est la première population microbienne du rumen à être touchée (Leroy, 1987). Leur activité commence à décliner dès le premier jour de diète, avant de disparaître après 72 heures. De même, les bactéries sont mises à mal par une période de jeûne : leur nombre diminue progressivement les premiers jours, puis atteint des valeurs très faibles après 4 à 5 jours de diète. Lors de la disparition des protozoaires ruminiaux, une augmentation des populations bactériennes est observée. La multiplication des bactéries s'explique par l'absence de l'activité prédatrice des protozoaires.

Il existe une variation quantitative de la population bactérienne du rumen en lien avec la prise alimentaire. En effet, des chercheurs ont constaté sur des vaches recevant un repas quotidien, une diminution du nombre de bactéries ruminales jusqu'à 4 heures après le repas, suivie d'une augmentation jusqu'à atteindre une valeur maximale 16 heures après le repas (Leedle et al., 1982). La diminution initiale peut s'expliquer par la dilution des populations bactériennes par les aliments et la salivation. Quant à l'augmentation observée par la suite, elle serait due à la croissance bactérienne en réponse à l'apport de nutriments.

L'ingestion de probiotique modifie, sans surprise, la composition du microbiote ruminal. Une orientation bénéfique est en effet recherchée lors de leur utilisation et c'est bien le cas dans l'étude de Schofield et al. (2018) chez la brebis avec un aliment contenant  $2,85 \times 10^9$  UFC spores de *Bacillus amyloliquefaciens* H57. Cependant, dans cette même étude, ce probiotique n'a entraîné aucune modification significative du microbiote ruminal chez les veaux âgés d'un mois.

La modification du microbiote ruminal lors de suppléments en huiles végétales ou animales a également été démontrée. Belenguer et al. (2010) l'ont observée en ajoutant 2 % d'huile de tournesol dans l'alimentation d'un lot de brebis en lactation, 1 % d'huile de poisson dans la ration d'un autre et la somme des deux pour un troisième lot, comparant chacun d'eux à un lot contrôle. C'est notamment la population des *Butyrivibrio* qui a été le plus affectée.

L'effet d'un déchet de la production de biocarburant à base d'algue, appelé Résidu de Post-Extraction d'Algues (PEAR), sur la population microbienne a également été observé, par McCann et al. (2014).

Il se trouve par exemple que l'abondance relative des *Firmicutes* dans la fraction liquide augmente de manière significative avec la supplémentation en PEAR.

Un impact sur le microbiote épimural est également observé, avec par exemple chez les ovins un changement de proportion d'abondance des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* lors d'un régime à base de fourrages (respectivement 50 et 33 %) et lors d'un régime à base de concentrés (Sadet-Bourgeteau et al., 2010). De moindres modifications ont été observées chez les bovins (R. M. Petri et al., 2013).

- L'âge de l'animal :

La colonisation du rumen par des micro-organismes s'effectue très tôt dans la vie du ruminant. Dès les deux premiers jours, une communauté d'espèces aéro-anaérobies s'installe, préparant l'apparition dans les cinq jours qui suivent des populations de bactéries cellulolytiques, méthanogènes, mais aussi de champignons anaérobies, caractéristiques du ruminant adulte. Ces installations sont indépendantes du régime alimentaire, étant donné que le rumen ne joue aucun rôle fonctionnel à cet âge-là. En effet, la présence d'une « gouttière œsophagienne » conduit le bol alimentaire de l'œsophage à la caillette sans passer par le rumen (Fonty et al., 1987).

Si à un âge plus avancé cette évolution est dépendante de l'alimentation, il a été démontré qu'elle est aussi dépendante de l'âge, puisque des bovins de six mois ont par exemple une composition de leur communauté ruminale significativement différente des bovins de deux ans, à régimes alimentaires identiques (Jami et al., 2013). Cette différence n'est pas étonnante compte tenu des différences anatomiques du rumen entre ces deux stades physiologiques.

Jewell et al. (2015) ont étudié la variation du microbiote ruminal de bovins au cours des deux premières lactations. Et si la représentation par Analyse de Composantes Principales (PCA) ne montre pas clairement d'évolution, il y a tout de même neuf familles bactériennes ayant des abondances significativement différentes entre les lactations (*BS11* des *Bacteroidales*, *Erysipelotrichaceae*, *F16* des *TM7*, *Fibrobacteraceae*, *Lachnospiraceae*, *Mogibacteriaceae* des *Clostridiales*, *Paraprevotellaceae*, *Pirellulaceae* et *Prevotellaceae*), avec deux embranchements qui voient leur abondances diminuer de moitié (*Proteobacteria* et *Synergistetes*). Une augmentation significative de la diversité microbienne de la phase liquide a également lieu entre les deux lactations, sans modifications de la richesse du microbiote.

- Autres paramètres physiologiques :

Il existe de nombreux autres facteurs de variation physiologiques du microbiote ruminal, surtout étudiés chez les bovins, comme la localisation géographique (Sundset et al., 2007), la saisonnalité (Orpin et al., 1985), la photopériode (McEwan et al., 2005), le niveau de stress (Uyeno et al., 2010), l'environnement (Romero-Pérez et al., 2011), la race (Hernandez-Sanabria et al., 2013 ; Li, Hitch, et al., 2019 ; Li, Li, et al., 2019), l'utilisation d'antibiotiques (Kleen et al., 2003), ou encore le stade physiologique. Ce dernier facteur a été étudié par Lima et al. (2015), qui a établi que les abondances des bactéries appartenant aux familles *Butyrivibrio*, *Succinivibrio*, *Selenomonas*, et *Ruminobacter* permettaient de distinguer les primipares des multipares. Une différence significative des abondances de *Fibrobacter*, *Ruminobacter*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio*, et *Succinivibrio* est démontrée entre les vaches en pré-partum et celle en post-partum. Une baisse significative de la diversité du microbiote ruminal (Chao1 et Shannon) après le vêlage est également observée.

Enfin, il est important de noter qu'il existe une très grande variabilité individuelle de la composition du microbiote ruminal au sein d'un groupe d'animaux homogène en tous points, avec la même alimentation (Jami, Mizrahi, 2012) ou subissant les mêmes changements alimentaires (Zhou et al., 2012). Cette variabilité est à modérer puisque des relations phylogénétiques entre les microbiotes ruminants individuels sont tout de même observées, suggérant une sélection de bactéries génétiquement proches, effectuée par la niche écologique ruminale pour des animaux ayant des conditions de vie similaires.

#### - Variations pathologiques

Les variations du microbiote peuvent également être pathologiques, c'est par exemple le cas lors d'acidose ruminale (Nagaraja, Titgemeyer, 2007), maladie très courante en élevage bovin laitier et beaucoup moins fréquente chez les petits ruminants. Elle est due à la consommation sur une durée très brève d'une ration riche en glucides rapidement fermentescibles (acidose lactique aiguë, ou ARLA) ou sur une période prolongée (acidose subaiguë, ou ARSA). Si des facteurs tels que le type d'aliment et ses conditions de distribution et d'ingestion peuvent favoriser son apparition, c'est tout de même fréquemment des aliments riches en amidon qui sont en à l'origine. La majorité des acidoses ruminales apparaissent pendant des périodes de transition alimentaire, lors du passage d'une ration à faible proportion de concentrés à un régime riche en concentrés. L'apport de concentré peut n'être pas suffisamment étalé dans le temps lors de cette période critique, pour permettre l'adaptation de la population ruminale. La petite taille des particules alimentaires est aussi un facteur favorisant l'acidose, augmentant la possibilité de dégradation bactérienne et donc la fermentescibilité. Elle entraîne également une plus faible mastication et une plus faible production de salive, dont le pouvoir tampon n'est alors plus suffisant.

#### ARLA :

Tout d'abord, la grande quantité d'amidon ingérée entraîne une production importante d'AGV, faisant diminuer le pH ruminal. La composition du microbiote est alors modifiée, avec une mort des protozoaires à un pH inférieur à 6, suivi par les bactéries fibrolytiques (pH < 5,5). Le stockage de l'amidon par les protozoaires n'a plus lieu, accélérant le processus d'acidose. Les lactobacilles et *S. bovis* deviennent prédominants, ces derniers orientant leur métabolisme vers la production d'acide lactique, au lieu de la synthèse d'AGV. Le lactate continue alors à s'accumuler, et le pH ruminal à diminuer. En dessous d'un pH de 5, *S. bovis* et les bactéries lactolytiques, elles aussi, ne se développent plus, laissant les lactobacilles atteindre jusqu'à 90 % de la flore bactérienne à des pH autour de 4,5. Ces modifications microbiennes et chimiques s'accompagnent de signes cliniques, tels qu'un syndrome de choc hypovolémique, des diarrhées aiguës, avec un pronostic sombre sans intervention thérapeutique.

#### ARSA :

Tout comme l'ARLA, l'ARSA est causé par une quantité excessive d'aliment concentré avec un niveau faible en fibres. Mais dans le cadre de cette pathologie, la population microbienne s'adapte et un grand nombre d'organismes produisant et consommant le lactate sont présents. La proportion de fibrolytiques décroît, tandis que les espèces fermentant l'amidon et le glucose prolifèrent. Le lactate ne s'accumule pas car il est rapidement consommé. On a alors un taux de fermentation élevé avec des concentrations élevées en acides gras volatils, résultant en une acidité modérée chronique du pH ruminal, entre 5 et 5,5. Les acides butyrique et propionique voient leurs proportions augmenter par rapport à l'acide acétique et stimulent la production de papilles ruminales, pouvant aller jusqu'à sa

parakératose. Cette hyperkératinisation diminue l'absorption des acides gras volatils et augmente les risques d'inflammation, qui peut conduire à des pénétrations tissulaires bactériennes avec des disséminations au foie. Cela résulte assez fréquemment en des abcès hépatiques, sans signes cliniques, mais diminuant la productivité des animaux (Smith, 2015).

La pertinence des analyses de microbiote est à modérer, car des facteurs expérimentaux peuvent également perturber la fiabilité des résultats, comme la méthode, le lieu et le moment de prélèvement (Leedle et al., 1982) du contenu ruminal et la méthode d'extraction de d'ADN (Li et al., 2009 ; Henderson et al., 2013). Afin de comparer des données, il est donc nécessaire de prendre en compte ces facteurs de variation pour ne pas mener à de mauvaises interprétations.

Enfin, il convient de rappeler que, malgré les nouvelles techniques d'identification, une grande partie du microbiote ruminale reste à ce jour non identifiée. En 2018, le projet Hungate1000 visant à établir un catalogue des micro-organismes ruminiaux le plus complet possible, a estimé à 75 % la couverture du génome ruminal connu (Seshadri et al., 2018).

### III- Liens établis entre microbiote ruminal et productions animales

70 % de l'énergie métabolique des ruminants provient de la dégradation des composants alimentaires par les fermentations microbiennes (Bergman, 1990). En ce sens, on peut facilement supposer que les acteurs de ces fermentations jouent un rôle important dans la modulation des caractères de production des ruminants. Nous allons voir à travers quels outils nous pouvons établir d'éventuels liens et quels sont-ils.

#### A- Outils de l'évaluation de la relation entre composition du microbiote ruminal et productions animales

##### 1- Indices de diversité

Les indices de diversités sont des indicateurs de biodiversité utiles pour caractériser une composition du microbiote. Il en existe deux sortes :

- Les indices d' $\alpha$ -diversités mesurent la diversité au sein d'un échantillon prélevé à un moment donné. Parmi celles-ci nous allons utiliser :
  - o La richesse spécifique (Species richness, ou Observed), qui n'est autre que le nombre d'OTU différents observés.
  - o L'indice de Shannon, qui représente la largeur de la distribution des abondances relatives d'OTU. Grossièrement, il représente notre habilité à prédire l'OTU d'une bactérie prise au hasard et l'homogénéité de la distribution de la biodiversité.
  - o L'indice de Simpson, correspondant à  $1 -$  la probabilité que deux bactéries, prises au hasard dans la communauté, appartiennent à deux OTU différents.
- Les indices de  $\beta$ -diversités servent à représenter les différences ou similitudes entre deux échantillons donnés. Ils peuvent être calculés de plusieurs façons, dont deux particulièrement utilisées pour les microbiotes :
  - o La méthode Bray-Curtis consiste à calculer la dissimilarité entre deux communautés, basée sur la formule suivante :
$$BC_{jk} = 1 - \frac{2 \sum_{i=1}^p \min(N_{ij}, N_{ik})}{\sum_{i=1}^p (N_{ij} + N_{ik})}$$
où  $N_{ij}$  est l'abondance de l'espèce  $i$  dans l'échantillon  $j$  et  $N_{ik}$  l'abondance de cette même espèce dans l'échantillon  $k$ .
  - o L'indice de Jaccard, quant à lui, est plus grossier et est égal au rapport entre le nombre d'espèces communes aux deux communautés et le nombre total d'espèces.

Ces différents indices vont nous permettre d'affiner notre étude des microbiotes ruminants, et de comparer des animaux ayant des caractères de production différents. Cependant, la comparaison des abondances d'espèces microbiennes particulières reste également intéressante.

## **2- Indices d'efficacité zootechnique**

Pour qualifier la performance de production d'un animal, le Residual Feed Intake (RFI) est un outil intéressant. Il correspond à la différence entre la quantité d'aliment ingérée réellement par l'animal et celle théoriquement ingérée selon ses besoins de production. Par définition, les animaux ayant un RFI élevé peuvent donc être qualifiés de moins efficaces que ceux ayant un RFI faible ou négatif. Il permet d'établir de manière identique une efficacité alimentaire pour des animaux dont le produit est différent.

Le Gain Moyen Quotidien (GMQ, ou ADG pour Average Daily Gain), correspondant à la variation journalière de poids, est un indice utile, mais ne concerne que la production de viande lors de la période de croissance ou d'engraissement.

La production laitière est également un facteur zootechnique intéressant. Cependant l'alimentation des vaches laitières et en général indexée sur leur production, ce qui ne permet pas de rendre compte de l'efficacité de la valorisation alimentaire. L'indice du GFE, pour Gross Feed Efficiency, est alors plus adapté. Il est calculé comme le rapport ECM/DMI, respectivement Energy-Calculated Milk (égal à  $Q_{\text{lait}} \times [0.0327 + (0.1296 \times TB) + (0.072 \times TP)]$ ) et Dry Matter Intake (la quantité de matière sèche ingérée).

## **B- Composition du microbiote ruminal et performance**

De nombreuses études recherchant des différences de diversité microbienne entre des groupes d'animaux différents par leurs niveaux de production ou d'ingestion n'ont rien révélé de significatif (Myer et al., 2015 ; Jewell et al., 2015 ; Li, Guan, 2017).

D'autres études ont cependant démontré que le microbiote ruminal des vaches « inefficaces », c'est-à-dire avec un RFI élevé, est caractérisé par une plus grande  $\alpha$ -diversité de taxons (que ce soit des embranchements, classes, ordres, familles, genre et OTU), soulignant un plus grand nombre de voies métaboliques utilisées que chez les vaches « efficaces » (RFI faible) (Shabat et al., 2016). Inversement, la communauté bactérienne ruminale des vaches efficaces possède des taxons plus dominants qui utilisent moins de voies métaboliques différentes, ce qui est énergétiquement plus rentable pour l'animal. Shabat et al. (2016) décrivent ainsi une différence significative des indices de Simpson en faveur des vaches ayant un RFI élevé. La diversité microbienne apparaît alors comme négativement associée à la capacité du microbiote à subvenir aux besoins énergétiques de son hôte. Cette même équipe a donc tenté d'expliquer ce lien par ce modèle schématique (Figure 14) : à partir des mêmes substrats une diversité importante des micro-organismes induit une diversité de produits, réduisant ainsi la part des produits impliqués dans les voies métaboliques les plus efficaces.

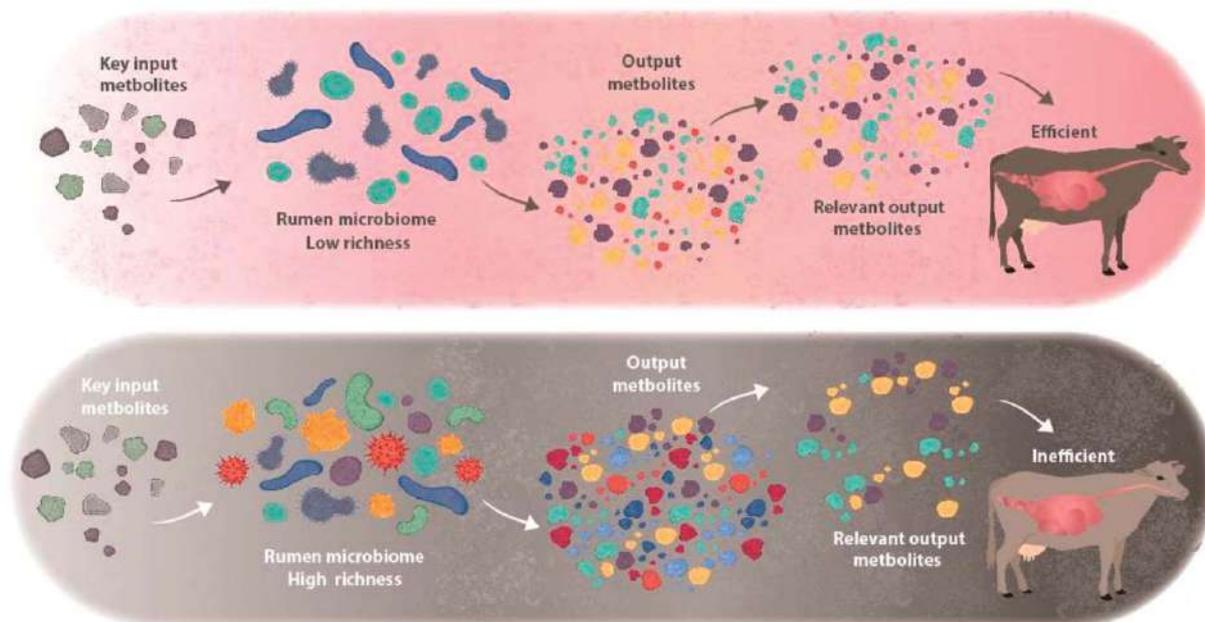


Figure 14 - Modèle proposé par (Shabat et al., 2016) pour expliquer les différences d'efficacité alimentaire chez les ruminants

Des comparaisons d' $\alpha$ -diversités (Shannon et Simpson) sur le microbiote de vaches laitières ont montré une richesse et une uniformité du microbiote plus faibles chez les vaches hautes productrices de lait par rapport aux basses productrices (Mu et al., 2019), confortant le modèle évoqué précédemment.

En analysant les différences microbiennes entre des animaux efficaces ou non, une connexion entre la composition ruminale en AGV, bactéries ruminales et efficacité de production a été mise en évidence par Hernandez-Sanabria et al. (2010).

L'embranchement des *Firmicutes* semble avoir un effet positif sur l'efficacité alimentaire. Myer et al. (2015) décrivent une corrélation positive de l'abondance de bactéries de cet embranchement sur le GMQ. De même, Tong et al. (2018) trouvent une production laitière plus importante chez les animaux possédant une grande abondance de bactéries *Firmicutes* parmi leur microbiote ruminal. Cependant, au sein de cet embranchement toutes les classes et familles ne permettent pas une amélioration des productions animales. L'étude de Jewell et al. (2015) montre que les bactéries de la classe des *Clostridia* auraient tendance à être liées à une efficacité alimentaire plus faible. Une corrélation positive entre l'abondance de *Clostridia* et le RFI sur les mêmes animaux confirme ce lien. De même, au sein de cette classe, des effets différents sont observés selon les familles : lien positif avec le RFI pour la famille des *Lachnospiraceae* (Jewell et al., 2015 ; Myer et al., 2015 ; Shabat et al., 2016 ; Indugu et al., 2017), lien négatif pour la famille des *Ruminococcaceae* (Jewell et al., 2015 ; Shabat et al., 2016 ; Indugu et al., 2017) et le genre *Clostridium* (Jewell et al., 2015).

En ce qui concerne l'embranchement des *Bacteroidetes*, Tong et al. (2018) montrent, contrairement à l'embranchement précédent, une corrélation négative entre abondance microbienne et production laitière, ce qui semble conforté par l'étude de Mu et al. (2019). La classe des *Bacteroidales* semble

également avoir un effet similaire. De par son état de genre le plus présent dans le rumen, de nombreux travaux se sont intéressés à la relation entre des bactéries du genre *Prevotella* et l'efficacité alimentaire des animaux. Si certaines études concluent à une corrélation négative (Carberry et al., 2012), d'autres ont des résultats qui diffèrent selon l'espèce de *Prevotella* (Jewell et al., 2015). La grande diversité du genre *Prevotella* ainsi que les multiples voies métaboliques qu'elle peut emprunter sont des hypothèses pouvant expliquer ces résultats contradictoires. Par ailleurs, Indugu et al.(2017) décrit le genre *Prevotella* comme favorisant la production laitière des vaches.

Si les études de Mu et al.(2019) et Tong et al.(2018) avaient des résultats similaires pour les bactéries de l'embranchement des *Bacteroidetes*, ce n'est pas le cas pour celles appartenant aux *Proteobacteria*. La première en voit la proportion augmenter chez les vaches hautes productrices, alors que la deuxième étude observe le contraire.

Quels que soit l'embranchement, de nombreuses espèces bactériennes ont été caractérisées comme significativement différentes entre des groupes de ruminants d'efficacité différentes. Cependant les données sont également souvent contradictoires d'une étude à l'autre. C'est par exemple le cas de *S. dextrinosolvans*, décrite par Shabat et al.(2016) comme présente en fréquence significativement plus élevée chez les bovins inefficaces, mais ayant un effet ambivalent dans l'étude de Hernandez-Sanabria et al.(2012).

Des études similaires ont également été menées pour étudier les rapports entre le microbiote ruminal et les émissions de méthane (Wallace et al., 2015), l'acidose ruminale subaiguë (McCann et al., 2016), et la composition du lait dont nous allons approfondir l'état des connaissances.

### C- Modification de la composition du lait selon le microbiote ruminal

Le rapport d'abondances *Firmicutes/Bacteroidetes* intestinales avait été décrit chez l'Homme et chez la souris comme ayant un effet sur la masse adipeuse et l'accumulation énergétique (Ley et al., 2006 ; Turnbaugh et al., 2006). C'est en utilisant cette donnée, qu'une corrélation très importante entre le taux butyreux du lait de vache et le rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* ruminal a été établie sur les vaches laitières de l'étude de Jami et al. (2014). Ce lien était quasiment exclusivement dirigé par la très grande abondance du genre *Prevotella*, appartenant aux *Bacteroidetes*, qui lui, est corrélé négativement au taux butyreux du lait. Malgré la solidité du modèle alors établi (Pearson R = 0,72, P =  $2 \times 10^{-3}$ ), Lima et al. (2015) n'ont quant à eux pas réussi à établir ce lien avec leurs données, ni pour le taux butyreux ni pour le taux protéique.

Toujours dans l'étude de Jami et al. (2014), une analyse de type matrice de corrélation linéaire de Pearson a été réalisée sur les genres présents à des abondances supérieures à 0,1 % dans au moins un échantillon, et présents dans au moins la moitié des échantillons ruminiaux. Les résultats sont présentés dans la figure 15.

Dans l'embranchement des *Firmicutes* l'abondance de plusieurs taxons bactériens étudiés est corrélée positivement au taux butyreux du lait, la plupart appartenant à l'ordre des *Clostridiales*.

Des genres issus d'autres embranchements ont également montré des corrélations avec le taux butyreux du lait, comme par exemple *Desulfovibrio* des *Proteobacteria*.

Parmi les *Actinobacteria*, on a à la fois *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* qui montrent une corrélation positive avec le taux butyreux.

Une corrélation positive significative entre quatre genres de l'ordre des *Coriobacteriales* et la teneur en lactose du lait a été observée, dont l'un est également positivement corrélé à la production laitière moyenne. Le fait que ces taxons soient phylogénétiquement proches suggère qu'ils partagent des fonctions qui affectent la physiologie de l'hôte d'une manière similaire. On a également *Mitsuokella* et *Desulfovibrio* qui sont positivement corrélés à la teneur en lactose du lait.

