



HAL
open science

Résilience du microbiote ruminal : influence de la source d'énergie alimentaire et du phénotype chez la chèvre et la vache

Pierre Gomes

► To cite this version:

Pierre Gomes. Résilience du microbiote ruminal : influence de la source d'énergie alimentaire et du phénotype chez la chèvre et la vache. Interactions entre organismes. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASA012 . tel-03202286

HAL Id: tel-03202286

<https://pastel.hal.science/tel-03202286>

Submitted on 19 Apr 2021

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

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

Résilience du microbiote ruminal : influence de la source d'énergie alimentaire et du phénotype chez la chèvre et la vache

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie,
environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat : Sciences animales

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR Modélisation
Systémique Appliquée aux Ruminants, 75005, Paris, France.

Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 20 mai 2020, par

Pierre GOMES

Composition du Jury

Philippe SCHMIDELY Professeur, AgroParisTech (MoSAR)	Président
Karen GOOSSENS Senior Researcher, ILVO	Rapporteur & Examinatrice
Annabelle MEYNADIER Maître de conférences (HDR), ENVT	Rapporteur & Examinatrice
Evelyne FORANO Directeur de recherche, INRAE (MEDIS)	Examinatrice
Pierre NOZIERE Directeur de recherche, INRAE (UMRH)	Examineur
Nicolas FRIGGENS Directeur de recherche, INRAE (MoSAR)	Directeur de thèse
Valérie BERTHELOT Maître de conférences, AgroParisTech (MoSAR)	Co-Encadrante & Examinatrice
Christine GERARD Ingénieur, Groupe NEOVIA	Co-Encadrante & Examinatrice
Laurent BROUDISCOU Chargé de recherche, INRAE (MoSAR)	Co-Encadrant & Invité

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je souhaite remercier l'ANRT pour leur financement et la possibilité de réaliser des partenariats public-privé au travers des thèses CIFRE.

Je remercie l'école doctorale, en particulier Alexandre, Christine, Irina, Corinne et tous les membres d'AIES pour leur accueil, leur suivi ainsi que pour les formations proposées.

Je souhaite remercier tout particulièrement NEOVIA qui a co-financé cette thèse et qui m'accompagne depuis mes débuts dans le milieu professionnel. Toute l'équipe de la R&D est formidable et m'a toujours amené à me poser de nombreuses questions qui m'ont permis d'avancer scientifiquement et personnellement. Sans faire une liste exhaustive, je remercie Claire qui a été le facteur déclenchant de cette thèse. Ces 3 années dans le service ruminant m'ont montré à quel point chaque membre est impliqué dans son travail. Pendant l'essai réalisé à Saint Nolf, Olivier et les animaliers des autres espèces ont fait un excellent travail malgré les contraintes que mon protocole leur a imposé. Un très grand merci à Kévin et Olivier pour leur travail, leur implication et les idées novatrices qu'ils ont apporté pour rendre cette synchronisation possible. En plus de cette implication professionnelle sans faille, les longues heures passées au batch n'ont pas paru si longues grâce aux nombreuses discussions sur une grande variété de sujet. Merci à Jessie pour son aide et ses nombreux conseils. Je souhaite également remercier Christine qui a toujours été là pour me conseiller, m'orienter, me donner son avis éclairé sur mes multiples interrogations et avec qui il fait bon travailler. Encore merci pour ces trois années.

Je souhaite également remercier toute l'équipe MoSAR pour son accueil. Merci à mes co-bureaux pour leur bonne humeur. Merci à toi Marjorie pour ces presque 3 années à me supporter. Merci Manuel pour tes nombreux conseils et pour tout ce que tu m'as appris. Nous sommes devenus « fêlés » ensemble. Merci Ahmed pour toutes ces discussions qu'on a pu ... enfin, tu as compris. Merci à Laurence, la plus morvandelle de l'unité, pour ta bonne humeur, ton dynamisme et ta franchise. Merci à Valérie et à Laurent pour tout le temps passé à me suivre durant cette thèse, pour vos conseils, vos propositions et vos idées. Un grand merci à Nicolas pour ses précieux conseils, sa vision pragmatique, son efficacité et pour m'avoir fait confiance y compris pour prendre soin des plantes. Merci à Olivier pour m'avoir initié à la modélisation, ces moments de réflexion, de création et d'essais resteront dans les meilleurs moments de cette thèse. Merci Raphaël pour ta bonne humeur permanente et pour les discussions très intéressantes que nous avons partagées. Merci Ophélie pour le peps que tu apportes à la vie dans l'unité. Merci à Iria et Cindy pour le travail fourni pour l'analyse de mes données. Je remercie bien évidemment l'ensemble des autres membres de l'unité.

Je remercie également toutes les personnes impliquées dans les formations que j'ai suivi au cours de ces 3 années. Je garderai en particulier un très bon souvenir de České Budějovice.

Je remercie Patrick pour ses précieux conseils d'écrivain qui m'ont permis un gain de temps précieux.

Je remercie mes proches pour leur soutien, sans vouloir davantage écrire ici à quel point vous avez été importants pour que cette thèse aboutisse.

Je remercie l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	7
Liste des figures	14
Liste des abréviations :	26
Introduction – Bibliographie	28
1 Introduction	29
2 Contexte	29
2.1 Sociétal	30
2.2 Evolution et enjeux du marché de l'alimentation animale	32
2.3 Avancées technologiques pour étudier les biocénoses	33
3 Bibliographie	38
3.1 La symbiose entre le microbiote ruminal et l'animal hôte	38
3.2 Composition du microbiote ruminal chez l'adulte	40
3.3 Propriétés du microbiote ruminal	43
3.4 Variabilité de la composition du microbiote ruminal.....	45
3.4.1 Partie commune aux microbiotes ruminiaux : le « core microbiome »	46
3.4.2 Variabilité en lien avec l'alimentation	47
3.4.3 Variabilité en lien avec le phénotype.....	64
3.4.4 Variabilité individuelle persistante	69
3.5 L'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote ruminal	77
3.6 Conclusion de la Bibliographie	88
4 Sujet de thèse	91
Références bibliographiques	93
Partie I : Etude de l'interrelation entre la chèvre et son microbiote ruminal.....	101
Chapitre 1 : Influence de l'animal hôte sur la composition de son microbiote ruminal suite à une perturbation de l'écosystème ruminal chez la chèvre tarie recevant une ration riche en fibres	102
1.1 Introduction	102
1.2 Matériels et méthodes.....	103
1.3 Résultats.....	109
1.4 Discussion	129

1.5	Conclusion	134
	Références bibliographiques.....	135
Chapitre 2 : Influence de l'animal hôte sur la composition de son microbiote ruminal et suivi de cette structure autour d'une perturbation de l'écosystème ruminal chez la chèvre en lactation recevant une ration riche en glucides rapidement fermentescibles		
1.1	Les enjeux de l'étude :.....	139
1.2	Résumé :.....	140
1.3	Does the goat phenotype in terms of feeding behavior, rumen dynamics and production traits shape the rumen microbiota composition? First case study.....	142
Partie II : Etude de l'interrelation entre la vache et son microbiote ruminal.....		
1.1	Introduction.....	168
1.2	Matériel et méthodes	169
1.3	Imprévu survenu pendant l'expérimentation.....	180
Chapitre 1. Suivi de la composition du microbiote et de ses activités fermentaires autour d'une perturbation de l'écosystème ruminal chez la vache tarie recevant successivement une ration riche en fibres ou riche en amidon		
1.4	Résultats.....	181
1.5	Discussion	210
1.6	Conclusion	212
Chapitre 2. Influence de l'animal hôte sur la composition de son microbiote ruminal chez la vache tarie recevant une ration riche en fibres ou en amidon		
1.7	Résultats.....	213
1.8	Discussion	222
1.9	Conclusion	224
	Références bibliographiques	225
Discussion générale.....		
1	La synchronisation : une méthode expérimentale inédite.....	229
2	Suivi du microbiote après une perturbation	233
3	Effet de l'animal sur son microbiote ruminal	236
4	Le lien structure fonction	239
5	Pour aller plus loin	240
	Références bibliographiques	243
Conclusion générale		
		246

Annexes	249
Annexe 1 : Formules des deux concentrés.....	250
Annexe 2 : Schéma du dispositif expérimental de synchronisation des microbiotes ruminants	251
Annexe 3 : Protocole de la préparation de la solution tampon	252
Annexe 4 : Séquences obtenues par prélèvements.....	253
Annexe 5 : alpha-diversité	254
Annexe 6 : Paramètres fermentaires testés un à un par jour de prélèvement	255
Annexe 7 : Analyse de redondances des caractéristiques de l'hôte sur la ration foin avant synchronisation	256
Annexe 8 : Lactation curve model with explicit representation of perturbations as a phenotyping tool for dairy livestock precision farming	257
Résumé en français	282
Abstract in English	284

LISTE DES TABLEAUX

Introduction – Bibliographie

Tableau 1 : Techniques utilisées pour caractériser le microbiote (Fraher et al., 2012).....	35
Tableau 2 : Substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen. La majorité des souches peuvent assurer cette fonction (+) ou non (-) (Fonty et al., 1995).....	40
Tableau 3 : Métabolites fermentaires des principales espèces bactériennes du rumen (Fonty et al., 1995).....	41
Tableau 4 : Caractéristiques de quelques archées. Abréviations : b, bacille ; c, coque. (Stewart et al., 1997).....	42
Tableau 5 : Caractéristiques décrivant la stabilité et l'adaptabilité de la communauté microbienne ruminale (Weimer, 2015a).....	45
Tableau 6 : Quantification de 12 bactéries ruminales par PCR en temps réel pendant un changement alimentaire. Jour 0 correspond au prélèvement sur le régime à base de foin avant la transition alimentaire. Jour 3 et Jour 28 correspondent aux prélèvements 3 jours et 28 jours après la transition alimentaire. La concentration en ADN a été mesurée en mmol d'ADNr 16S par mg d'ADN ruminal total ± écart-type. ND signifie non détecté. (Tajima et al., 2001).....	48
Tableau 7 : Fluctuations journalière des produits de fermentation de vaches laitières nourries avec 4 régimes à 2 niveaux de protéine et 2 sources d'énergie après 4 semaines d'adaptation (Belanche et al., 2012). HP : niveau de protéine à 110 % des besoins ; LP : niveau de protéine à 80 % des besoins ; FIB : régime riche en fibres ; STA : régime riche en amidon.....	56
Tableau 8 : Fluctuations journalières de 10 groupes microbiens chez des vaches laitières nourries avec 4 régimes à 2 niveaux de protéine et 2 sources d'énergie après 4 semaines d'adaptation. Les moyennes au sein d'une ligne sans avoir la même lettre en exposant différent ($P < 0.05$), entre les régimes (a, b, c) ou entre les temps de prélèvement (x, y, z) (Belanche et al., 2012). HP : niveau de protéine à 110 % des besoins ; LP : niveau de protéine à 80 % des besoins ; FIB : régime riche en fibres ; STA : régime riche en amidon.....	57
Tableau 9 : Composés utilisés pour modifier les fermentations du rumen et leurs sites d'action connus (Jouany, 1994).....	60
Tableau 10 : Effets d'huiles essentielles sur les fermentations ruminales. Effets sur les fermentations ruminales par rapport au témoin ($P < 0.05$) : augmentation (+), diminution (-), pas d'effet (=) et non déterminé (ND) (Hart et al., 2008).....	61
Tableau 11 : Effets des plantes à saponine sur les fermentations ruminales. Effets sur les fermentations ruminales par rapport au témoin ($P < 0.05$) : augmentation (+), diminution (-), pas d'effet (=) et non déterminé (ND) (Hart et al., 2008).....	63
Tableau 12 : Comparaisons 2 à 2 des communautés microbiennes des différents organes. La mention NS en exposant indique les comparaisons dont la p-value est supérieure au seuil de 5 % (Douglas et al., 2016).....	65

Tableau 13 : Indicateurs phénotypiques des différences métaboliques et mesures du métabolisme ruminal chez des jeunes bovins mâles en croissance de race différente avec un régime à faible densité énergétique. Les valeurs des AGV sont données en fonction de la concentration totale en AGV (Hernandez-Sanabria et al., 2013).....	66
Tableau 14 : Caractéristiques d'ingestion d'aliment et de production de gaz ruminal issu des fermentations chez des génisses Blanc bleu belge et de des génisses Holstein frisonne en gestation (de Mulder et al., 2018).....	67
Tableau 15 : Valeur moyenne des pourcentages de 3 espèces bactériennes cellulolytiques dans les contenus ruminiaux collectés 3 heure après la distribution du repas sur 4 vaches nourries avec des aliments variant en teneurs en NDF et en sources de fourrage (EL : ensilage de luzerne et EM : ensilage de maïs). Les lettres a et b au sein d'un même groupe (ration, fourrage, NDF ou vache) indique des différences significatives quand celles-ci varient ($P < 0.05$) (Weimer et al., 1999).....	70
Tableau 16 : Amplicons de différentes tailles obtenus par ARISA qui sont partagés ou non entre les 2 vaches avant et après l'échange des contenus ruminiaux. Pour qu'un amplicon soit pris en compte, il a dû être détecté sur tous les prélèvements avant échange ou sur les 2 derniers prélèvements après l'échange. Avant échange les 3 échantillons ont été prélevés 2 et 1 jours avant et le jour même avant la procédure d'échange. Les prélèvement après échange sont ceux à 34 et 65 jours après échange (Weimer et al., 2010).....	78
Tableau 17 : Amplicons de différentes tailles obtenus par ARISA, qui sont partagés ou non entre les 2 vaches, avant et après l'échange des contenus ruminiaux. Pour qu'un amplicon soit pris en compte, il a dû être détecté sur tous les prélèvements avant échange ou sur les 2 derniers prélèvements après l'échange. Avant échange les 3 échantillons ont été prélevés 2 et 1 jours avant et le jour même avant la procédure d'échange. Les prélèvement après échange sont ceux à 61 et 62 jours après échange (Weimer et al., 2010).....	80
Tableau 18 : Caractéristiques des fermentations ruminales des génisses nourries à la paille d'orge avant et après l'inoculation de contenu ruminal provenant de bisons (Ribeiro et al., 2017).....	84
Tableau 19 : Composition taxonomique au niveau des familles de communautés bactériennes des génisses canulées nourries avec une ration à base de paille d'orge avant et après l'inoculation de contenu ruminal de bison. Les p-value ont été ajustées par la méthode FDR (False discovery rate de Benjamini-Hochberg). Un seuil de 0,15 a été utilisé pour déterminer la significativité des résultats (Ribeiro et al., 2017).....	85

Partie I

Chapitre 1

Tableau 1 : Composition de l'alimentation, des quantités distribuées en fonction du poids des chèvres et des périodes de distribution sur l'ensemble de la période d'expérimentation. Le jour de synchronisation des contenus ruminiaux est considéré comme étant do. PV : Poids Vifs ; CMV : Complément en minéraux et Vitamines ; NDF : Neutral Detergent Fiber ; ADF : Acid Detergent Fiber ; ADL : Acid Detergent Lignin ; MAT : Matière Azotée Totale.....	104
---	-----

Tableau 2 : Tableau indiquant le poids moyen des chèvres (PV) mesuré 1 fois par semaine pendant 32 semaines sur l'ensemble de l'essai ainsi que l'écart type associé.....	110
---	-----

Tableau 3 : Tableau indiquant la matière sèche ingérée (MSI) par les chèvres moyennée sur trois périodes d'une semaine au cours de l'expérimentation (d -84 à d -79, d 26 à d 31 et d 139 à d 144 sachant que la synchronisation des contenus ruminiaux est considérée comme d 0).....	110
Tableau 4 : Moyennes des caractéristiques des cinétiques d'ingestion des 12 chèvres sur l'ensemble de l'expérimentation concernant le repas distribué l'après-midi. Les 4 variables sont le temps où la consommation a atteint 80 % de sa consommation sur le repas du soir (T80), l'écart type de T80 (et(T80)), le nombre de repos inter-repas (> 8min) (nb_repos) et la moyenne des sommes journalières des repos inter-repas (tps_repos_cumul).....	112
Tableau 5 : Les 2 variables présentées ici sont : le taux de passage de la phase liquide (TPPL) et le taux de passage de la phase solide (TPPS) pour 12 chèvres tarées nourries avec une ration couvrant les besoins d'entretien de ces animaux.....	113
Tableau 6 : Analyse de similarité (one-way ANOSIM) testant les rangs des indices de dissimilarité de Bray-Curtis calculés à partir de la composition au niveau OTU des microbiotes des 12 chèvres entre les différents jours de prélèvement. La statistique R mesure la séparation entre 2 communautés. R = 1 indique des structures complètement différentes alors que R proche de 0 indique que les 2 communautés sont très proches. Ce critère est basé sur des comparaisons des rangs des distances intra et inter-groupes. Les R et P-values des comparaisons significativement différentes sont représentés en gras. Les p-values sont basées sur un test de permutation de Monte Carlo avec 999 permutations.....	121
Tableau 7 : Tableau présentant le nombre de familles parmi les 20 ayant leurs séquences lues plus de 5000 fois sur l'ensemble de l'expérimentation et ayant une différence significative entre 2 temps de prélèvement. Les temps de prélèvement sont 53 jours avant synchronisation et 3, 35, 114 et 141 jours après.....	121
Tableau 8 : Tableau présentant le nombre de genres parmi les 36 dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois sur l'ensemble de l'expérimentation et ayant une différence significative entre 2 temps de prélèvement. Les temps de prélèvement sont 53 jours avant synchronisation et 3, 35, 114 et 141 jours après.....	122
Tableau 9 : Abondances relatives en pourcentage des 20 familles dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois durant l'expérimentation aux différents temps de prélèvement des contenus ruminiaux (d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141) sachant qu'une synchronisation des contenus ruminiaux a été réalisée à d 0 (n = 12). La P-value de l'analyse testant l'évolution d'une famille en fonction du temps et prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite. Les lettres en exposant à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupes suite à un test de comparaison des moyennes ajustées avec une correction de Bonferroni quand le test était significatif. Un code couleur basé sur la composition initiale (d -53) facilite la lecture du tableau. Un écart de minimum 2 tons indique une différence significative avec la composition initiale. L'absence de couleur de fond ou les couleurs 4 et 6 indiquent un niveau non significativement différent du niveau initial. *Ce sont deux cas particuliers où le modèle général est significatif mais où le test de comparaison de moyennes ne montrait que des tendances sur la comparaison des valeurs extrêmes.....	123
Tableau 10 : Abondances relatives en pourcentage des 36 genres dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois durant l'expérimentation aux différents temps de prélèvement des contenus ruminiaux (d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141) sachant qu'une synchronisation des contenus ruminiaux a été réalisée à d 0 (n = 12). La P-value de l'analyse testant l'évolution d'un genre en fonction du temps et prenant en compte la structure en mesures répétées (voir	

matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite. Les lettres majuscules à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupes suite à un test de comparaison des moyennes ajustées quand le test était significatif. Un code couleur basé sur la composition initiale (d -53) facilite la lecture du tableau. Un écart de minimum 2 tons indique une différence significative avec la composition initiale. L'absence de couleur de fond ou les couleurs 4 et 6 indiquent un niveau non significativement différent du niveau initial. *C'est un cas particulier où le modèle général est significatif mais le test de comparaison de moyennes ne montrait qu'une tendance sur la comparaison des valeurs extrêmes.....124

Tableau 11 : Tableau reportant la significativité des variables caractérisant les chèvres testées une à une par temps de prélèvement avec une analyse de redondance (RDA) avec une procédure de permutation de Monte Carlo. La significativité des tests est indiquée : non significatif « NS » ; en tendance $0,1 > p\text{-value} > 0,05$ « - » ; $0,05 > p\text{-value} > 0,01$ « * » et $0,01 > p\text{-value}$ « ** ». Les variables testées sont : les taux de passage de la phase liquide (TPPL) ; les taux de passage de la phase solide (TPPS) ; la matière sèche ingérée (MSI) ; le temps où la consommation a atteint 80 % de la consommation sur le repas du soir (T80) ; et l'écart type de T80 (et(T80)). Les temps de prélèvement sont 53 jours avant synchronisation et 3, 35, 114 et 141 jours après.....125

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des corrélations entre le taux de passage de la phase solide (TPPS) des 12 chèvres et la composition des 20 familles principales observées dans leurs microbiotes ruminiaux 114 (d 114) et 141 jours (d 141) après synchronisation de leur contenu. Dans les colonnes d 114 et d 141 sont indiqués la significativité du test : non significatif « NS » ; en tendance $0,1 > p\text{-value} > 0,05$ « - » ; $0,05 > p\text{-value}$ « * ». Dès que le test est au moins en tendance, le coefficient de corrélation de Spearman rho est indiqué. Ainsi, un coefficient positif indiquera une augmentation de la famille avec une augmentation du TPPS alors qu'un coefficient négatif indiquera une diminution de la famille avec l'augmentation du TPPS.....128