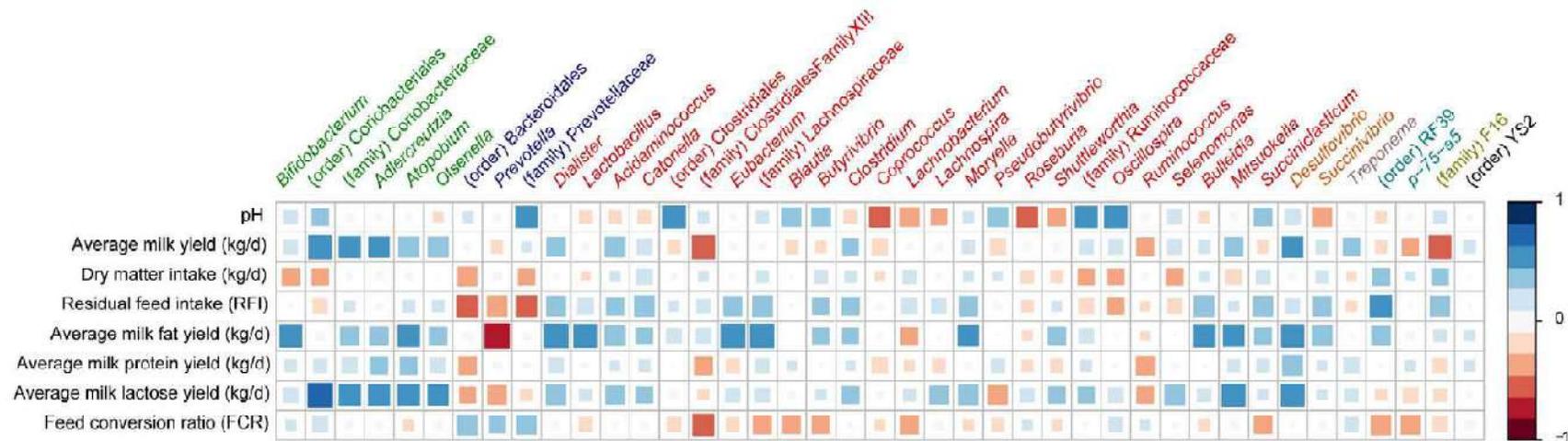


Figure 15 - Corrélation entre l'efficacité des paramètres et l'abondance des taxons bactériens (Jami et al., 2014).

Les fortes corrélations sont représentées par de grands carrés, les faibles corrélations par de petits carrés. L'échelle de couleur indique si la corrélation est positive (plus proche de 1 en bleu) ou négative (plus proche de -1 en rouge) entre le taxon bactérien et les paramètres zootechniques. Le code couleur permet de regrouper les taxons par embranchement : *Actinobacteria* (vert), *Bacteroidetes* (bleu), *Firmicutes* (rouge), *Proteobacteria* (orange), *Spirochaetes* (violet), *Tenericutes* (bleu clair), *TM7* (olive), *Cyanobacteria* (noir).

Indugu et al. (2017) ont établi une matrice similaire dans leur étude, avec les genres les plus abondants des embranchements *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* (Figure 16). Tous les taxons bactériens appartenant aux *Firmicutes* ont montré une corrélation positive avec les taux butyreux et protéiques du lait, excepté *Christensenellaceae*, *Coprococcus*, *Erysipelotrichaceae*, *Lachnospiraceae*, *Shuttleworthia* et *Veillonellaceae*.

On remarque dans ces deux études, qu'en général, les taxons bactériens positivement corrélés à la production laitière le sont négativement au taux butyreux et au taux protéique. Une hypothèse explicative est la dilution des taux qu'entraîne une augmentation de la quantité globale de lait sans augmentation de la quantité de protéine ou de gras dans le lait.

Si nous n'avons regardé que les paramètres phénotypiques des productions animales, d'autres travaux s'intéressent aux liens entre génétique de l'hôte et son microbiote ruminal.



Figure 16 - Corrélation entre l'efficacité des paramètres et l'abondance des taxons bactériens (Indugu et al., 2017)

L'échelle de couleur indique si la corrélation est positive (plus proche de 1 en bleu) ou négative (plus proche de - 1 en rouge) entre le taxon bactérien et les paramètres de production. Les couleurs des taxons rouge, vert et bleu, indiquent l'embranchement, respectivement *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*

## D- Lien entre génétique de l'hôte, productions animales, et composition du microbiote ruminal

### 1- Héritabilité des caractères de production laitière chez la brebis

L'héritabilité des caractères de production est un paramètre très important dans toutes les filières d'animaux de production, puisque la reproduction et le renouvellement sont au cœur des intérêts des éleveurs. L'évolution du troupeau dépend en grande partie des choix réalisés par l'éleveur en termes de reproducteurs, mais également du travail des sélectionneurs.

L'outil de choix pour étudier cela en génétique animale est l'héritabilité ( $h^2$ ), défini comme la part de variation d'un caractère quantitatif (mesurée sur les individus d'une population) due à la génétique (valeur génétique additive). Il correspond alors à un indice d'efficacité selon laquelle on pourra sélectionner un caractère. En ce qui concerne les paramètres de la fonction laitière chez les brebis, plusieurs travaux se sont penchés sur les valeurs d'héritabilité.

Dès 1987 des valeurs d'héritabilité de plusieurs caractères de production laitière de première lactation ont été établis par Barillet et Boichard (1987), par décomposition de la variance et de la covariance entre demi-sœurs de père, selon 3 méthodes décrites par Henderson (1953) (Tableau 8). Cette étude a été réalisée à partir d'un fichier de 1 487 agnelles de race Lacaune, issues de 102 béliers de testage et 74 mâles de service.

Tableau 8 - Estimations des héritabilités pour les caractères sur la lactation totale de brebis en première lactation (Barillet, Boichard, 1987)

Trait	Abbreviation	Analysis		
		I	II	III
		$h^2$	$h^2$	$h^2$
Days of milking . . . . .	<i>D</i>	0.07 ± 0.08	0.08 ± 0.08	0.09 ± 0.09
Milk yield . . . . .	<i>M</i>	0.29 ± 0.10	0.27 ± 0.09	0.27 ± 0.10
Daily milk production . . . . .	<i>DM</i>	0.28 ± 0.10	0.29 ± 0.09	0.26 ± 0.10
Corrected milk yield . . . . .	<i>CM</i>	0.32 ± 0.10	0.32 ± 0.10	0.30 ± 0.10
Fat yield . . . . .	<i>F</i>	0.26 ± 0.10	0.27 ± 0.09	0.23 ± 0.09
Corrected fat yield . . . . .	<i>CF</i>	0.28 ± 0.10	0.29 ± 0.09	0.25 ± 0.10
Protein yield . . . . .	<i>P</i>	0.24 ± 0.09	0.22 ± 0.09	0.22 ± 0.09
Corrected protein yield . . . . .	<i>CP</i>	0.27 ± 0.10	0.26 ± 0.09	0.26 ± 0.10
Average useful yield . . . . .	<i>U</i>	0.28 ± 0.10	0.27 ± 0.09	0.26 ± 0.10
Fat percent . . . . .	<i>F%</i>	0.49 ± 0.11	0.62 ± 0.11	0.57 ± 0.12
Protein percent . . . . .	<i>P%</i>	0.47 ± 0.11	0.53 ± 0.11	0.52 ± 0.11
Average useful content . . . . .	<i>U%</i>	0.58 ± 0.12	0.65 ± 0.12	0.66 ± 0.12
Fat percent/Protein percent . . . . .	<i>F%/P%</i>	0.27 ± 0.10	0.37 ± 0.10	0.29 ± 0.10

$$CM = k M ; CF = k F ; CP = k P ; \text{avec } k = 220 / (D + 60)$$

$$U = (CF + 1,85 CP) / 2 ; U\% = (F\% + 1,85 P\%) / 2$$

Les trois types d'analyses semblent cohérents entre eux. Si la durée de lactation semble être un facteur faiblement héritable, tous les autres ont des valeurs d'héritabilité élevées.

Concernant ces héritabilités, l'étude de El-Saied et al. (1998) a été réalisée via une analyse multi-caractères et un modèle animal de répétabilité à partir de données d'un unique élevage, sur 6 917 lactations issues de 1 569 brebis Churra, étalées sur 20 ans. Les caractères sélectionnés étaient la production totale laitière, la production laitière standardisée et la durée de lactation. Les valeurs d'héritabilité de ces caractères ont été estimées respectivement à  $0,27 \pm 0,036$ ,  $0,25 \pm 0,034$ ,  $0,015 \pm 0,010$ , ce qui semble rationnel compte tenu des valeurs précédemment données.

Des études plus récentes se sont intéressées à l'héritabilité de la concentration en cellules somatiques (CCS) dans le lait de brebis laitières, facteur clé dans la gestion des mammites sub-cliniques. Rupp et al. (2003) l'ont étudié à partir de données issues de 94 445 et 45 499 brebis Lacaune en première et deuxième lactations. Ils ont obtenu un  $h^2$  modéré (0,13), similaires pour les deux premières lactations en ce qui concerne les moyennes des CCS par lactation. Des valeurs d'héritabilité de la production laitière totale, des taux butyreux et protéiques ont également été estimées dans cette étude, avec comme valeur respectivement 0,30, 0,40 et 0,60.

Ces valeurs d'héritabilité soulignent l'importance de la génétique et de la sélection dans l'amélioration des troupeaux de brebis laitières, notamment en ce qui concerne les taux de matières protéiques et grasses.

## 2- Héritabilité du microbiote ruminal

L'importance du microbiote ruminal a conduit à l'étude de son héritabilité, notamment par Wallace et al. (2019) à partir de données issues de 650 bovins de race Prim'Holstein. Cette équipe a estimé les valeurs d'héritabilité de 39 OTU du « noyau » du microbiote ruminal (Figure 17).

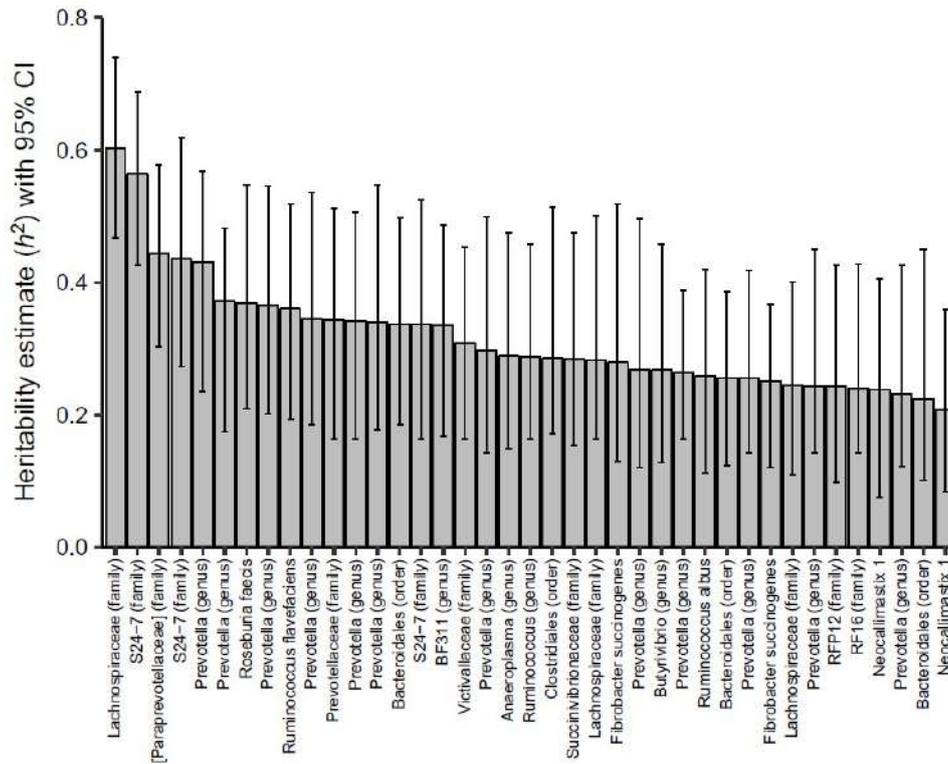


Figure 17 - Analyse d'héritabilité basée sur la matrice de parenté génétique (GRM) de 39 OTU microbiens significativement corrélés au génotype animal (Wallace et al., 2019)

Des valeurs comprises entre 0,2 et 0,6 révèlent une héritabilité importante de l'abondance de ces taxons dans le rumen des bovins étudiés.

Chez les ovins, une étude menée par Marie-Etancelin C et al. (2018) s'est portée sur le déterminisme génétique du microbiote ruminal. À partir de 369 brebis Lacaune, des estimations de l'héritabilité ont été réalisées à l'échelle des genres : pour les 139 genres bactériens identifiés, les valeurs varient entre 0,00 et 0,49 ( $\pm 0,11$ ), avec 22 % des genres ayant une héritabilité supérieure à 0,1. Les genres les plus héritables ( $h^2 > 0,25$ ) sont *Ruminococcaceae UCG002*, *Lachnospira*, *Atopobium* et *Oscillospira*.

Tout comme pour les caractères de production laitière, on a donc des valeurs d'héritabilité non négligeables, qui soulignent la part de la génétique de l'hôte dans la composition de son microbiote ruminal.

### ***3- Lien entre génétique de l'hôte, métagénome ruminal et performance laitière chez la brebis***

À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur l'ensemble de ces trois facteurs en même temps. C'est dans le cadre de ce manque de données que s'inscrit notre travail : étudier le microbiote de brebis sélectionnées sur leur persistance laitière (c'est-à-dire la capacité à maintenir un haut niveau de production laitière le plus longtemps possible au cours d'une lactation) sur 3 années/lactations successives.

**DEUXIÈME PARTIE :**  
**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**

## **I- Présentation de l'étude**

Notre étude s'appuie sur un programme de recherche du laboratoire GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevages) de l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement) de Toulouse, qui est porté par le Pr. Annabelle Meynadier et Mme Christel Marie-Etancelin. Les données proviennent d'une partie du troupeau de brebis laitières de l'Unité Expérimentale INRAE de La Fage, située à côté de Roquefort-sur-Soulzon.

Nous avons alors pour objectifs de :

- voir si la sélection sur la persistance laitière modifie le microbiote ruminal des brebis laitières
- observer la stabilité du microbiote ruminal au cours des lactations successives de ces brebis

## **II- Matériels et méthodes**

### **A- Animaux**

Pour répondre à cette problématique, un suivi de performances a été réalisé sur des brebis du même âge durant 3 lactations successives appartenant à deux lignées génétiques divergentes pour la persistance laitière durant la lactation : 22 brebis de génotype ayant une persistance de la production laitière élevée (PERS+), et 22 brebis ayant une persistance de la production laitière faible (PERS-).

Les brebis étaient logées en stabulation libre sur aire paillée. Les animaux recevaient tous la même ration à horaires fixes, représentant en moyenne 3,32 kg de matière sèche ingérée. Elle était composée d'une base de foin et d'ensilage d'herbe (dactyle et de luzerne), équilibré par un concentré brebis laitière (pour une moyenne ingérée de 278 g/j).

### **B- Plan expérimental et prélèvements**

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

Ils ont été réalisés sur les 44 brebis une fois par an sur 3 ans : le 24 mars 2017, le 16 mars 2018 et le 1<sup>er</sup> mars 2019. L'heure de prélèvement a été notée pour chaque brebis.

Tous les échantillons ont été congelés à -20°C directement après aliquotage dans 2 microtubes Eppendorf de 2 mL, puis transportés à l'INRAE de Toulouse et conservés à -80°C jusqu'à analyse.

## ***1- Extraction et séquençage de l'ADN bactérien***

L'extraction de l'ADN des échantillons de jus de rumen a été réalisée grâce au Quick-DNATM Fecal/Soil Microbe 96 Kit.

Un séquençage MiSeq (Illumina) ciblé sur le gène codant pour la région v3-v4 de l'ARN ribosomal 16S des brins d'ADN obtenus et amplifiés, a permis d'obtenir pour chaque échantillon un pool de séquences d'ADN bactérien.

Il est important de noter que les séquençages des échantillons de 2017 et 2019 ont été réalisés lors d'un même « run de séquençage », c'est-à-dire en une seule fois (en 2020), tandis que celle des échantillons de 2018 a été réalisée à un autre moment (en 2018).

## ***2- Obtention des OTUs, les étapes FROGS***

L'analyse bio-informatique a ensuite été réalisée par le pipeline FROGS qui a procédé à un nettoyage et à un regroupement des séquences identiques à 3 erreurs près. Ces clusters de séquences (ou OTU) considérées comme identiques sont ensuite affiliés par comparaison à la base Silva 132 (Escudie et al., 2015).

Le traitement du pool de séquences par FROGS est composé de différentes étapes, pour nettoyer et affilier les séquences à des OTUs (Figure 17).

### **a. Le « Pre-process »**

Cette étape permet de supprimer les séquences de longueurs anormales (les longueurs attendues sont entre 380 et 500 paires de bases (pb)), les séquences avec des bases ambiguës (N), et les séquences avec de mauvaises amorces. La figure 18 schématise cette étape préliminaire.

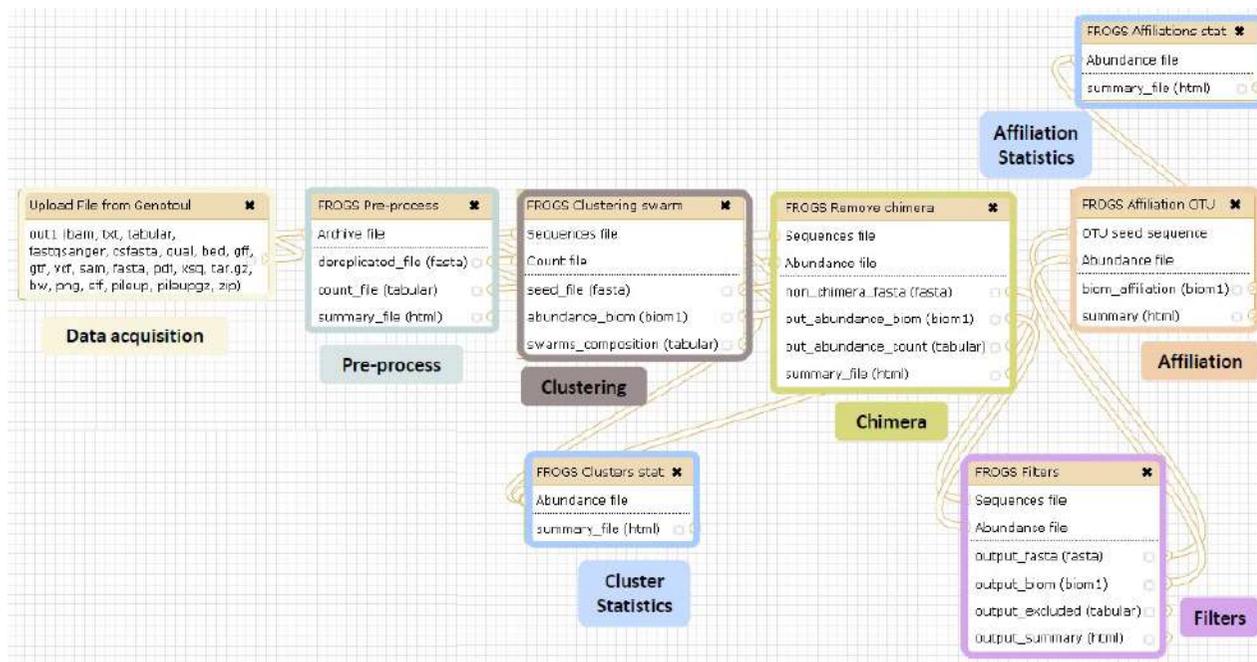


Figure 18 - Etapes du pipeline FROGS pour nettoyer un séquençage et obtenir des OTUs

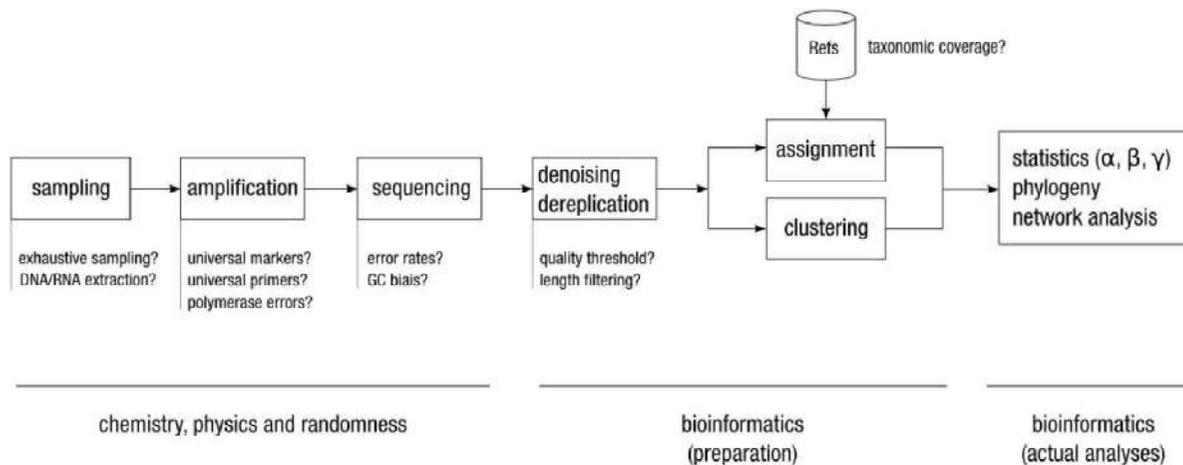


Figure 19 - Erreurs au cours des étapes du process de séquençage et correction par le pre-process

b. « Clustering » ou clusterisation

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

La clusterisation consiste donc à regrouper toutes les séquences identiques, en considérant de possibles erreurs de PCR ou de lecture.

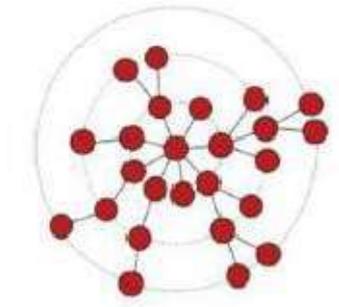


Figure 20 - Schématisation de la conservation des séquences à 3 erreurs de bases près, lors du Clustering

Sur la figure 19, chaque point rouge représente un pool de séquences identiques. A chaque différence de base acceptée, des séquences différentes d'une seule base sont identifiées et regroupées autour du pool initial (chaque cercle correspond donc à une différence de base). Nous avons choisi d'accepter 3 erreurs de bases, nous avons donc 3 cercles.

c. « Chimera » ou suppression des chimères

Comme l'illustre la figure 20, les chimères générées par PCR sont créées quand un amplicon avorté agit comme une amorce pour un modèle hétérologue. La chimère ainsi obtenue est à peu près de la même longueur que l'amplicon non chimérique, et contient les séquences amorces forward (for.) et reverse (rev.) à chaque extrémité. Ce sont des artefacts de la polymérisation.

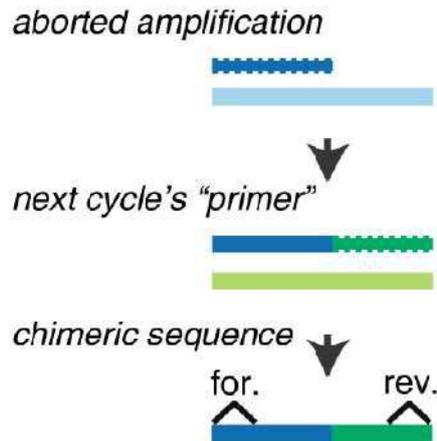


Figure 21 - Schéma explicatif de l'obtention d'une chimère

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

#### d. Application de filtres

L'application de filtres avant l'étape d'affiliation permet de supprimer les clusters trop peu représentés et non redondants, dont les singletons, qui correspondent très généralement à des artefacts analytiques. Cela rend l'étape d'affiliation plus simple.

Nous avons utilisé deux filtres différents.

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

Le deuxième filtre appliqué supprime les séquences non partagées par au minimum 3 échantillons.

#### e. Affiliation des clusters à des OTUs

A partir de la base Silva 132 (Quast et al., 2013), les clusters sont identifiés et affiliés à des OTUs.

## C- Analyse statistique

Nous allons utiliser le logiciel libre R (version 4.2.13194.0) à l'aide de l'interface Rstudio (version 1.2.5033 © 2009-2019 RStudio, Inc). Afin de réaliser nos analyses statistiques, nous nous appuyerons sur les packages sasLM (Bae, 2020), emmeans (Lenth et al., 2020), MixOmics (Cao et al., 2020), vegan(Oksanen et al., 2019), ggplot 2 (Wickham, Chang, et al., 2020), dplyr (Wickham, François, et al., 2020).