Tableau 13 : Tableau récapitulatif de l'effet du taux de passage de la phase solide (TPPS) des 12 chèvres sur la composition des 36 genres principaux observés dans leurs microbiotes ruminiaux 114 (d 114) et 141 jours (d 141) après synchronisation de leur contenu. Dans les colonnes d 114 et d 141 sont indiqués la significativité du test : non significatif « NS » ; en tendance $0,1 > p\text{-value} > 0,05$ « - » ; $0,05 > p\text{-value}$ « * ». Dès que le test est au moins en tendance le coefficient de corrélation de Spearman rho est indiqué. Ainsi, un coefficient positif indiquera une augmentation du genre avec une augmentation du TPPS alors qu'un coefficient négatif indiquera une diminution du genre avec l'augmentation du TPPS.....129

Chapitre 2

Table 1: One-way ANOSIM (Analysis of Similarity) testing ranked Bray-Curtis dissimilarity indices between the 10 goats microbiota compositions at OTU taxonomic rank and between days, i.e. d -8 and d -5 (before rumen contents pooling) and d 2, d 139 and d 148 (after rumen contents pooling = d 0). The R-test statistic measures whether separation of community structure is found ($R = 1$) or not ($R = 0$). It is based on the comparison of the ranks of distances between and within groups. The R and Bonferroni-corrected P-values (P) of the pairwise comparisons with significant differences are depicted in bold; P-values are based on a 999 Monte Carlo permutations procedure.....146

Table 2: Animal husbandry and production traits as well as rumen contents dynamics of the 10 lactating goats. The values are the averages per goat throughout the experiment; body weight (BW), dry matter intake (DMI, in kg/d and DMIBW in % BW), milk yield at peak (MYPeak), milk yield persistency (MYPer), rumen liquid (LPR) and solid (SPR) fractional

passage rate , intake rate estimate (T80), intake rate estimate variability (sd(T80)) and between eating bout interval (BBI).....148

Table 3: Principal characteristics of diets concerning dry matter intake, feed components, and chemical composition. The feed change took place à d 86.....155

Partie II

Tableau 1 : Description des vaches utilisée. Les poids sont issus d'une pesée des animaux le 6 novembre 2018, avant le début de l'expérimentation.....170

Tableau 2 : Récapitulatif des quantités de matière sèche ingérée sur les 2 rations (EM et FOIN) des ingrédients composant ces 2 rations et de leur composition chimique.....171

Tableau 3 : Transition alimentaire de l'aliment riche en concentré (ration EM) à l'aliment riche en fibres (ration FOIN). Ce tableau indique les quantités distribuées de chaque composant des rations pendant cette semaine de transition alimentaire.....172

Tableau 4 : Transition alimentaire de l'aliment riche en fibres (ration FOIN) à l'aliment riche en concentré (ration EM). Ce tableau indique les quantités distribuées de chaque composant des rations pendant cette semaine de transition.....172

Tableau 5 : pH des contenus ruminaux mesurés le matin avant la distribution du repas pendant les 4 semaines principales de mesures sur les deux rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminaux.....182

Tableau 6 : Concentrations ruminales moyennes journalières en NH₃ (mmol/L) mesurées pendant les 4 semaines principales de mesures pour les deux rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminaux.....184

Tableau 7 : Concentrations ruminales moyennes journalières (mmol/L) en acide acétique (C₂), acide propionique (C₃) et acide butyrique (C₄) mesurées pendant les 4 semaines principales de mesures pour les rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de Foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminaux.....185

Tableau 8 : Production de gaz totale (gaz_tot (mmol)), production de méthane totale (CH₄_tot (mmol)) et le taux fractionnaire de la fraction insoluble (taux_Orskov (h-1)) mesurés pendant des incubations in vitro de 47h pendant les 4 semaines principales de mesures sur les deux rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminaux.....190

Tableau 9 : Analyse de similarité (one-way ANOSIM) testant les rangs des indices de dissimilarité de Bray-Curtis calculés à partir de la composition au niveau des OTU des microbiotes des 6 vaches entre les différents jours de prélèvement. La statistique R, présentée pour chaque comparaison, mesure la séparation entre 2 communautés. R = 1 indique des structures de communautés totalement différentes alors que R proche de 0 indique que les 2 communautés sont très proches. Ce critère est basé sur des comparaisons des rangs des distances intra et intergroupes. Les p-values, présentées en italiques, sont basées sur un test de permutation de Monte Carlo avec 9999 permutations. Lorsque les p-values sont inférieures à 0,05, la case est grisée. Lorsque les p-values ne sont pas significatives, la case est entourée d'une bordure plus épaisse. Orange = ration EM ; vert = ration FOIN ; gris = comparaison entre les 2 rations.....203

Tableau 10 : Abondances relatives en pourcentage des 16 familles dont les séquences ont été lues plus de 2 000 fois au cours de l'expérimentation. Les pourcentages de ces familles sont présentés pour les 4 semaines de mesures (figure 1) sur les 2 rations (EM et FOIN) avant (av)

et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux qui a été réalisée à d 0. La P-value de l'analyse testant l'évolution d'une famille en fonction de la semaine de mesure et prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite (P-value > 0,1 : 'NS' ; 0,1 > P-value >= 0,05 : '-' ; 0,05 > P-value >= 0,01 : '**' ; 0,01 > P-value >= 0,001 : '***' ; 0,001 > P-value : '****'). Les lettres à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupe suite à un test de comparaison des moyennes ajustées quand le test était significatif.....204

Tableau 11 : Abondances relatives en pourcentage des 24 genres dont les séquences ont été lues plus de 2 000 fois au cours de l'expérimentation. Les pourcentages de ces genres sont présentés pour les 4 semaines de mesures (figure 1) sur les 2 rations (EM et FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux qui a été réalisée à d 0. La P-value de l'analyse testant l'évolution d'un genre en fonction de la semaine de mesure prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite (P-value > 0,1 : 'NS' ; 0,1 > P-value >= 0,05 : '-' ; 0,05 > P-value >= 0,01 : '**' ; 0,01 > P-value >= 0,001 : '***' ; 0,001 > P-value : '****'). Les lettres à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupe suite à un test de comparaison des moyennes ajustées quand le test était significatif. *Parfois pour cette catégorie le modèle général peut être significatif sans que le test de comparaison de moyennes ne le soit, il y a souvent une tendance pour la comparaison des valeurs extrêmes.....205

Tableau 12 : Valeurs des taux de passage de la phase liquide (TPPL) par vache en fonction des deux rations distribuées. La ration riche en concentrés est symbolisée dans le tableau par EM et la ration riche en fibres est symbolisée dans le tableau par FOIN.....214

Tableau 13 : Valeurs des taux de passage de la phase solide (TPPS) par vache en fonction des deux rations distribuées. La ration riche en concentrés est symbolisée dans le tableau par EM et la ration riche en fibres est symbolisée dans le tableau par FOIN.....215

Tableau 14 : valeurs du poids vif des 6 vaches (PV) en kg et du contenu ruminal présent dans leurs rumens le jour de la synchronisation des contenus ruminiaux (CR) en kg.....216

Tableau 15 : Tableau reportant la significativité des caractéristiques des vaches testées une à une par jour de prélèvement avec une analyse de redondance (RDA) et une procédure de permutation de Monte Carlo. Les caractéristiques testées sont : le poids des animaux (PV), la quantité de contenu ruminal présent le jour de la synchronisation (CR), le taux de passage de la phase solide avec la ration EM (TPPS_EM) et avec la ration FOIN (TPPS_FOIN) ainsi que le taux de passage de la phase liquide avec la ration EM (TPPL_EM) et avec la ration FOIN (TPPL_FOIN). Le jour de la synchronisation des contenus ruminiaux est noté d 0. Les temps de prélèvement pour la ration EM sont d -43, d -39, d 111 et d 115. Les temps de prélèvement pour la ration FOIN sont d -8, d -4, d 76 et d 80. (P-value > 0,1 : 'NS' ; 0,1 > P-value >= 0,05 : '-' ; 0,05 > P-value : '**').....217

Discussion générale

Tableau 1 : Rappel rapide des principes des échanges de contenu, du partage de contenu et de la synchronisation ainsi que des principaux avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes.....231

Conclusion

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques de l'animal hôte n'étant pas corrélées avec la composition du microbiote (italique) et étant corrélées avec la composition du microbiote

(gras). Les paramètres écrits en bleu et en gras sont ceux liés aux flux des phases solide et liquide traversant le rumen.....248

LISTE DES FIGURES

Introduction – Bibliographie

- Figure 1 : Amélioration du rendement journalier de séquençage de l'ADN des années 80 à nos jours (Stratton et al., 2009).....34
- Figure 2 : Organisation du réseau (reticulum) représenté en orange, du rumen représenté en vert, du feuillet (omasum) représenté en rouge et de la caillette (abomasum) représenté en rose chez la vache. La vue de gauche et de droite de l'animal est représentée (Bedrane, 2019).....38
- Figure 3 : Changement de populations de quelques espèces bactériennes observées durant une transition alimentaire à partir d'un qRT-PCR. Les analyses ont comporté 4 réplicats biologiques et 2 réplicats techniques. Les changements de populations sont représentés par des facteurs multiplicatifs par rapport à la taille de la population lorsque les animaux étaient nourris de foin de prairie au cours de la phase d'adaptation. Un gène à copie unique conservé universellement, rpoB, a été utilisé pour la normalisation. Les étoiles indiquent des différences significatives de composition par rapport à la situation initiale (Fernando et al., 2010).....50
- Figure 4 : Diagramme de Venn montrant les superpositions des OTU entre le lot témoin ayant un ratio fourrages sur concentrés de 65/35 (LC), le lot sur consommant l'aliment au ratio fourrages sur concentrés de 35/65 depuis 6 semaines (HL) et le lot consommant l'aliment au ratio fourrages sur concentrés de 35/65 depuis 19 semaines (HS) (Hua et al., 2017).....52
- Figure 5 : Composition phylogénétique des genres bactériens présents au-dessus du seuil de 0,9 % dans les fractions ruminales totales, liquides et solides avec le régime foin et avec le pâturage, provenant de données analysées à l'aide de techniques de pyroséquençage bTEFAP (Pitta et al., 2010).....54
- Figure 6 : Différences des abondances relatives exprimées en pourcentages des OTU obtenus à partir du séquençage 16S au niveau des familles pour les échantillons de contenu ruminant associés à l'épithélium, à la phase liquide et à la phase solide pour les 3 prélèvements en semaine 1, 5 et 10 pour les 5 animaux témoins et les 5 animaux ayant suivi la transition alimentaire (Schären et al., 2017).....55
- Figure 7 : Algorithme de groupement des paires non pondérées avec le dendrogramme des moyennes arithmétiques représentant l'analyse de classement hiérarchique des profils d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant . B indique la race de chèvre Boer, Y indique la race de chèvre jaune Nanjiang et C indique la race de chèvre à cachemire de Mongolie intérieure (Shi et al., 2008).....64
- Figure 8 : Composition des microbiotes ruminants en bactéries et en archées en fonction de la race des vaches (Holstein ou Brown Swiss). Abondances relatives des bactéries et archées ayant une abondance supérieure à 0.1 % dans les 2 races (Gonzalez-Recio et al., 2017).....68
- Figure 9 : Abondances relatives au niveau des familles de la composition de contenu ruminant chez 6 yaks (Guo et al., 2015).....71
- Figure 10 : Diagramme de Venn montrant la distribution des différentes tailles d'amplicons détectés par l'analyse ARISA dans les phases solides et liquides de la vache n°1 et n°2 (Welkie et al., 2010).....72

Figure 11: Occurrence des OTU entre les échantillons. Les différents OTU ont été additionnés au sein de catégorie en fonction de leurs fréquences d'occurrences entre les vaches. Le pourcentage de chaque catégorie a été calculé en fonction de la population totale des OTU. L'axe des abscisses représente le pourcentage de vaches partageant un OTU spécifique. L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'OTU dans chacune des catégories (Jami and Mizrahi, 2012a).....	73
Figure 12: Abondances relatives de 13 espèces bactériennes obtenus par analyse PCR quantitative en temps réel en proportion de la population bactérienne totale (Jami and Mizrahi, 2012a).....	74
Figure 13: Occurrence des OTU entre les échantillons. Les différents OTU ont été additionnés au sein de chaque catégorie en fonction de leur fréquence d'occurrence entre les vaches. Le pourcentage de chaque catégorie a été calculé en fonction de la population totale des OTU. L'axe des abscisses représente le pourcentage de vaches partageant un OTU spécifique. L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'OTU dans chacune des catégories (Jami and Mizrahi, 2012b).....	75
Figure 14 : Genres et abondances partagés entre les différents prélèvements. Les boîtes à moustaches indiquent les abondances relatives des genres bactériens partagés par l'ensemble des animaux de l'étude mesurées par qPCR. La couleur des boîtes à moustaches indique le phylum auquel appartient chaque genre (Bacteroidetes (bleu), Firmicutes (rouge), Proteobacteria (vert), Tenericutes (bleu clair), Cyanobacteria (orange), TM7 (gris) et Actinobacteria (violet)). Les taxons dont le genre est non-identifiés sont indiqués par une astérisque sur le dernier niveau taxonomique connu (Jami and Mizrahi, 2012b).....	76
Figure 15 : Graphique d'ordination représentant l'évolution des communautés bactériennes de la phase liquide des contenus ruminiaux des 2 vaches de l'expérimentation. Les coordonnées des points ont été obtenues par une analyse de correspondance basée sur les résultats de l'analyse ARISA utilisant des amorces spécifiques aux bactéries. CA1 et CA2 représentent les 2 premiers axes de l'analyse de correspondance. Chaque point représente un échantillon et le nombre à côté de chacun indique le jour de prélèvement par rapport à l'échange des contenus ruminiaux. PRE et POST indique les échantillons prélevés immédiatement avant et immédiatement après l'échange. Les échantillons ont des communautés bactériennes davantage semblables lorsqu'ils sont proche sur ce graphique et inversement (Weimer et al., 2010).....	78
Figure 16 : Graphiques d'ordination représentant l'évolution des communautés bactériennes de la phase liquides des contenus ruminiaux des 2 vaches de l'expérimentation. Les coordonnées des points ont été obtenues par une analyse de correspondance basée sur les résultats de l'analyse ARISA utilisant des amorces spécifiques aux bactéries. CA1, CA2 et CA1', CA2'représentent les 2 premiers axes de l'analyse de correspondance. Chaque point représente un échantillon et le nombre à côté de chaque point indique le jour de prélèvement par rapport à l'échange des contenus ruminiaux. PRE et POST indique les échantillons prélevés immédiatement avant et immédiatement après l'échange. Les échantillons ont des communautés bactériennes davantage semblables lorsqu'ils sont proche sur ce graphique et inversement (Weimer et al., 2010).....	79
Figure 17 : Représentation sur une analyse NMDS (nonmetric multidimensional scaling) par des ellipses représentant l'intervalle de confiance à 95 % des coordonnées des mesures de diversité de Bray-Curtis pour la phase solide et la phase liquide de contenus ruminiaux pour 3 paires de vaches avant et après un échange de contenus ruminiaux. Les ellipses sont colorées en fonction de l'efficacité de l'animal, les couleurs froides indiquent une efficacité faible alors que les couleurs chaudes indiquent une efficacité élevée. La couleur la plus sombre indique la période avant échange. La couleur intermédiaire indique la première période après échange (0-7 jours post échange) et la couleur la plus claire indique la seconde période après échange (10-56 jours post échange). Les flèches indiquent le sens d'évolution chronologique (Weimer et al., 2017a).....	81

Figure 18 : Design expérimental. Les 16 génisses ont été divisées en 2 groupes de 8 de poids identiques pour permettre d'étudier les vitesses de passage des fibres dans le tractus digestif. Ces sous-groupes ont encore été divisés en 2 pour réaliser les autres mesures. Les prélèvements de microbiote ont été réalisés sur l'ensemble des animaux le même jour (Ribeiro et al., 2017).....83

Figure 19 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) au niveau des OTU de génisses avant et après inoculation de contenu ruminal de bison, ainsi que la composition du second inoculum de bison utilisé. Les proportions de variance expliquées par les axes sont données entre parenthèses après le nom des axes (Ribeiro et al., 2017).....86

Partie I

Chapitre 1

Figure 1 : Schéma des mesures réalisées sur les chèvres au cours de l'expérimentation. La ligne continue représente le temps sur laquelle sont indiqués les différents temps de mesures et sur laquelle est indiqué le mélange des contenus ruminiaux à do par un sablier noir. Les prélèvements de contenus ruminiaux pour l'analyse microbiote sont indiqués par des flèches. Les périodes de mesure des cinétiques d'ingestion sont représentées par des rectangles blancs. Les périodes de mesure des taux de renouvellement du rumen sont représentées par des rectangles hachurés verticalement. Enfin les pesées hebdomadaires sont symbolisées par des étoiles.....105

Figure 2 : Graphique représentant le logarithme du nombre de pauses observées sur les 3 périodes de mesures des cinétiques d'ingestion en fonction du temps de pause. Les mesures des balances sont obtenues toutes les 2 minutes. L'intersection entre les de droites en pointillés noir indique la limite entre les pauses intra-repas et les pauses inter-repas.....111

Figure 3 : Matrice de corrélations entre les variables décrivant les cinétiques d'ingestion des chèvres. Les coefficients de corrélation sont indiqués en haut à droite au-dessus de la diagonale. La significativité du test de Pearson est indiquée par le code suivant : $0,1 > p\text{-value} > 0,05 = \text{'-'}$; $0,05 > p\text{-value} > 0,01 = \text{'*'}$; $0,01 > p\text{-value} > 0,001 = \text{'***'}$; $0,001 > p\text{-value} = \text{'****'}$. Les variables testées ici sont le temps où la consommation a atteint 80 % de sa consommation sur le repas du soir (T80), l'écart type de T80 (et(T80)), le nombre de repos inter-repas (> 8min) (nb_repos) et la moyenne des sommes journalières des repos inter-repas (tps_repos_cumul).....112

Figure 4 : Matrice de corrélations entre 2 variables décrivant les taux de passage de la phase liquide et solide TPPL et TPPS respectivement. Les coefficients de corrélation sont indiqués en haut à droite au-dessus de la diagonale. La significativité du test de Pearson est indiquée par le code suivant : $0,1 > p\text{-value} > 0,05 = \text{'-'}$; $0,05 > p\text{-value} > 0,01 = \text{'*'}$; $0,01 > p\text{-value} > 0,001 = \text{'***'}$; $0,001 > p\text{-value} = \text{'****'}$ 114

Figure 5 : Matrice de corrélations des variables conservées pour caractériser les chèvres. La significativité du test de Pearson est indiquée par le code suivant : $0,1 > p\text{-value} > 0,05 = \text{'-'}$; $0,05 > p\text{-value} > 0,01 = \text{'*'}$; $0,01 > p\text{-value} > 0,001 = \text{'***'}$; $0,001 > p\text{-value} = \text{'****'}$. Les 6 variables conservées sont : les taux de passage de la phase liquide (TPPL) ; Les taux de passage de la phase solide (TPPS) ; Le poids vif des chèvres (PV) ; la matière sèche ingérée (MSI) ; le temps où la consommation a atteint 80 % de la consommation total sur le repas du soir (T80) ; et l'écart type de T80 (et(T80)).....115

Figure 6 : Représentation d'une ACP avec les variables conservées pour décrire les 12 chèvres. Les chèvres sont représentées sur le graphiques avec des ronds rouges pour les Alpines et des triangles verts pour les Saanen. Les barycentres de ces 2 groupes sont également représentés.