Les variables étudiées sont :

- Les comptages de chacun des OTU identifiés ont été convertis en abondances relatives.
- Les indices d' $\alpha$ -diversité : Observed (nombre d'OTU différents observés), Shannon et Simpson, ont été calculés par l'outil FROGS.
- Les indices de  $\beta$ -diversité : distance de Bray-Curtis et distance de Jaccard

Les effets fixes considérés:

- Rang de lactation (LACT) : 1,2 et 3
- Lignée (LIGNEE) : PERS- et PERS+

Nous allons regrouper les données quantitatives en groupes suffisamment conséquents d'individus en vérifiant qu'il n'y ait pas de confusion entre 2 effets :

- Heure de prélèvement (HPrel) en 3 groupes : 8h25-9h04, 9h05-9h31, 9h32-9h54, 9h55-11h36
- Taille de la portée (Portée) en 2 groupes : 1 (1 agneau), 2 (2 ou 3 agneaux).
- Intervalle mise bas-premier contrôle laitier (IM1C) en 3 groupes : 29-40 j, 41-42 j, 43-48 j

Afin de vérifier la qualité de nos données, nous avons dans un premier temps réalisé des tables croisées du nombre d'individus par groupe, suivi d'analyses par PCA (Principal Component Analyses).

En ce qui concerne l'analyse statistique des données, nous allons traiter tout d'abord les  $\alpha$ -diversités et les  $\beta$ -diversités à l'aide d'analyses de 2 ANOVA et 2 PERMANOVA (permutations = 9999), respectivement, et en explorant séparément l'effet de la lignée et du numéro de lactation. Nous nous intéresserons dans un second temps à la relation entre les taxons bactériens, la lignée des animaux et leur rang de lactation à travers une analyse par sPLS-DA (sparse Partial Least-Square-Discriminant Analysis). Les abondances des taxons bactériens sont obtenues en sommant les abondances des OTUs qui les composent.

Les OTUS identifiés lors de cette première analyse seront analysés ensuite à l'aide du modèle suivant :

$$\text{OTU} = \text{Moyenne} + \text{Effet Lignée} + \text{Effet Numéro de Lactation} + \text{Effet Heure de Prélèvement} + \text{Effet Taille de la Portée} + \text{Effet IM1C} + \text{Interaction Lignée} \times \text{Numéro de Lactation} + \varepsilon$$

### III- Résultats

#### A- Vérification de la qualité du jeu de données

##### 1- Tables croisées du nombre d'individus par groupe

Le tableau 8 contient le nombre d'individus regroupés selon les niveaux des différents effets fixes afin que le croisement 2 à 2 de ces effets soit une cellule avec suffisamment d'individus pour que les effets soient estimés sans confusion.

Tableau 9 - Tableaux croisés du nombre d'individus entre les groupes

a. Lignée et rang de lactation, b. Lignée et groupe d'heure de prélèvement, c. Lignée et groupe de taille de portée, d. Lignée et groupe d'intervalle mise-bas - contrôle laitier, e. Rang de lactation et groupe d'heure de prélèvement, f. Rang de lactation et groupe de taille de portée, g. Rang de lactation et groupe d'intervalle mise-bas – contrôle laitier, h. Groupe d'heure de prélèvement et groupe de taille de portée, i. Groupe d'heure de prélèvement et groupe d'intervalle mise-bas – contrôle laitier, j. Groupe de taille de portée et groupe d'intervalle mise-bas – contrôle laitier

a.

LIGNEE\LACT	1	2	3
PERS -	22	22	21
PERS +	22	22	19

b.

LIGNEE\HPrel	1	2	3	4
PERS-	18	16	12	19
PERS+	14	16	20	13

c.

LIGNEE\Portée	1	2
PERS-	28	37
PERS+	41	22

d.

LIGNEE\IM1C	1	2	3
PERS-	18	32	15
PERS+	23	20	20

e.

LACT\HPrel	1	2	3	4
1	6	9	10	19
2	10	12	11	11
3	16	11	11	2

f.

LACT\Portée	1	2
1	27	17
2	24	20
3	18	22

g.

LACT\IM1C	1	2	3
1	14	17	13
2	13	18	13
3	14	17	9

h.

HPrel \Portée	1	2
1	17	15
2	21	11
3	17	15
4	14	18

i.

HPrel \IM1C	1	2	3
1	10	15	7
2	10	14	8
3	9	14	9
4	12	9	11

j.

Portée\IM1C	1	2	3
1	25	20	24
2	16	32	11

Le résultat de cette organisation est satisfaisant, et nous permet de limiter les confusions qu'on aurait pu avoir avec un trop faible nombre d'individus dans une cellule.

## 2- Validité des données du microbiote

Les figures 22 et 23 sont les représentations graphiques des analyses par PCA de la composition du microbiote à l'échelle des OTU, en fonction des lignées et du rang de lactation.

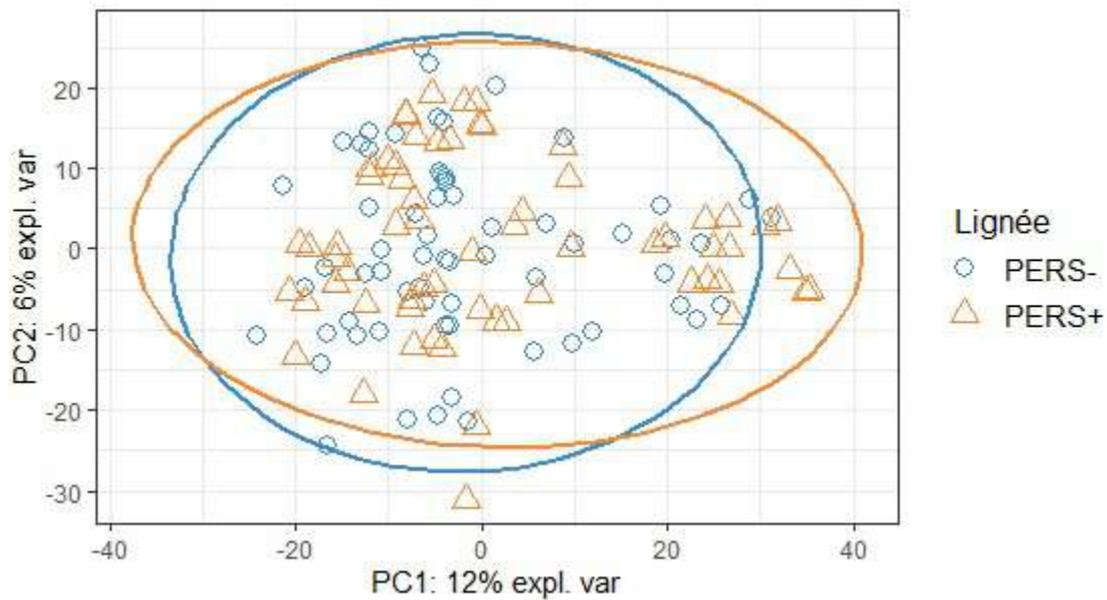


Figure 22 - Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de leur lignée

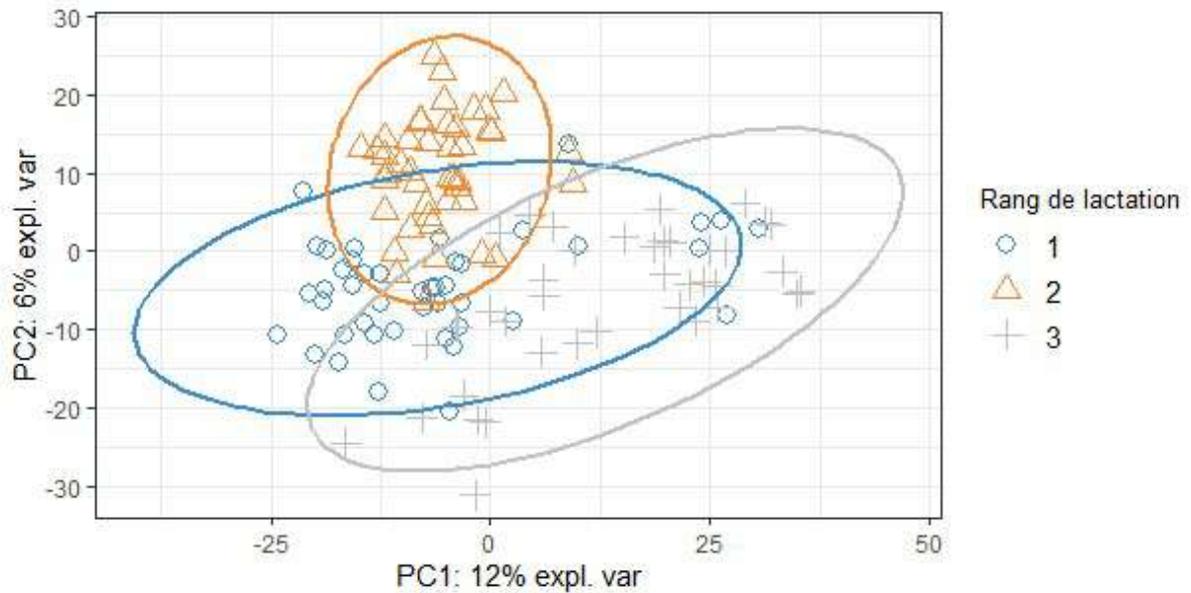


Figure 23 - Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de leur rang de lactation

Les représentations graphiques des autres analyses par PCA sont disponibles dans l'annexe 1.

On observe sur les graphiques une uniformité du nuage de points, sans échantillon totalement déviant. Cette caractéristique permet de témoigner de la qualité de nos données et du modèle défini en II-C.

Si la PCA ne permet pas de distinguer les deux lignées PERS- et PERS+ (Figure 22), on observe une différence au niveau des rangs de lactation, notamment pour le rang numéro 2 (Figure 23). Il faut cependant rappeler qu'il existe une confusion complète entre rang de lactation et année de prélèvement, qui peut, elle aussi, avoir un effet comme par exemple via la qualité des fourrages de l'année. De plus, le séquençage des échantillons de deuxième lactation a été réalisé indépendamment des deux autres : l'effet « run de séquençage » peut aussi se confondre avec la différence entre L2 et L1+L3. La PCA ne permet pas d'analyser finement les données de microbiote pour lesquelles le nombre de variables (1 800 OTU) est très important (bien plus important que le nombre d'observations (128 brebis)) et dilue l'information.

## B- Analyse de la diversité du microbiote bactérien

### 1- Etude de la diversité du microbiote en fonction de la lignée

#### a- $\alpha$ -diversité

Les résultats des index « Observed », « Shannon » et « Simpson » en fonction de la lignée PERS- ou PERS+ sont représentés par des boxplots en figure 24.

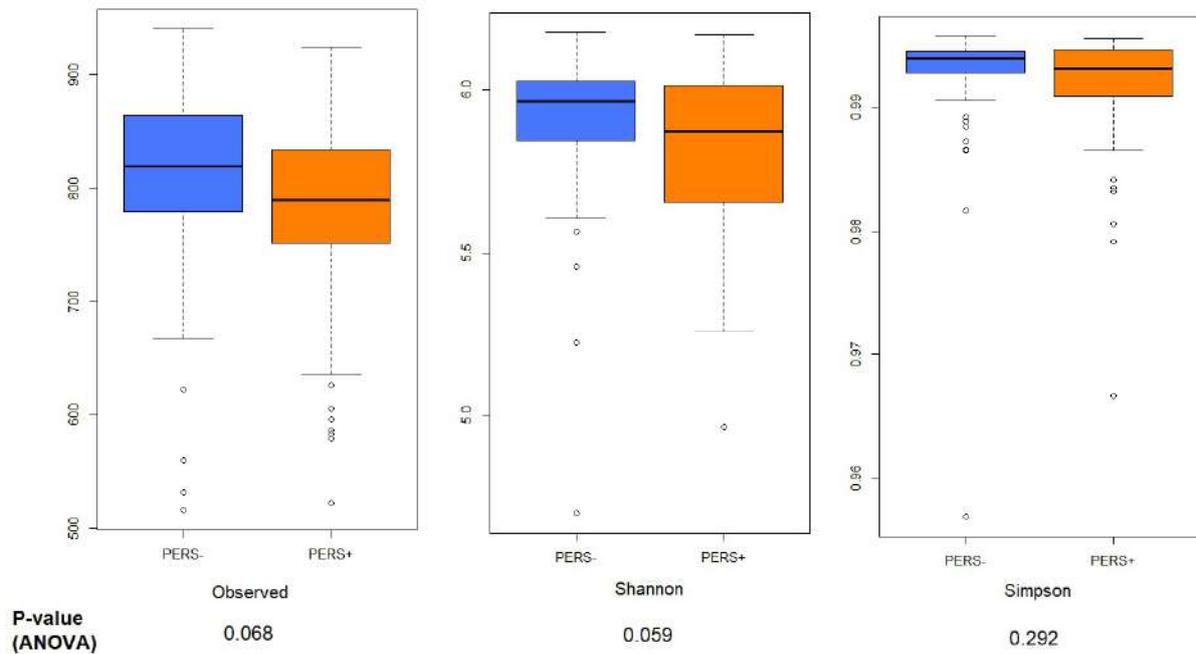


Figure 24 - Boxplots de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal des brebis en fonction des lignées PERS- et PERS+

Quel que soit l'index d' $\alpha$ -diversité, aucune différence significative de diversité du microbiote au seuil de 5 % n'est observée entre les lignées PERS- et PERS+. On peut tout de même noter une tendance à des indices de diversité plus faibles pour la lignée PERS+ (Observed et Shannon).

Les tables rapportant les ANOVA correspondantes sont exposées en annexe 2.

## b- $\beta$ -diversité

Il s'agit ici d'étudier la diversité entre nos échantillons. Sur le graphique en nuage de points de la figure 25, obtenu à l'aide du calcul des distances de Bray-Curtis, chaque point correspond à un échantillon et la distance entre chaque point représente l'éloignement entre ceux-ci (NMDS).

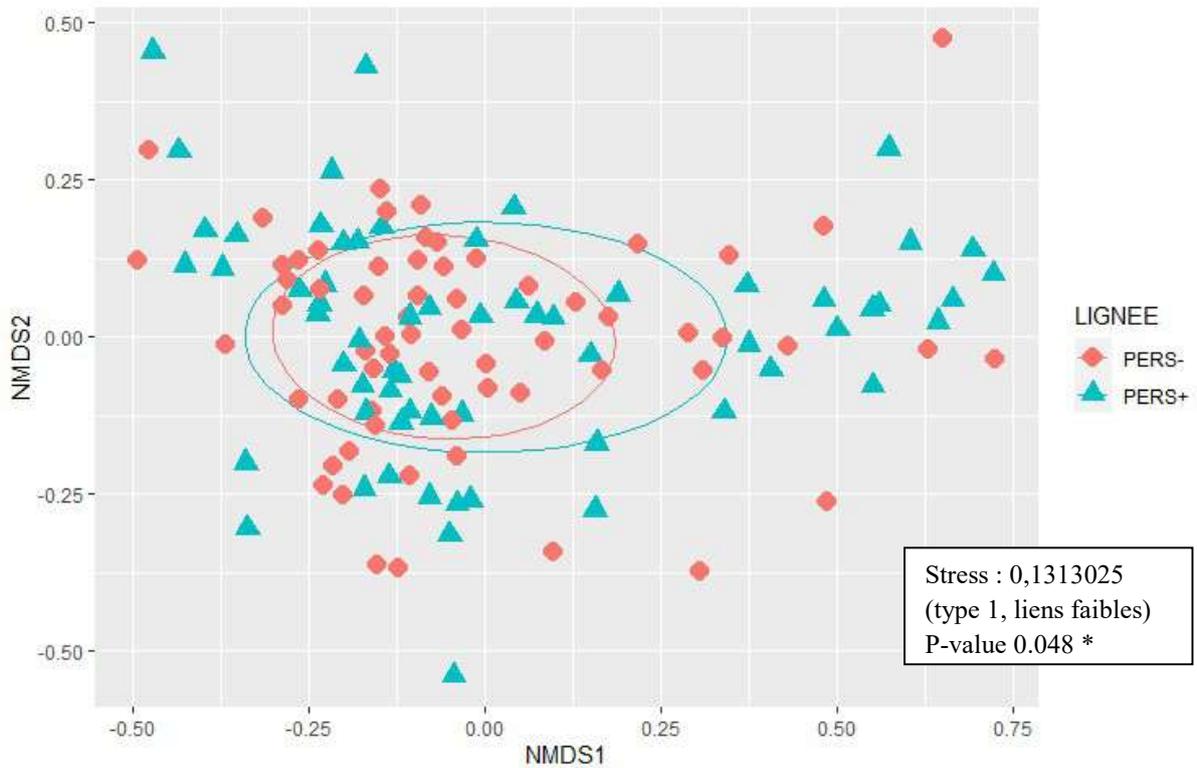


Figure 25 - Graphique en nuage de points représentant la  $\beta$ -diversité (Bray-Curtis) du microbiote ruminal en fonction des lignées PERS- et PERS+

La P-value donnée par l'analyse PERMANOVA est inférieure à 0,05 : on a donc un effet significatif de la lignée sur la  $\beta$ -diversité microbienne. Cependant cette différence ne s'observe pas sur le graphique. Il faut s'intéresser à la valeur de « stress » de la NMDS, qui représente la différence entre la configuration en deux dimensions et les valeurs calculées par la régression : une valeur supérieure ou autour de 0,2 est considérée comme douteuse, et une valeur approchant 0,3 indique que la représentation graphique est arbitraire. Des valeurs de stress égales ou inférieures à 0,1 traduisent une représentation raisonnable, tandis que des valeurs égales ou inférieures à 0,05 indiquent une bonne concordance. Dans notre cas, nous avons alors une représentation graphique moyennement fiable (stress = 0,13).

## 2- Etude de la diversité du microbiote en fonction du rang de lactation

### a- $\alpha$ -diversité

La figure 26 représente les boxplots des résultats des index « Observed », « Shannon » et « Simpson » en fonction du rang de lactation (1, 2 ou 3).

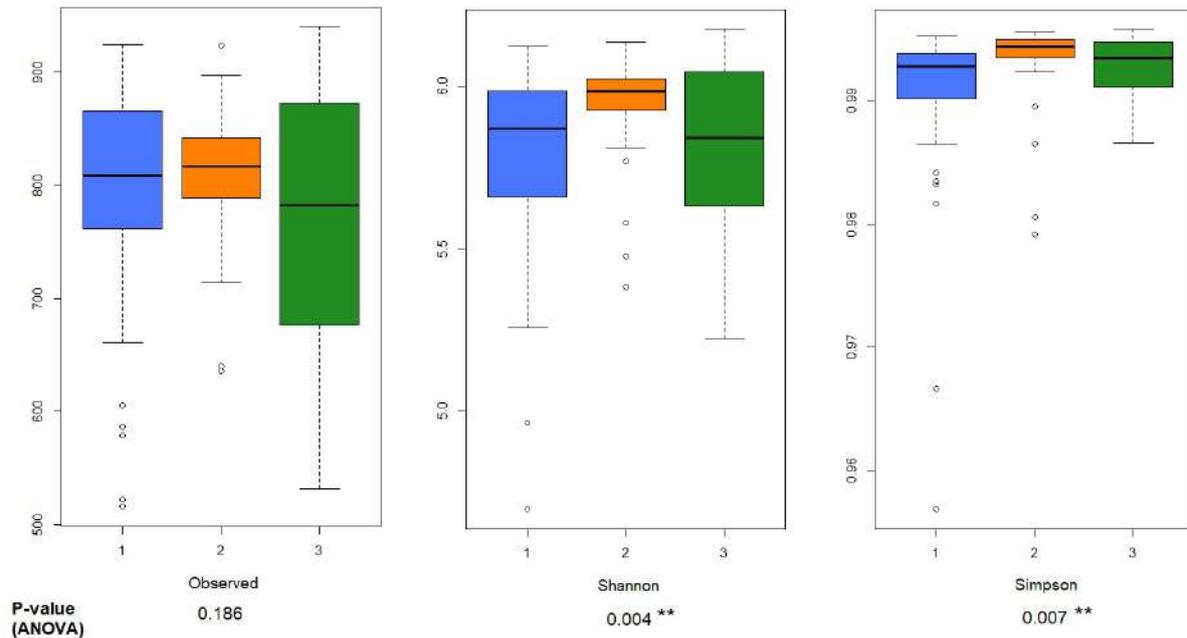


Figure 26 - Boxplots de l' $\alpha$ -diversité du microbiote ruminal des brebis en fonction des rangs de lactation 1, 2 et 3

La valeur du rang de lactation a un effet significatif sur les valeurs d'indice de Shannon et de Simpson. Nous avons donc réalisé une analyse de variance par paire, à l'aide du test de comparaison multiple de Tukey, pour identifier quels groupes sont significativement différents. Pour l'indice de Shannon, la seule différence significative s'observe entre les groupes de rang de lactation 1 et 2 (P-value de 0,005) ; cependant les écarts numériques sont très faibles et il est alors difficile de tirer des conclusions fiables.

Pour l'indice de Simpson, les différences significatives s'observent aussi entre les rangs de lactation 1 et 2 (P-value de 0,009). Cependant ces valeurs sont comprises entre 0,99 et 1 et donc non interprétables.

Les tables rapportant les ANOVA correspondantes sont exposées en annexe 2.

## b- $\beta$ -diversité

La figure 27 représente l'effet du rang de lactation sur la  $\beta$ -diversité du microbiote ruminal (distance de Bray-Curtis). On a cette fois-ci des ellipses qui ne se superposent pas, illustrant une différence marquée entre les rangs de lactations. Ceci est confirmé par une p-value de 0,01 donnée par l'analyse PERMANOVA.

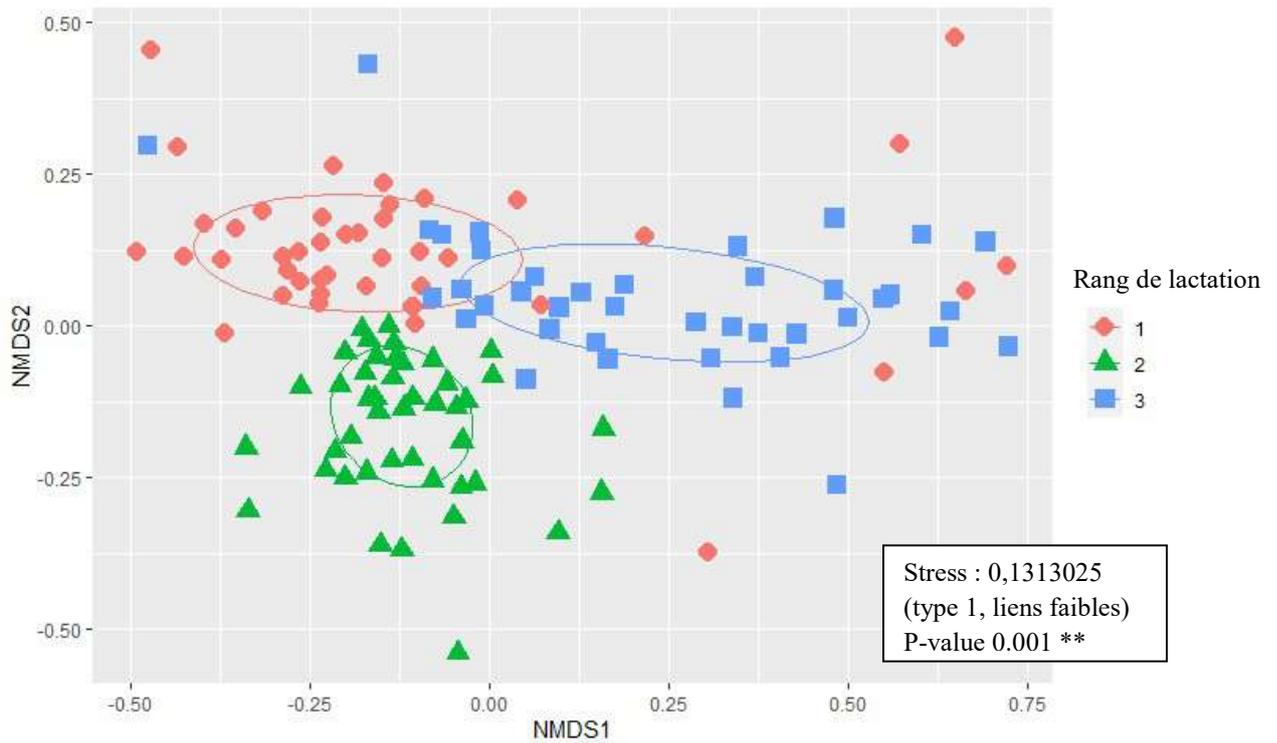


Figure 27 - Graphique en nuage de points représentant la  $\beta$ -diversité (Bray-Curtis) du microbiote ruminal en fonction des rangs de lactation 1, 2 et 3

Nous avons trois nuages de points qui se distinguent, un pour chaque rang de lactation. Malgré un stress de 0,13, la représentation graphique nous indique donc que les échantillons d'un même rang de lactation possèdent un microbiote relativement plus proche les uns des autres qu'avec ceux d'autres rangs.