Les variables conservées sont représentées par des flèches bleues. Il s'agit : des taux de passage de phase liquide (TPPL) ; des taux de passage de la phase solide (TPPS) ; du poids vif des chèvres (PV) ; de la matière sèche ingérée (MSI) ; du temps où la consommation a atteint 80 % de la consommation sur le repas du soir (T80) ; et de l'écart type de T80 (et(T80)). La dimension 1 représente 40,9 % de la variabilité et la dimension 2 représente 27 % de la variabilité.....116

Figure 7 : Histogramme des abondances relatives des bactéries et archées au niveau des familles 53 jours avant la synchronisation des rumens. Les familles ayant été observées moins de 5 000 fois sont placées dans la catégorie « Autres ». Les 12 chèvres sont identifiées sur l'axe des abscisses.....117

Figure 8 : Boîtes à moustaches représentant la richesse par temps des différents prélèvements de contenus ruminiaux. Ces 5 temps d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141 se situent autour d'une synchronisation du microbiote qui a eu lieu à d 0. Les comparaisons des richesses 2 à 2 ont été réalisées par un test de Wilcoxon. Si 2 groupes partagent une même lettre alors ils ne sont pas significativement différents, au contraire si 2 groupes ne partagent pas une lettre alors ils sont significativement différents.....118

Figure 9 : Boîtes à moustaches représentant les indices de diversité de Shannon par temps des différents prélèvements de contenus ruminiaux. Ces 5 temps d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141 se situent autour d'une synchronisation du microbiote qui a eu lieu à d 0. Les comparaisons des richesses 2 à 2 ont été réalisées par un test de Wilcoxon. Si 2 groupes partagent une même lettre alors ils ne sont pas significativement différents, au contraire si 2 groupes ne partagent pas une lettre alors ils sont significativement différents.....119

Figure 10 : Analyse d'ordination non contrainte des coordonnées principales (PCoA) des échantillons de contenus ruminiaux basée sur les dissimilarités des communautés de Bray Curtis. Les contenus ruminiaux des 12 chèvres ont été mélangés et homogénéisés à d 0. Les 5 jours de prélèvement sont 53 jours avant la synchronisation des contenus et 3, 35, 114 et 141 jours après. Les échantillons d'un même jour sont représentés avec le même symbole et entouré par un polygone de même couleur (d -53 : cercles noirs, d 3 : carrés verts, d 35 : losanges rouges, d 114 : croix bleues et d 141 triangles marron). Les flèches indiquent l'évolution chronologique.....120

Figure 11 : Graphique de l'analyse de redondances (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 12 chèvres 114 jours après la synchronisation des contenus ruminiaux. Les échantillons de chaque chèvre sont identifiés par la lettre G suivie des 3 derniers chiffres de leurs numéros d'identification. Le diagramme d'ordination est contraint par les variables caractérisant les chèvres sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où cette variable augmente. La p-value obtenu par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. La variable sélectionnée ici est le taux de passage de la phase solide (TPPS). Les variables non sélectionnées sont le taux de passage de la phase liquide (TPPL), la matière sèche ingérée (MSI), le temps pour consommer 80% de la ration (T80) et la variabilité de ce temps (et(T80)). Le premier axe représente 19,7 % de la variabilité. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....126

Figure 12 : Graphique de l'analyse de redondances (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log transformées du microbiote ruminal des 12 chèvres 141 jours après la synchronisation des contenus. Les échantillons de chaque chèvre sont identifiés par la lettre G suivie des 3 derniers chiffres de leurs numéros d'identification. Le diagramme d'ordination est contraint par les variables caractérisant les chèvres sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où cette variable augmente. La p-value obtenu par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. La variable sélectionnée ici est le taux de passage de la phase solide (TPPS). Les variables non sélectionnées sont le taux de passage de la phase

liquide (TPPL), la matière sèche ingérée (MSI), le temps pour consommer 80% de la ration (T80) et la variabilité de ce temps (et(T80)). Le premier axe représente 21,3 % de la variabilité. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....127

Figure 13 : Graphique illustrant la variabilité des mesures de taux de passage de la phase solide (TPPS) pour les 12 chèvres sur 3 périodes : p1 (de d -56 à d -51 représenté par des triangles gris), p2 (de d 14 à d 19 représenté par des losanges gris) et p3 (de d 133 à d 138 représenté par des carrés gris) avec d 0 correspondant à la synchronisation des contenus ruminiaux. Les moyennes de TPPS pour chacune des chèvres sont représentées par les rectangles noirs.....133

Chapitre 2

Figure 1: Overview of the experiment. Ten lactating goats receiving a nutritionally equivalent feed, were milked twice a day (hatched rectangle) and weighed each week (black star) throughout the experiment. The rumen contents pooling was carried out on d 0. Rumen microbiota sampling days are indicated by arrows. Horizontal hatched rectangles represent the recording periods of intake patterns. Vertical hatched rectangles represent rumen fractional passage rate measurement periods. Empty rectangles represent feed intake measurement periods with measurements of dry matter intake expressed as kg/day (DMI) and as % BW (DMIBW). Milk yield information was used to estimate the milk yield at the peak (MYPeak) and milk yield persistency (MYPer). Goat feeding behavior was characterized with 3 parameters: estimation of intake rate (T80) and its variability (sd(T80)), and between eating bout intervals (BBI). Rumen passage rate measurements were characterized with 2 variables: the liquid passage rate (LPR), and the solid passage rate (SPR).....144

Figure 2: Individual rumen bacterial and archaeal relative abundances at family taxonomic rank. The families under 5,000 reads are into “Others”. The 10 goats are identified by their breed (S: Saanen; A: Alpine) and a number. In addition to the rumen contents pool (RCP) at d 0, three histograms per goat display its rumen community composition before (average of d -8 and d -5), two days after rumen contents pooling (d 2) and at the end of the experiment (average of d 139 and d 148).....145

Figure 3: Principal coordinates analysis ordination of rumen microbiota samples based on OTU community dissimilarities (Bray Curtis). The rumen contents of 10 goats were pooled on day d 0. Sampling days before (d -8 and d -5), 2 days (d 2) and 5 months after (d 139 and d 148) are included as supplementary variables to show their relative positions. The samples of a given day are marked with a symbol (d -8: black circle; d -5: blue square; d 2: green diamond; d 139: brown triangle; d 148: red star) and surrounded by a polygon.....146

Figure 4: Biplot of RDA based on the log transformed OTU relative abundances of rumen microbiota relative to hosts traits in 10 lactating goats before rumen contents pooling (d -8 and d -5). The samples from each goat are identified by a symbol and the goat's breed (S: Saanen; A: Alpine) and number. Ordination diagrams are constrained by the host traits selected by an interactive forward selection with FDR corrected P-value ($P < 0.05$). Arrows represent the directions in which host traits increase. Bottom-right, Pvalue obtained by Monte Carlo Permutation Procedure (MCPP) is reported. a. The selected rumen dynamic variables are the rumen liquid passage rate (LPR), solid passage rate (SPR), intake rate (T80), and between eating bout intervals (BBI). The discarded variable is the intake rate variability (sd(T80)). b. The selected host traits are the body weight (BW) and dry matter intake (DMI) along with the breed (black rectangles). The discarded variables are the milk yield persistency (MYPer) and dry matter intake expressed as % of BW (DMIBW). First and second ordination axes are plotted, representing 14.6% and 12.2% of the total variation in the microbiota composition related to the 3 selected traits, respectively. First and second

ordination axes are plotted, representing 14.7% and 13.6% of the total variation in the microbiota composition related to the 4 selected traits, respectively.....150

Figure 5: Biplot of RDA based on the log transformed OTU relative abundances of rumen microbiota relative to hosts traits in 10 lactating goats after rumen contents pooling (d 139 and d 148). Both samples of each goat are identified by a symbol and the goat's breed (S: Saanen; A: Alpine) and number. Arrows represent the directions in which host traits increase. Bottom-right, P-value obtained by Monte Carlo Permutation Procedure (MCP) is reported. a. The ordination diagram is constrained by the solid passage rate (SPR), intake rate estimate (T80) and between eating bout interval (BBI). The corrected p value associated to these variables in the forward selection process equal 0.14. The discarded variables are the intake rate variability (sd(T80)) and the liquid passage rate (LPR). b. The ordination diagram is constrained by the host traits selected by an interactive forward selection with FDR corrected p value ($P < 0.05$). The selected host trait is the milk yield persistency (MYPer) along with the breed (black rectangles). The discarded variables are the body weight (BW), and dry matter intake in kg/d (DMI) and in % of BW (DMIBW). First and second ordination axes are plotted, representing 16.6% and 6.5% of the total variation in the microbiota composition related to the 2 selected traits. First and second ordination axes are plotted, representing 13.7% and 8.9% of the total variation in the microbiota composition related to the 3 selected traits.....151

Partie II

Figure 1 : Schéma des principales mesures réalisées sur les vaches au cours de l'expérimentation. Chacun des tronçons de la ligne de temps représente une semaine. La synchronisation des contenus ruminiaux indique une procédure de vidange, mélange et réensemencement des contenus ruminiaux des 6 vaches. Les triangles noirs indiquent les incubations réalisées in vitro.....170

Figure 2 : Diagramme du modèle de l'évolution de la concentration des cendres insolubles dans le rumen en fonction du temps, des apports périodiques par les repas et d'un apport ponctuel avec l'incorporation de balle de riz.....176

Figure 3 : Analyse de sensibilité du modèle décrivant l'évolution de la concentration des cendres insolubles dans le contenu ruminal pour différents taux de passage de la phase solide (TPPS). Les valeurs des paramètres du modèle présenté ici sont : [cendres insolubles]_{init} = 1 ; repas = 0,2 ; incorpo_bdr = 3 et TPPS qui prend des valeurs de 1 à 2 avec une marche de 0,2. L'incorporation de balle de riz, riche en cendres insolubles, est réalisée à 177h.....177

Figure 4 : Graphiques de boîtes à moustaches du pH ruminal mesuré pendant les 4 semaines de mesures en fonction des vaches. Le modèle cherchant à expliquer le pH en fonction des vaches est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences entre vaches. Deux vaches partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....182

Figure 5 : Graphiques de boîtes à moustaches du pH ruminal mesuré après la synchronisation des contenus ruminiaux avec la ration FOIN en fonction des jours de prélèvement. Le modèle décrivant le pH en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....183

Figure 6 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration en NH_3 ruminale en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en NH_3 en fonction du temps est significatif (P

< 0,05). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.....184

Figure 7 : Graphiques de boîtes à moustaches du ratio de la concentration ruminale d'acide acétique sur acide propionique mesuré pendant les 4 semaines de mesures en fonction des vaches. Le modèle expliquant ce ratio en fonction des vaches est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences entre vaches. Deux vaches partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....186

Figure 8 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration ruminale en acide acétique en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en acide acétique en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.....187

Figure 9 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration ruminale en acide propionique en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en acide propionique en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.....188

Figure 10 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration ruminale en acide butyrique en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en acide butyrique en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.....189

Figure 11 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production de gaz totale mesurée durant les incubations in vitro en fonction de la ration. Le modèle expliquant cette production de gaz en fonction de la ration est significatif ($P < 0,05$). Un test de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni a permis d'identifier les différences entre rations à l'aide de lettres (deux variables une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes). EM : Ration riche en concentrés; FOIN : Ration riche en fibres.....190

Figure 12 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production de gaz totale avec la ration FOIN après la synchronisation des contenus ruminiaux en fonction du jour de la réalisation des incubations in vitro (Temps). Le modèle expliquant cette production de gaz en fonction du temps est significative ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps

partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....191

Figure 13 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production de méthane mesurée durant les incubations in vitro en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant cette production de méthane en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.....192

Figure 14 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production totale de méthane avec la ration FOIN après la synchronisation des contenus ruminiaux en fonction du jour de réalisation des incubations in vitro. Le modèle expliquant cette production de méthane en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....193

Figure 15 : Graphiques de boîtes à moustaches du taux fractionnaire associé à la phase insoluble (h-1) (paramètre c du modèle d'Orskov) durant les incubations in vitro en fonction de la ration. Le modèle expliquant ces taux en fonction de la ration est significatif ($P < 0,05$). Un test de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni a permis d'identifier les différences pour chaque ration. Deux rations partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM : Ration riche en concentrés; FOIN : Ration riche en fibres.....194

Figure 16 : Graphiques de boîtes à moustaches du taux fractionnaire associé à la phase insoluble (h-1) (paramètre c du modèle d'Orskov) avec la ration FOIN après la synchronisation des contenus ruminiaux durant les incubations en fonction du jour de réalisation de ces dernières. Le modèle expliquant ces taux en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....195

Figure 17 : Représentation graphique des variables et des individus. Les individus sont répartis en 4 catégories selon la ration distribuée et le moment de prélèvement. EM_ap : ration riche en amidon après la synchronisation ; EM_av : ration riche en amidon avant la synchronisation ; FOIN_ap : ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : ration riche en fibre avant la synchronisation ; NH₃ : concentration ruminal en ammoniac ; pH : pH ruminal ; C₂ : concentration ruminale en acide acétique ; C₃ : concentration ruminale en acide propionique ; AGV_tot : somme des acides acétique, propionique et butyrique ; ratio_C₂_sur_C₃ : ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique ; gaz_tot : production de gaz totale pendant les incubations in vitro ; CH₄_tot : production totale de méthane pendant les incubations in vitro et taux_Orskov : taux fractionnaire de la fraction insoluble concernant la cinétique de production de gaz durant les incubations in vitro (plus cette valeur est grande, plus la production de gaz est rapide).....196

Figure 18 : Représentation graphique des variables et des individus sur la ration EM. Les individus sont répartis en 2 catégories : EM_av : avant la synchronisation et EM_ap : après la synchronisation. NH₃ : concentration ruminal en ammoniac ; pH : pH ruminal ; C₂ : concentration ruminale en acide acétique ; C₃ : concentration ruminale en acide propionique ; AGV_tot : somme des acides acétique, propionique et butyrique ; ratio_C₂_sur_C₃ : ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique ; gaz_tot : production de gaz totale pendant les incubations in vitro ; CH₄_tot : production totale de méthane pendant les incubations in vitro et taux_Orskov : taux fractionnaire de la fraction insoluble concernant la cinétique de

production de gaz durant les incubations in vitro (plus cette valeur est grande, plus la production de gaz est rapide).....197

Figure 19 : Représentation graphique des variables et des individus sur la ration FOIN. Les individus sont répartis en 2 catégories : FOIN_av : avant la synchronisation et FOIN_ap : après la synchronisation. NH₃ : concentration ruminal en ammoniac ; pH : pH ruminal ; C₂ : concentration ruminale en acide acétique ; C₃ : concentration ruminale en acide propionique ; AGV_tot : somme des acides acétique, propionique et butyrique ; ratio_C₂_sur_C₃ : ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique ; gaz_tot : production de gaz totale pendant les incubations in vitro ; CH₄_tot : production totale de méthane pendant les incubations in vitro et taux_Orskov : taux fractionnaire de la fraction insoluble concernant la cinétique de production de gaz durant les incubations in vitro (plus cette valeur est grande, plus la production de gaz est rapide).....198

Figure 20 : Représentation de la cinétique des gaz fermentaires en fonction de la concentration ruminale en acide acétique. EM_ap : ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : ration riche en fibres avant la synchronisation.....199

Figure 21 : Diagramme en boîtes à moustaches représentant la richesse en OTU des microbiotes ruminiaux des 6 vaches durant les 4 semaines de mesures de l'essai. Les temps de prélèvement se situent autour d'une synchronisation des contenus ruminiaux à d 0. Les animaux ont été nourris avec une ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon pour EM_av (d -43 et d -39) et EM_ap (d 111 et d 115). Ils ont été nourris avec une ration à base de foin riche en fibres pour FOIN_av (d -8 et d -4) et FOIN_ap (d 76 et d 80). Les comparaisons 2 à 2 ont été réalisées par un test sur les moyennes ajustées. Si 2 groupes partagent une lettre, alors ils ne sont pas significativement différents.....200

Figure 22 : Diagramme en boîtes à moustaches représentant les indices de diversité de Shannon des microbiotes ruminiaux des 6 vaches durant les 4 semaines de mesures de l'essai. Les temps de prélèvement se situent autour d'une synchronisation des contenus ruminiaux à d 0. Les animaux ont été nourris avec une ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon pour EM_av (d 43 et d -39) et EM_ap (d 111 et d 115). Ils ont été nourris avec une ration à base de foin riche en fibres pour FOIN_av (d -8 et d 4) et FOIN_ap (d 76 et d 80). Les comparaisons 2 à 2 ont été réalisées avec un test sur les moyennes ajustées. Si 2 groupes partagent une lettre, alors ils ne sont pas significativement différents.....200

Figure 23 : Analyse d'ordination non contrainte des coordonnées principales (PCoA) des échantillons de contenus ruminiaux basée sur les dissimilarités des communautés de Bray Curtis. Les contenus ruminiaux des 6 vaches ont été mélangés et homogénéisés à d 0 (points noir). Les 14 jours de prélèvement sont d -43, d -39, d -8, d -4, d 0, d 3, d 22, d 36, d 57, d 76, d 80, d 92, d 111 et d 115. Les échantillons d'un même jour sont représentés avec le même symbole. L'aliment distribué aux vaches pour les échantillons d 43, d -39, d 92, d 111 et d 115 était à base d'ensilage de maïs et riche en amidon (points orange). L'aliment distribué aux vaches pour les échantillons d -8, d -4, d 0, d 3, d 22, d 36, d 57, d 76 et d 80 était à base de foin et riche en fibres (points vert). Les flèches noires indiquent l'évolution chronologique.....201

Figure 24 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches durant les 4 semaines de mesures (EM_av, EM_ap, FOIN_av et FOIN_ap). Le diagramme d'ordination est contraint par les paramètres fermentaires sélectionnés par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) (P<0,05). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés ici sont : la concentration ruminale en ammoniac (NH₃), la concentration ruminale en acide propionique (C₃), la concentration ruminale en acide butyrique (C₄), la concentration ruminale de l'ensemble des

trois AGV C2, C3 et C4 (AGVtot), le ratio C2/C3 (C2/C3), le pH ruminal (pH), la production totale de gaz in vitro (gaztot), la production totale de méthane in vitro (CH₄ tot) et la cinétique de production de gaz in vitro (taux_Orskov). Le paramètre non sélectionné est la concentration ruminale en acide acétique (C2). Le premier axe représente 13,6 % de la variabilité et le second 11,9 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....207

Figure 25 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches durant les 2 semaines de mesures réalisées avec la ration EM (EM_av et EM_ap). Le diagramme d'ordination est contraint par les paramètres fermentaires sélectionnés par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) (P<0,05). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés ici sont : la concentration ruminale en ammoniacque (NH₃), la concentration ruminale en acide propionique (C3), la concentration ruminale en acide butyrique (C4), la concentration ruminale de l'ensemble des trois AGV C2, C3 et C4 (AGVtot), le ratio C2/C3 (C2/C3), la production totale de gaz in vitro (gaztot), la cinétique de production de gaz (Taux Orskov) et la production totale de méthane in vitro (CH₄ tot). Les deux paramètres non sélectionnés sont le pH ruminal (pH) et la concentration ruminale en acide acétique (C2). Le premier axe représente 19,4 % de la variabilité et le second 11,8 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....208

Figure 26 : Graphique de l'analyse de redondances (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches durant les 2 semaines de mesures réalisées avec la ration FOIN (FOIN_av et FOIN_ap). Le diagramme d'ordination est contraint par les paramètres fermentaires sélectionnés par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) (P<0,05). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés ici sont : la concentration ruminale de l'ensemble des trois AGV C2, C3 et C4 (AGVtot), la concentration ruminale en acide acétique (C2), la production totale de gaz in vitro (gaztot) et la cinétique de production de gaz (Taux Orskov). Les paramètres non sélectionnés sont : la concentration ruminale en ammoniacque (NH₃), la concentration ruminale en acide propionique (C3), la concentration ruminale en acide butyrique (C4), le ratio C2/C3 (C2/C3), le pH ruminal (pH) et la production totale de méthane in vitro (CH₄ tot). Le premier axe représente 18,4 % de la variabilité et le second 11,7 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....209

Figure 27 : Graphiques de boîtes à moustaches des taux de passages de la phase liquide (TPPL) des contenus ruminiaux en fonction des vaches sur l'ensemble de l'expérimentation. Le modèle expliquant le TPPL en fonction du facteur vache est significatif (P < 0,05). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences entre vaches. Deux vaches partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.....214

Figure 28 : Graphiques de boîtes à moustaches des taux de passages de la phase solide (TPPS) des contenus ruminiaux en fonction de la ration et du jour de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant le TPPS en fonction du temps est significatif (P < 0,05). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : ration riche en fibres avant la synchronisation.....215

Figure 29 : Représentation graphique des variables de l'ACP des caractéristiques décrivant les 6 vaches de l'expérimentation. Les deux premiers axes de l'ACP expriment 93,8 % de l'inertie totale du jeu de données avec 66,6 % pour l'axe 1 et 27,2 % pour l'axe 2. CR : Contenu ruminal (kg) ; PV : Poids vif (kg) ; TPPS_FOIN : taux de passage de la phase solide pour la

ration riche en fibres ; TPPL_FOIN : taux de passage de la phase liquide pour la ration riche en fibres ; TPPL_EM : taux de passage de la phase liquide pour la ration riche en concentrés ; TPPS_EM : taux de passage de la phase solide pour la ration riche en concentrés.....217

Figure 30 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d -43 et d -39. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés sont : le poids vif des vaches (PV) et le taux de passage de phase solide pour la ration EM (TPPS_EM). Les paramètres non sélectionnés sont la quantité de contenu ruminal retiré le jour de la synchronisation (CR) et le taux de passage de la phase liquide pour la ration EM (TPPL_EM). Le premier axe représente 22,8 % de la variabilité et le second 16,0 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....219

Figure 31 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d 111 et d 115. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Le paramètre sélectionné est le taux de passage de phase liquide pour la ration EM (TPPL_EM). Les paramètres non sélectionnés sont le poids vif (PV), la quantité de contenu ruminal mesuré le jour de la synchronisation (CR) et le taux de passage de la phase liquide mesuré sur la ration EM (TPPS_EM). Le premier axe représente 25,0 % de la variabilité. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....220