### 3- Autres effets du modèle

Aucun des autres effets du modèle n'a révélé d'effet significatif, en ce qui concerne les indices d' $\alpha$ -diversités ou de  $\beta$ -diversités, comme le montre le tableau 10.

Tableau 10 - Résultat de l'analyse PERMANOVA de la diversité (Bray-Curtis) du microbiote ruminal en fonction des différents paramètres étudiés

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. Model	R2	Pr(>F)
LACT	2	2.5256	1.26280	15.5931	0.19811	0.001 ***
LIGNEE	1	0.1570	0.15698	1.9384	0.01231	0.048 *
HPrel	3	0.2762	0.09206	1.1367	0.02166	0.245
IMIC	2	0.1634	0.08171	1.0090	0.01282	0.400
LACT :LIGNEE	2	0.1511	0.0755	0.9329	0.01185	0.494
Residuals	117	9.4752	0.08098		0.74324	
Total	127	12.7485			1.00000	

Les données obtenues avec le calcul des distances de Jaccard sont disponibles en annexe 3.

### 4- Conclusion partielle

#### a- Effet lignée

Nous n'avons pas établi de différences significatives entre les valeurs d' $\alpha$ -diversité selon la lignée de la brebis. Cependant, une tendance à une valeur plus élevée du nombre d'OTU et de l'indice de Shannon est observée pour la lignée PERS- par rapport à la lignée PERS+. La  $\beta$ -diversité est significativement différente entre nos deux lignées mais difficile à mettre en évidence graphiquement.

#### b- Effet du rang de lactation

Seul le rang de lactation a été établi comme variable ayant un effet significatif et visible sur les indices d' $\alpha$ -diversité. Cependant les valeurs numériques étant très proches ne nous pouvons pas en tirer de réelle conclusion. Des différences de  $\beta$ -diversités ont quant à elles été observées entre chacun des rangs de lactation.

Nous avons identifié le rang de lactation comme variable entraînant une différence significative de microbiote. Nous allons donc continuer à l'étudier, en plus de la lignée, par une approche sPLS.

### C- Etude de l'effet de la lignée et du rang de lactation sur la composition du microbiote

Nous avons utilisé l'outil d'analyse sPLS-DA du package MixOmics pour rechercher si des taxons bactériens avaient des relations particulières avec les deux facteurs identifiés préalablement comme significatifs : la lignée et le rang de lactation.

Ce type d'analyse est une analyse discriminante par la méthode des moindres carrés partiels. Ce qui diffère avec la PCA c'est la mise en discriminant de l'effet fixe étudié (la lignée ou le rang de lactation), permettant d'insister sur la notion de groupes différents, et de mieux rechercher les différences et leurs explications.

#### 1- Lien entre lignée et bactéries du microbiote ruminal

##### a- Échelle des genres

La figure 28 constitue la représentation graphique en nuage de point de l'analyse sPLS-DA de nos données, à l'échelle du genre et avec la lignée comme facteur discriminant. Elle a été réalisée à partir des 2 premières composantes, qui expliquent respectivement 12 et 10 % de la variance du jeu de données, avec une faible discrimination des 2 lignées.

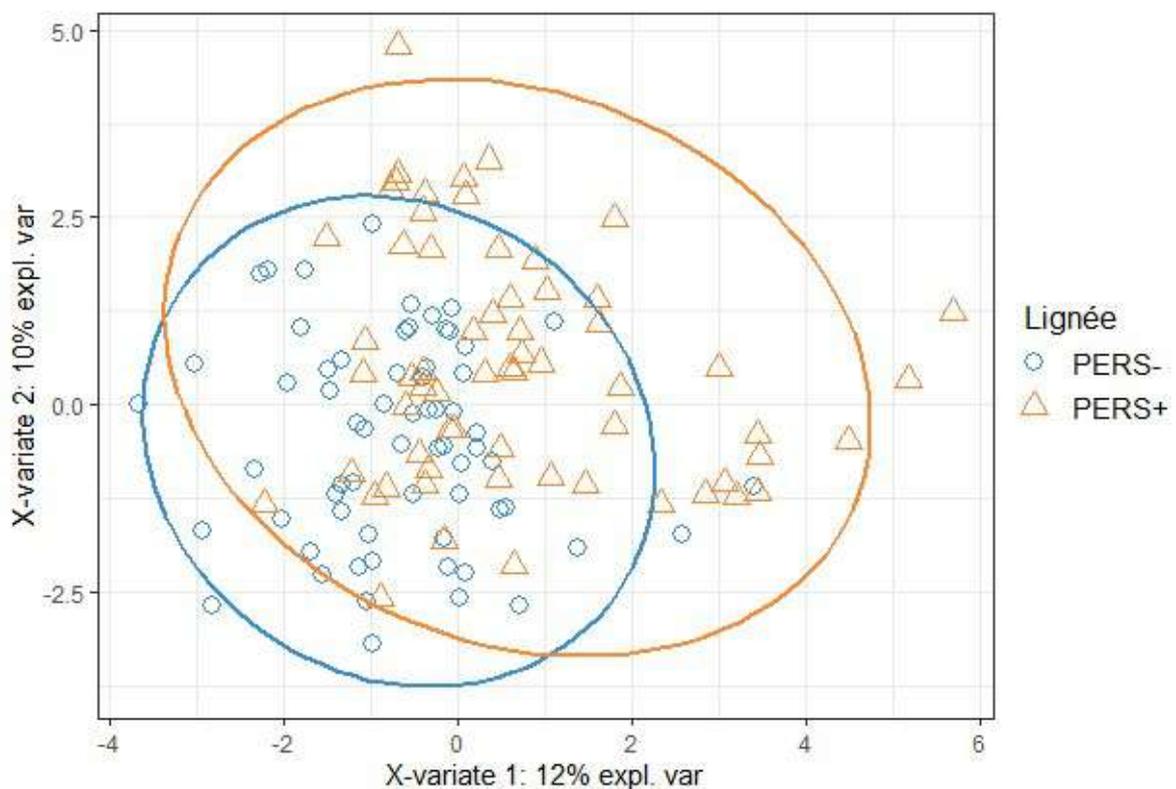


Figure 28 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction de la lignée

Les loading-values et leurs correspondances sont présentées par la figure 29. Elles correspondent aux « poids de charge » qu'exerce chaque variable sur chaque composante. Dans notre travail nous nous intéressons uniquement aux taxons bactériens dont la valeur absolue de loading value est supérieure à 0,2.

Ressortent de cette analyse uniquement 3 genres dont l'abondance relative dépasse la limite de détection de notre analyse (1 %) : *NK4A214 group* de la famille des *Oscillospiraceae*, et les genres *Lachnospiraceae NK3A20 group* et *Acetitomaculum* de la famille des *Lachnospiraceae*.

Les OTU regroupés par genre, identifiés par la sPLS, ont fait l'objet d'une analyse plus poussée grâce au modèle présenté dans le paragraphe II-C. Toutes les différences numériques sont faibles bien que significatives, comme l'illustre la figure 30. Aussi, certains de ces genres appartenant à la même famille, nous avons poursuivi notre analyse à ce niveau taxonomique.

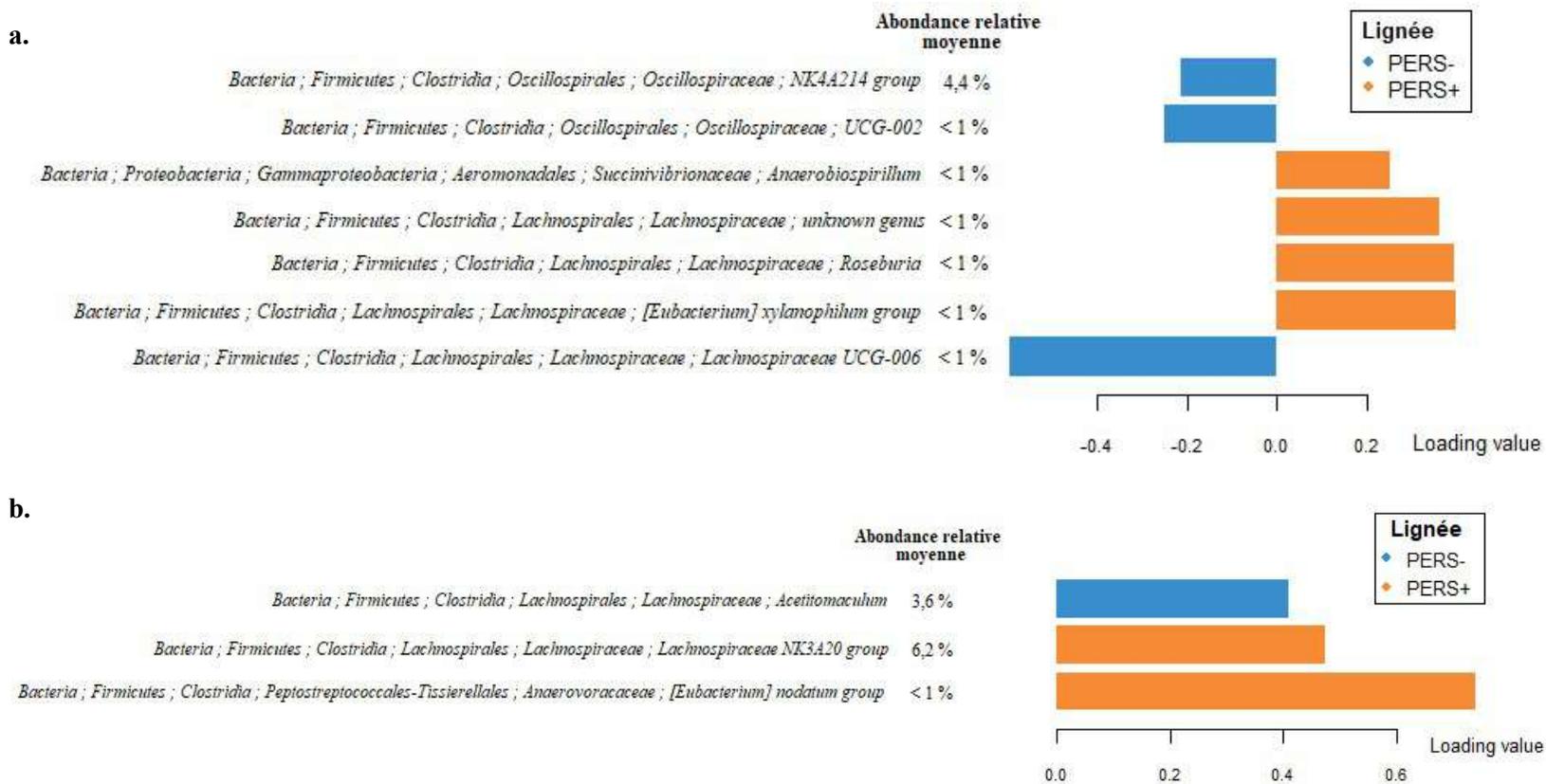


Figure 29 - Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction des lignées PERS- et PERS+, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes

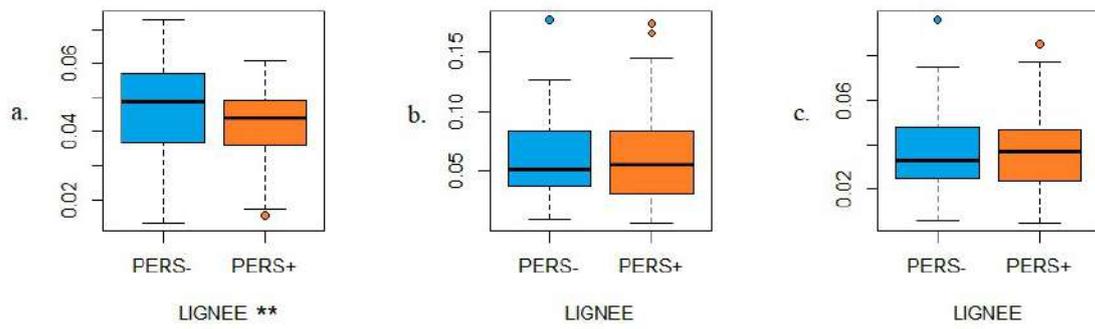


Figure 30 – Boxplots de la distribution des abondances relatives des genres *NK4A214* group (fig a.), et *Lachnospiraceae NK3A20* group (fig. b.) et *Acetitomaculum* (fig. c.) selon la lignée (\* P-value < 0.05 ; \*\* P-value < 0.01 ; \*\*\* P-value < 0.001)

## b- Échelle des familles

La figure 31 constitue la représentation graphique en nuage de point de l'analyse sPLS-DA de nos données, à l'échelle des familles et avec la lignée comme facteur discriminant. Elle a été réalisée également à partir des 2 premières composantes, mais la composante 1 a une part explicative beaucoup plus importante (21 % versus 5 %). Cependant on n'observe pas de distinction nette entre les deux nuages de points.

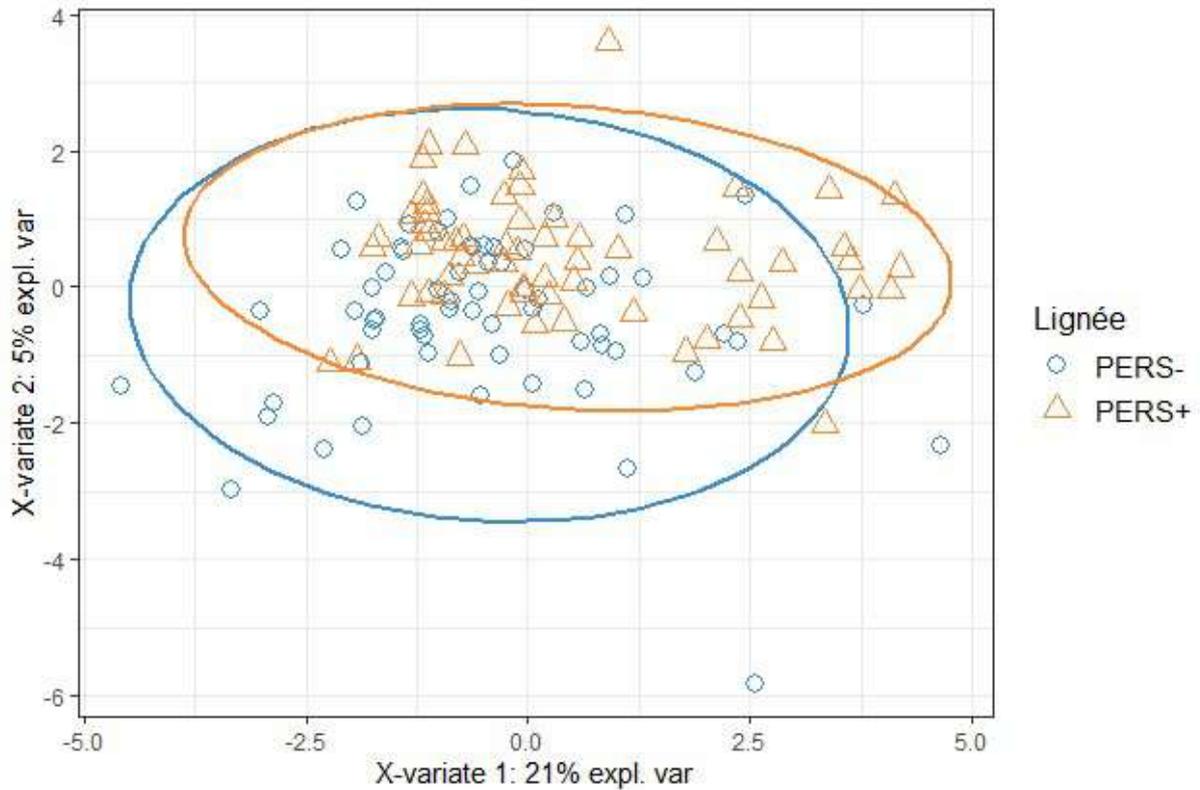
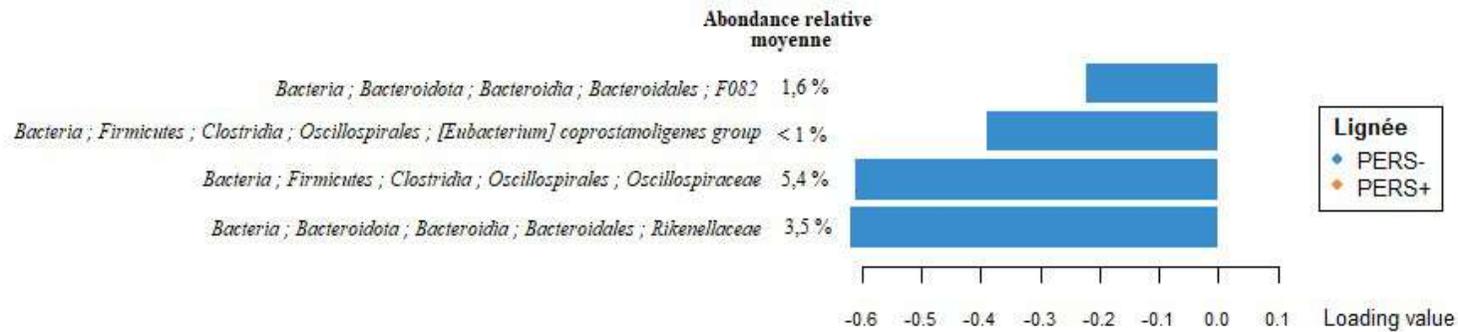


Figure 31 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des familles en fonction de la lignée

Les loading-values et leurs correspondances sont présentées par la figure 32.

a.



b.

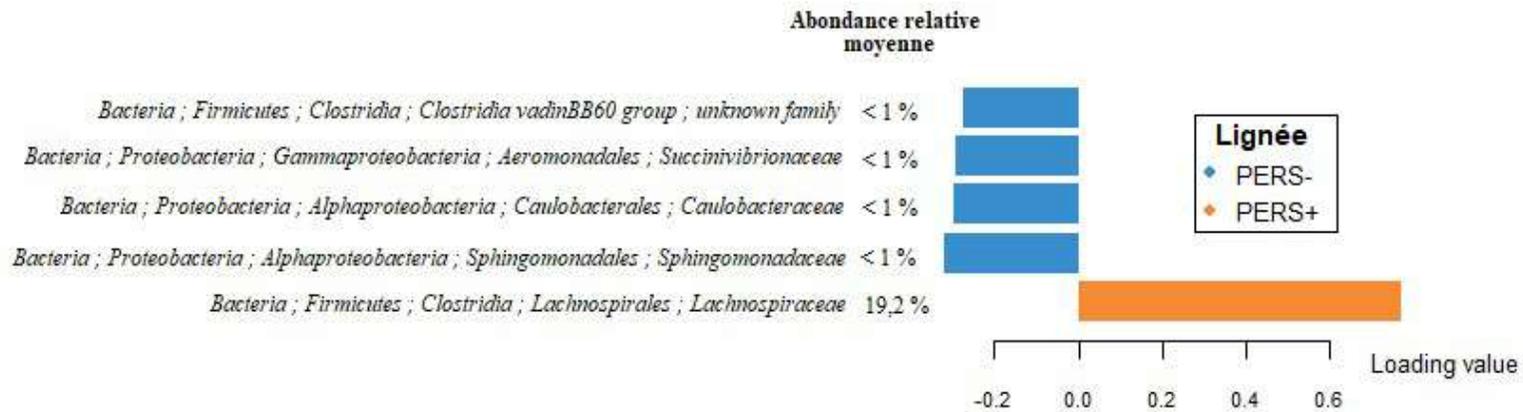


Figure 32–Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des familles en fonction des lignées PERS- et PERS+, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes

Parmi les familles discriminant le plus nos lignées sur la composante 1, on retrouve la famille des *Oscillospiraceae*, mais également les *Rikenellaceae* et *F082*. En ce qui concerne la composante 2, on retrouve la famille des *Lachnospiraceae*.

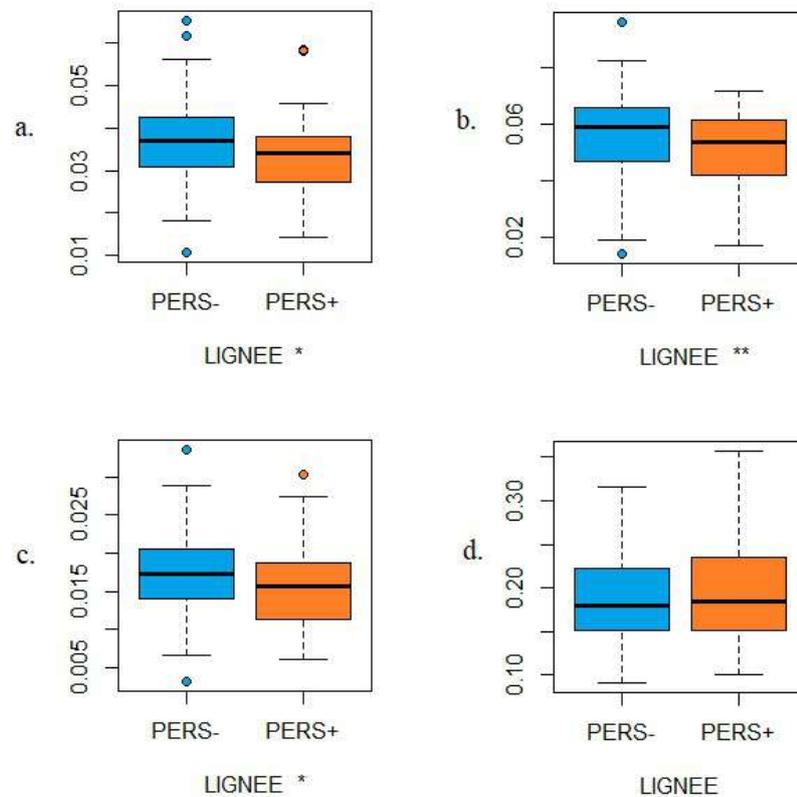


Figure 33 - Boxplots de la distribution des abondances relatives des familles *Rikenellaceae* (fig. a.), *Oscillospiraceae* (fig. b.), *F082* (fig. c.) et *Lachnospiraceae* (fig. d.) selon la lignée (\* P-value < 0.05 ; \*\* P-value < 0.01 ; \*\*\* P-value < 0.001)

Quatre des familles identifiées en sPLS présentent des valeurs supérieures à 1 % des séquences totales. Néanmoins là encore la différence numérique entre les 2 lignées est faible (Figure 33), et ne permet donc pas d'interprétation claire.

### c- Conclusion partielle

L'analyse sPLS-DA de nos données à deux niveaux taxonomiques n'a pas permis la mise en évidence d'une différence évidente d'abondances relatives de bactéries selon la lignée PERS- et PERS+. Nos résultats ne sont cependant pas inexistantes, puisque nous avons observé que les *Oscillospirales*, dont la famille des *Oscillospiraceae*, sont retrouvées dans les 2 niveaux d'approche. Elles sont présentes en plus grande abondance relative dans les échantillons obtenus chez les animaux PERS-.

## 2- Lien entre rang de lactation et bactéries du microbiote ruminal

### a- Échelle des genres

La représentation graphique en nuage de point de l'analyse sPLS-DA de nos données, à l'échelle des genres en prenant comme facteur discriminant le rang de lactation, est présentée en figure 34.