Figure 32 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d -8 et d -4. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Le paramètre sélectionné est la quantité de contenu ruminal mesuré le jour de la synchronisation (CR). Les paramètres non sélectionnés sont le poids vif (PV), le taux de passage de la phase solide mesuré sur la ration FOIN (TPPS_FOIN) et le taux de passage de la phase liquide mesuré sur la ration FOIN (TPPL_FOIN). Le premier axe représente 21,6 % de la variabilité. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».....221

Figure 33 : Représentation des taux de passage de la phase solide mesurés avec la ration riche en fibres (TPPS_FOIN) et avec la ration riche en amidon (TPPS_EM) en fonction de la quantité de contenu ruminal présente le jour de la procédure de synchronisation.....223

Discussion générale

Figure 1 : Schéma synthétique représentant l'évolution des contenus de trois rumens (R1, R2 et R3) avant et après la procédure de synchronisation avec contribution proportionnelle (la chimère réintroduite est composée des proportions des contenus ruminiaux en fonction de la quantité retirée des rumens). Les communautés microbiennes initiales sont représentées par un certain nombre de formes associées à une couleur rond 'r' bleu, triangle 't' vert et carré 'c' rouge respectivement. Le trapèze contient les éléments de contenu non utilisés pour la réintroduction du mélange. La quantité de chimère réintroduite correspond à 90 % du contenu initialement retiré.....229

Figure 2 : Schéma synthétique représentant l'évolution des contenus de trois rumens (R1, R2 et R3) avant et après la procédure de synchronisation avec contribution équivalente (la chimère réintroduite est composée des mêmes quantités de chacun des contenus). Les communautés microbiennes initiales sont représentées par un certain nombre de formes associées à une couleur rond 'r' bleu, triangle 't' vert et carré 'c' rouge respectivement. Le trapèze contient les éléments de contenu non utilisés pendant la réintroduction du mélange.....232

Figure 3 : Schéma conceptuel des résultats obtenus pour l'expérimentation avec des chèvres en lactation nourries avec une ration de production (riche en glucides rapidement fermentescibles) (a) et de ceux obtenus avec des chèvres taries nourries avec une ration d'entretien (à base de foin riche en fibres) (b). Ces schémas de plan incliné représentent les possibilités d'évolution de la composition du microbiote en fonction du temps. Le relief composé de vallées est différent d'une ration à l'autre. Les fonds de vallée indiquent les compositions stables. Sans aucune perturbation la composition resterait stable (trajectoire dans une même vallée). Des perturbations peuvent modifier la composition temporairement si elle est faible et qu'elle n'a pas conduit à un changement de vallée ou durable dans le cas contraire. Plus une vallée est creuse plus la perturbation nécessaire pour changer de vallée doit être importante. Les trajectoires d'évolution d'une communauté microbienne (lignes pointillées) sont schématisées par des billes rouges pour des rations riches en concentrés et/ou des animaux à fort niveau de production et des billes vertes pour des rations riches en fibres et/ou des animaux à faible niveau de production ou à l'entretien. Dans ces deux schémas, la synchronisation se produit au premier quart de la ligne de temps.....234-235

Figure 4 : Représentation du logarithme de l'abondance relative en fonction du taux de renouvellement de la phase solide (TPPS) sur deux journées de prélèvement d 114 et d 141 pour l'essai présenté dans le chapitre 1 de la première partie de cette thèse.....237

Figure 5 : Types d'alimentation morpho-physiologique des ruminants : représentation schématique de la spécialisation des ruminants, avec leurs adaptations aux plantes qu'ils consomment, au cours de l'évolution. Bien que la conception structurelle et fonctionnelle de base soit conservée, la capacité croissante de digérer les glucides pariétaux provoque certaines régressions mais aussi le développement d'autres composants du système digestif et des modifications de stratégie d'alimentation. Des critères morpho-physiologiques se chevauchent et conservent une large plage d'adaptation permettant à ces animaux de s'adapter dans des environnements différents. Les limites de séparation se trouvent aux extrémités. Les intermédiaires peuvent changer de stratégie en fonction des saisons (Hofmann, 1989).....238

Figure 6 : Schéma des interrelations entre l'animal hôte et son microbiote modulées par l'alimentation distribuée aux animaux.....241

Figure 7 : Graphique illustrant le résultat obtenu après utilisation du modèle de lactation perturbée (PLM) sur les données de lactation de la chèvre G096 durant l'expérimentation de 2014. La courbe bleue représente la courbe de lactation théorique sans perturbation. La courbe rouge reprend la courbe de lactation perturbée. Le début de chacune des perturbations est représenté par une droite verticale en pointillée appelée P suivie du numéro de la perturbation (Gomes et al., 2018).....242

LISTE DES ABREVIATIONS :

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADF : Acid Detergent Fiber

ADL : Acid Detergent Lignin

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AGV : Acide Gras Volatil

AIA : Acid Insoluble Ash

AMPTS : Automatic Methane Potential Test System

ANOSIM : ANalysis Of SIMilarity

ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

ARN : Acide RiboNucléique

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal

BBI : Between Bout Interval

bTEFAP : bacterial Tag-Encoded FCX Amplicon Pyrosequencing

BW : Body Weight

CMV : Complément en Minéraux et Vitamines

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CR : Contenu Ruminant

CREDOC : Centre de Recherche pour l'Étude et l'Observation des Conditions de vie

DGGE : Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant

DMI : Dry Matter Intake

ETP : Equivalent Temps Plein

FDR : False Discovery Rate

FEFAC : Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés

IC : Indice de Consommation

IPAA : Indice des Prix de matières premières pour l'Alimentation Animale

IV : *In Vitro*

LPR : Liquid Passage Rate

MAT : Matière Azotée Totale

MS : Matière Sèche

MSI : Matière Sèche Ingérée

MYPeak : Milk Yield **Peak**

MYPer : Milk Yield **P**ersistence

NDF : Neutral **D**etergent **F**iber

NS : Non **S**ignificatif

OTU : Unité **T**axonomique **O**pérationnelle

PB : Protéine **B**rute

PCoA : Analyse en **C**oordonnées **P**incipales

PCR : Réaction en Chaîne par **P**olymérase

PEG : Poly**E**thylène **G**lycol

PV : Poids **V**if

RDA : Re**D**undancy **A**nalysis

RFI : Residual **F**eed **I**ntake

SNIA : Syndicat National de l'Industrie de la Nutrition **A**nimale

SPR : Solid **P**assage **R**ate

SSCP : Polymorphisme de **C**onformation des **S**imples brins

TPPL : Taux de **P**assge de la **P**hase **L**iquide

TPPS : Taux de **P**assge de la **P**hase **S**olide

T-RLFP : analyse des **P**olymorphismes de la **L**ongueur des **F**ragments de **R**estriction **T**erminaux

Introduction – Bibliographie

1 INTRODUCTION

La préoccupation principale d'un animal est de trouver de la nourriture pour se développer, croître et se reproduire afin d'assurer la pérennité de son espèce. En plus de répondre à ces besoins primaires, l'Homme, de nature curieuse, a cherché à mieux comprendre le fonctionnement des organismes vivants. Il a ainsi développé les productions agricoles végétales et animales. Aujourd'hui, la fonction de nourrir la population est assurée par une petite proportion d'individus. Après avoir sécurisé ses besoins fondamentaux, l'Homme a souhaité prendre en compte dans ses systèmes de production de nouveaux critères alimentaires, nutritionnels, sanitaires et environnementaux. Pour satisfaire les demandes de la société, la recherche travaille pour accroître les connaissances et trouver des solutions optimales à ces problèmes plus ou moins complexes. Le travail de thèse présenté ici est une petite brique à ajouter à l'édifice des connaissances pour relever ces défis.

2 CONTEXTE

L'essentiel du contexte :

Sociétal

La population mondiale est en pleine croissance. Derrière l'augmentation de la demande en produits alimentaires issus des productions animales, nous observons une grande hétérogénéité d'évolution entre les pays. Par exemple, le marché français des produits carnés et laitiers est au mieux stable pour certains produits ou en cours de diminution pour d'autres. Une des principales voies de maintien du niveau de production est l'exportation. L'élevage actuel n'est plus uniquement centré sur la productivité. Les préoccupations de la société autour de l'élevage se développent au niveau environnemental et sanitaire. Il fournit des services écosystémiques et maintient le tissu rural grâce à ses emplois. Les ruminants sont en compétition avec l'Homme pour certaines ressources végétales comme les céréales. En revanche, ils ne le sont pas quand ils consomment des coproduits végétaux ou des produits très riches en fibres végétales non digestibles pour le système digestif de l'Homme, ce qui les rend parfaitement compétitifs quand ils intègrent ce genre de matières premières dans leur ration alimentaire.

Evolution et enjeux du marché de l'alimentation animale

Le marché des aliments pour bovin est stabilisé depuis quelques années. La volatilité des cours des matières premières limite la rentabilité des ateliers de production quand les prix flambent. Dans ce marché concurrentiel, les professionnels du secteur orientent leurs recherches vers l'amélioration de l'adéquation entre l'aliment et les besoins des animaux. Le microbiote ruminal, qui est à l'interface entre l'aliment et l'animal hôte, permet de valoriser une fraction des fibres indigestibles par l'Homme. L'étude du microbiote et de ses interrelations avec les aliments, les performances de production et les caractéristiques phénotypiques des animaux hôtes est un sujet actuel de recherche. La prise en compte des besoins de certaines bactéries d'intérêt ou la maîtrise de l'orientation du faciès du microbiote sont des pistes actuelles de recherche pour les fabricants d'aliment.

Avancées technologiques pour étudier les biocénoses

La microbiologie vient de connaître une évolution de rupture avec les analyses « omics ». Il est aujourd'hui possible d'analyser des fractions du microbiote non cultivables grâce aux gènes codant pour l'ARN 16S des bactéries. La vitesse de séquençage et le gain de précision représentent une révolution permettant de progresser rapidement sur la compréhension des écosystèmes microbiens.

2.1 SOCIÉTAL

Evolution de la place des produits issus de l'élevage de ruminants vis-à-vis de la demande sociétale :

La population humaine est en pleine croissance à l'échelle mondiale. Les prévisions d'évolution indiquent que nous serons près de 9 milliards d'êtres humains d'ici à 2050 sur la surface du globe. Parvenir à nourrir toutes ces personnes est un défi majeur que doit relever l'agriculture et l'élevage dans les années à venir. L'augmentation de la demande se fait déjà sentir. En effet la demande mondiale en produits carnés a été multipliée entre 4 et 5 fois depuis 1961 (Ritchie and Roser, 2017). Cette croissance globale en moins de 60 ans cache une importante hétérogénéité entre les pays. Par exemple selon le Centre de Recherche pour l'Étude et l'Observation des Conditions de vie (CREDOC) la consommation de produits carnés en France a diminué de 12 % en 10 ans (Tavoularis and Sauvage, 2018). Cette hétérogénéité se retrouve également entre 2010 et 2016 sur la consommation de viande bovine. Celle-ci a augmenté de 2,3 % au niveau mondial (+19,1 % en Chine) et a diminué de 8,4 % en Union Européenne (FranceAgriMer, 2017a). Au niveau français, on constate un changement de comportement alimentaire sur cette même période. En effet, la consommation de viande bovine « à bouillir » a diminué de 17,5 % en 5 ans de 2010 à 2014 et de 9,6 % pour la viande bovine « à rôtir » alors qu'elle a augmenté de 6 % pour la viande hachée fraîche (FranceAgriMer, 2017a). Les tendances d'évolution de la consommation mondiale de produits laitiers entre 2010 et 2016 sont à la hausse. La consommation de beurre a augmenté de 19,6 % au niveau mondial et de 11,3 % au niveau de l'Union européenne. La consommation de fromage a augmenté de 10,1 % au niveau mondial et de 9 % au niveau de l'Union européenne (FranceAgriMer, 2017b). Ces tendances ne sont pas conservées au niveau français où la consommation des produits laitiers (lait, yaourts, fromages et fromages frais) par habitant entre 1994 et 2016 a diminué d'environ 11 % dans chacune de ces catégories (Charby et al., 2017). Ces diminutions au niveau français peuvent s'expliquer par diverses raisons : des préoccupations sociétales, environnementales (telles que la production de gaz à effet de serre et l'efficacité de transformation des productions carnées par rapport aux productions végétales) et sanitaires. La communication autour de ces différents aspects de l'élevage n'est pas toujours très rigoureuse scientifiquement parlant et ces arguments peuvent être largement remis en question (Rosner et al., 2016). Cette désinformation contribue en partie à la diminution de la consommation de certains de ces produits comme la viande de bœuf. Malgré de faibles perspectives de croissance pour le marché de la viande bovine en France, le marché du lait et des produits laitiers devrait, quant à lui, être tiré par les exportations de produits transformés comme le fromage à l'horizon 2030 (European Commission, 2018).

Aujourd'hui, les objectifs d'amélioration des systèmes de production ne sont pas uniquement axés sur l'augmentation de la productivité. L'élevage de ruminants ne se résume

pas à la fourniture de biens alimentaires. En effet, il fournit des coproduits utilisés pour différents usages (alimentation des animaux de compagnie, oléochimie, pharmacie, tannerie, mégisserie, fertilisants, ...) (Laisse et al., 2017). Il fournit également plusieurs services écosystémiques. Sur nos territoires, l'élevage de ruminants est souvent implanté dans des zones climatiques difficiles (sécheresse estivale, hiver long et rigoureux, ...) ou dans des zones où les contraintes pédologiques empêchent l'implantation de cultures céréalières (comme les zones montagneuses). L'élevage permet le maintien d'un tissu rural, entretient et façonne les territoires, maintient la biodiversité, participe aux cycles des nutriments avec la fertilisation des sols par les déjections animales et fait partie de notre patrimoine gastronomique et culturel (Alary et al., 2011; Dollé and Gac, 2016; Laisse et al., 2017). Les emplois dépendants des élevages en France se situent en zone rurale et ne sont généralement pas délocalisables. L'élevage français correspond à 703 000 Equivalent Temps Plein (ETP). Ce nombre comprend à la fois les emplois directs et indirects. Un petit peu plus de la moitié de ces emplois sont des emplois indirects. Ils se répartissent en 4 catégories principales : 20 % en amont de la production ; 53 % en aval ; 15 % dans la distribution ; 6 % dans les services publics et parapublics. Le secteur laitier représente 238 000 ETP alors que l'élevage de ruminant pour la viande représente 183 000 ETP (Lang et al., 2015). De nouveaux critères tels que les paramètres environnementaux sont à prendre en compte pour répondre aux besoins et contraintes de la société de manière durable (Godfray et al., 2010).

Compétition alimentaire animale / humaine sur les ressources végétales :

Il existe une compétition entre l'alimentation humaine et l'alimentation animale vis à vis des productions végétales. Parfois, les animaux d'élevage consomment des ressources qui auraient pu être directement consommées par les humains. Les ruminants ont l'avantage de pouvoir tirer profit de matières premières très peu valorisables par l'Homme. En effet, une de leurs caractéristiques principales est de pouvoir valoriser les coproduits de filières végétales et des matières premières à forte teneur en fibres pariétales (cellulose, hémicellulose et lignine). Pour qualifier et quantifier l'intérêt de cette valorisation par les ruminants de ces matières premières à faible intérêt pour l'homme, un critère a été mis en place. Il s'agit de l'efficacité nette de conversion des aliments. Cet indice est calculé comme étant le ratio des produits alimentaires issus de l'élevage et consommés par l'Homme (viande, lait, ...) divisé par la consommation par l'élevage de végétaux directement valorisables par l'Homme (blé, orge, ...). Lorsque ce critère est supérieur à 1, il existe une production nette d'aliment pour l'Homme. Cette efficacité peut s'appliquer à des fractions particulières des matières premières telles que les protéines. Les élevages de bovins laitiers ont une efficacité protéique nette moyenne de 1,2 avec cependant une importante variabilité entre les systèmes d'élevages. Les systèmes herbagers ont une efficacité supérieure à 1,5. Pour les systèmes transhumants valorisant principalement voire uniquement des prairies, l'efficacité nette peut être très élevée (Laisse et al., 2017). Ces ressources végétales non valorisables initialement par l'Homme sont transformées à travers les ruminants en produits (lait et viande) très bien valorisés par l'Homme. De plus, l'équilibre des acides aminés indispensables aux humains est meilleur dans les produits carnés que dans les produits végétaux (Remond et al., 2014).

Dans ce contexte, l'élevage de ruminants a son rôle à jouer au niveau des produits, des services et de l'emploi qu'il fournit à notre société.

2.2 EVOLUTION ET ENJEUX DU MARCHÉ DE L'ALIMENTATION ANIMALE

Outre les cultures et fourrages produits au sein des exploitations agricoles pour nourrir le bétail, l'optimisation du rationnement des ruminants passe souvent par une complémentation des fourrages par des concentrés. Ces derniers sont formulés à partir de matières premières variées et choisies en fonction des caractéristiques des fourrages distribués afin d'équilibrer la ration et d'assurer une couverture optimale des besoins nutritionnels des animaux. En grande majorité, ils ne sont pas produits sur l'exploitation agricole qui les utilise mais par des fabricants d'aliment. Selon le **Syndicat National de l'Industrie de la nutrition Animale (SNIA)**, en France, après avoir atteint un pic de production en 2001, la fabrication d'aliments composés pour les productions animales diminue progressivement. Elle a déjà reculé de 10 % entre 2001 et 2017. Représentant environ 25 % de la production totale, le secteur des bovins est moins touché par la chute de production que le secteur porcin qui décroît depuis 2002 ou que celui de la volaille qui stagne depuis 2010. Depuis les années 90, la croissance du secteur des aliments à destination des bovins est d'environ 25 % mais cette augmentation semble aujourd'hui stagner (SNIA, 2018a; SNIA, 2018b). Dans ce contexte d'une demande constante en termes de quantité d'aliments pour les ruminants en France, la volatilité du cours des matières premières sur le marché mondial conduit à des augmentations saisonnières parfois très importantes du prix de l'aliment. Pour suivre la volatilité de ces prix, on peut se référer à l'**Indice des Prix de matières premières pour l'Alimentation Animale**, indice **IPAA**, qui mesure l'évolution du prix de 16 matières premières représentatives des utilisations globales par les fabricants d'aliment. A titre d'exemple, cet indice était de 166 le 9 août 2018 contre 135 un an plus tôt en août 2017 et 150 quatre mois auparavant en avril 2018 (SNIA, 2018c). Durant les fortes augmentations des prix, les ateliers de productions animales ont une rentabilité fortement limitée car l'alimentation est souvent le premier poste de dépenses. Cette contrainte entraîne une concurrence très importante entre les marchands d'aliment du bétail. Pour se différencier, ces acteurs accompagnent les aliments qu'ils vendent de conseils aux éleveurs afin de répondre à leurs attentes spécifiques et de leur permettre d'optimiser leurs gains à l'échelle de leur exploitation.

Pour maintenir leur volume de production et leur rentabilité, les fabricants d'aliment travaillent sur l'amélioration de l'efficacité alimentaire pour faire correspondre au mieux l'aliment aux besoins des animaux. Sachant qu'il y a une forte variabilité entre les individus, le rationnement des animaux traditionnellement par lots laisse place de plus en plus au rationnement individuel. L'estimation des besoins individuels et l'adaptation dynamique de la qualité et des quantités distribuées aux animaux sont les fondements de l'agriculture de précision. Selon la **Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés (FEFAC)**, cette alimentation de précision s'intègre parfaitement dans un objectif de produire davantage avec moins de ressources d'ici à 2030 (FEFAC, 2016a). Être au plus proche des besoins des animaux évite le « gaspillage » d'aliments et permet d'optimiser de manière économique l'expression du potentiel des animaux. Le développement d'outils de mesures individualisées est une piste clairement identifiée pour optimiser l'utilisation des ressources et la production (Peyraud, 2016). Par exemple, le stade de gestation, la note d'état corporelle, la croissance de l'animal et la quantité ainsi que la composition du lait produit chaque jour sont de bons indicateurs des besoins de production d'une vache laitière. La mesure de l'activité d'un animal et la température d'ambiance peuvent être utilisés pour estimer les besoins d'entretien. La détermination d'indicateurs des besoins nutritionnels des animaux passe aussi par une meilleure compréhension des interactions dans le tractus digestif. En effet, l'animal hôte apporte des conditions uniques à son microbiote ruminal par la combinaison de son historique, de son comportement alimentaire, de la rumination, du brassage du rumen et

de bien d'autres facteurs. Ce microbiote est la résultante d'un équilibre écologique entre différentes communautés microbiennes plus ou moins spécialisées dans la dégradation de substrats. L'interrelation entre l'animal et son microbiote conduit à des efficacités digestives différentes entre les individus qu'il est intéressant de comprendre pour satisfaire au plus juste les besoins des animaux. Ainsi, une fois connue, la composition du microbiote ruminal individuelle peut être confrontée aux caractéristiques et aux performances de chaque animal qui l'héberge, ce qui permettrait à terme de perfectionner l'alimentation de précision et d'aider à répondre au mieux à la demande mondiale croissante en protéine animale (FEFAC, 2016b). Le développement des technologies de séquençage à haut débit du microbiote, permettant de connaître avec précision sa composition, est une condition essentielle pour parvenir à une alimentation sur mesure des animaux (Pitta et al., 2014; Loor et al., 2015). La prise en compte des besoins de certaines bactéries d'intérêt ou la maîtrise de la composition de la communauté microbienne ruminale peuvent également être des objectifs pour les fabricants d'aliment.