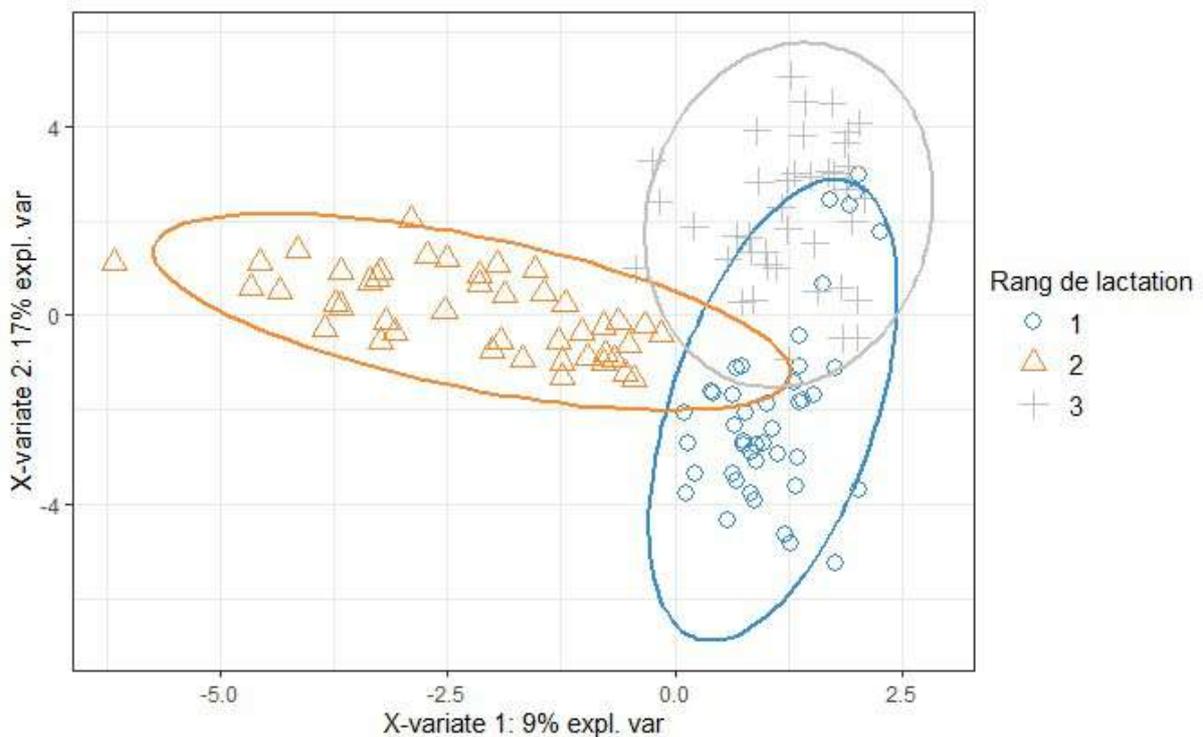


Figure 34 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction du rang de lactation

La part de variabilité expliquée par la composante 2 est plus importante que celle de la composante 1 dans ce cas.

Cette représentation graphique nous permet d'identifier deux choses :

- sur l'axe des abscisses on note la séparation de deux amas de nuages. La composante 1, expliquant 9 % de la variabilité, permet donc de différencier deux groupes, avec d'un côté les échantillons de la deuxième lactation, et de l'autre les échantillons des lactations 1 et 3. Cette différence entre les deux groupes nous fait penser à la différence de « run de séquençage » déjà évoquée.
- sur l'axe des ordonnées on a une distinction des trois groupes : la composante 2 permet de séparer les lactations 1, 2 et 3, avec une part explicative de variabilité de 17 %.

L'étude des loading values est réalisée via la figure 35.

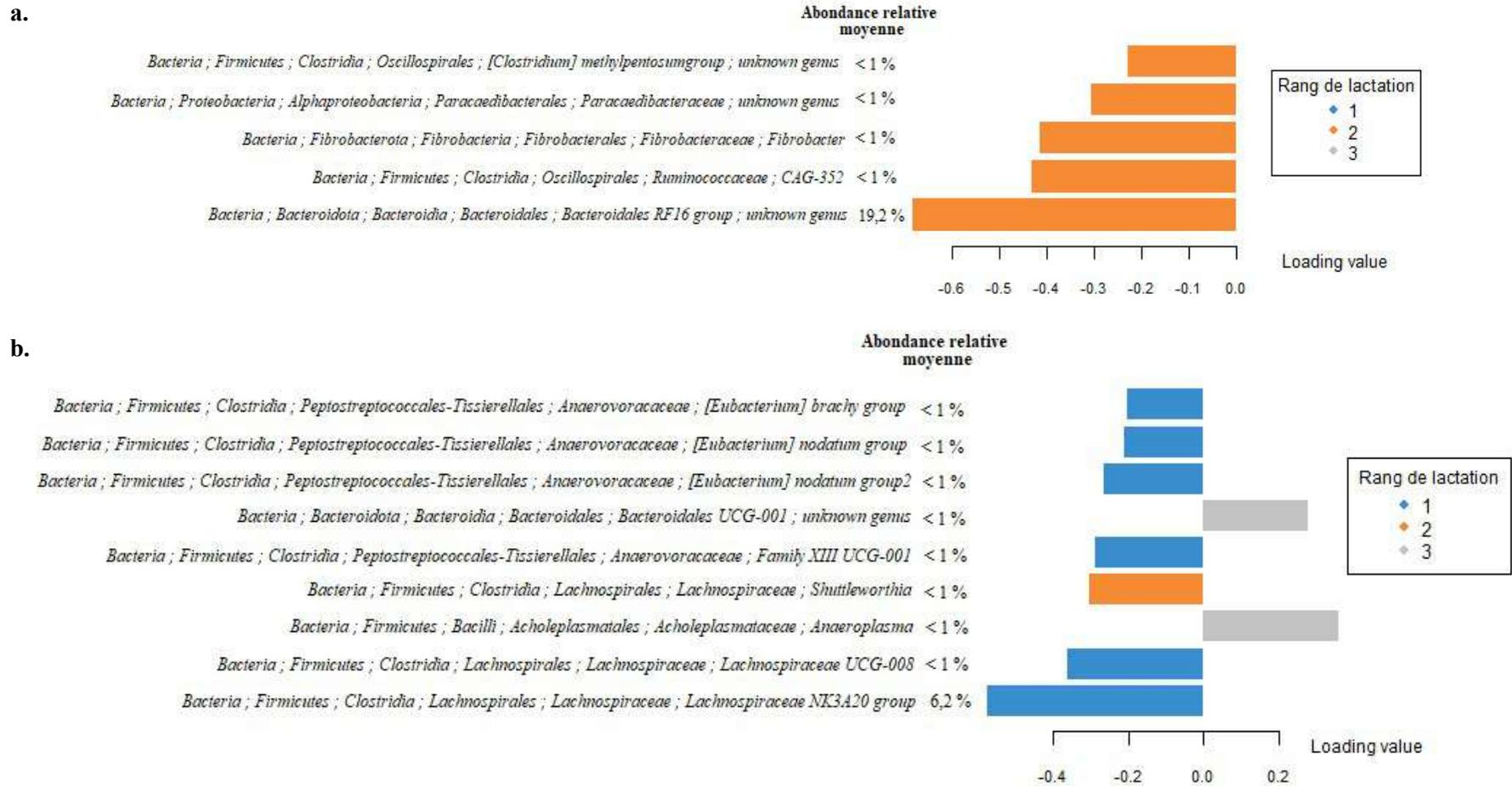


Figure 35 - Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction des rangs de lactation 1,2 et 3, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes

Deux genres dont l'abondance relative est supérieure à 1 % se distinguent par notre analyse :

- un genre inconnu de la famille *Bacteroidales RF16 group* selon la composante 1,
- le genre *Lachnospiraceae NK3A20 group* de la famille des *Lachnospiraceae* selon la composante 2.

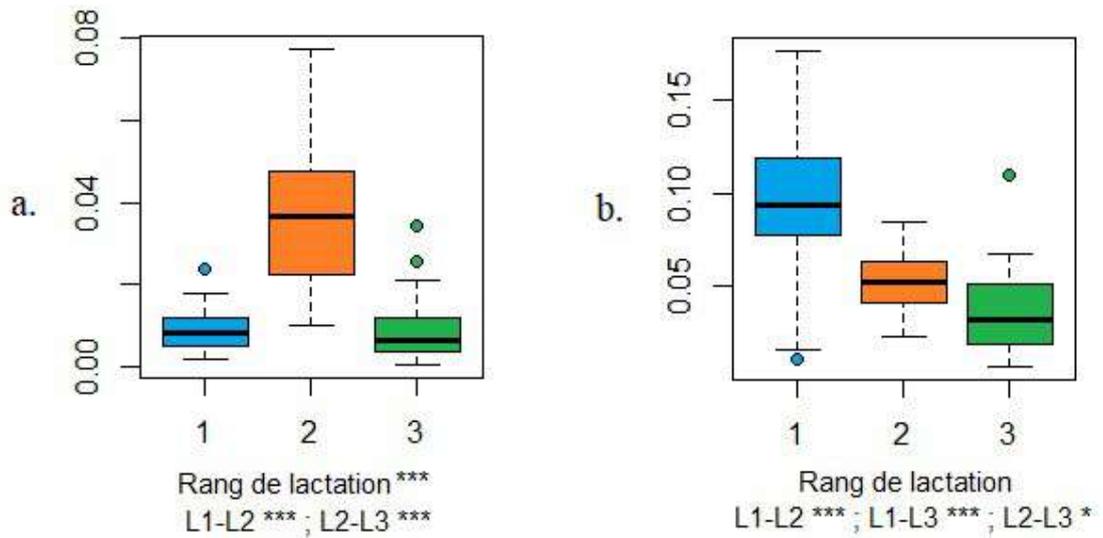


Figure 36 – Boxplots de la distribution des abondances relatives des genres *unknown genus* de la famille *Bacteroidales RF16 group* (fig. a.) et *Lachnospiraceae NK3A20 group* (fig. b.) selon le rang de lactation (\* P-value < 0.05 ; \*\* P-value < 0.01 ; \*\*\* P-value < 0.001)

Pour chacun de ces genres les différences numériques sont significatives et suffisamment importantes pour être interprétées (Figure 36). On observe :

- une abondance relative plus importante de bactéries du genre inconnu de la famille *Bacteroidales RF16 group* en deuxième lactation que pour les autres.
- à chaque lactation successive l'abondance en bactéries du genre *Lachnospiraceae NK3A20 group* diminue. Une évolution lente de la composition du microbiote ruminal avec l'âge de l'animal peut expliquer cette variation.

b- Échelle des familles

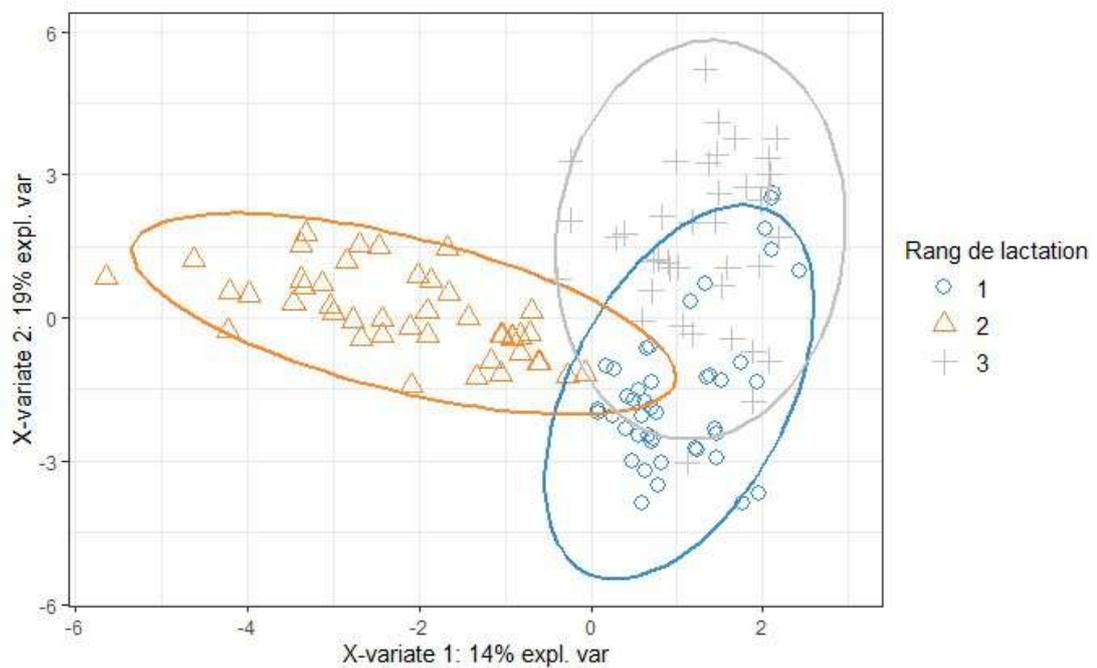


Figure 37 - Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données du microbiote ruminal à l'échelle des familles en fonction du rang de lactation

La représentation graphique de notre analyse à l'échelle des familles (Figure 37) nous permet, tout comme à l'échelle des genres, de distinguer 3 nuages de points, un pour chacun des rangs de lactation, avec :

- sur l'axe des abscisses, encore une fois d'un côté les échantillons de la deuxième lactation, et de l'autre les échantillons des lactations 1 et 3 (effet « run de séquençage » probable),
- sur l'axe des ordonnées, toujours une démarcation des trois groupes L1, L2 et L3.

Les parts de variabilité expliquées par les deux composantes sont similaires, et les loading values associées sont représentées par la figure 38.

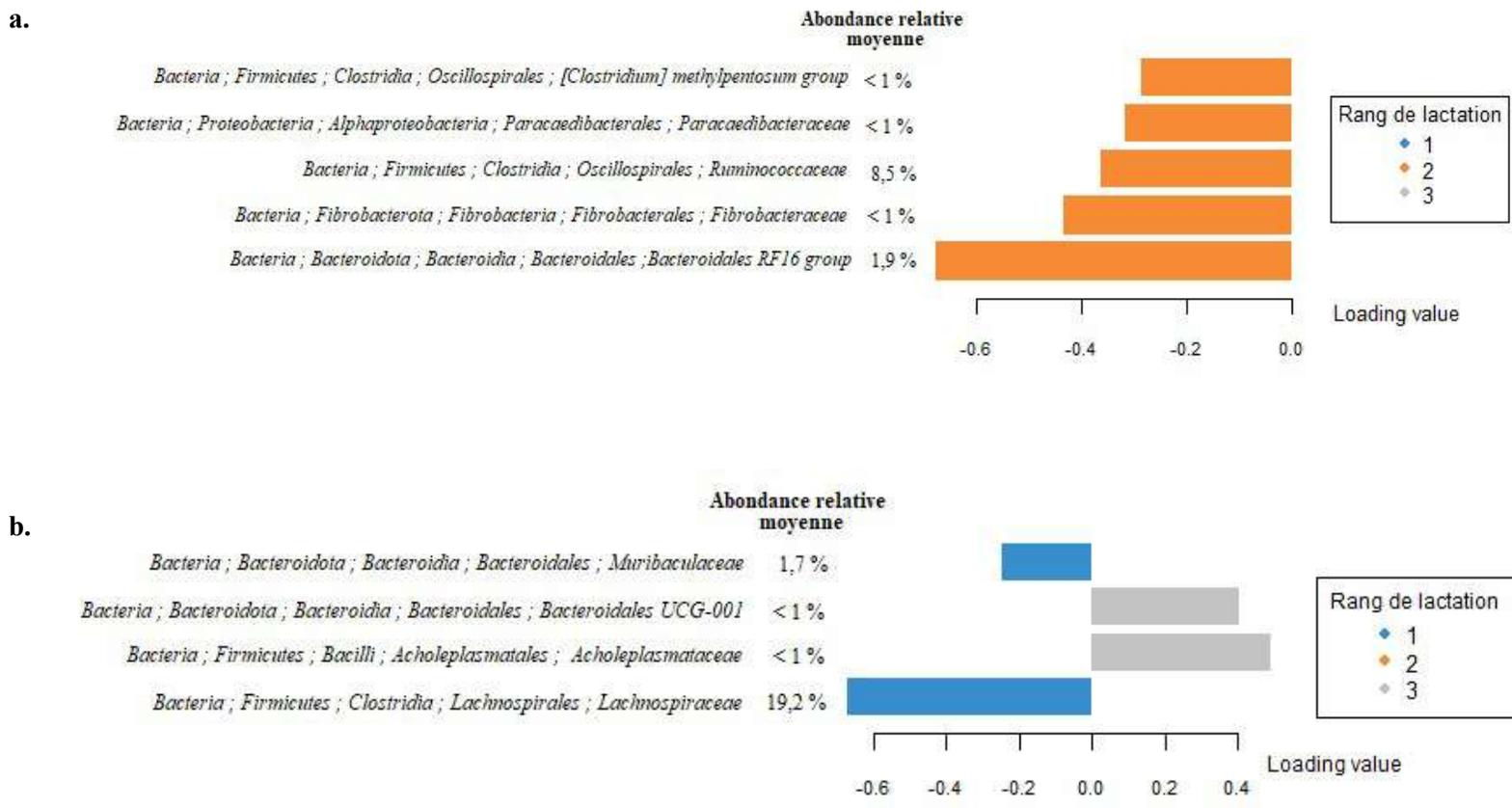


Figure 38 - Représentation graphique des loading values issues des composantes 1 (fig a.) et 2 (fig b.) de l'analyse sPLS-DA du microbiote ruminal à l'échelle des genres en fonction des rangs de lactation 1,2 et 3, associées aux abondances relatives moyennes correspondantes

Selon la composante 1, les familles *Bacteroidales RF16 group* et *Ruminococcaceae* sont discriminantes du rang de lactation. De plus, leurs abondances sont significativement différentes avec des écarts numériques importants (Figure 39). Elles permettent donc de différencier les échantillons selon leur appartenance au groupe L2 (où elles sont plus abondantes) ou au groupe L1+L3 (où elles le sont moins). Tout comme à l'échelle des genres, cette évolution des abondances est difficilement interprétable biologiquement, et l'hypothèse la plus probable est le biais amené par le « run de séquençage » distinct des échantillons du groupe L2. On se doit cependant de noter une différence significative d'abondance relative de la famille *Ruminococcaceae* entre les groupes L1 et L3.

Selon la composante 2 ce sont les familles *Lachnospiraceae* et *Muribaculaceae* qui discriminent le mieux le rang de lactation : leurs abondances relatives baissent de manière significative à chaque nouveau rang de lactation. Ces deux familles voient donc diminuer leur présence dans le rumen avec l'âge des animaux.

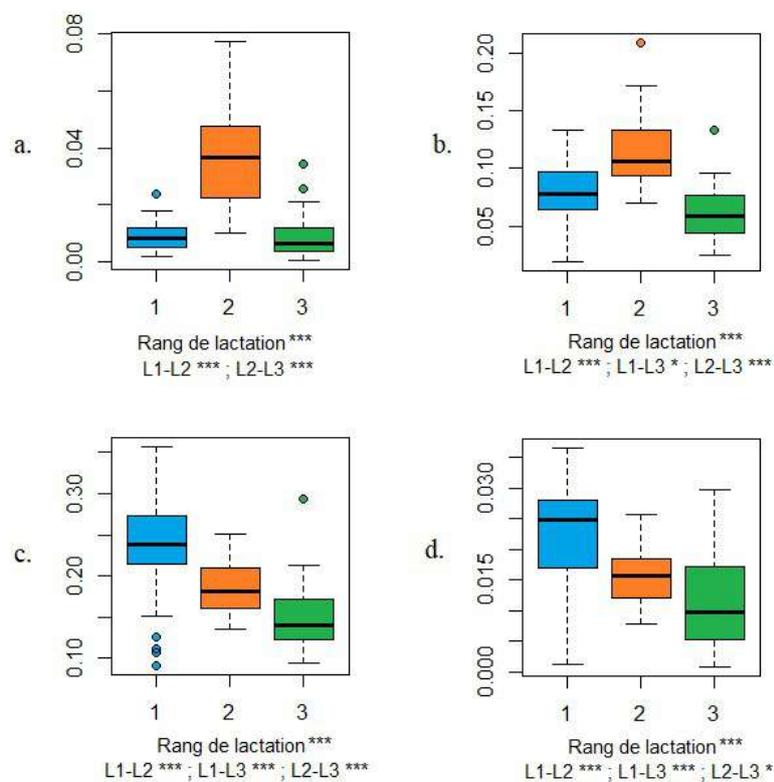


Figure 39 - Boxplots de la distribution des abondances relatives des familles *Bacteroidales RF16 group* (fig. a.), *Ruminococcaceae* (fig.b.), *Lachnospiraceae* (fig. c.) et *Muribaculaceae* (fig. d.) selon le rang de lactation (\* P-value < 0.05 ; \*\* P-value < 0.01 ; \*\*\* P-value < 0.001)

### c- Conclusion partielle

Aux deux échelles d'étude la composante 1 sépareit les groupes L2 et L1+L3, ceci étant expliqué par l'effet «run de séquençage». Les informations que l'on peut tirer des données sont donc ininterprétables.

En ce qui concerne la composante 2 les choses sont différentes, puisque les trois groupes sont distinguables. Le genre *Lachnospiraceae NK3A20 group* de la famille des *Lachnospiraceae* est un marqueur fort de distinction du rang de lactation (loading value de -0.57), et son abondance relative diminue de manière significative à chaque lactation. On retrouve les *Lachnospiraceae* à l'échelle des familles, avec une diminution significative de l'abondance relative au fur et à mesure des lactations, tout comme la famille des *Muribaculaceae*.

## IV- Discussion

### A- Effet de la lignée sur les variables étudiées

Les animaux appartenant au groupe PERS – semblent posséder un microbiote ruminal plus diversifié que les animaux du groupe PERS+, mais cette différence n'atteint pas le niveau de significativité à 5 %.

Au sein de chaque lignée, les microbiotes ruminiaux sont plus proches les uns des autres ( $\beta$ -diversité).

Ces résultats, mis à la lumière des travaux récemment évoqués, nous laissent établir les hypothèses suivantes :

- les animaux d'une même lignée héritent d'un microbiote ruminal proche génétiquement,
- le microbiote des animaux PERS– étant plus diversifié, il peut être considéré au premier abord comme utilisateur de plus de voies métaboliques. Ce qui, selon certains auteurs, pourrait diminuer l'efficacité du métabolisme digestif, et donc abaisser l'efficacité de production laitière. Ce mécanisme pourrait être concomitant à une moindre performance purement génétique des animaux.

En ce qui concerne la composition même du microbiote, les animaux de la lignée PERS+ comptent une abondance relative significativement plus faible en bactérie de la famille des *Oscillospiraceae*, notamment du genre *NK4A214 group*. Cette famille de bactéries contient le genre *Oscillospira*, dont l'héritabilité est élevée (Marie-Etancelin C et al., 2018), ce qui vient renforcer notre idée d'un possible lien fort avec la lignée d'origine. Peu étudiée, la famille des *Oscillospiraceae* a cependant été décrite comme productrice de C4, et utilisatrice de nombreuses voies de métabolisation des glucides (Gophna et al., 2017 ; Neves et al., 2020). Les travaux de Miettinen, Huhtanen (1996) sur le rapport C3/C4 ruminal avait mis en évidence une production laitière plus élevée quand le taux de C4 diminuait : ceci pourrait constituer une piste d'explication de nos observations en termes de persistance laitière.

### B- Effet du rang de lactation sur les variables étudiées

L'interprétation des résultats de nos analyses en terme de rang de lactation a été compliquée par le biais appelé effet « run de séquençage ». En effet, on a vu apparaître contre toute logique biologique, une différence forte entre les groupes L2 et L1 + L3, et ce sur plusieurs points dont nous discuterons.

Si les indices de Shannon et de Simpson ont montré des différences significatives en fonction du rang de lactation, leurs valeurs numériques sont très proches et empêchent leur interprétation. L'analyse de la  $\beta$ -diversité a quant à elle révélé une proximité métagénomique entre les échantillons prélevés lors de la même lactation.

L'étude des abondances relatives des bactéries selon le rang de lactation a été très touchée par l'effet « run de séquençage », rendant ininterprétables les données des composantes 1 des sPLS-DA à la fois à l'échelle des genres et des familles. La composante 2 est peu touchée par ce biais, et révèle des données intéressantes :

- le genre *Lachnospiraceae NK3A20 group*, représentant en moyenne plus de 6 % des bactéries ruminales, est très bien corrélé au rang de lactation, de manière négative (i.e. plus le rang de lactation augmente, plus l'abondance de ce genre diminue). La famille d'appartenance de ce

genre, les *Lachnospiraceae*, est également corrélée négativement au rang de lactation. Jewell et al. (2015) avaient déjà identifié une variation significative de l'abondance de cette famille chez des bovins Prim'Holstein, mais en faveur d'une augmentation entre L1 et L2. Cette famille héberge notamment *L. multiparus*, impliquée principalement dans la dégradation de la pectine des végétaux. Cependant aucun lien biologique avec le rang de lactation ou l'âge n'est reconnu.

- la famille des *Muribaculaceae* est également fortement corrélée négativement au rang de lactation. Les bactéries de cette famille sont essentiellement connues pour être prédominantes dans le tube digestif distal des souris (Lagkouvelos et al., 2019), mais demeurent peu étudiées. Elles possèdent entre autres un ensemble souple et conséquent d'enzymes affectant les glucides. L'évolution de leur abondance relative au cours des trois premières lactations reste pour l'heure sans explication biologique.

### C- Biais d'étude subis par l'analyse de nos résultats

Plusieurs travaux déjà évoqués ont mis en évidence des différences de résultats selon la nature du prélèvement ruminal : solide, liquide ou le mélange des deux. Notre travail ayant été réalisé sur des animaux vivants, les contraintes matérielles n'ont pas permis de séparer strictement les phases ruminales, comme certains travaux l'ont fait à partir de cadavres. Les différents échantillons ne sont donc pas strictement identiques en termes de substrat prélevé, pouvant générer un biais.