2.3 AVANCEES TECHNOLOGIQUES POUR ETUDIER LES BIOCENOSSES

Les technologies « omics » ont été développées à partir de la fin du XX^{ème} siècle jusqu'à nos jours. Elles sont de plus en plus utilisées pour étudier les biocénoses. Derrière le terme « omics » se cache 4 grands groupes d'analyses. La génomique correspond à l'analyse de grandes quantités de gènes. Elle permet de savoir quels sont les gènes présents dans un échantillon analysé : c'est la lecture du génome à haut débit. Nous obtenons des informations sur les génotypes. Cette technologie a beaucoup évolué depuis les années 1970. Cette évolution de la capacité de séquençage a été exponentielle comme le montre la figure 1 extraite de la publication de Stratton (Stratton et al., 2009).

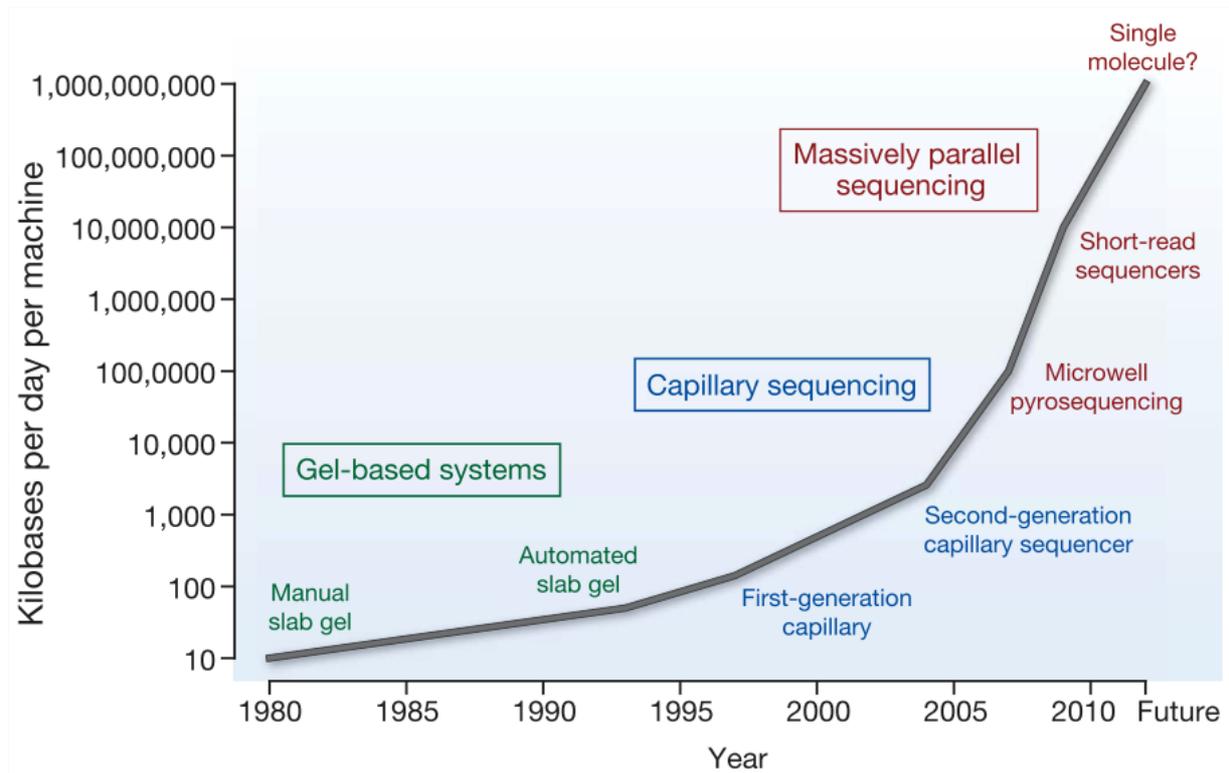


Figure 1 : Amélioration du rendement journalier de séquençage de l'ADN des années 80 à nos jours (Stratton et al., 2009).

Depuis la méthode par synthèse enzymatique des années 70 (Sanger et al., 1977) et les séquenceurs à capillaires des années 90, le séquençage à haut débit est apparu sur le marché en 2004 avec la technologie de pyroséquençage 454 (séquençage par synthèse avec émission de lumière) suivi par les technologies Illumina (Mardis, 2008). Ces dernières sont moins chères (Mardis, 2008; Bartram et al., 2011) ce qui permet une utilisation plus généralisée de cette technique. Elles ont permis de caractériser et de comparer l'abondance des populations majoritaires mais aussi des populations minoritaires au sein de communautés microbiennes (Bartram et al., 2011). Les méthodes d'exploration des microbiotes sont nombreuses. Le tableau 1 décrit chaque technique en présentant ses principaux avantages et ses principaux inconvénients (Fraher et al., 2012).

Technique	Description	Avantages	Inconvénients
Culture	Isolement des bactéries sur des milieux sélectifs	Bon marché, semi-quantitatif	Besoin de beaucoup de main-d'œuvre, <30% du microbiote intestinal ont été cultivés à ce jour
qPCR	Amplification et quantification de l'ARNr 16S. Le mélange réactionnel contient un composé qui est fluorescent lorsqu'il se lie à l'ADN double brin	Identification phylogénétique, quantitative, rapide	Biais de PCR, incapable d'identifier des espèces inconnues
DGGE/TGGE	Séparation sur gel d'amplicons d'ARNr 16S à l'aide de dénaturant / température	Rapide, semi-quantitative, les bandes peuvent être extraites pour une analyse plus approfondie	Biais de PCR, pas d'identification phylogénétique
T-RFLP	Les amorces marquées par fluorescence sont amplifiées, puis des enzymes de restriction sont utilisées pour digérer l'amplicon de l'ARNr 16S. Fragments digérés séparés par électrophorèse sur gel	Rapide, semi-quantitative, bon marché	Biais de PCR, pas d'identification phylogénétique, faible résolution
FISH	Les sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence hybrident des séquences d'ARNr 16S cibles complémentaires. Lorsque l'hybridation se produit, la fluorescence peut être dénombrée en utilisant la cytométrie en flux	Identification phylogénétique, semi-quantitative, pas de biais PCR	Dépend des séquences des sondes - incapable d'identifier les espèces inconnues
microréseaux ADN	Les sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence s'hybrident avec des séquences nucléotidiques complémentaires. Fluorescence détectée avec un laser	Identification phylogénétique, semi-quantitative, rapide	Hybridation croisée, biais de PCR, les espèces présentes à de faibles niveaux peuvent être difficiles à détecter
Séquençage du gène de l'ARNr 16S cloné	Clonage d'amplicon d'ARNr 16S pleine longueur, séquençage de Sanger et électrophorèse capillaire	Identification phylogénétique, quantitative	Biais de PCR, laborieux, coûteux, biais de clonage
Séquençage direct des amplicons d'ARNr 16S	Séquençage parallèle massif d'amplicons d'ARNr 16S partiels, par exemple, 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GmbH Ltd, Mannheim, Allemagne) (amplicon immobilisé sur des billes, amplifié par PCR en émulsion, l'addition de luciférase donne un signal chimioluminescent)	Identification phylogénétique, quantitative, rapide, identification de bactéries inconnues	Biais de PCR, coûteux, laborieux
Séquençage <i>shotgun</i> du microbiome	Séquençage parallèle massif de l'ensemble du génome (par exemple 454 pyrosequencing® ou Illumina®, San Diego, CA, USA)	Identification phylogénétique, quantitative	Cher, l'analyse des données est intense sur le plan des calculs

Abbreviations : DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ; FISH : Fluorescence In Situ Hybridation ; qPCR : quantitative PCR ; TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

Tableau 1 : Techniques utilisées pour caractériser le microbiote (Fraher et al., 2012).

Dans le groupe des « omics », nous trouvons également la transcriptomique. Elle correspond à l'analyse des Acides RiboNucléiques (ARN) d'un échantillon. Elle permet de savoir quels gènes ont été transcrits à partir de l'ADN et à quelle fréquence. On peut donc avoir une estimation de l'intensité de la transcription du ou des gènes d'intérêt dans l'échantillon analysé. On obtient des informations sur l'expression du génotype appelé le transcriptome. Toujours dans la famille des « omics », la protéomique correspond à l'analyse des protéines. Elle permet de connaître les protéines fabriquées par les ribosomes et l'intensité de cette production dans l'échantillon analysé. Enfin, l'étude des métabolites est

réalisée par la métabolomique. Celle-ci permet de connaître quels sont les métabolites présents dans l'échantillon. Ces informations permettent de mieux comprendre le métabolisme au niveau d'un tissu ou d'une communauté. L'ensemble de ces outils nécessitent de faire référence à une base de données pour comparer les résultats obtenus sur les échantillons aux informations stockées afin de faciliter l'interprétation. Ces différentes technologies ne sont pas à opposer, elles sont complémentaires pour décrire dans un échantillon de microbiote : les microorganismes présents, leur potentiel génétique, les gènes exprimés, les protéines et les métabolites présents.

Le rumen est un milieu dont les caractéristiques physiques et chimiques sont relativement uniformes (température, pH, milieu anaérobie, ...). Il peut être considéré comme un biotope. L'ensemble des êtres vivants présents dans le rumen est alors appelé biocénose. L'étude de sa composition et le suivi de son évolution dans différentes situations comme l'âge de l'animal, la composition et présentation de l'aliment, le rationnement ou le stade physiologique permettent de mieux comprendre les liens entre la biocénose et les facteurs précités. L'étude du contenu génétique d'un échantillon prélevé dans le rumen est appelé métagénomique car il s'agit d'un environnement complexe (composé d'une communauté de microorganismes) par opposition à l'analyse du génome d'une vache (un seul individu) appelé dans ce cas génomique (Braly, 2015). Pour identifier à la fois les bactéries et les archées présentes dans un échantillon de microbiote, il est nécessaire de s'appuyer sur une molécule conservée au cours de l'évolution des organismes et qui comporte des zones assez variables pour permettre la différenciation des espèces en présence. C'est le cas des ribosomes, présents dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Ces derniers sont constitués à la fois de protéines et d'ARN. Ils ont pour fonction la synthèse des protéines à partir d'acides aminés et d'ARN messagers : une fonction indispensable et transversale au sein de l'arbre phylogénétique (Ramakrishnan, 2002). La portion d'ADN codant pour l'**ARN ribosomal (ARNr)** a une grande ubiquité et contient des régions hypervariables entrecoupées par des séquences hautement conservées entre les domaines du vivant. Les analyses basées sur cette molécule ont permis de mieux appréhender la diversité phylogénétique depuis les années 1990 (Ward et al., 1990; Head et al., 1998). Il s'agit d'une évolution qui a révolutionné la microbiologie et l'analyse des communautés microbiennes. L'étude de la population bactérienne basée sur la sous unité ribosomale 16S (ARNr 16S) permet de voir la partie cachée de l'iceberg que constitue la communauté bactérienne ruminale non-cultivable (Krause et al., 2003). L'accès à la composition complète du microbiote ouvre la possibilité de mieux comprendre la structure de la communauté bactérienne son rôle et son évolution (Denman et al., 2018). Avec le développement rapide de ces techniques « omics », l'adaptation aux besoins des clients (coût attractif et/ou temps d'analyse réduit) et l'augmentation du nombre d'analyses demandées, le prix unitaire de l'analyse de l'ARNr 16S a diminué, facilitant d'un point de vue économique l'utilisation de cette technique (Caporaso et al., 2012). Cette dernière permet donc d'identifier les bactéries présentes pour pouvoir mettre leurs présences en corrélation avec leur environnement (Tringe and Hugenholtz, 2008).

Quand on analyse un échantillon en métagénomique, souvent, le premier objectif est de connaître la composition de la communauté microbienne. En taxonomie et en systématique, les espèces constituent les unités de base de la diversité en biologie mais elles ne sont pas toujours génétiquement bien séparées. Une approche plus pragmatique a donc été développée. Les séquences d'ARNr 16S sont regroupées quand leurs similitudes sont élevées en Unités Taxonomiques Opérationnelles (**OTU**). Un taux de similarité égale ou supérieur à 97 % a été défini (Stackebrandt and Goebel, 1994). Chaque OTU est représentée par une séquence unique. Il s'agit d'une approximation car au sein d'une même espèce il y a de la variabilité. Cette approximation est suffisante pour comparer des échantillons mais

trouve ses limites en taxonomie (Nguyen et al., 2016). Ce niveau d'étude (OTU) est utilisé pour suivre l'évolution des biocénoses et est plus ou moins standardisé entre les chercheurs ce qui facilite la comparaison des résultats. En effet, il existe différentes méthodes pour transformer les séquences d'ARNr 16S obtenues en OTU en fonction de leur nature (séquences partielles (choix d'une ou plusieurs régions hypervariables) ou séquences entières). Les taux de similarité peuvent ainsi être différents (Edgar, 2018). Des séquences complètes de très bonne qualité, c'est-à-dire sans erreurs, seront nécessaires pour la taxonomie de demain (Rosselló-móra and Amann, 2015).

L'étude de la biocénose est rendue plus accessible par le développement des technologies « omics » qu'il ne faut pas opposer les unes aux autres. L'utilisation combinée de ces techniques permet d'identifier les bactéries et les archées présentes, de connaître leurs génotypes, de savoir quel sont les gènes qui sont exprimés dans un échantillon, de connaître les protéines produites et l'intensité de cette production et même de connaître les métabolites en présences pour mieux comprendre le fonctionnement de la biocénose.

3 BIBLIOGRAPHIE

3.1 LA SYMBIOSE ENTRE LE MICROBIOTE RUMINAL ET L'ANIMAL HOTE

Les ruminants ont 3 pré-estomacs : le réseau (reticulum) qui est le plus crânial et le plus petit pré-estomac (il est ainsi nommé car sa muqueuse à une forme en nid d'abeille), le feuillet (omasum) qui doit son nom aux nombreuses lames qui le compose et le rumen qui est la plus grande poche pré-gastrique (représentant les deux tiers de la cavité abdominale) et qui abrite tout un écosystème de micro-organismes. Ils ont également un estomac sécrétant des enzymes avec une muqueuse peptique appelé caillette (abomasum) (Sautet, 1995). La disposition des organes dans la cavité abdominale est représentée sur la figure 2 (Bedrane, 2019).

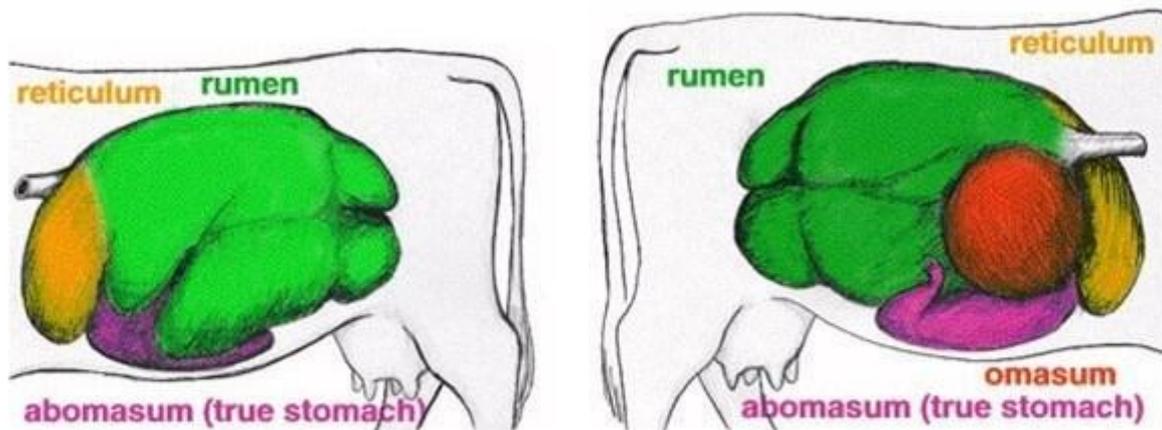


Figure 2 : Organisation du réseau (reticulum) représenté en orange, du rumen représenté en vert, du feuillet (omasum) représenté en rouge et de la caillette (abomasum) représenté en rose chez la vache. La vue de gauche et de droite de l'animal est représentée (Bedrane, 2019).

Dans cette thèse, nous nous intéressons principalement au rumen et à la communauté microbienne qu'il abrite. Les caractéristiques de cet organe sont relativement stables au cours du temps. La température du rumen est d'environ 39°C. Il est maintenu dans des conditions anaérobies grâce aux productions de gaz tel que le dioxyde de carbone (CO₂) et le méthane (CH₄) issus des fermentations qui s'y déroulent. Les ondes de contractions périodiques de l'avant vers l'arrière de cet organe sont assurées par l'hôte et permettent le brassage du contenu. Le pH se situe entre 6 et 7 grâce à 4 facteurs complémentaires : la salive et son pouvoir tampon (entre 117 et 183 kg/jour (Meyer et al., 1964), l'absorption des acides gras volatils par l'épithélium ruminal, le renouvellement du contenu ruminal et le pouvoir tampon des aliments consommés. La pression osmotique est aux alentours de 250 mOsm et peut atteindre 400 mOsm après l'ingestion d'un repas (Dehority, 2002). Dans le rumen on trouve une stratification des matériaux. Les aliments venant d'être ingérés se trouvent à la surface. Les particules séjournant depuis plus longtemps ont une densité plus importante et se retrouvent donc au fond. Au-dessus de ce contenu se trouve une poche de gaz (Belbis, 2007). Ces caractéristiques maintenues dans des conditions stables au cours du temps sont appropriées au développement des micro-organismes.

Entre le microbiote ruminal et l'animal hôte la relation est qualifiée de symbiotique. C'est une relation biologique durable qui est profitable entre 2 ou plusieurs organismes appartenant à des espèces différentes (ici le microbiote ruminal et l'animal hôte). Cette relation peut être illustrée par la dégradation des parois végétales. Après l'ingestion de ces parois, les champignons et les bactéries se fixent à leur surface. Les champignons réalisent tout d'abord une action mécanique avec le développement de rhizoïdes au sein des parois végétales. La fixation des bactéries et des champignons aux fibres permet une proximité entre les sécrétions enzymatiques bactériennes et la paroi végétale. La rumination (environ 8h par jour dans le budget temps d'un bovin adulte) est un phénomène physiologique de régurgitation de contenu ruminal par l'animal hôte préalablement ingéré de manière rapide suivie d'une mastication avant d'avaler définitivement son contenu. La mastication permet d'ouvrir de nouveaux fronts d'attaque dans les tissus végétaux pour les micro-organismes et de stimuler la salivation. Plus la taille des particules se réduit, plus la colonisation bactérienne est importante. Les protozoaires, eux, ingèrent de toutes petites particules végétales afin de les digérer. La phase de fermentation produit des **Acides Gras Volatils (AGV)**, de l'ammoniac (NH_3) et des gaz tels que le méthane et le dioxyde de carbone qui sont érucés par les ruminants. Les AGV sont absorbés par l'animal au niveau de l'épithélium ruminal ce qui évite une chute du pH ruminal qui serait néfaste à la poursuite de la dégradation par les micro-organismes. Le pH diminue en phase postprandiale alors qu'il augmente dans les périodes de jeûne. Les AGV produits servent de substrats énergétiques pour l'animal hôte. Ce dernier assure également le renouvellement du milieu fermentaire par vidange de son contenu dans la suite du tractus digestif lorsque les particules sont assez réduites en taille (renouvellement des phases liquides et solides). L'apport de nouveaux substrats dans le rumen se fait par la consommation d'aliment. La dynamique de ces entrées est décrite par les cinétiques d'ingestion. Le microbiote quant à lui utilise l'ammoniac et dégrade les aliments en substrats nécessaires pour son développement. Cet exemple illustre les avantages réciproques de cette relation symbiotique (Jouany, 1994).

Le rumen et son microbiote apportent 3 principaux avantages aux ruminants. Premièrement, le microbiote sécrète des enzymes, dont l'animal hôte ne dispose pas, permettant de dégrader les parois cellulaires. Ces enzymes permettent d'augmenter la fraction de l'aliment utilisée par l'animal en tant que substrat énergétique. Deuxièmement, la population microbienne peut valoriser de l'azote non aminé tel que l'ammoniac pour synthétiser des acides aminés essentiels ou non et produire ses propres protéines. Enfin, les micro-organismes entraînés dans le chyme digestifs fournissent des nutriments (vitamines K et B12, acides aminés essentiels, ...) valorisables et de bonnes qualités, nécessaires à son hôte (Bowen; Ibrahim and Ingalls, 1971; Yang and Beauchemin, 2001; Beauchemin, 2018).