Les chantiers de prélèvement ayant été organisés à près d'un an d'intervalle, les horaires de prélèvement ne sont pas totalement comparables d'une année sur l'autre et sont significativement différents selon le rang de lactation ( $P$ -value < 0.001). Une confusion entre les deux effets peut donc être faite.

Notre étude a été réalisée sur les mêmes animaux durant les trois lactations successives. La construction même de notre modèle expérimental entraîne dès lors une confusion entre le rang de lactation et l'année de prélèvement. Cela signifie que toute modification extérieure entre deux années peut venir biaiser nos résultats. C'est le cas notamment de l'alimentation, qui, malgré toute bonne volonté, est dépendante de la qualité des aliments qui varie chaque année. Or de nombreux travaux déjà explicités démontrent que l'alimentation est le premier facteur de variation du microbiote ruminal.

Enfin, comme indiqué de nombreuses fois au cours des pages précédentes, le décalage temporel entre les séquençages des groupes L2 et L1 + L3 a sans aucun doute été responsable d'une orientation des résultats qui a rendu plus difficile l'exploitation de nos données. Si des études avaient montré l'existence de variations des résultats selon les méthodes d'extraction et de séquençage, nous avons probablement été témoins d'un effet similaire.

## CONCLUSION

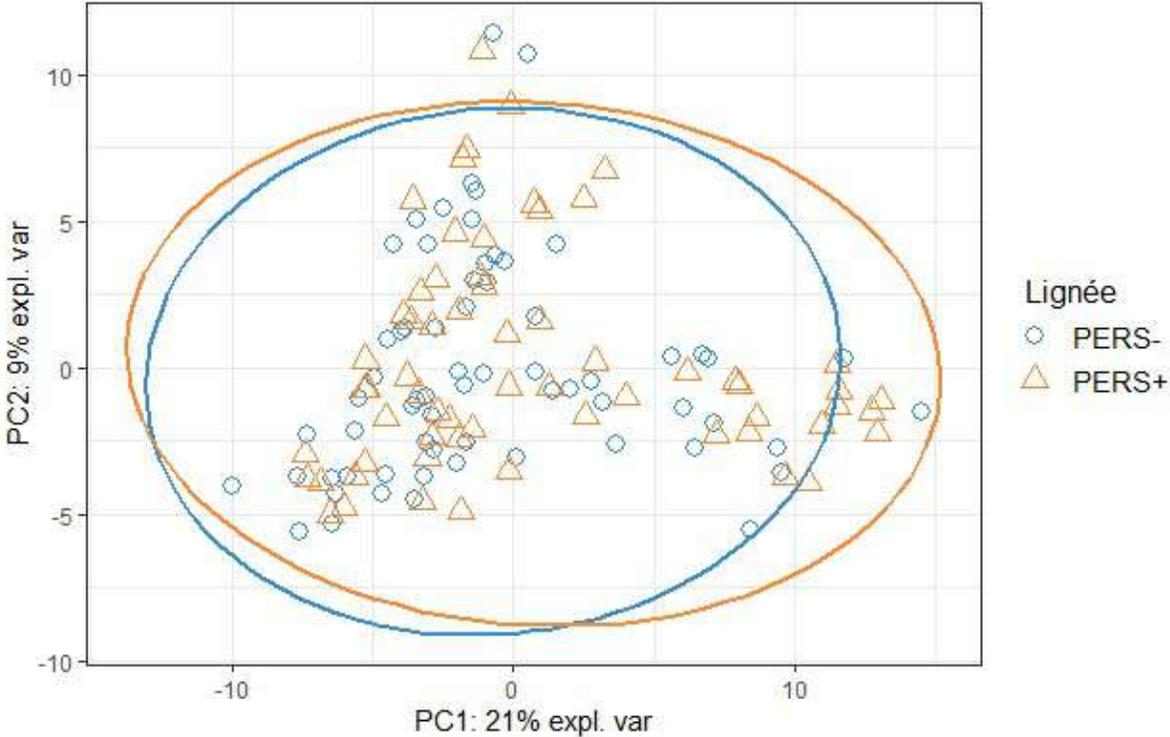
Les brebis Lacaune sont à la base de toute l'économie autour du fromage de Roquefort. Le rumen constitue le plus grand des pré-estomacs des ruminants, et est le siège des très nombreuses réactions enzymatiques digestives, grâce aux micro-organismes le colonisant, en particulier les bactéries. L'avancée des connaissances sur ce microbiote ruminal a été fortement accélérée par l'apparition des nouvelles techniques « Omics ». Si l'alimentation est le premier facteur de variation de ce microbiote, des effets physiologiques tels que l'âge ou le rang de lactation, ou pathologiques (acidose), peuvent également apporter des modifications dans sa composition. De plus, plusieurs travaux ont démontré de nombreux liens entre les caractères de production et les abondances relatives des différentes espèces, avec un rôle important joué par la génétique.

Les objectifs de notre étude étaient d'analyser les variations du microbiote ruminal de brebis Lacaune en fonction de leur lignée génétique basée sur leur persistance laitière, sur trois lactations successives. Si nous n'avons pas établi de différences significatives de l' $\alpha$ -diversité entre les différents groupes de l'étude, nous avons tout de même pu mettre en évidence des proximités de composition microbiotale au sein des groupes en fonction de la lignée et du rang de lactation ( $\beta$ -diversité). Des analyses plus poussées ont également permis de rechercher les familles et les genres bactériens pouvant discriminer la lignée et le rang de lactation d'appartenance des échantillons. C'est ainsi que la famille des *Oscillospiraceae* apparaît comme significativement moins abondante dans le rumen des brebis de lignée PERS+, notamment le genre *NK4A214 group*. En ce qui concerne le rang de lactation, et malgré des difficultés d'interprétation dues en particulier à l'existence d'un effet « run de séquençage », deux familles voient leur abondance diminuer de manière significative au fil du temps : *Muribaculaceae* et *Lachnospiraceae*. Ces données constituent à notre connaissance les premiers résultats sur plusieurs lactations chez les ovins. Ils permettent de faire avancer la compréhension des interactions de tous ces effets sur les performances des brebis.

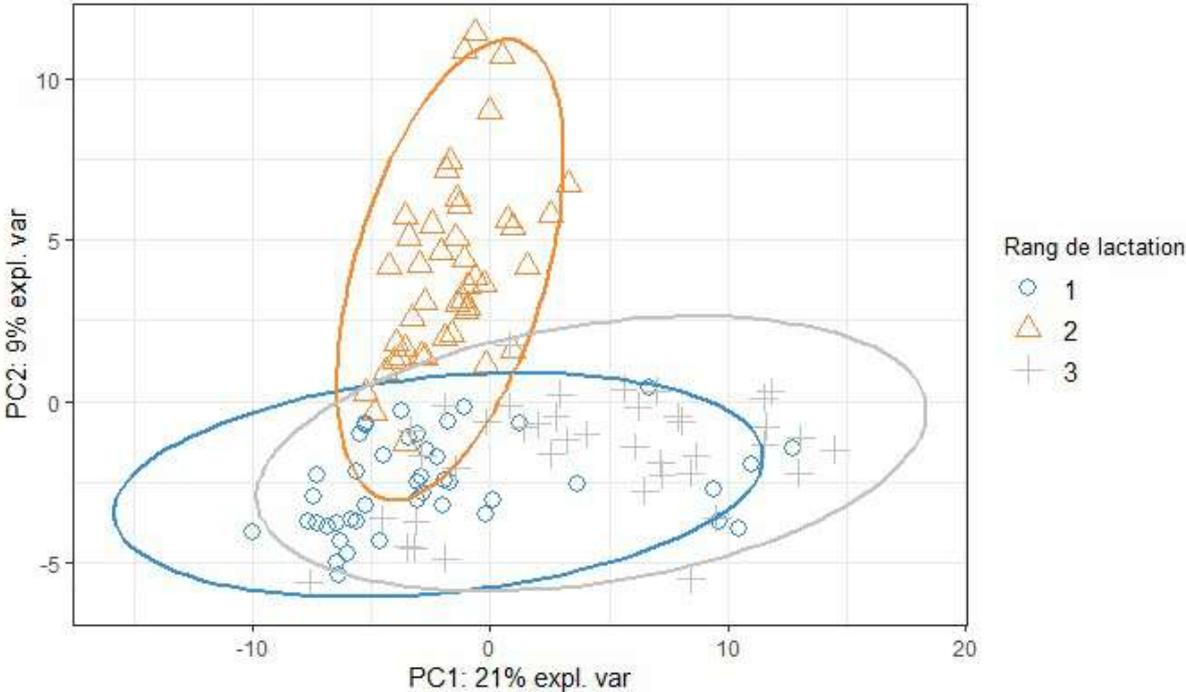
Les connaissances du microbiote ruminal, de ses variations, de son héritabilité et de ses effets sur le métabolisme et les performances des ruminants sont de plus en plus précises, ouvrant la porte à de nouvelles méthodes de sélection et d'élevage. Si les probiotiques sont depuis longtemps utilisés à des fins thérapeutiques, ils commencent également à être utilisés pour optimiser l'efficacité alimentaire des ruminants.

# **ANNEXES**

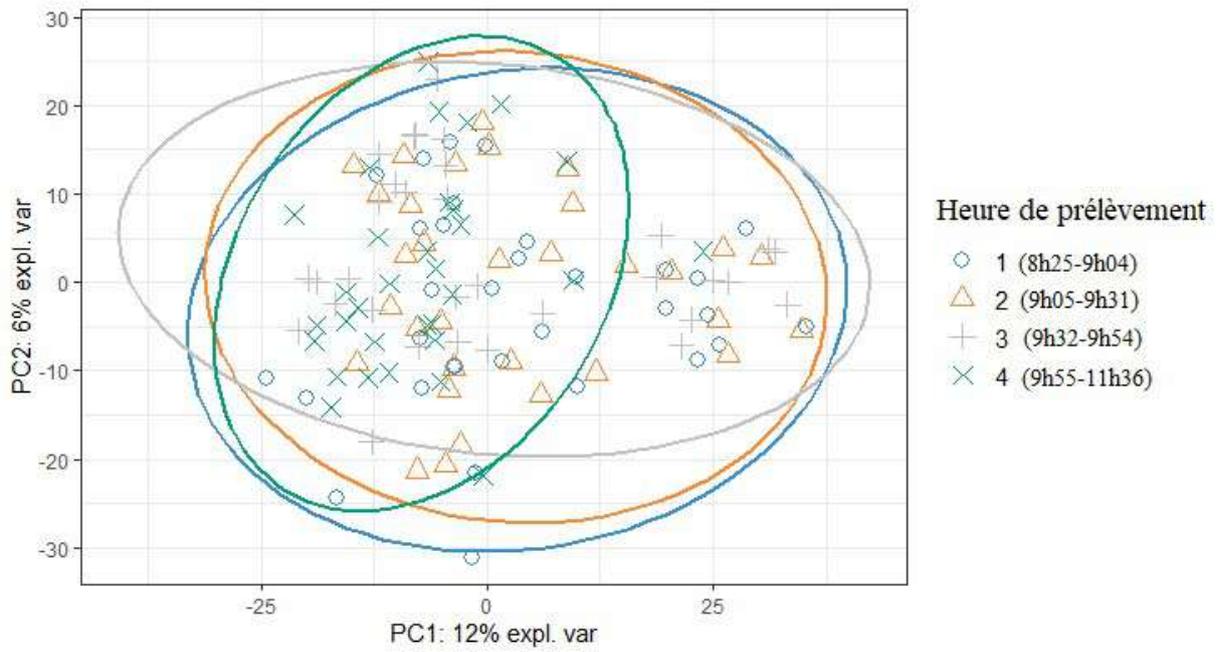
**Annexe 1 : Représentations graphiques des analyses par PCA de la composition du microbiote à l'échelle des OTU et des genres, selon les différents paramètres**



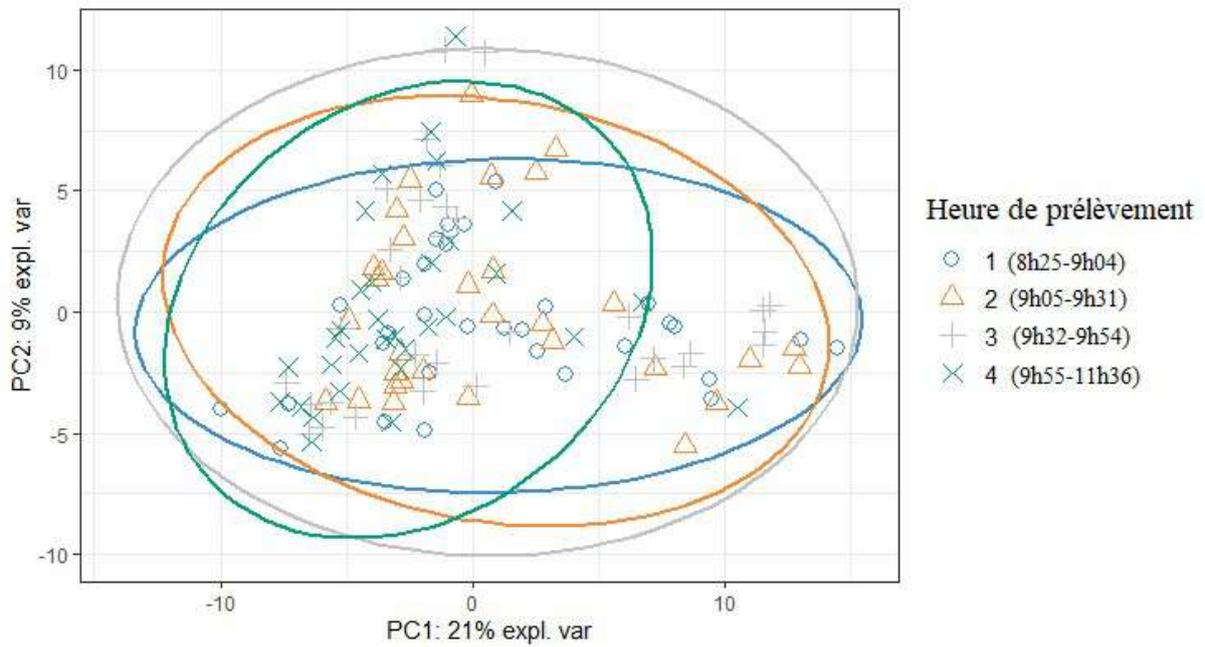
Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (genres) en fonction de leur lignée



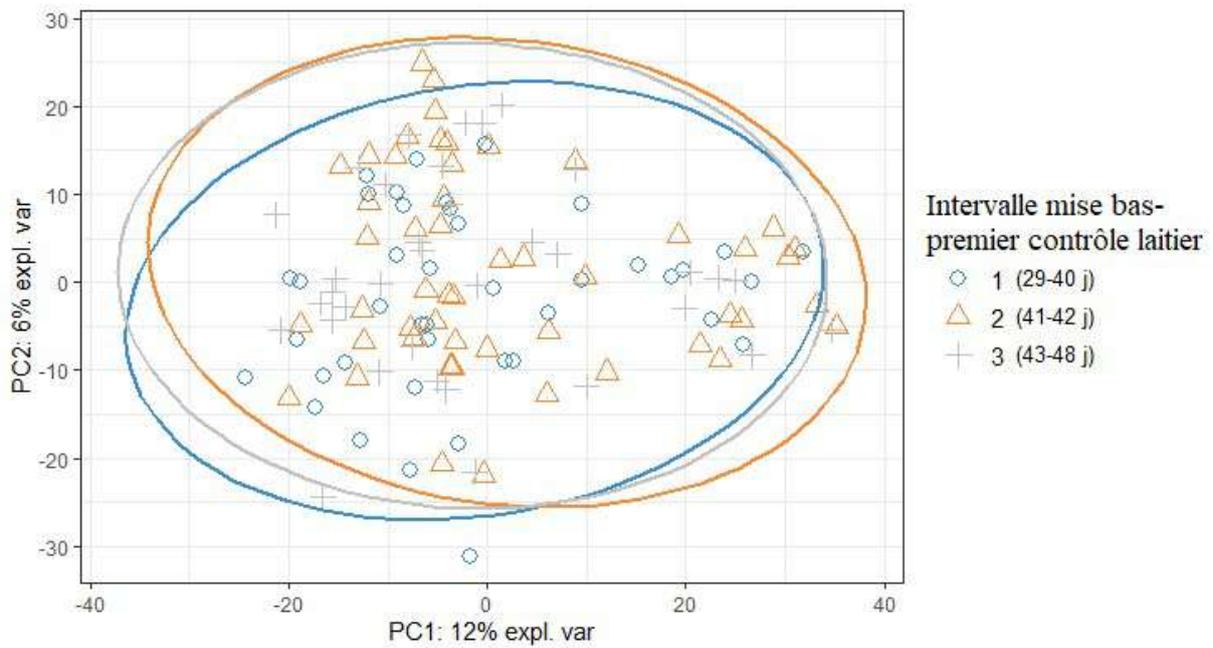
Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (genres) en fonction du rang de lactation



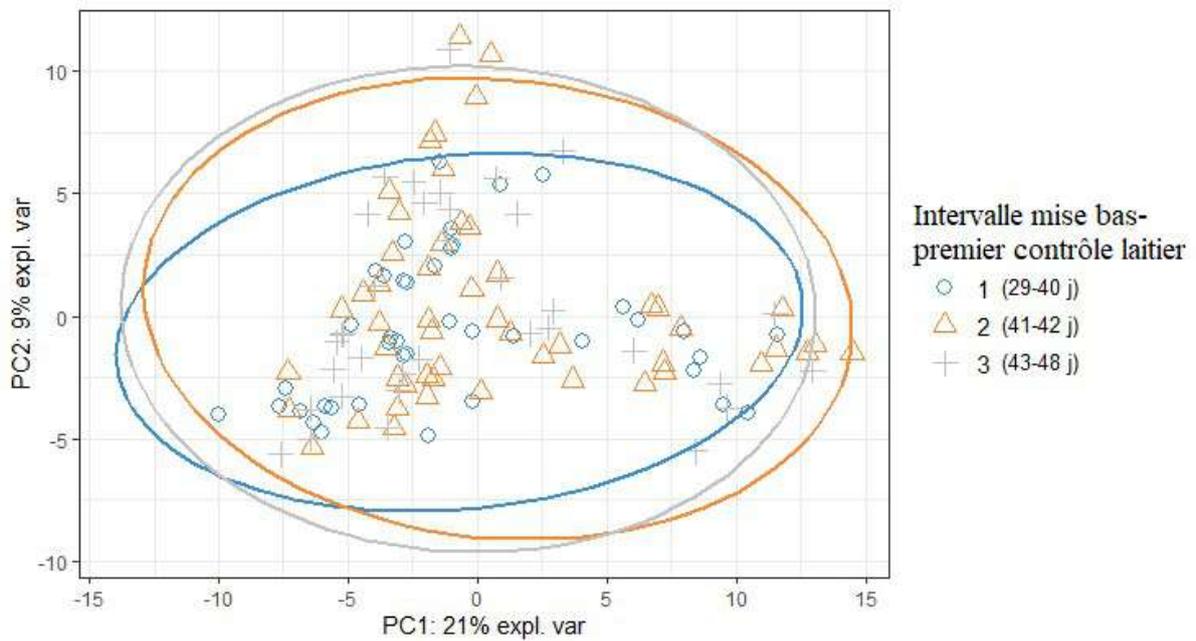
Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de l'heure de prélèvement



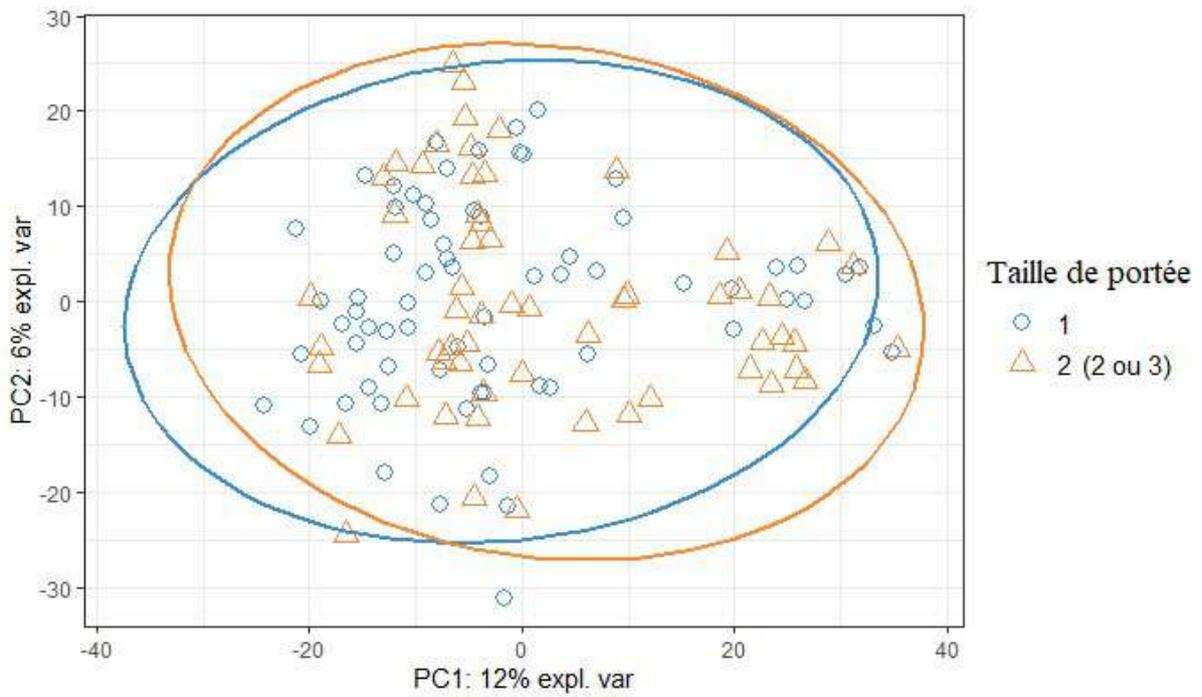
Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (genres) en fonction de l'heure de prélèvement



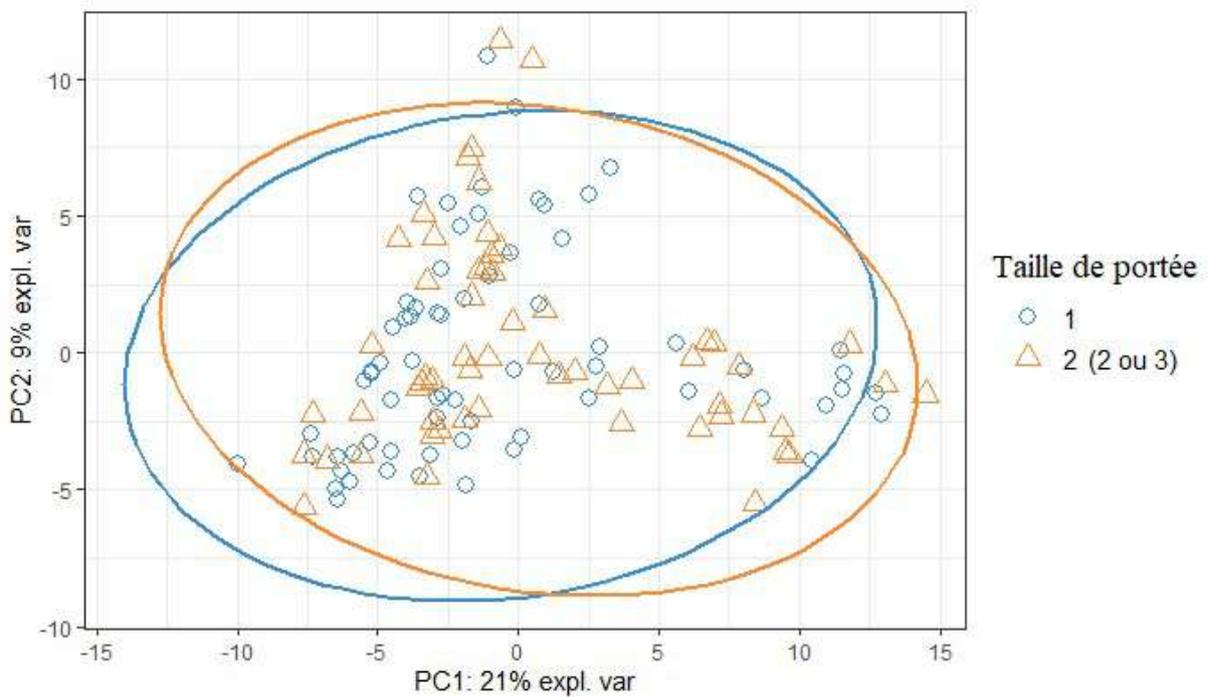
Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de l'intervalle mise bas-premier contrôle laitier



Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (genres) en fonction de l'intervalle mise bas-premier contrôle laitier



Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (OTU) en fonction de la taille de portée



Représentation graphique d'analyse par PCA de la composition du microbiote ruminal des brebis (genres) en fonction de la taille de portée

## Annexe 2 : Tables ANOVA des indices d' $\alpha$ -diversité en fonction des variables du modèle

Table ANOVA de l'indice de diversité « Observed » en fonction des variables du modèle

	Df	SumSq	MeanSq	F value	Pr(>F)
No lact	2	28734	14367	1.707	0.186
LIGNEE	1	28571	28571	3.394	0.068 .
Heure	3	35059	11686	1.388	0.250
IM1C	2	71953	3597	0.427	0.653
Portée	1	17011	17011	2.021	0.158
Nolact :LIGNEE	2	12912	6456	0.767	0.467
Residuals	116	976372	8417		

Table ANOVA de l'indice de diversité « Shannon » en fonction des variables du modèle

	Df	SumSq	MeanSq	F value	Pr(>F)
No lact	2	0.634	0.3170	5.692	0.00438 **
LIGNEE	1	0.202	0.2019	3.624	0.05941 .
Heure	3	0.417	0.1389	2.493	0.06352 .
IM1C	2	0.064	0.0322	0.578	0.56275
Portée	1	0.132	0.1316	2.362	0.12701
Nolact :LIGNEE	2	0.067	0.0335	0.601	0.55004
Residuals	116	6.461	0.0557		

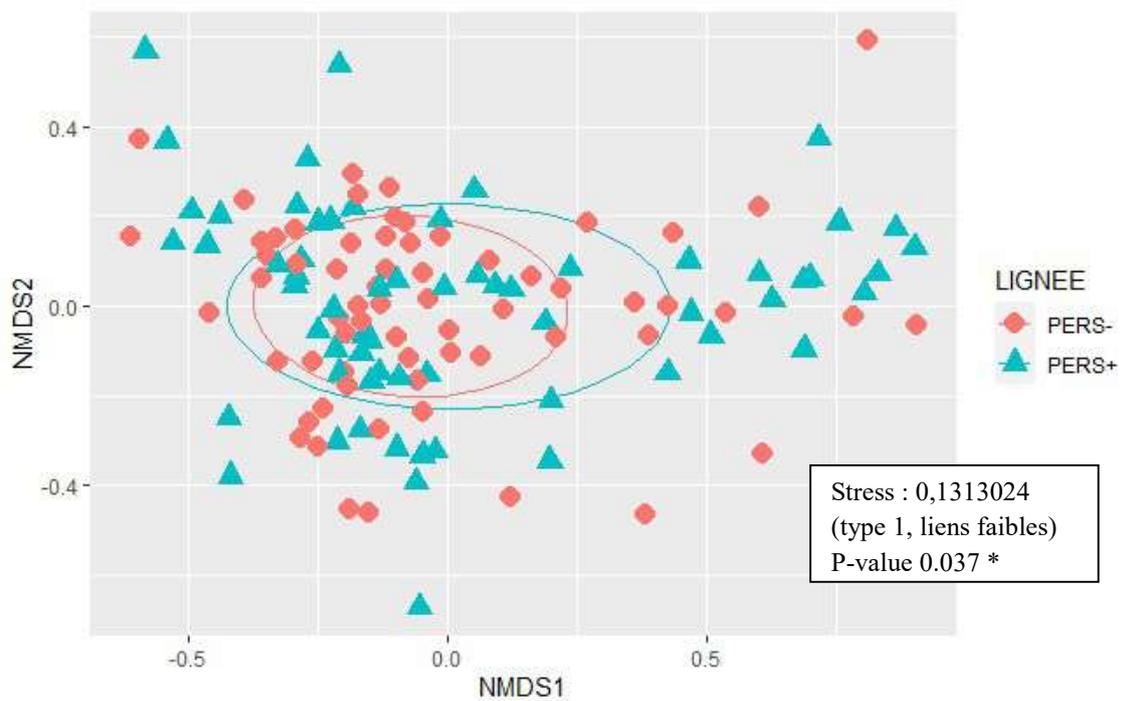
Table ANOVA de l'indice de diversité « Simpson » en fonction des variables du modèle

	Df	SumSq	MeanSq	F value	Pr(>F)
No lact	2	0.0002365	1.183 10 <sup>-4</sup>	5.160	0.00713 **
LIGNEE	1	0.0000257	2.565 10 <sup>-5</sup>	1.119	0.29225
Heure	3	0.0001534	5.112 10 <sup>-5</sup>	2.231	0.08833 .
IM1C	2	0.0000609	3.046 10 <sup>-5</sup>	1.329	0.56275
Portée	1	0.0000701	7.013 10 <sup>-5</sup>	3.060	0.08288 .
Nolact :LIGNEE	2	0.0000017	8.400 10 <sup>-7</sup>	0.037	0.96390
Residuals	116	0.0026584	2.292 10 <sup>-5</sup>		

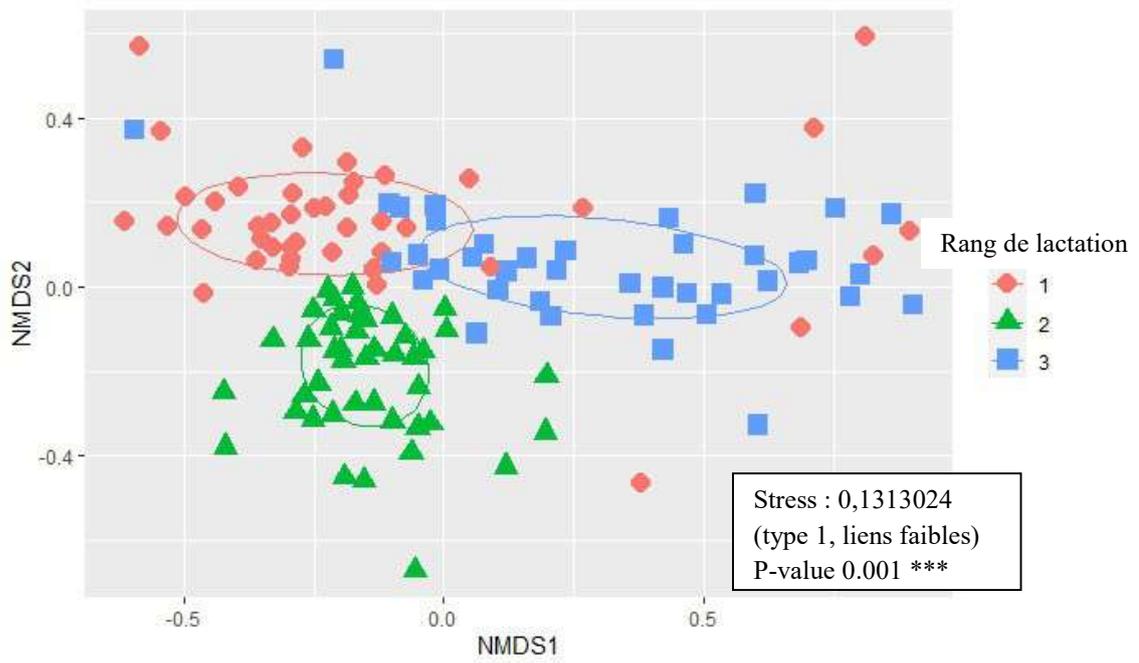
### Annexe 3 : résultats des analyses de la $\beta$ -diversité par la distance de Jaccard

Résultat de l'analyse PERMANOVA de la diversité (Jaccard) du microbiote ruminal en fonctions des différents paramètres étudiés

	Df	SumsOfSqs	MeanSqs	F. Model	R2	Pr(>F)
NoLact	2	3.5767	1.78833	11.2142	0.15121	0.001 ***
LIGNEE	1	0.2683	0.26825	1.6821	0.01134	0.037 *
Gr_heure	3	0.5329	0.17764	1.1139	0.02253	0.228
Gr_imlc	2	0.3097	0.15485	0.9711	0.01309	0.476
Nolact :LIGNEE	2	0.3075	0.15375	0.9641	0.01300	0.470
Residuals	117	18.6580	0.15947		0.78882	
Total	127	23.6530			1.00000	



Graphique en nuage de points représentant la  $\beta$ -diversité (Jaccard) du microbiote ruminal en fonction des lignées PERS- et PERS+



Graphique en nuage de points représentant la  $\beta$ -diversité (Jaccard) du microbiote ruminal en fonction des rangs de lactation 1, 2 et 3

## Bibliographie

- BAE, Kyun-Seop, 2020. *sasLM: « SAS » Linear Model* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 7 novembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://CRAN.R-project.org/package=sasLM>.
- BARICHIEVICH, E. M. et CALZA, R. E., 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* EB188. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 janvier 1990. Vol. 56, n° 1, p. 43-48.
- BARILLET, F. et BOICHARD, D., 1987. Studies on dairy production of milking ewes I. - Estimates of genetic parameters for total milk composition and yield. In : *Génétique sélection évolution*. 1987. Vol. 19, n° 4, p. 459-474.
- BARONE, R., 1996. *Anatomie comparée des mammifères domestique, tome 3. Splanchnologie I : appareil digestif et appareil respiratoire*. 4e édition. Paris : Vigot. ISBN 978-2-7114-9046-2.
- BAUCHOP, T., CLARKE, R. T. J. et NEWHOOK, J. C., 1975. Scanning Electron Microscope Study of Bacteria Associated with the Rumen Epithelium of Sheep. In : *Applied Microbiology*. octobre 1975. Vol. 30, n° 4, p. 668-675.
- BELENGUER, A., TORAL, P.G., FRUTOS, P. et HERVÁS, G., 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. In : *Journal of Dairy Science*. juillet 2010. Vol. 93, n° 7, p. 3275-3286. DOI 10.3168/jds.2010-3101.
- BERGMAN, E. N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. In : *Physiological Reviews*. avril 1990. Vol. 70, n° 2, p. 567-590. DOI 10.1152/physrev.1990.70.2.567.
- BERNALIER, Annick, FONTY, Gérard, BONNEMOY, Frédérique et GOUET, Philippe, 1993. Inhibition of the cellulolytic activity of *Neocallimastix frontalis* by *Ruminococcus flavefaciens*. In : *Microbiology*. 1993. Vol. 139, n° 4, p. 873-880. DOI 10.1099/00221287-139-4-873.
- BOKULICH, Nicholas A., SUBRAMANIAN, Sathish, FAITH, Jeremiah J., GEVERS, Dirk, GORDON, Jeffrey I., KNIGHT, Rob, MILLS, David A. et CAPORASO, J. Gregory, 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. In : *Nature methods*. janvier 2013. Vol. 10, n° 1, p. 57-59. DOI 10.1038/nmeth.2276.
- BORNEMAN, William S., HARTLEY, Roy D., MORRISON, W. Herbert, AKIN, Danny E. et LJUNGDAHL, Lars G., 1990. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 juin 1990. Vol. 33, n° 3, p. 345-351. DOI 10.1007/BF00164534.
- CAO, Kim-Anh Le, ROHART, Florian, GONZALEZ, Ignacio, DEJEAN, Sebastien, ABADI, Al, GAUTIER, Benoit, BARTOLO, Francois, MONGET, Pierre, COQUERY, Jeff, YAO, FangZou et LIQUET, Benoit, 2020. *mixOmics: Omics Data Integration Project* [en ligne]. S.l. : Bioconductor version: Release (3.12). [Consulté le 7 novembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://bioconductor.org/packages/mixOmics/>.
- CARBERRY, Ciara A., KENNY, David A., HAN, Sukkyan, MCCABE, Matthew S. et WATERS, Sinead M., 2012. Effect of Phenotypic Residual Feed Intake and Dietary Forage Content on the Rumen Microbial Community of Beef Cattle. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 15 juillet 2012. Vol. 78, n° 14, p. 4949-4958. DOI 10.1128/AEM.07759-11.

CASTRO-CARRERA, T., TORAL, P.G., FRUTOS, P., MCEWAN, N.R., HERVÁS, G., ABECIA, L., PINLOCHE, E., GIRDWOOD, S.E. et BELENGUER, A., 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. In : *Journal of Dairy Science*. mars 2014. Vol. 97, n° 3, p. 1661-1669. DOI 10.3168/jds.2013-7243.

CHAUMETON JUSTINE, 2018. Mise au point de milieux de culture sélectifs pour l'étude de la biohydrogénation ruminale. In : . 2018. p. 183.

CHEN, Yanhong, OBA, Masahito et GUAN, Le Luo, 2012. Variation of bacterial communities and expression of Toll-like receptor genes in the rumen of steers differing in susceptibility to subacute ruminal acidosis. In : *Veterinary Microbiology*. 12 octobre 2012. Vol. 159, n° 3, p. 451-459. DOI 10.1016/j.vetmic.2012.04.032.

CODE RURAL ET DE LA PÊCHE MARITIME, 2000. Article L654-30 - Code rural et de la pêche maritime - Légifrance. In : [en ligne]. 2000. [Consulté le 4 octobre 2020]. Disponible à l'adresse : [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000006584973](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006584973).

CONFÉDÉRATION GÉNÉRALE DES PRODUCTEURS DE LAIT DE BREBIS ET DES INDUSTRIELS DE ROQUEFORT, 2017. *Brochure de présentation de l'organisation et du fonctionnement de la filière Roquefort*. 2017. S.l. : s.n.

DE VIENNE, Damien M., 2016. Lifemap: Exploring the Entire Tree of Life. In : *PLoS Biology* [en ligne]. 22 décembre 2016. Vol. 14, n° 12. [Consulté le 28 septembre 2020]. DOI 10.1371/journal.pbio.2001624. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5179005/>.

DEBIESSE O, 2000. *Les critères de qualité du lait de brebis lacaune, matière première de fabrication du roquefort*. s.l. : sl. 6609-2000-095

DEHORITY, Burk A., 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham : Nottingham University Press. ISBN 978-1-897676-99-8.

DEUSCH, Simon, TILOCCA, Bruno, CAMARINHA-SILVA, Amélia et SEIFERT, Jana, 2015. News in livestock research — use of Omics -technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. In : *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2015. Vol. 13, p. 55-63. DOI 10.1016/j.csbj.2014.12.005.

ELLISON, M. J., CONANT, G. C., COCKRUM, R. R., AUSTIN, K. J., TRUONG, H., BECCHI, M., LAMBERSON, W. R. et CAMMACK, K. M., 2014. Diet Alters Both the Structure and Taxonomy of the Ovine Gut Microbial Ecosystem. In : *DNA Research*. 1 avril 2014. Vol. 21, n° 2, p. 115-125. DOI 10.1093/dnares/dst044.

ELLISON, M.J., CONANT, G.C., LAMBERSON, W.R., COCKRUM, R.R., AUSTIN, K.J., RULE, D.C. et CAMMACK, K.M., 2017. Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. In : *Small Ruminant Research*. novembre 2017. Vol. 156, p. 12-19. DOI 10.1016/j.smallrumres.2017.08.009.

EL-SAIED, U. M., CARRIEDO, J. A., BARO, J. A., DE LE FUENTE, L. F. et SAN PRIMITIVO, F., 1998. Genetic correlations and heritabilities for milk yield and lactation length of dairy sheep. In : *Small Ruminant Research*. 1 mars 1998. Vol. 27, n° 3, p. 217-221. DOI 10.1016/S0921-4488(97)00060-6.

ERICKSON, D. L., NSEREKO, V. L., MORGAVI, D. P., SELINGER, L. B., RODE, L. M. et BEAUCHEMIN, K. A., 2002. Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N-

acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. In : *Canadian Journal of Microbiology*. avril 2002. Vol. 48, n° 4, p. 374-378. DOI 10.1139/w02-022.

ESCUDIE, Frédéric, AUER, Lucas, BERNARD, Maria, CAUQUIL, Laurent, VIDAL, Katia, MAMAN, SARAH, MARIADASSOU, Mahendra, HERNANDEZ RAQUET, Guillermina et PASCAL, Géraldine, 2015. *FROGS : Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution* [en ligne]. S.l. : Oxford University Press. [Consulté le 4 octobre 2020]. Bioinformatics. Disponible à l'adresse : <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01886389>.

FINLAY, Bland J., ESTEBAN, Genoveva, CLARKE, Ken J., WILLIAMS, Alan G., EMBLEY, T. Martin et HIRT, Robert P., 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. In : *FEMS Microbiology Letters*. 1 avril 1994. Vol. 117, n° 2, p. 157-161.

FONTY, G., GOUET, P., JOUANY, J.-P. et SENAUD, J., 1987. Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. In : *Microbiology*. 1 juillet 1987. Vol. 133, n° 7, p. 1835-1843. DOI 10.1099/00221287-133-7-1835.

GOPHNA, Uri, KONIKOFF, Tom et NIELSEN, Henrik Bjørn, 2017. Oscillospira and related bacteria - From metagenomic species to metabolic features. In : *Environmental Microbiology*. 2017. Vol. 19, n° 3, p. 835-841. DOI 10.1111/1462-2920.13658.

HAZLEWOOD, Geoffrey et DAWSON, Rex M. C., 1979. Characteristics of a Lipolytic and Fatty Acid-requiring *Butyrivibrio* sp. Isolated from the Ovine Rumen. In : *Microbiology*,. 1979. Vol. 112, n° 1, p. 15-27. DOI 10.1099/00221287-112-1-15.

HENDERSON, C., 1971. A Study of the Lipase Produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a Rumen Bacterium. In : *Microbiology*,. 1971. Vol. 65, n° 1, p. 81-89. DOI 10.1099/00221287-65-1-81.

HENDERSON, C. R., 1953. Estimation of Variance and Covariance Components. In : *Biometrics*. 1953. Vol. 9, n° 2, p. 226-252. DOI 10.2307/3001853.

HENDERSON, Gemma, COX, Faith, KITTELMANN, Sandra, MIRI, Vahideh Heidarian, ZETHOF, Michael, NOEL, Samantha J., WAGHORN, Garry C. et JANSSEN, Peter H., 2013. Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. In : BERTILSSON, Stefan (éd.), *PLoS ONE*. 11 septembre 2013. Vol. 8, n° 9, p. e74787. DOI 10.1371/journal.pone.0074787.

HERNANDEZ-SANABRIA, Emma, GOONEWARDENE, Laksiri A., WANG, Zhiquan, DURUNNA, Obioha N., MOORE, Stephen S. et GUAN, Le Luo, 2012. Impact of Feed Efficiency and Diet on Adaptive Variations in the Bacterial Community in the Rumen Fluid of Cattle. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 15 février 2012. Vol. 78, n° 4, p. 1203-1214. DOI 10.1128/AEM.05114-11.

HERNANDEZ-SANABRIA, Emma, GOONEWARDENE, Laksiri A., WANG, Zhiquan, ZHOU, Mi, MOORE, Stephen S. et GUAN, Le Luo, 2013. Influence of Sire Breed on the Interplay among Rumen Microbial Populations Inhabiting the Rumen Liquid of the Progeny in Beef Cattle. In : ZHOU, Zhi (éd.), *PLoS ONE*. 8 mars 2013. Vol. 8, n° 3, p. e58461. DOI 10.1371/journal.pone.0058461.

HERNANDEZ-SANABRIA, Emma, GUAN, Le Luo, GOONEWARDENE, Laksiri A., LI, Meiju, MUJIBI, Denis F., STOTHARD, Paul, MOORE, Stephen S. et LEON-QUINTERO, Monica C., 2010. Correlation of particular bacterial PCR-denaturing gradient gel electrophoresis patterns with bovine ruminal fermentation parameters and feed efficiency traits. In : *Applied and Environmental Microbiology*. octobre 2010. Vol. 76, n° 19, p. 6338-6350. DOI 10.1128/AEM.01052-10.

HUNGATE, 1966. *The Rumen and its Microbes* [en ligne]. S.l. : Elsevier. [Consulté le 3 octobre 2020]. ISBN 978-1-4832-3308-6. Disponible à l'adresse : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C2013012555X>.

INDUGU, Nagaraju, VECCHIARELLI, Bonnie, BAKER, Linda D., FERGUSON, James D., VANAMALA, Jairam K. P. et PITTA, Dipti W., 2017. Comparison of rumen bacterial communities in dairy herds of different production. In : *BMC Microbiology*. décembre 2017. Vol. 17, n° 1, p. 190. DOI 10.1186/s12866-017-1098-z.

INRA, 2018. *Alimentation des ruminants*. Editions Quæ. Versailles, France : s.n. ISBN 978-2-7592-2867-6.

JAMI, Elie, ISRAEL, Adi, KOTSER, Assaf et MIZRAHI, Itzhak, 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. In : *The ISME Journal*. juin 2013. Vol. 7, n° 6, p. 1069-1079. DOI 10.1038/ismej.2013.2.

JAMI, Elie et MIZRAHI, Itzhak, 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. In : *PloS one*. 2012. Vol. 7, n° 3, p. e33306.

JAMI, Elie, WHITE, Bryan A. et MIZRAHI, Itzhak, 2014. Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency. In : HEIMESAAT, Markus M. (éd.), *PLoS ONE*. 22 janvier 2014. Vol. 9, n° 1, p. e85423. DOI 10.1371/journal.pone.0085423.

JARRIGE, Robert et RUCKEBUSCH, Yves, 1995. *Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion*. S.l. : Editions Quæ. ISBN 978-2-7380-0629-5.

JEWELL, Kelsea A., MCCORMICK, Caroline A., ODT, Christine L., WEIMER, Paul J. et SUEN, Garret, 2015. Ruminant Bacterial Community Composition in Dairy Cows Is Dynamic over the Course of Two Lactations and Correlates with Feed Efficiency. In : GRIFFITHS, M. W. (éd.), *Applied and Environmental Microbiology*. 15 juillet 2015. Vol. 81, n° 14, p. 4697-4710. DOI 10.1128/AEM.00720-15.

JIN, Di, ZHAO, Shengguo, ZHENG, Nan, BU, Dengpan, BECKERS, Yves, DENMAN, Stuart E., MCSWEENEY, Christopher S. et WANG, Jiaqi, 2017. Differences in Ureolytic Bacterial Composition between the Rumen Digesta and Rumen Wall Based on ureC Gene Classification. In : *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. 7 mars 2017. Vol. 8. [Consulté le 3 octobre 2020]. DOI 10.3389/fmicb.2017.00385. Disponible à l'adresse : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5339240/>.

KAMRA, D. N., 2005. Rumen microbial ecosystem. In : *Current Science*. 2005. Vol. 89, n° 1, p. 124-135. JSTOR

KLEEN, J. L., HOOIJER, G. A., REHAGE, J. et NOORDHUIZEN, J. P. T. M., 2003. Subacute Ruminant Acidosis (SARA): a Review. In : *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 2003. Vol. 50, n° 8, p. 406-414. DOI 10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x.

KOIKE, Satoshi, YOSHITANI, Sayo, KOBAYASHI, Yasuo et TANAKA, Keiichi, 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. In : *FEMS Microbiology Letters*. 1 décembre 2003. Vol. 229, n° 1, p. 23-30. DOI 10.1016/S0378-1097(03)00760-2.

KOPEČNÝ, J. et HODROVÁ, Blanka, 1995. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. In : *Letters in Applied Microbiology*. 1995. Vol. 20, n° 5, p. 312-316. DOI 10.1111/j.1472-765X.1995.tb00453.x.

LAGKOUVARDOS, Ilias, LESKER, Till R., HITCH, Thomas C. A., GÁLVEZ, Eric J. C., SMIT, Nathiana, NEUHAUS, Klaus, WANG, Jun, BAINES, John F., ABT, Birte, STECHER, Bärbel,

OVERMANN, Jörg, STROWIG, Till et CLAVEL, Thomas, 2019. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. In : *Microbiome*. 19 février 2019. Vol. 7, n° 1, p. 28. DOI 10.1186/s40168-019-0637-2.

LEEDLE, J A, BRYANT, M P et HESPELL, R B, 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high-forage diets. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1982. Vol. 44, n° 2, p. 402-412. DOI 10.1128/AEM.44.2.402-412.1982.

LENTH, Russell, BUERKNER, Paul, HERVE, Maxime, LOVE, Jonathon, RIEBL, Hannes et SINGMANN, Henrik, 2020. *emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 7 novembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>.

LEROY, H, 1987. *Effets physiologiques du jeûne chez les ruminants*. Thèse Med. Vet. Alfort. S.l. : s.n.

LEY, Ruth E., TURNBAUGH, Peter J., KLEIN, Samuel et GORDON, Jeffrey I., 2006. Human gut microbes associated with obesity. In : *Nature*. décembre 2006. Vol. 444, n° 7122, p. 1022-1023. DOI 10.1038/4441022a.