Cette symbiose est un sujet d'étude de longue date qui a été récemment marqué par les évolutions technologiques telle que la métagénomique et les impulsions sociétales (prise de conscience du réchauffement climatique et sensibilité à la production de gaz à effet de serre) qui ont permis un accroissement rapide des connaissances sur ce sujet. Le microbiote ruminal a donc une importance clé dans la digestion des parois végétales par les ruminants, ce qui en fait un de leurs principaux avantages. Mais qui sont ces microorganismes qui occupent le rumen ?

3.2 COMPOSITION DU MICROBIOTE RUMINAL CHEZ L'ADULTE

Le microbiote ruminal est composé de 5 groupes de micro-organismes différents : les bactéries, les archées, les protozoaires, les champignons et les bactériophages.

Les bactéries représentent la composante principale du rumen avec environ 7000 espèces observées. Ces espèces se répartissent en 19 *phyla* dont les 3 plus abondants sont les Firmicutes, les Bacteroidetes et les Proteobacteria. L'abondance est estimée à 10¹² bactéries par gramme de contenu ruminal (Chaucheyras-Durand and Ossa, 2014). Parmi ces bactéries, les principales espèces cultivables ainsi que les substrats qu'elles sont capables de dégrader sont présentés dans le tableau 2 (Fonty et al., 1995).

Substrats	Fermentés														Hydrolysés													
	Cellulose	Cellobiose	Xylodextrines	Pentoses	Dextrines	Maltose	Ac. uronique	Glycérol	Saccharose	Fructose	Glucose	Galactose	Lactate	Malate	Fumarate	Succinate	Protéines	Peptides	Acides aminés	Hydrogène utilisé	Méthanol							
Espèces																												
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Ruminococcus albus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
<i>Prevotella ruminicola</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+						
<i>Selenomonas ruminantium</i>	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+						
<i>Streptococcus bovis</i>	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-						
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-						
<i>Succinomonas amylolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Eubacterium ruminantium</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+						
<i>Lachnospira multiparus</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
<i>Veillonella alcalescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-						
<i>Wolinella succinogenes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
<i>Eubacterium limosum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						

Tableau 2 : Substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen. La majorité des souches peuvent assurer cette fonction (+) ou non (-) (Fonty et al., 1995).

Les espèces bactériennes ayant une importante fonction cellulolytique sont *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*. Les espèces telles que *Prevotella ruminicola* et *Selenomonas ruminantium* sont capables de valoriser un grand nombre de substrats végétaux. Elles n'appartiennent pas à une niche écologique restreinte. *Anaerovibrio lipolytica* a quant à elle une niche très restreinte : elle n'hydrolyse que les lipides et ne fermente que le glycérol et le fructose. Les bactéries ayant une fonction principalement amylolytique ou associée à la digestion de l'amidon sont *Succinomonas amylolytica* et *Succinivibrio*. La moitié des espèces bactériennes ont une activité protéolytique. Les plus connues sont *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrosolvens* et *Prevotella ruminicola* (Fonty et al., 1995). En plus de ces bactéries, nous pouvons également citer des bactéries ruminales n'utilisant pas de sucres telles que *Succiniclasticum ruminis*, *Wolinella succinogenes*, *Veillonella parvula*,

Synergistes jonesii, *Oxalobacter formigenes*, *Eubacterium oxidoreducens* et *Acidaminococcus fermentans* (Stewart et al., 1997). Dans le rumen, nous trouvons également des bactéries de plus grosse dimension telles que *Oscillospira guillermontii*, *Lampropedia*, *Sarcinas*, *Eadie's Ovals*, *Quinella* et *Selenomonas* (Stewart et al., 1997). Toutes les fonctions ne sont pas réalisées par chacune des espèces présentes dans le rumen : il existe une complémentarité dans les fonctions, dépendante de la qualité et de la quantité des substrats de la ration. En lien avec le tableau précédent, le tableau 3 reprend les principaux métabolites fermentaires de ces mêmes bactéries (Fonty et al., 1995).

	Métabolites fermentaires										
	Formate	Acétate	Propionate	Butyrate	Valérate	Caproate	Ethanol	Succinate	Lactate	H ₂	CO ₂
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+						+			
<i>Ruminococcus albus</i>	+	+					+			+	+
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+						+		+	+
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	+		+							+
<i>Prevotella ruminicola</i>	+	+	+					+			
<i>Selenomonas ruminantium</i>		+	+						+		
<i>Streptococcus bovis</i>		+	-						+		
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	+	+						+			
<i>Succimonas amylolytica</i>		+	+					+			
<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	+		+							+
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	+	+						+	+		
<i>Megasphaera elsdenii</i>		+		+		+				+	+
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	+					+		+	+	+
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>		+	+					+			
<i>Veillonella alcalescens</i>			+								
<i>Wolinella succinogenes</i>								+			
<i>Eubacterium limosum</i>		+		+							

Tableau 3 : Métabolites fermentaires des principales espèces bactériennes du rumen (Fonty et al., 1995).

Nous constatons que de mêmes fonctions peuvent être réalisées par des bactéries différentes rendant l'écosystème microbien stable. En effet, la disparition d'une espèce bactérienne, n'entraîne pas forcément la perte d'une fonction. La production des AGV dans le rumen dépend de la ration alimentaire et de la communauté microbienne associée. En effet, avec des rations riches en fourrages la production d'acide acétique et butyrique est favorisée par les bactéries cellulolytiques alors qu'une ration riche en amidon entraîne une augmentation de la production d'acide propionique par les bactéries amylolytiques. Les sucres solubles entraînent une augmentation de la production d'acide butyrique. L'ajout sans transition alimentaire d'une grande quantité de glucides fermentescibles peut entraîner une production importante d'acide lactique pouvant conduire à l'acidose (Jouany et al., 1995).

Dans le rumen, nous retrouvons également environ 1500 espèces d'archées. 90 % des séquences observées sont associées à des genres produisant du méthane. *Methanobrevibacter* avec 60 % est le genre le plus abondant (Chaucheyras-Durand and Ossa, 2014). Les archées sont présentes à hauteur de 10⁷ à 10⁹ cellules/mL de contenu

ruminal selon l'alimentation. Ces méthanogènes récupèrent l'hydrogène produit lors des fermentations des glucides pour réduire le CO₂ et produire du méthane. Ce phénomène est appelé le transfert interspécifique d'hydrogène entre des espèces productrices et des espèces hydrogénotrophes. Cette production de méthane entraîne une perte d'énergie pour l'animal (Kamra, 2005). Le tableau 4 reprend les caractéristiques de quelques archées du rumen (Stewart et al., 1997).

	Methanobacterium formicicum	Methanobrevibacter ruminantium	Methanosarcina barkeri	Ms. Mazei	Methanomicrobium mobile
Morphologie	b	b	c	c	b
Gram	±	+	+	+	-
Production de méthane à partir de	H ₂ / CO ₂ , formate	H ₂ / CO ₂ , formate	H ₂ / CO ₂ , acetate, méthanol, méthylamines	Acetate, méthanol, méthylamines	H ₂ / CO ₂ , formate
Facteurs de croissance requis	-	Coenzyme M, acetate	-	-	

Tableau 4 : Caractéristiques de quelques archées. Abréviations : b, bacille ; c, coque. (Stewart et al., 1997).

Les espèces fournissant l'hydrogène sont : certaines bactéries telles que *R. flavefaciens*, *R. albus*, les espèces fongiques et les protozoaires (Fonty et al., 1995).

Les protozoaires sont estimés entre 10⁵ et 10⁶ par gramme de contenu ruminal (Chaucheyras-Durand and Ossa, 2014). Ils ont une taille entre 20 et 100 fois plus grande que les bactéries. Ces organismes unicellulaires eucaryotes sont mobiles grâce à des cils pour les ciliés et des flagelles pour les flagellés (Fonty et al., 1995). Les ciliés sont les principaux protozoaires du rumen et sont divisés en 2 catégories : les holotriches appartenant à l'ordre *Vestibuliferida* et les entodiniomorphes appartenant à l'ordre *Entodiniomortphida*. Les 3 principales espèces de protozoaires holotriches présentes dans le rumen sont *Isotricha intestinalis*, *Isotricha prostoma* et *Dasytricha ruminantium*. Les principaux genres de protozoaires entodiniomorphes sont : *Entodinium*, *Eodinium*, *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Polyplastron*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Epidinium*, *Enoploplastron*, *Ophryoscolex*, *Epiplastron*, *Elytroplastron*, *Caloscolex*, *Opisthotricum* et *Parentodium*. Les protozoaires ont de nombreuses interactions avec les bactéries. Sur l'extérieur des protozoaires, nous pouvons régulièrement trouver des archées fixées sur leurs pellicules. Il existe également un lien trophique. En effet, on retrouve dans le cytoplasme des protozoaires des bactéries phagocytées dans des vacuoles digestives. Certaines bactéries survivent relativement bien car elles sont peu sensibles à ces enzymes. Celles qui sont tuées contribuent à une grande part des apports de composés azotés pour les besoins de croissance. Les autres sources azotées des protozoaires sont les acides aminés libres et les protéines libres. Tous les entodiniomorphes phagocytent et fermentent lentement des grains d'amidon.

Ils sont également capables de digérer des fibres telles que la cellulose, et parfois certaines hémicelluloses. (Williams and Coleman, 1997).

Les champignons anaérobies sont présents dans le rumen avec une concentration d'environ 1000/ml (Jouany, 1994). Ils représentent 10 % de la masse des micro-organismes présents dans le rumen (Krause et al., 2013). Ils sont les premiers à coloniser les aliments lors de leur entrée dans le rumen et participent, en partie, à la dégradation des parois végétales (Mountfort, 1987). Les principaux genres de champignons trouvés dans le rumen sont : *Neocallimastix*, *Piromyces Barr & Kudo*, *Caecomyces Gold*, *Opinomyces Barr & Kudo* et *Anaeromyces* (Orpin and Joblin, 1997). Les champignons du rumen sont impliqués dans la digestion des glucides de la paroi végétale en cellobiose qui sera ensuite fermenté. Ils sont également capable de fermenter les mono et disaccharides en les transformant en lactate, formate, acétate, hydrogène, dioxyde de carbone et éthanol (Jouany, 1994).

Les bactériophages sont des virus bactériens qui se reproduisent en injectant leur matériel génétique dans une bactérie et en utilisant ainsi le matériel cellulaire de cette dernière pour se reproduire. Ils sont ensuite libérés lors de la lyse de la bactérie infectée. Ces phages jouent un rôle important dans la régulation des populations bactériennes. Ils sont estimés de 10^7 à 10^9 par gramme de contenu ruminal (Chaucheyras-Durand and Ossa, 2014). La diversité de génotype au sein des bactériophages est importante. Sur 3 animaux Holstein, entre 4000 et 28000 génotypes ont été observés (Berg Miller et al., 2012).

La composition du microbiote ruminal évolue avec l'âge de l'animal. Il se diversifie rapidement après la naissance et des modifications dans la communauté bactérienne sont encore observées bien après le sevrage. Par exemple des bovins Holstein de 6 mois ($n = 5$) et ceux de 2 ans ($n = 5$), consommant le même aliment, peuvent avoir des communautés bactériennes différentes. Les animaux de 2 ans par rapport à ceux de 6 mois ont 23 % d'OTU en plus et un pourcentage significativement plus faible du phylum Proteobacteria. Au niveau des genres, en ne prenant en compte que ceux partagés par tous les animaux du même groupe d'âge, les bovins de 6 mois hébergent 47 genres, et ceux de 2 ans 40. Les 2 groupes partagent 33 genres ce qui indiquent que 14 et 7 genres sont plus spécifiques des bovins Holstein de 6 mois et de 2 ans respectivement (Jami et al., 2013). Ce travail de thèse cible uniquement l'animal adulte, la bibliographie sur l'évolution de la composition du microbiote au cours du développement du système digestif ne sera pas abordée.

A cette variabilité temporelle s'ajoute une variabilité spatiale. L'écosystème ruminal abrite 3 sous-écosystèmes qui peuvent être différenciés dans la bibliographie : le microbiote épi-mural, le microbiote associé à la phase liquide du contenu ruminal et celui associé à la phase solide. Sur 10 vaches Holstein en lactation, ces 2 derniers microbiotes présentent une similarité moyenne de 82 %. La similarité avec le microbiote épimural est beaucoup plus faible avec 39 % pour le microbiote associé à la phase liquide et 37 % pour le microbiote associé à la phase solide. La richesse est similaire entre les microbiotes associés aux phases liquides et solides alors qu'elle est inférieure de moitié pour le microbiote épimural (Schären et al., 2017).

3.3 PROPRIETES DU MICROBIOTE RUMINAL

Après avoir vu les composantes du microbiote ruminal, nous allons maintenant décrire les deux propriétés intrinsèques prédominantes de cette communauté microbienne : la redondance fonctionnelle et la résilience. Nous verrons ensuite très brièvement le lien entre microbiote et immunité.

La première propriété du microbiote concerne sa redondance en termes de fonctionnalité. Une expérimentation a consisté à séparer 12 vaches frisonnes en lactation en 3 groupes recevant ou non une supplémentation à base de levures (*Saccharomyces cerevisiae*). Concernant la structure des communautés microbiennes entre les traitements, au niveau des familles, des différences importantes ont été observées. Par exemple la famille *Lachnospiraceae* a été observée de 8,6 à 16,3 %, de 7,3 à 12,8 % pour *Ruminococcaceae* et de 1,1 à 15,6 % pour *Streptococcaceae*. Si nous ne nous plaçons plus au niveau des groupes de vaches mais au niveau des individus, les différences de proportion en *Ruminococcaceae* sont encore plus importantes allant de 2,32 % à 20,63 %. Malgré ces différences importantes de composition, les concentrations, les proportions et les ratios des AGV sont similaires entre les différents groupes. Le ratio acide propionique sur acide acétique est de 0,3 pour les 3 groupes. Le ratio acide butyrique sur acide acétique est de 0,1 pour les 3 groupes, le ratio acide propionique plus acide butyrique sur acide acétique est de 0,5 pour 2 groupes et de 0,4 pour le troisième (Sandri et al., 2014). Arriver aux mêmes productions fermentaires avec un microbiote différent confirme la propriété de redondance de fonctionnalité du microbiote. Des résultats similaires ont été observés après des échanges quasi-intégraux de contenus ruminiaux entre 2 paires de vaches Holstein en lactation, choisies pour leurs différences initiales de composition de la communauté microbienne. Pour une paire de vaches, 1 jour après l'échange, le pH et la production d'AGV sont revenus à leur valeur avant échange alors que la communauté microbienne était encore très différente de la composition d'avant mélange. Le pH et la production d'AGV ne sont pas liés à une composition particulière de la communauté microbienne. Ces résultats ne sont pas retrouvés aussi clairement avec la deuxième paire de vaches (Weimer et al., 2010). La même procédure d'échange de contenus ruminiaux a été réalisée sur 3 paires de vaches Holstein en lactation. Nous retrouvons sur ces animaux des concentrations en AGV et des pH identiques entre avant et après l'échange de contenus, alors que les communautés microbiennes ont des distances écologiques significativement différentes. Seules les distances écologiques entre les communautés microbiennes associées à la phase liquide pour une paire de vache ressort seulement en tendance (Weimer et al., 2017b). Les milliers d'espèces de bactéries et d'archées présentent dans le rumen (Kim et al., 2011) ramenées au nombre beaucoup plus restreint d'étapes de dégradation des composantes de l'aliment indiquent très clairement que des OTU différents pourraient contribuer à une même voie de dégradation (Weimer, 2015a).

La deuxième propriété du microbiote ruminal est la résilience : c'est la capacité de la communauté microbienne ruminale à restaurer sa structure après une perturbation aiguë ou chronique. Cette propriété n'est pas facile à démontrer car il n'existe pas une seule forme de perturbation mais de nombreuses et dont les causes, l'intensité, la fréquence et d'autres facteurs les influençant sont difficiles à mettre en œuvre au niveau expérimental. Cependant, la résilience des fonctions (résilience fonctionnelle) a été illustrée par des essais d'échange de contenus, où les produits fermentaires tels que les AGV ont des teneurs et des proportions identiques à celles avant l'échange seulement 1 jour après (Weimer et al., 2010; Weimer et al., 2017b). Durant ces 2 essais, la résilience compositionnelle, c'est-à-dire le retour à la composition de la communauté microbienne avant l'échange de contenus ruminiaux, a été étudiée. Dans ces expériences toutes les vaches sauf une ont tendance à avoir une communauté microbienne très différente après l'échange et leur microbiote revient vers une composition proche de la situation initiale sans pour autant avoir une très grande similarité (Weimer et al., 2010; Weimer et al., 2017b). Après une perturbation de l'écosystème ruminal, causée par l'échange de contenu ruminal après quelques jours, la communauté microbienne ruminale se rapproche de la composition initiale pour chaque animal.

A partir de ses différentes observations, Weimer a décrit, selon lui, les caractéristiques supposées de stabilité et d'adaptation de la communauté microbienne ruminale (tableau 5).

Un animal ne réagissant pas comme les autres et ayant une nouvelle composition de sa communauté microbienne ruminale par rapport à celle initialement observée ainsi que la manière unique dont la perturbation est réalisée doit tout de même conduire à prendre ces premiers résultats avec précaution. L'étude des interrelations entre le microbiote ruminal et l'animal hôte doit permettre de mieux comprendre comment les individus ont un microbiote qui leur est propre et comment ils font pour plus ou moins le maintenir. La propriété de résilience pourrait être liée à un effet de l'hôte.

Caractéristique	Définition	Statut probable dans le rumen
Inertie	Résistance aux changements	Elevé, basé sur des études de dosage
Résilience	Capacité à restaurer sa structure après une perturbation aiguë ou chronique	Elevé, basé sur les études d'échange de contenus
<u>Composantes de la résilience :</u>		
Elasticité	Rapidité de restauration d'un état stable suite à une perturbation	Relativement élevé, basé sur les études d'échange de contenu
Amplitude	Zone à partir de laquelle le système reviendra à un état stable	Très élevé, basé sur les études d'échange de contenu
Hystérésis	Degré avec lequel le chemin de la restauration est un exact renversement du chemin dégradation	Inconnu
Plasticité	Degré auquel l'état stable établi après perturbation diffère de l'état stable d'origine.	Faible

Tableau 5 : Caractéristiques décrivant la stabilité et l'adaptabilité de la communauté microbienne ruminale (Weimer, 2015a).

Le microbiote intestinal serait impliqué dans le développement du système immunitaire chez le mammifère hôte. En effet, il a été montré dans l'intestin des mammifères que le microbiote permet de stimuler les défenses immunitaires de l'hôte, le protégeant ainsi des agents pathogènes infectieux. L'induction locale et/ou systémique d'inflammation permet d'éviter le passage de bactéries à travers l'épithélium. Un microbiote intestinal en bonne santé est un équilibre entre les symbiotes qui sont des résidents aux effets positifs, des résidents commensaux qui n'ont pas d'effets négatifs ni positifs sur l'hôte et enfin les pathobiontes constituants du microbiote sain mais qui ont potentiellement la capacité d'induire des pathologies dans certaines conditions (Koboziev et al., 2014). Le rôle précis de chacune des composantes du microbiote intestinal et du microbiote en général sur la santé reste non clairement identifié, mais des liens entre maladies et évolutions des microbiotes ont déjà été mis en évidence. La communication entre le microbiote et le système nerveux serait impliqué (Park, 2018). Peu d'étude s'intéressent spécifiquement au rôle du microbiote ruminal sur la santé des ruminants. Les cas pathologiques tel que l'acidose, l'alcalose, la météorisation spumeuse sont plus généralement étudiés (Belbis, 2007).

3.4 VARIABILITE DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE RUMINAL

Chez l'homme le microbiote intestinal est beaucoup étudié pour son rôle sur la santé de son hôte car il se situe à l'interface entre le milieu extérieur (chyme digestif) et le milieu intérieur (au-delà de notre épithélium intestinal). Le microbiote est la résultante de ses évolutions depuis la colonisation du tube digestif après la naissance et de l'historique de

chaque individu. Il en résulte une structure complexe unique pour chacun d'entre nous (Gunaydin, 2017). Cette spécificité à l'échelle de la communauté microbienne, qualitative et quantitative, n'est pas le propre du microbiote intestinal humain. En effet, dans le microbiote ruminal, malgré une partie des espèces microbiennes partagée entre les individus, une partie est spécifique à son hôte. Nous allons présenter ici les connaissances actuelles sur la partie considérée fixe et la partie considérée variable des microbiotes ruminants. Dans un premier temps nous aborderons la partie commune avec sa définition et ses exemples, avant de présenter pour la partie variable les deux principaux facteurs de variations : l'alimentation et le phénotype des animaux. Dans cette thèse une caractéristique phénotypique est considérée comme étant une caractéristique de l'hôte peu ou minoritairement influencée par le microbiote. Nous aborderons enfin la variabilité individuelle persistante.

3.4.1 Partie commune aux microbiotes ruminants : le « core microbiome »

Parmi les différentes communautés microbiennes ruminales observées chez différentes espèces et différents animaux, il existe des micro-organismes que l'on retrouve systématiquement. L'ensemble des taxons présents chez tous les animaux d'une même étude est appelé « core microbiome » (Henderson et al., 2015; Weimer, 2015b). Voici, ci-dessous, 3 exemples d'études ayant porté leurs attentions sur ce « core microbiome ».