LI, Fuyong et GUAN, Le Luo, 2017. Metatranscriptomic Profiling Reveals Linkages between the Active Rumen Microbiome and Feed Efficiency in Beef Cattle. In : MCBAIN, Andrew J. (éd.), *Applied and Environmental Microbiology*. 1 mai 2017. Vol. 83, n° 9, p. e00061-17, e00061-17. DOI 10.1128/AEM.00061-17.

LI, Fuyong, HITCH, Thomas C. A., CHEN, Yanhong, CREEVEY, Christopher J. et GUAN, Le Luo, 2019. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle. In : *Microbiome*. 14 janvier 2019. Vol. 7, n° 1, p. 6. DOI 10.1186/s40168-019-0618-5.

LI, Fuyong, LI, Changxi, CHEN, Yanhong, LIU, Junhong, ZHANG, Chunyan, IRVING, Barry, FITZSIMMONS, Carolyn, PLASTOW, Graham et GUAN, Le Luo, 2019. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. In : *Microbiome*. 13 juin 2019. Vol. 7, n° 1, p. 92. DOI 10.1186/s40168-019-0699-1.

LI, M., PENNER, G.B., HERNANDEZ-SANABRIA, E., OBA, M. et GUAN, L.L., 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. In : *Journal of Applied Microbiology*. décembre 2009. Vol. 107, n° 6, p. 1924-1934. DOI 10.1111/j.1365-2672.2009.04376.x.

LIMA, Fabio S., OIKONOMOU, Georgios, LIMA, Svetlana F., BICALHO, Marcela L. S., GANDA, Erika K., DE OLIVEIRA FILHO, Jose C., LORENZO, Gustavo, TROJACANEC, Plamen et BICALHO, Rodrigo C., 2015. Parturition and Postpartum Rumen Fluid Microbiomes: Characterization and Correlation with Production Traits in Dairy Cows. In : GRIFFITHS, M. W. (éd.), *Applied and Environmental Microbiology*. 15 février 2015. Vol. 81, n° 4, p. 1327-1337. DOI 10.1128/AEM.03138-14.

LIU, Hongjin, XU, Tianwei, XU, Shixiao, MA, Li, HAN, Xueping, WANG, Xungang, ZHANG, Xiaoling, HU, Linyong, ZHAO, Na, CHEN, Yongwei, PI, Li et ZHAO, Xinquan, 2019. Effect of dietary concentrate to forage ratio on growth performance, rumen fermentation and bacterial diversity of Tibetan sheep under barn feeding on the Qinghai-Tibetan plateau. In : *PeerJ*. 5 août 2019. Vol. 7, p. e7462. DOI 10.7717/peerj.7462.

LIU, Jun-hua, ZHANG, Meng-ling, ZHANG, Rui-yang, ZHU, Wei-yun et MAO, Sheng-yong, 2016. Comparative studies of the composition of bacterial microbiota associated with the ruminal content,

ruminal epithelium and in the faeces of lactating dairy cows. In : *Microbial Biotechnology*. mars 2016. Vol. 9, n° 2, p. 257-268. DOI 10.1111/1751-7915.12345.

MACKIE, R I, AMINOV, R I, GASKINS, H R et WHITE, B A, 2000. Molecular microbial ecology in gut ecosystems. In : . 2000. p. 9.

MALMUTHUGE, Nilusha, LI, Meiju, CHEN, Yanhong, FRIES, Patrick, GRIEBEL, Philip J., BAURHOO, Bushansingh, ZHAO, Xin et GUAN, Le Luo, 2012. Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. In : *FEMS microbiology ecology*. février 2012. Vol. 79, n° 2, p. 337-347. DOI 10.1111/j.1574-6941.2011.01220.x.

MAO, Shengyong, ZHANG, Mengling, LIU, Junhua et ZHU, Weiyun, 2015. Characterising the bacterial microbiota across the gastrointestinal tracts of dairy cattle: membership and potential function. In : *Scientific Reports*. 3 novembre 2015. Vol. 5, n° 1, p. 16116. DOI 10.1038/srep16116.

MARIE-ETANCELIN C, GABINAUD B, PASCAL G, TOMAS R et MENRAS JM, 2018. Genetic determinism of dairy sheep ruminal microbiota. In : *Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)*. Dubrovnik, Croatia : s.n. août 2018. p. 705.

MCALLISTER, T. A., BAE, H. D., JONES, G. A. et CHENG, K.-J., 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. In : *Journal of Animal Science*. 1 novembre 1994. Vol. 72, n° 11, p. 3004-3018. DOI 10.2527/1994.72113004x.

MCCANN, J. C., DREWERY, M. L., SAWYER, J. E., PINCHAK, W. E. et WICKERSHAM, T. A., 2014. Effect of postextraction algal residue supplementation on the ruminal microbiome of steers consuming low-quality forage. In : *Journal of Animal Science*. novembre 2014. Vol. 92, n° 11, p. 5063-5075. DOI 10.2527/jas.2014-7811.

MCCANN, Joshua C., LUAN, Shaoyu, CARDOSO, Felipe C., DERAKHSHANI, Hooman, KHAFIPOUR, Ehsan et LOOR, Juan J., 2016. Induction of Subacute Ruminal Acidosis Affects the Ruminal Microbiome and Epithelium. In : *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7, p. 701. DOI 10.3389/fmicb.2016.00701.

MCCOWAN, R P, CHENG, K J, BAILEY, C B et COSTERTON, J W, 1978. Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. In : *Applied and Environmental Microbiology*. janvier 1978. Vol. 35, n° 1, p. 149-155.

MCEWAN, N. R., ABECIA, L., REGENSBGENOVA, M., ADAM, C. L., FINDLAY, P. A. et NEWBOLD, C. J., 2005. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. In : *Letters in Applied Microbiology*. 2005. Vol. 41, n° 1, p. 97-101. DOI 10.1111/j.1472-765X.2005.01707.x.

MCSWEENEY, Christopher S., DENMAN, Stuart E. et MACKIE, Roderick I., 2005. Rumen bacteria. In : MAKKAR, Harinder P.S. et MCSWEENEY, Christopher S. (éd.), *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants* [en ligne]. Dordrecht : Springer Netherlands. p. 23-37. [Consulté le 29 juillet 2020]. ISBN 978-1-4020-3791-7. Disponible à l'adresse : [https://doi.org/10.1007/1-4020-3791-0\\_2](https://doi.org/10.1007/1-4020-3791-0_2).

MICHELLAND, Rory, 2009. *Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores : approche comparée vache/lapin* [en ligne]. These de doctorat. S.l. : Toulouse, INPT. [Consulté le 28 septembre 2020]. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2009INPT006A>.

- MIETTINEN, Harri et HUHTANEN, Pekka, 1996. Effects of the Ratio of Ruminal Propionate to Butyrate on Milk Yield and Blood Metabolites in Dairy Cows. In : *Journal of Dairy Science*. 1 mai 1996. Vol. 79, n° 5, p. 851-861. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(96)76434-2.
- MIRON, J., BEN-GHEDALIA, D. et MORRISON, M., 2001. Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. In : *Journal of Dairy Science*. 1 juin 2001. Vol. 84, n° 6, p. 1294-1309. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2.
- MOUNTFORT, D. O. et ASHER, R. A., 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 avril 1989. Vol. 55, n° 4, p. 1016-1022.
- MU, Yingyu, LIN, Xueyan, WANG, Zhonghua, HOU, Qiuling, WANG, Yun et HU, Zhiyong, 2019. High-production dairy cattle exhibit different rumen and fecal bacterial community and rumen metabolite profile than low-production cattle. In : *MicrobiologyOpen*. avril 2019. Vol. 8, n° 4, p. e00673. DOI 10.1002/mbo3.673.
- MYER, Phillip R., SMITH, Timothy P. L., WELLS, James E., KUEHN, Larry A. et FREETLY, Harvey C., 2015. Rumen Microbiome from Steers Differing in Feed Efficiency. In : FORSTER, Robert J (éd.), *PLOS ONE*. 1 juin 2015. Vol. 10, n° 6, p. e0129174. DOI 10.1371/journal.pone.0129174.
- NAGARAJA, T. G. et TITGEMEYER, E. C., 2007. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook<sup>1,2</sup>. In : *Journal of Dairy Science*. 1 juin 2007. Vol. 90, p. E17-E38. DOI 10.3168/jds.2006-478.
- NEVES, A. L. A., CHEN, Y., CAO, K.-A. Lê, MANDAL, S., SHARPTON, T. J., MCALLISTER, T. et GUAN, L. L., 2020. Taxonomic and functional assessment using metatranscriptomics reveals the effect of Angus cattle on rumen microbial signatures. In : *animal*. avril 2020. Vol. 14, n° 4, p. 731-744. DOI 10.1017/S1751731119002453.
- NOCKER, Andreas, BURR, Mark et CAMPER, Anne K., 2007. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. In : *Microbial Ecology*. 1 août 2007. Vol. 54, n° 2, p. 276-289. DOI 10.1007/s00248-006-9199-5.
- NOVOTNÁ, Z., PROCHÁZKA, J., ŠIMŮNEK, J. et FLIEGEROVÁ, K., 2010. Xylanases of anaerobic fungus *Anaeromyces mucronatus*. In : *Folia Microbiologica*. 1 juillet 2010. Vol. 55, n° 4, p. 363-367. DOI 10.1007/s12223-010-0059-9.
- OKSANEN, Jari, BLANCHET, F. Guillaume, FRIENDLY, Michael, KINDT, Roeland, LEGENDRE, Pierre, MCGLINN, Dan, MINCHIN, Peter R., O'HARA, R. B., SIMPSON, Gavin L., SOLYMOS, Peter, STEVENS, M. Henry H., SZOECs, Eduard et WAGNER, Helene, 2019. *vegan: Community Ecology Package* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 7 novembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- ORPIN, C. G., 1975. Studies on the Rumen Flagellate *Neocallimastix frontalis*. In : *Microbiology*. 1975. Vol. 91, n° 2, p. 249-262. DOI 10.1099/00221287-91-2-249.
- ORPIN, C. G., MATHIESEN, S. D., GREENWOOD, Y. et BLIX, A. S., 1985. Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 juillet 1985. Vol. 50, n° 1, p. 144-151.
- PALLERONI, Norberto J., 1997. Prokaryotic diversity and the importance of culturing. In : *Antonie van Leeuwenhoek*. 1 juillet 1997. Vol. 72, n° 1, p. 3-19. DOI 10.1023/A:1000394109961.

- PAUL, Shyam Sunder, KAMRA, Devki Nandan, SASTRY, Vadali Rama Bhadra, SAHU, Narottam Prasad et AGARWAL, Neeta, 2004. Effect of anaerobic fungi on in vitro feed digestion by mixed rumen microflora of buffalo. In : *Reproduction Nutrition Development*. 1 juillet 2004. Vol. 44, n° 4, p. 313-319. DOI 10.1051/rnd:2004036.
- PETRI, R. M., SCHWAIGER, T., PENNER, G. B., BEAUCHEMIN, K. A., FORSTER, R. J., MCKINNON, J. J. et MCALLISTER, T. A., 2013. Changes in the Rumen Epimural Bacterial Diversity of Beef Cattle as Affected by Diet and Induced Ruminant Acidosis. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 15 juin 2013. Vol. 79, n° 12, p. 3744-3755. DOI 10.1128/AEM.03983-12.
- PETRI, Renee M., SCHWAIGER, Tyler, PENNER, Greg B., BEAUCHEMIN, Karen A., FORSTER, Robert J., MCKINNON, John J. et MCALLISTER, Tim A., 2013. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. In : REN, Xiaofeng (éd.), *PLoS ONE*. 31 décembre 2013. Vol. 8, n° 12, p. e83424. DOI 10.1371/journal.pone.0083424.
- PÔLE ÉCONOMIE ET PROSPECTIVE DES CHAMBRES D'AGRICULTURE D'OCCITANIE et CHARGÉS D'ÉTUDES CERFRANCE RÉGION OCCITANIE, 2020. Agri'scopie Édition 2020 - Dossier spécial - L'Agriculture d'Occitanie en dynamique. In : . 2020. p. 60.
- PUNIYA, Anil Kumar, SINGH, Rameshwar et KAMRA, Devki Nandan (éd.), 2015. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* [en ligne]. New Delhi : Springer India. [Consulté le 31 juillet 2020]. ISBN 978-81-322-2400-6. Disponible à l'adresse : <http://link.springer.com/10.1007/978-81-322-2401-3>.
- QUAST, Christian, PRUESSE, Elmar, YILMAZ, Pelin, GERKEN, Jan, SCHWEER, Timmy, YARZA, Pablo, PEPLIES, Jörg et GLÖCKNER, Frank Oliver, 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. In : *Nucleic Acids Research*. janvier 2013. Vol. 41, n° Database issue, p. D590-D596. DOI 10.1093/nar/gks1219.
- ROHWER, Forest et YOULE, Merry, 2011. Consider something viral in your research. In : *Nature Reviews Microbiology*. mai 2011. Vol. 9, n° 5, p. 308-309. DOI 10.1038/nrmicro2563.
- ROMERO-PÉREZ, Gustavo A., OMINSKI, Kim H., MCALLISTER, Tim A. et KRAUSE, Denis O., 2011. Effect of Environmental Factors and Influence of Rumen and Hindgut Biogeography on Bacterial Communities in Steers. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 janvier 2011. Vol. 77, n° 1, p. 258-268. DOI 10.1128/AEM.01289-09.
- ROUSSEAU, J.-P. et FALEMPIN, M., 1985. Contrôle nerveux de la motricité du réticulo-rumen. In : *Reproduction Nutrition Développement*. 1985. Vol. 25, n° 4B, p. 763-775.
- RUPP, R., LAGRIFFOUL, G., ASTRUC, J. M. et BARILLET, F., 2003. Genetic Parameters for Milk Somatic Cell Scores and Relationships with Production Traits in French Lacaune Dairy Sheep. In : *Journal of Dairy Science*. 1 avril 2003. Vol. 86, n° 4, p. 1476-1481. DOI 10.3168/jds.S0022-0302(03)73732-1.
- SADET, Sophie, 2008. *Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire* [en ligne]. phdthesis. S.l. : Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II. [Consulté le 1 août 2020]. Disponible à l'adresse : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00728351>.
- SADET-BOURGETEAU, S., MARTIN, C. et MORGAVI, D.P., 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. In : *Veterinary Microbiology*. novembre 2010. Vol. 146, n° 1-2, p. 98-104. DOI 10.1016/j.vetmic.2010.04.029.

SCHLOSS, Patrick D., GEVERS, Dirk et WESTCOTT, Sarah L., 2011. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. In : *PLOS ONE*. 14 décembre 2011. Vol. 6, n° 12, p. e27310. DOI 10.1371/journal.pone.0027310.

SCHOFIELD, B. J., LACHNER, N., LE, O. T., MCNEILL, D. M., DART, P., OUWERKERK, D., HUGENHOLTZ, P. et KLIEVE, A. V., 2018. Beneficial changes in rumen bacterial community profile in sheep and dairy calves as a result of feeding the probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* H57. In : *Journal of Applied Microbiology*. 2018. Vol. 124, n° 3, p. 855-866. DOI 10.1111/jam.13688.

SESHADRI, Rekha, LEAHY, Sinead C., 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., 2018. Cultivation and sequencing of rumen microbiome members from the Hungate1000 Collection. In : *Nature Biotechnology*. avril 2018. Vol. 36, n° 4, p. 359-367. DOI 10.1038/nbt.4110.

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, 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. In : *The ISME Journal*. décembre 2016. Vol. 10, n° 12, p. 2958-2972. DOI 10.1038/ismej.2016.62.

SMITH, Bradford P., 2015. *Large Animal Internal Medicine*. S.l. : Elsevier Mosby. ISBN 978-0-323-08839-8.

SUNDSET, Monica A., PRÆSTENG, Kirsti E., CANN, Isaac K. O., MATHIESEN, Svein D. et MACKIE, Roderick I., 2007. Novel Rumen Bacterial Diversity in Two Geographically Separated Sub-Species of Reindeer. In : *Microbial Ecology*. 4 octobre 2007. Vol. 54, n° 3, p. 424-438. DOI 10.1007/s00248-007-9254-x.

TAJIMA, K., AMINOV, R. I., NAGAMINE, T., MATSUI, H., NAKAMURA, M. et BENNO, Y., 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. In : *Applied and Environmental Microbiology*. 1 juin 2001. Vol. 67, n° 6, p. 2766-2774. DOI 10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001.

TONG, Jinjin, ZHANG, Hua, YANG, Delian, ZHANG, Yonghong, XIONG, Benhai et JIANG, Linshu, 2018. Illumina sequencing analysis of the ruminal microbiota in high-yield and low-yield lactating dairy cows. In : LOOR, Juan J. (éd.), *PLOS ONE*. 13 novembre 2018. Vol. 13, n° 11, p. e0198225. DOI 10.1371/journal.pone.0198225.

TURNBAUGH, Peter J., LEY, Ruth E., MAHOWALD, Michael A., MAGRINI, Vincent, MARDIS, Elaine R. et GORDON, Jeffrey I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. In : *Nature*. décembre 2006. Vol. 444, n° 7122, p. 1027-1031. DOI 10.1038/nature05414.

UYENO, Yutaka, SEKIGUCHI, Yuji, TAJIMA, Kiyoshi, TAKENAKA, Akio, KURIHARA, Mitsunori et KAMAGATA, Yoichi, 2010. An rRNA-based analysis for evaluating the effect of heat stress on the rumen microbial composition of Holstein heifers. In : *Anaerobe*. 1 février 2010. Vol. 16, n° 1, p. 27-33. DOI 10.1016/j.anaerobe.2009.04.006.

WALLACE, R. J., CHENG, K.-J., DINSDALE, D. et ØRSKOV, E. R., 1979. An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. In : *Nature*. mai 1979. Vol. 279, n° 5712, p. 424-426. DOI 10.1038/279424a0.

WALLACE, R. John, ROOKE, John A., MCKAIN, Nest, DUTHIE, Carol-Anne, HYSLOP, Jimmy J., ROSS, David W., WATERHOUSE, Anthony, WATSON, Mick et ROEHE, Rainer, 2015. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. In : *BMC Genomics*. 23 octobre 2015. Vol. 16, n° 1, p. 839. DOI 10.1186/s12864-015-2032-0.

WALLACE, R. John, SASSON, Goor, GARNSWORTHY, Philip C., TAPIO, Ilma, GREGSON, Emma, BANI, Paolo, HUHTANEN, Pekka, BAYAT, Ali R., STROZZI, Francesco, BISCARINI, Filippo, SNELLING, Timothy J., SAUNDERS, Neil, POTTERTON, Sarah L., CRAIGON, James, MINUTI, Andrea, TREVISI, Erminio, CALLEGARI, Maria L., CAPPELLI, Fiorenzo Piccioli, CABEZAS-GARCIA, Edward H., VILKKI, Johanna, PINARES-PATINO, Cesar, FLIEGEROVÁ, Kateřina O., MRÁZEK, Jakub, SECHOVCOVÁ, Hana, KOPEČNÝ, Jan, BONIN, Aurélie, BOYER, Frédéric, TABERLET, Pierre, KOKOU, Fotini, HALPERIN, Eran, WILLIAMS, John L., SHINGFIELD, Kevin J. et MIZRAHI, Itzhak, 2019. A heritable subset of the core rumen microbiome dictates dairy cow productivity and emissions. In : *Science Advances*. 1 juillet 2019. Vol. 5, n° 7, p. eaav8391. DOI 10.1126/sciadv.aav8391.

WANG, Yaoyue, CAO, Pinghua, WANG, Lei, ZHAO, Zhaoyan, CHEN, Yulin et YANG, Yuxin, 2017. Bacterial community diversity associated with different levels of dietary nutrition in the rumen of sheep. In : *Applied Microbiology and Biotechnology*. mai 2017. Vol. 101, n° 9, p. 3717-3728. DOI 10.1007/s00253-017-8144-5.

WICKHAM, Hadley, CHANG, Winston, HENRY, Lionel, PEDERSEN, Thomas Lin, TAKAHASHI, Kohske, WILKE, Claus, WOO, Kara, YUTANI, Hiroaki, DUNNINGTON, Dewey et RSTUDIO, 2020. *ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 7 novembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>.

WICKHAM, Hadley, FRANÇOIS, Romain, HENRY, Lionel, MÜLLER, Kirill et RSTUDIO, 2020. *dplyr: A Grammar of Data Manipulation* [en ligne]. S.l. : s.n. [Consulté le 7 novembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.

WILLIAMS, Alan G. et COLEMAN, Geoffrey S., 2012. *The Rumen Protozoa*. S.l. : Springer Science & Business Media. ISBN 978-1-4612-2776-2.

ZHOU, M., HÜNERBERG, M., BEAUCHEMIN, K. A., MCALLISTER, T. A., OKINE, E. K. et GUAN, L. L., 2012. Individuality of ruminal methanogen/protozoa populations in beef cattle fed diets containing dried distillers' grain with solubles. In : *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*. 1 décembre 2012. Vol. 62, n° 4, p. 273-288. DOI 10.1080/09064702.2013.788206.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

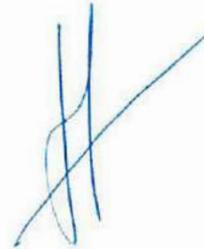
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Annabelle MEYNADIER, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directrice de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **VEZIGNOL Thomas** intitulée « **Comparaison de la composition du microbiote ruminal de brebis de race Lacaune, issues de deux lignées divergentes selon leur persistance laitière : étude sur trois lactations successives** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

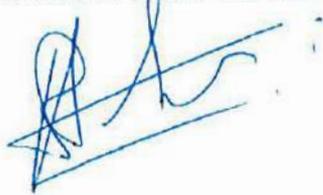
Fait à Toulouse, le 09/11/2020  
Enseignant-chercheur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeure Annabelle MEYNADIER



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



Vu :  
Le Président du jury  
Professeur Alexis VALENTIN



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université Paul Sabatier  
M. Jean-Marc BROTO



M. VEZIGNOL Thomas  
a été admis(e) sur concours en : 2015  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le: 09/07/2019  
a validé son année d'approfondissement le: 24/09/2020  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

**NOM : VÉZIGNOL    PRENOM : THOMAS**

**TITRE : COMPARAISON DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE RUMINAL DE BREBIS DE RACE LACAUNE, ISSUES DE DEUX LIGNÉES DIVERGENTES SELON LEUR PERSISTANCE LAITIÈRE : ÉTUDE SUR TROIS LACTATIONS SUCCESSIVES**

**RÉSUMÉ :** Chaque année, plus de 15 000 tonnes de fromage de Roquefort sont produites à partir de lait de brebis de race Lacaune. Le microbiote ruminal de ces animaux joue un rôle majeur dans la digestion, en particulier les bactéries qui le composent. Des techniques récentes ont permis d'explorer de manière plus précise sa composition, son fonctionnement, et son lien avec les productions animales. Cette thèse présente une étude *in vivo* sur les effets d'une sélection de deux lignées divergentes de brebis Lacaune, selon leur persistance laitière. Leur microbiote ruminal a été analysé, et ce sur trois lactations successives. Les analyses menées ont permis de mettre en évidence des proximités de microbiote au sein des lignées mais également pour un rang de lactation donné. Certains taxons bactériens ont également été identifiés comme discriminants de ces effets, ouvrant la voie à de nouvelles pistes de recherches pour en établir plus précisément les aboutissants.

**MOTS CLEFS :** BREBIS, MICROBIOTE RUMINAL, BACTÉRIES, PRODUCTION LAITIÈRE, LIGNÉES DIVERGENTES, LACTATIONS SUCCESSIVES

**TITLE : COMPARISON OF RUMEN MICROBIOTA COMPOSITION OF LACAUNE EWES, FROM TWO DIVERGENT LINEAGES ACCORDING TO THEIR DAIRY PERSISTENCY : A THREE CONSECUTIVE LACTATION STUDY**

**SUMMARY :** More than 15 000 tons of Roquefort cheese are made from Lacaune ewe's milk every year. Rumen microbiota of these animals, especially bacteria, plays a major role in digestion. Recent techniques allowed to explore more precisely its composition, its functioning, and its connection with animal performance indicator. This thesis presents an *in vivo* study of the effects of a selection of two divergent lineages of Lacaune ewes, according to their dairy persistency. Their rumen microbiota had been analysed during three consecutive lactation. The lead analysis highlights microbiota proximities within lineages, and also for a given rank of lactation. Some bacterial taxa have also been identified as discriminating for these effects, opening the path for new researches to understand the ins and outs.

**KEYWORDS:** EWES, RUMEN MICROBIOTA, BACTERIA, MILK PRODUCTION, DIVERGENT LINEAGES, CONSECUTIVE LACTATION