Henderson et al. (2015) ont mis en évidence cette composante « fixe » du microbiote à partir de 742 échantillons issus de 32 espèces différentes de ruminants répartis dans 35 pays. Malgré des différences d'espèces, de régimes alimentaires et de localisations géographiques, un « core microbiome » a été identifié, composé de 3 genres bactériens *Prevotella*, *Butyrivibrio* et *Ruminococcus* et de 4 taxons non classifiés de *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* et *clostridiales*. L'ensemble des séquences de ces taxons représente 67,1 % de l'ensemble des séquences bactériennes. Ces taxons ont des abondances significativement différentes entre les espèces étudiées. Par exemple, l'abondance de *Prevotella* est de 21,4 % chez la vache alors qu'elle est de 30,8 % chez la chèvre. Le genre *Butyrivibrio* a une abondance plus importante chez la vache que chez la chèvre 4,1 % et 2,1 % respectivement. Cette différence est moins prononcée concernant le genre *Ruminococcus* avec 3,9 % chez la vache et 3,4 % chez la chèvre. Pour les archées, 5 taxons composent le « core microbiome » : *Methanobrevibacter gottschalkii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanosphaera sp.* et 2 taxons de *Methanomassiliicoccaceae-affiliated groups*. Des différences d'abondance entre espèces ont également été observées pour les archées. Chez les vaches, *Methanobrevibacter gottschalkii* et *Methanobrevibacter ruminantium* ont des abondances de 42,6 et 31,64 % respectivement alors qu'elles sont de 57,2 et 18,3 % chez la chèvre. Ces 5 taxons représentent 89,2 % de la communauté des archées, ce qui indique que cette dernière est moins diverse que la communauté bactérienne (Henderson et al., 2015).

Wirth et al. (2018) ont étudié le microbiote de 10 vaches de race Holstein en lactation. Le « core microbiome » qu'ils ont observé est composé de 48 genres dont 47 genres de bactéries et 1 genre d'archées, ce qui représente entre 18 et 23 % de l'ensemble des genres observés. Pour les archées, il s'agit du genre *Methanobrevibacter*. Pour ce qui est des représentants de la communauté bactérienne, le genre prédominant du « core microbiome » est *Prevotella*. Sont également présents les genres *Bacteroides* chez les *Bacteroidia*. Dans la classe *Clostridia*, Wirth et al. (2018) ont observé *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Oribacterium*, *Sarcina* et des séquences non-classifiées pour les familles *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae*. Parmi les *Firmicutes* les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Mycoplasma*, *Erysipelotrichaceae* non-classifié,

Succiniclasticum et *Selenomonas* dans la classe *Negativicutes* ont été observés ainsi que *Treponema* chez les *Spirochaetes*. Le genre *Fibrobacter* du phylum *Fibrobacteres* et *Bifidobacterium* du phylum *Actinobacteria* sont également retrouvés. Enfin, dans le phylum *Proteobacteria*, Wirth et al. (2018) ont retrouvé les genres *Acinetobacter* et *Ruminobacter*.

Li & Guan (2017) ont étudié le microbiote de jeunes bovins en croissance. Pour 20 jeunes bovins en croissance recevant la même alimentation, ils ont trouvé le « core microbiome » actif suivant : 6 *phyla* bactériens (*Proteobacteria* 46,2 %, *Firmicutes* 23,2 %, *Bacteroidetes* 17,5 %, *Spirochaetes* 2,6 %, *Cyanobacteria* 1 % et *Synergistetes* 0,7 %), 8 familles bactériennes (*Succinivibrionaceae* 44,1 %, *Prevotellaceae* 11,2 %, *Ruminococcaceae* 7,6 %, *Lachnospiraceae* 6,1 %, *Veillonellaceae* 3,7 %, *Spirochaetaceae* 2,0 %, *Dethiosulfovibrionaceae* 0,7 % et *Mogibacteriaceae* 0,7 %) et 4 taxons d'archées (*Methanomassiliicoccales* 35,6 %, *Methanobrevibacter ruminantium* 34,6 %, *Methanobrevibacter gottschalkii* 18,4 % et *Methanosphaera* 0,8 %). Sur les différents niveaux observés, le « core microbiome » représente 89,4 % de l'abondance des bactéries et des archées (Li and Guan, 2017).

Selon les caractéristiques de l'échantillon (nombre d'animaux, espèces, ...) et les méthodes utilisées pour analyser les communautés microbiennes, le « core microbiome » observé n'est pas strictement équivalent entre les expérimentations. Cependant, des taxons bactériens et des archées sont retrouvés au sein des 3 exemples précédents. Le « core microbiome » est souvent présenté comme un pool de taxons sans préciser l'abondance de ces derniers. Néanmoins, les abondances peuvent varier d'une espèce à l'autre comme nous avons pu le voir dans la comparaison entre les vaches et les chèvres dans le premier exemple.

3.4.2 Variabilité en lien avec l'alimentation

Après avoir fait une description des composantes du microbiote ruminal, de ces principales propriétés et du « core microbiome », nous allons maintenant nous intéresser aux facteurs de variations de la composition des microbiotes ruminants. Le premier facteur de variation décrit dans cette partie est la composition de la ration des ruminants qui est clairement identifiée comme ayant un impact sur la structure de la communauté microbienne, et ce, à tout âge (McCann et al., 2014; Looor et al., 2016). Dans un premier temps, nous allons présenter différents exemples : les effets du ratio fourrages sur concentrés, la mise à l'herbe et l'effet de la composition chimique de la ration. Cette partie nous permettra principalement de comprendre l'effet du type de glucides donnés aux animaux. Dans un second temps, nous verrons l'effet d'additifs, d'extraits végétaux et des métabolites secondaires sur la composition les fonctions du microbiote ruminal.

3.4.2.1 Effet des principaux constituants de la ration

- **Effet du ratio fourrages / concentrés de la ration**

Au sein du microbiote ruminal, certaines bactéries sont connues pour être associées à une niche écologique précise. Par exemple, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* sont des bactéries cellulolytiques (Michalet-Doreau et al., 2001). *Streptococcus bovis*, *Bifidobacterium* sp., *Borrelia* sp., *Butyrivibrio* sp., *Prevotella* sp., *Eubacterium ruminantium*, *Ruminobacter amylophilus*, *Ruminococcus bromii*, *Succinimonas amylolytica*, *Lactobacillus* sp. et certains membres de la famille

Ruminococcaceae sont quant à eux identifiés comme des bactéries amylolytiques (Xia et al., 2015). Cependant, en pratique, les rations ne sont jamais constituées uniquement de cellulose ou d'amidon mais d'un mélange d'un grand nombre de composés chimiques dans des proportions variées. L'identification précise des relations entre la présence qualitative et quantitative d'un ou plusieurs de ces composés et la structure de la communauté microbienne ruminale est très difficile à mettre en évidence. Les variations simultanées des différents paramètres sont des facteurs de confusions qui ne permettent pas d'identifier des liens de causalité. Au niveau le moins précis des variations de la composition de la ration, nous allons présenter l'effet d'une transition alimentaire, c'est-à-dire le passage d'une ration à une autre. Dans ce cas, un grand nombre de composés chimiques de la ration varient simultanément. Ce changement entraîne une modification de la structure de la communauté microbienne. Voici quelques exemples chez la vache laitière, les bovins en croissance et les chèvres. Les exemples basés sur des transitions alimentaires *peripartum* ne sont pas traités ici car les modifications de la physiologie, du comportement et de la mise en place de la lactation sont des facteurs de confusion supplémentaire que nous souhaitons éviter.

Le premier exemple présenté ici a été réalisé sur 8 vaches Holstein tarées (Tajima et al., 2001). Au début de l'expérimentation, les animaux recevaient une ration riche en foin composée de 3,5 kg de foin à brins longs, 1 kg de foin à brins courts et 1,5 kg de concentré (24 % de blé, 20 % de maïs grain, 20 % de son de blé, et 10 % de tourteau de soja). Au jour 0, l'alimentation de cinq vaches a été modifiée vers une ration riche en céréales, composée de 0,5 kg de foin à brins longs, de 2,4 kg du concentré précédemment décrit et de 3,6 kg d'orge. Les échantillons de contenus ruminiaux pour analyser le microbiote ont été réalisés au jour 0 avant le changement de la ration puis au jour 3 et au jour 28 post modification de la ration. Les analyses des microbiotes ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques à 12 espèces bactériennes et grâce à la technique de PCR en temps réel. Le tableau 6 reprend les évolutions de ces bactéries (Tajima et al., 2001) :

Bactéries ciblées	Concentration en ADN		
	Jour 0	Jour 3	Jour 28
<i>P. ruminicola</i>	29.45 ± 3.6	205.2 ± 38.4	10.94 ± 1.9
<i>P. bryantii</i>	0.284 ± 0.1	74.77 ± 14.9	2.865 ± 0.5
<i>F. Succinogenes</i>	12.32 ± 0.8	0.597 ± 0.0	0.215 ± 0.0
<i>S. ruminantium</i> - <i>M. multiacida</i>	7.114 ± 1.3	60.40 ± 6.6	16.92 ± 2.7
<i>S. bovis</i>	0.232 ± 0.1	15.63 ± 2.8	0.104 ± 0.0
<i>T. bryantii</i>	0.072 ± 0.0	0.043 ± 0.0	0.011 ± 0.0
<i>E. ruminantium</i>	0.585 ± 0.1	0.042 ± 0.0	0.048 ± 0.0
<i>A. lipolytica</i>	0.137 ± 0.1	0.440 ± 0.2	0.095 ± 0.0
<i>S. dextrinosolvans</i>	0.468 ± 0.1	0.733 ± 0.1	ND
<i>R. flavefaciens</i>	2.891 ± 0.7	0.260 ± 0.0	0.324 ± 0.1

Tableau 6 : Quantification de 12 bactéries ruminales par PCR en temps réel pendant un changement alimentaire. Jour 0 correspond au prélèvement sur le régime à base de foin avant la transition alimentaire. Jour 3 et Jour 28 correspondent aux prélèvements 3 jours et 28 jours après la transition alimentaire. La concentration en ADN a été mesurée en mmol d'ADNr 16S par mg d'ADN ruminal total ± écart-type. ND signifie non détecté. (Tajima et al., 2001).

Entre le jour 0 avec la ration foin et le jour 28 avec la ration riche en céréales, Tajima et al. (2001) ont observé une diminution des bactéries fibrolytiques *F. succinogenes* et *R. flavefaciens*. Pour certaines bactéries ayant des fonctions amylolytiques telle que *S. ruminantium*, ils ont observé une augmentation de leur présence avec la ration riche en céréales. En revanche, pour les espèces *S. bovis* et *E. ruminantium* qui ont elles aussi des fonctions amylolytiques, leur concentration n'augmente pas avec la ration riche en céréales.

Les espèces ayant une large variété de fonctions comme *P. ruminicola*, *S. ruminantium* et *S. bovis* ont des concentrations en ADN très élevées 3 jours après le changement de ration : ce sont des bactéries opportunistes. Concernant *P. bryantii*, un opportunisme avec une préférence pour les rations riches en céréales peut être supposé (Tajima et al., 2001). En conclusion, le passage d'un régime riche en parois végétales à un régime amylicé entraîne une diminution des bactéries fibrolytiques et une augmentation de certaines bactéries amylolytiques. Les espèces polyvalentes ont des concentrations en ADN plus importantes peu de temps après le changement de ration pendant la phase de transition de la structure de la communauté microbienne ruminale. Yang et Beauchemin (2001), dans une autre expérience sur 8 vaches Holstein en lactation, 2 régimes alimentaires ont été testés. Le premier régime, avec peu de fourrages (ratio fourrages sur concentrés de 35/65), contient 31,7 % de NDF et 32,9 % d'amidon. Le second régime, avec beaucoup de fourrages (ratio fourrages sur concentrés de 55/45), contient 37,8 % de NDF et 24,1 % d'amidon. Dans ces deux régimes, les taux de protéines brutes étaient proches : 17,9 % pour le premier régime et 18,3 % pour le second. De même, la concentration en énergie était très proche pour ces deux régimes avec 1,66 Mcal/kg pour le premier régime et 1,59 Mcal/kg pour le second. La communauté microbienne ruminale n'a pas été étudiée. En revanche, la colonisation des fibres par les bactéries a été analysée. Avec le ratio 35/65 la fraction solide des contenus ruminiaux contient 21,9 % de bactéries contre 24,6 % avec le ratio 55/45 (Yang and Beauchemin, 2001). La composition des rations n'étant pas identique, ces résultats sont peut-être dus aux proportions des matières premières.

Après avoir constaté des changements de structure de la communauté microbienne ruminale en fonction du ratio fourrages sur concentrés de la ration distribuée aux vaches laitières, nous allons nous intéresser à l'effet du changement de ce ratio sur 8 jeunes bovins en croissance d'environ 380 kg d'après les travaux de Fernando et al. (2010). Dans cette étude, les animaux ont été nourris avec du foin de prairie et des céréales. Parmi les 8 animaux, 4 jeunes bovins sont passés d'une ration avec un ratio fourrages sur céréales de 80/20 à une ration avec un ratio de 60/40, puis 40/60 et enfin 20/80. La période d'adaptation à chacun de ces aliments était de 7 jours avant de réaliser un prélèvement de contenu ruminal pour analyser la structure de la population bactérienne. Cette dernière a été suivie à chaque étape de la transition alimentaire grâce à l'analyse des polymorphismes de la taille des fragments de restriction terminaux basés sur l'ARNr 16S (T-RFLP) ainsi que l'analyse PCR quantitative en temps réel. Avec la ration dont le ratio fourrages sur céréales était de 80/20, 398 OTU ont été observés. Avec le ratio 20/80, 315 OTU ont été observés mais seulement 24 sont communs à ces 2 régimes extrêmes. Les *Firmicutes* sont le phylum le plus retrouvé dans la ration riche en foin alors que ce sont les *Bacteroidetes* qui sont le plus retrouvés dans la ration riche en céréales. La figure 3 synthétise les évolutions quantitatives de 6 micro-organismes (*Butyrivibrio fibrosolvens*, *Streptococcus bovis*, *Fibrobacter succinogenes*, *Selenomonas ruminantium*, *Prevotella bryantii* et *Megasphaera elsdenii*), (Fernando et al., 2010) :

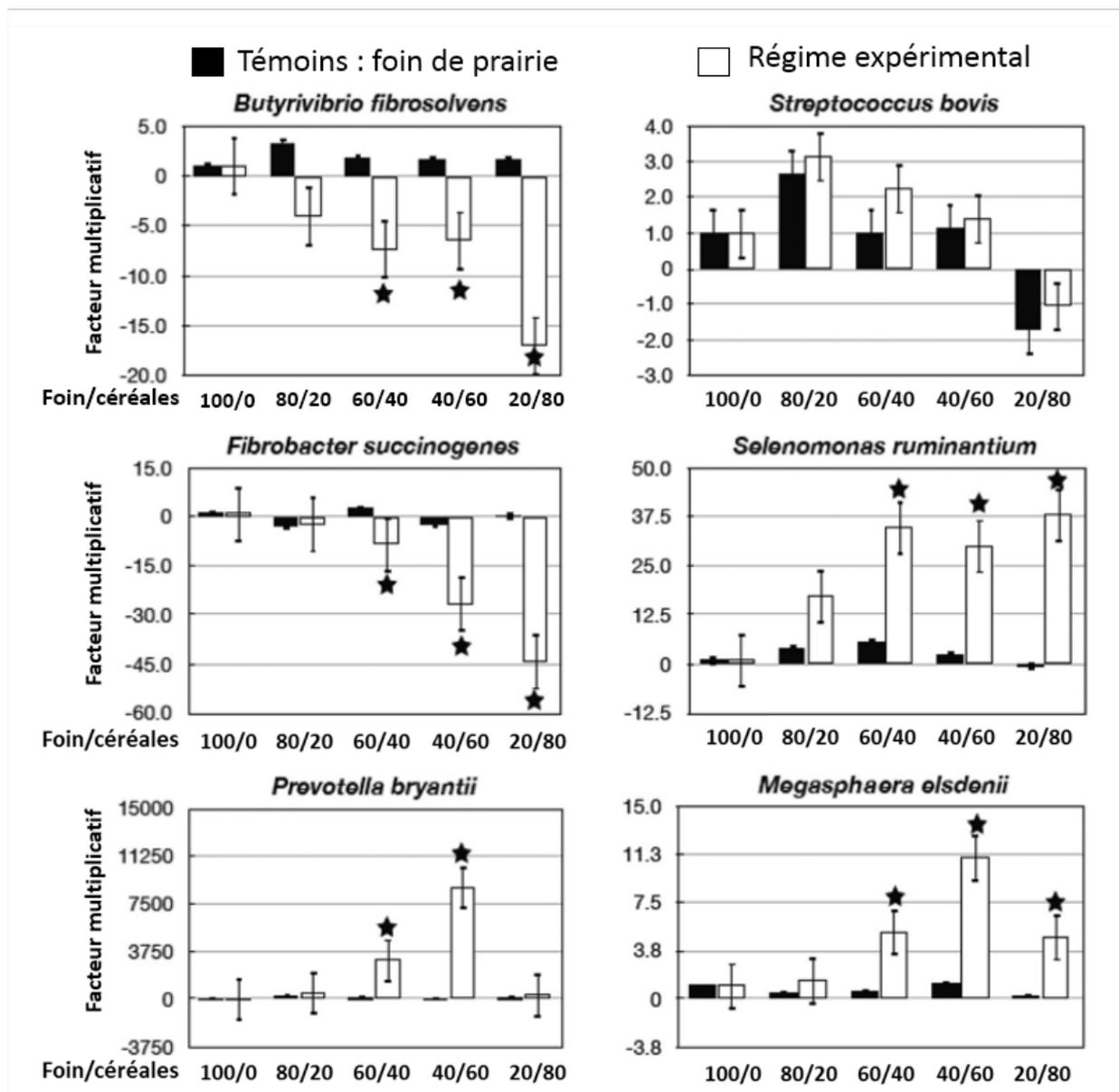


Figure 3 : Changement de populations de quelques espèces bactériennes observées durant une transition alimentaire à partir d'un qRT-PCR. Les analyses ont comporté 4 répliquats biologiques et 2 répliquats techniques. Les changements de populations sont représentés par des facteurs multiplicatifs par rapport à la taille de la population lorsque les animaux étaient nourris de foin de prairie au cours de la phase d'adaptation. Un gène à copie unique conservé universellement, *rpoB*, a été utilisé pour la normalisation. Les étoiles indiquent des différences significatives de composition par rapport à la situation initiale (Fernando et al., 2010).

La diminution du ratio foin sur céréales entraîne une diminution de *Butyrivibrio fibrosolvens* et *Fibrobacter succinogenes*, une augmentation de *Selenomonas ruminantium* et des concentrations maximales de *Prevotella bryantii* et *Megasphaera elsdenii* à 40/60. L'évolution de *Streptococcus bovis* semble synchronisée avec le lot témoin (Fernando et al., 2010). Les 2 espèces bactériennes impliquées dans la dégradation des fibres, *Butyrivibrio fibrosolvens* et *Fibrobacter succinogenes* ont des pourcentages qui diminuent de manière régulière avec la diminution de la part des fourrages dans la ration. La bactérie aux fonctions amylolytique, *Selenomonas ruminantium*, augmente avec l'augmentation de la part de céréales dans la ration. *Megasphaera elsdenii* est capable de dégrader les substrats suivants : le maltose, le saccharose, le fructose, le glucose, le lactate, les peptides et les acides aminés (Fonty et al., 1995). Il semblerait que le ratio foin sur céréales de la ration optimal pour le développement de cette bactérie soit de 40/60. Pour *Streptococcus bovis* et *Prevotella*

bryantii, le même comportement que celui observé chez les vaches laitières a été retrouvé dans cette expérience : ces espèces se développent particulièrement bien dans les périodes de transition, ce qui laisse supposer une stratégie opportuniste de ces bactéries. Les résultats observés sur vaches laitières et sur jeunes bovins en croissance sont cohérents.

Les bovins ne sont pas le seul objet d'étude en ruminant et des expériences similaires à celles conduites ci-dessus ont été réalisées avec les caprins. L'effet d'une transition alimentaire entre une ration composée uniquement de foin de luzerne et une ration composée de foin de luzerne et de maïs grain avec un ratio de 60/40 a été testé sur 4 chèvres pendant que 4 autres continuaient d'être alimentées avec la ration de foin de luzerne pour servir de témoin (Grilli et al., 2016). Une transition brutale a été réalisée. Des échantillons de contenus ruminaux ont été pris 2, 10 et 20 jours après la transition. La communauté microbienne a été analysée grâce à 3 techniques différentes : l'analyse PCR-DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant), la PCR en temps réel et le séquençage à haut débit d'ADN. Le premier constat concerne le pH : il est systématiquement inférieur dans le rumen des animaux nourris avec la ration contenant du maïs. Ce changement de pH est caractéristique d'une transition d'une ration riche en fibre à une ration riche en amidon, passant d'un microbiote avec une part importante de bactéries fibrolytiques à un microbiote avec une part importante de bactéries amylolytiques. Le ratio des phyla *Firmicutes* sur *Bacteroidetes* est supérieur chez les chèvres consommant uniquement le foin de luzerne. Au niveau des genres bactériens, une diminution de *Prevotella* est observée sur le régime contenant 40 % de maïs (Grilli et al., 2016). Au sein de ce genre les espèces bactériennes ont de très nombreuses fonctions ce qui rend l'interprétation fonctionnelle difficile à réaliser (Fonty et al., 1995). L'absence d'information au niveau des espèces bactériennes ne nous permet pas de comparer ces évolutions avec celles présentées en bovin ci-dessus. Une autre étude s'est intéressée aux effets du ratio fourrages sur concentrés (Hua et al., 2017). Avant le début de l'expérimentation, les animaux recevaient une alimentation dont le ratio fourrages sur concentrés était de 65/35. Au début de l'essai, 10 chèvres ont continué d'être alimentées avec cette ration alors que 5 autres ont été nourries pendant 19 semaines avec une ration au ratio fourrages sur concentrés de 35/65. Après 13 semaines, 5 chèvres des 10 présentes dans le lot témoin ont également été nourries avec la ration au ratio fourrages sur concentrés de 35/65. A la fin de l'essai, les trois lots d'animaux ont été abattus (lot témoin (LC), lot sur ration riche en concentré sur une longue période (HL) et lot sur la même ration maïs sur une courte période (HS)). La structure des communautés microbiennes a été analysée à l'aide de techniques de pyroséquençage 454 de l'ADNr 16S et la technique de PDR en temps réel. Au niveau des phyla, les *Firmicutes* sont les plus représentés avec 55,1 % suivi des *Bacteroidetes* avec une abondance relative de 37,82 %. Le diagramme de Venn (figure 4) reprend les OTU partagés et propre à chacun des 3 groupes étudiés (Hua et al., 2017).

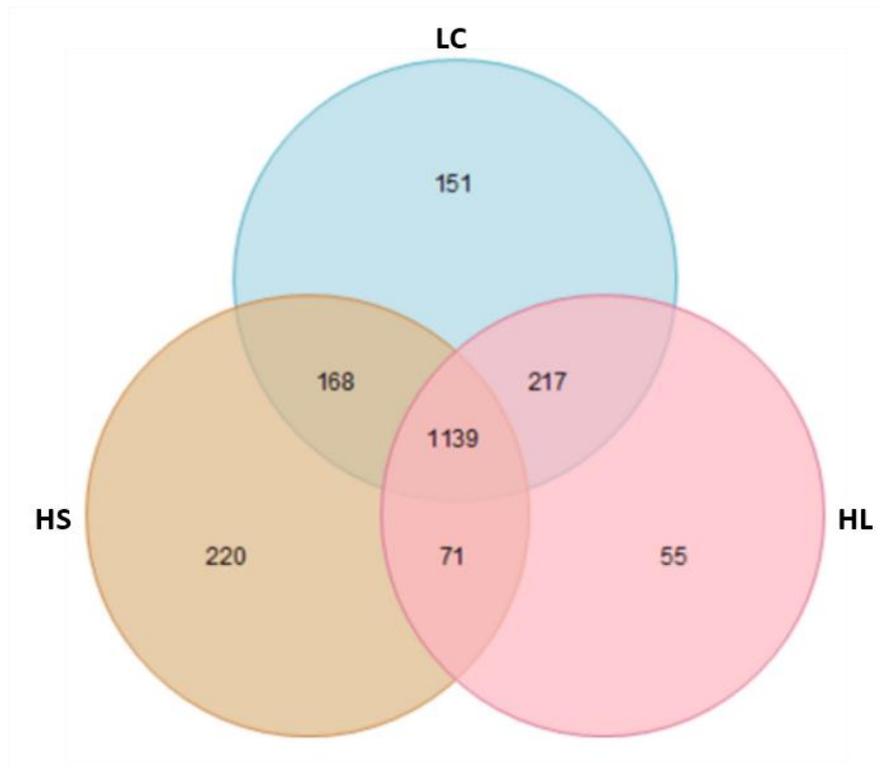


Figure 4 : Diagramme de Venn montrant les superpositions des OTU entre le lot témoin ayant un ratio fourrages sur concentrés de 65/35 (LC), le lot sur consommant l'aliment au ratio fourrages sur concentrés de 35/65 depuis 6 semaines (HS) et le lot consommant l'aliment au ratio fourrages sur concentrés de 35/65 depuis 19 semaines (HL) (Hua et al., 2017).

La richesse en OTU des 3 groupes a été de 1675 pour LC, de 1598 pour HS et de 1482 pour HL. Les OTU spécifiques à chacun des groupes ont été de 151 pour LC, 220 pour HS et de 55 pour HL. La diminution du ratio fourrages sur concentrés de 65/35 à 35/65 a entraîné une chute de la richesse en OTU. Dix genres bactériens ont été significativement affectés par l'augmentation du concentré dans la ration au dépend du fourrage. L'abondance de *Bulleidia*, *Paracoccus*, *Pseudoramibacter Eubacterium*, *Atopobium* et *Selenomonas* a augmenté alors que l'abondance d'*Oscillospira*, *YRC22*, *Bacteroidetes*, *CF231* et *Akkermansia* a significativement diminué. Le nombre de méthanogènes a eu tendance à augmenter lors du passage de la ration de base à la ration riche en concentrés à court terme (HS) (Hua et al., 2017). L'abondance du genre bactérien *Selenomonas*, dont l'espèce *S. Ruminantium* est capable de dégrader l'amidon, a augmenté avec l'augmentation de la part des concentrés dans la ration (Fonty et al., 1995). La structure de la communauté microbienne évolue longtemps après un changement alimentaire. En effet, la composition du microbiote est très différente entre les groupes HS et HL (c'est-à-dire 6 semaines ou 19 semaines après un changement alimentaire) avec respectivement environ 24 % et 18 % d'OTU spécifiques.

À travers ces différents exemples en bovins et en caprins, nous constatons qu'une modification du ratio fourrages sur concentrés entraîne systématiquement une modification de la structure de la communauté microbienne. Les espèces bactériennes mises en évidence dans ces différentes études ne sont pas toujours exactement les mêmes, mais les bactéries spécifiques des substrats (amylolytiques et cellulolytiques) varient en fonction du substrat qui leur est accessible. Des espèces bactériennes opportunistes profitent des changements alimentaires pour se développer au dépend des spécialistes. Au sein des études entre les animaux et entre les études, des différences sont observées indiquant une complexité dans les réponses des communautés face à la modification du ratio fourrages sur concentrés. La mise

à l'herbe est un autre type de transition alimentaire que nous n'avons pas évoqué jusqu'ici et que nous allons développer dans le paragraphe suivant.

- **Effet de la mise à l'herbe**

Dans les zones climatiques où nous retrouvons une saison rigoureuse marquée par le froid et de nombreuses intempéries de pluie ou de neige, les ruminants sont souvent logés à l'intérieur de bâtiments d'élevage pour passer cette période. Les animaux n'ont alors pas accès aux pâturages et consomment généralement une ration à base de fourrages récoltés et stockés tels que le foin, l'enrubannage et/ou l'ensilage. Au retour des beaux jours et suite au redémarrage de la végétation, les animaux retournent aux pâturages. Cette transition alimentaire très fréquemment rencontrée en France est une situation propice pour étudier l'adaptation du microbiote ruminal à un changement de substrat. Nous allons ici présenter 2 études chez les bovins.

Dans la première étude réalisée par Dipti W. Pitta et al. (2010), quatorze jeunes bovins croisés Angus et Hereford ont été utilisés pour mieux comprendre le changement de structure de la communauté microbienne entre 2 aliments autour d'un changement d'alimentation. Dans un premier temps, les animaux ont été nourris avec du foin (*cynodon spp.*) pendant 34 jours avant d'être mis au pâturage (blé). Les 3 différences principales au niveau des valeurs nutritives des aliments sont :

- le pâturage est plus riche en protéine de 77,4 % par rapport au foin,
- le pâturage contient 35,2 % de NDF en moins que le foin
- la digestibilité *in vitro* de la matière sèche au pâturage est supérieure de 40.4 % à celle du foin

Des échantillons de contenus ruminiaux ont été prélevés à la fin de chacune de ces 2 périodes. Ils ont été analysés par des techniques de bTEFAP (bacterial Tag-Encoded FLX Amplicon Pyrosequencing). La richesse en OTU du microbiote est inférieure pour le pâturage par rapport au foin, que ce soit sur la fraction fibreuse du contenu ruminal ou que ce soit sur la partie liquide. En utilisant un niveau de dissimilarité de 3 % pour différencier les OTU et à l'aide des courbes de raréfaction, des diminutions de 11 % et 24,9 % des OTU ont été observés pour la phase fibreuse et la phase liquide des contenus ruminiaux respectivement. Concernant les évolutions des communautés microbiennes, la figure 5 reprend les différences de structure entre les phases du contenu et entre les 2 régimes alimentaires (Pitta et al., 2010).

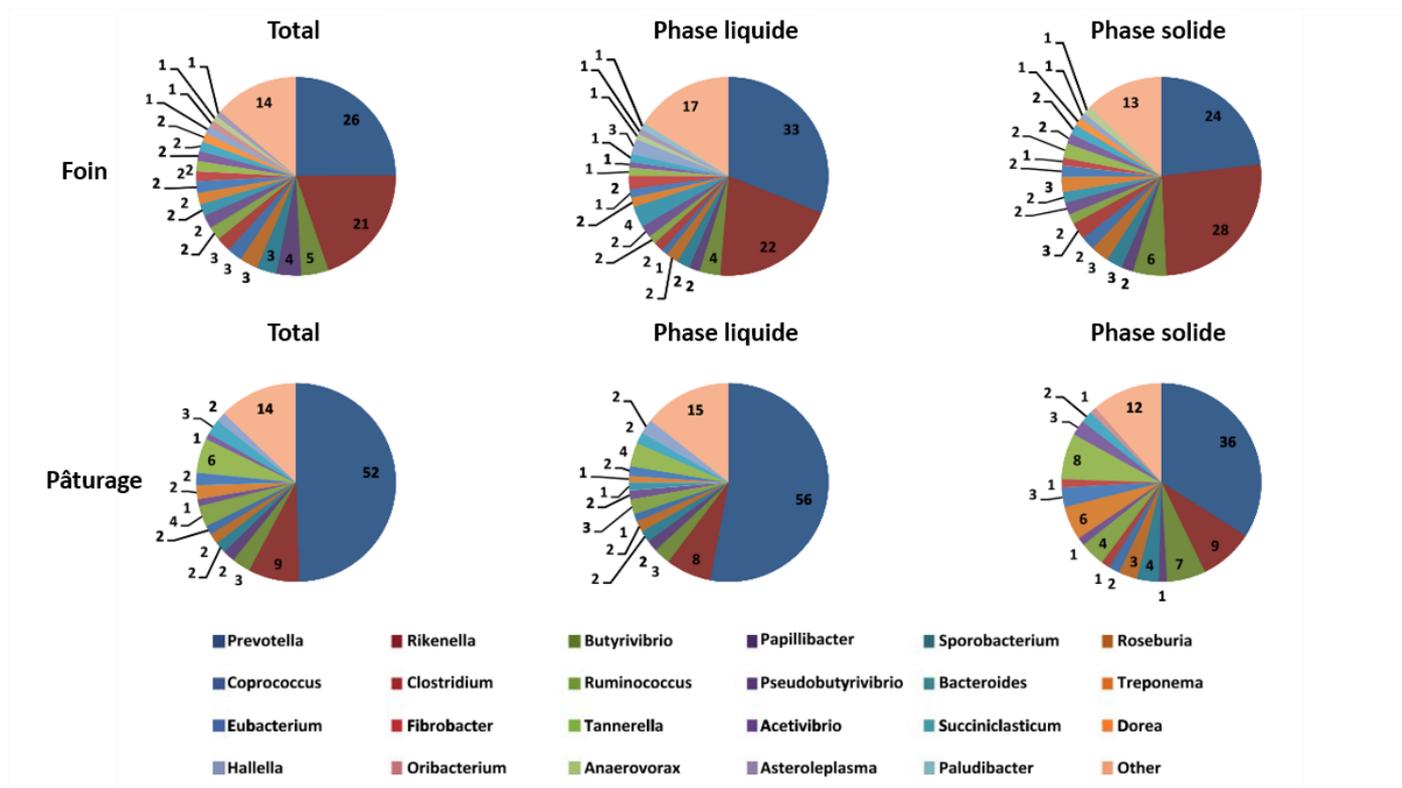


Figure 5 : Composition phylogénétique des genres bactériens présents au-dessus du seuil de 0,9 % dans les fractions ruminales totales, liquides et solides avec le régime foin et avec le pâturage, provenant de données analysées à l'aide de techniques de pyroséquençage bTEFAP (Pitta et al., 2010).

Les 2 genres prédominants dans l'ensemble de ces échantillons sont *Prevotella* et *Rikenella*. De la ration foin au pâturage, une diminution du genre *Rikenella* et une augmentation du genre *Prevotella* ont été observées (Pitta et al., 2010). La richesse en OTU est plus élevée pour la ration contenant davantage de fibres, ce qui est en cohérence avec les résultats présentés précédemment. La proportion plus importante du genre *Prevotella* dans la ration ayant un taux de protéines brutes supérieur de 77,4 % peut s'expliquer par le fait que certaines espèces de *Prevotella* comme *ruminicola* sont capables de dégrader les peptides et les protéines (Fonty et al., 1995). Les bactéries fibrolytiques comme le genre *Fibrobacter* sont observées dans des proportions plus faibles avec la ration contenant 35,2 % de NDF en moins. Les abondances relatives des principaux genres bactériens varient beaucoup lors de la transition d'un foin au pâturage. Chez les jeunes bovins, la structure de la communauté microbienne semble s'adapter aux évolutions de composition nutritionnelle de la ration. Quand est-il pour les vaches laitières ?

En 2017, Schären et al. ont utilisé dix vaches Holstein en lactation pour observer l'effet d'une transition alimentaire sur la composition du microbiote ruminal. Sur les 10 semaines de l'essai, parmi ces 10 vaches, 5 ont été nourries avec une ration complète mélangée contenant 35 % d'ensilage de maïs, 35 % d'ensilage d'herbe et 30 % de concentrés (pourcentages basés sur la teneur en matière sèche des aliments). Les 5 autres vaches laitières ont suivi une transition alimentaire selon les modalités suivantes :

- en semaine n°1, elles consommaient uniquement la ration complète ;
- en semaine n°2, elles allaient au pâturage 3 h par jour ;
- en semaines n°3 et n°4 elles allaient au pâturage 12h par jour ;
- en semaine n°5 elles allaient uniquement au pâturage (+ 1,75 kg de concentré par jour).

Les prélèvements de contenus ruminiaux pour analyse du microbiote ont été réalisés au début de l'essai, juste après la transition (en semaine 5) et à la fin de l'essai (en semaine 10). Les analyses de microbiote ont été réalisées par des analyses PCR-SSCP (Polymorphisme de conformation des simples brins) et par analyses au séquenceur Illumina MiSeq. Concernant la richesse en bactéries et en archées, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes. Pour la composition des structures des communautés microbiennes la figure 6 synthétise les évolutions en fonction du temps, de la ration et de la phase de contenu (Schären et al., 2017).

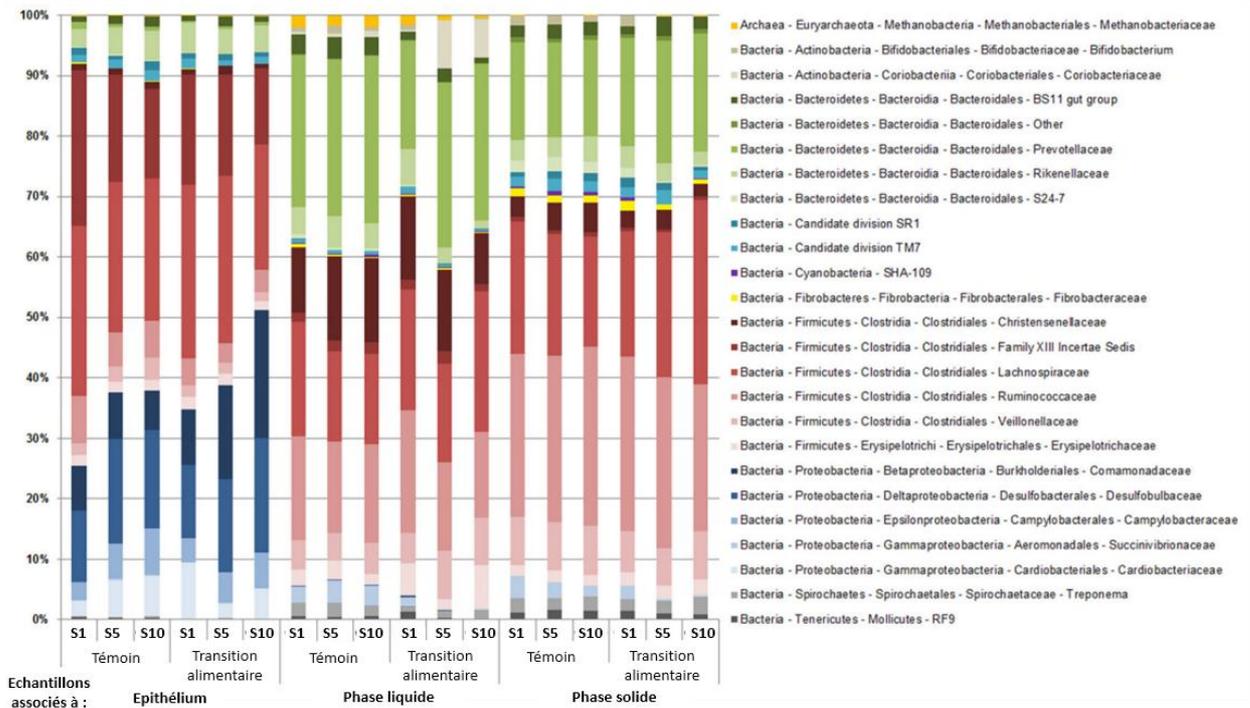


Figure 6 : Différences des abondances relatives exprimées en pourcentages des OTU obtenus à partir du séquençage 16S au niveau des familles pour les échantillons de contenu ruminiaux associés à l'épithélium, à la phase liquide et à la phase solide pour les 3 prélèvements en semaine 1, 5 et 10 pour les 5 animaux témoins et les 5 animaux ayant suivi la transition alimentaire (Schären et al., 2017).

Les analyses de Beta diversité indiquent des différences significatives de portion de microbiote analysé (épimural, liquide et solide), de groupes, de temps et d'animaux ainsi que des interactions entre la portion de microbiote étudiée et le groupe ainsi que le groupe et le temps. Il y a une plus grande similarité entre les communautés microbiennes associées aux phases liquide et solide que la communauté microbienne associée à l'épithélium du rumen. En semaine 5, les animaux du groupe « transition alimentaire » sont déjà à la pâture et pourtant la structure de la communauté bactérienne à ce moment-là est différente de celle en semaine 10. Ce résultat indique une évolution du microbiote dans les semaines suivant la fin de la transition (Schären et al., 2017). Ces variations d'abondances relatives au niveau des familles ne permettent pas de faire un lien entre structure et fonction. En effet, à ce niveau taxonomique, les genres et les espèces au sein de ces familles peuvent avoir des fonctions différentes. Les changements de structure de la communauté microbienne ne se s'arrêtent pas dès la stabilisation de la ration en fin de transition. Le maillage des prélèvements n'est pas assez fin pour estimer le temps de stabilisation sur cet essai.

Ces 2 exemples illustrent à quel point la communauté microbienne ruminale s'adapte aux substrats qui lui sont fournis par son animal hôte. Pour comprendre plus précisément les changements et les espèces directement affectés par une modification de composition de l'alimentation, nous allons nous focaliser sur des changements simples de la composition

chimique de la ration pour identifier la ou les communautés spécifiques à ce dernier pour faciliter l'interprétation des résultats obtenus.

- **Effet de la variation de composition chimique de la ration**

Dans cette partie nous allons nous intéresser à l'effet de la source énergétique de la ration, l'effet du niveau de protéine et des interactions entre ces 2 facteurs sur la composition du microbiote ruminal chez la vache laitière. Nous verrons également l'effet du taux de protéine chez le jeune bovin en croissance.

Belanche et al. (2012a) ont utilisé 4 vaches Holstein dans une expérimentation en carré latin (2 x 2 facteurs). Le premier facteur correspond à la source énergétique de la ration : régime riche en fibre (FIB) ou régime riche en amidon (STA). Le ratio NDF sur amidon pour ces deux rations est de 4,2 pour FIB et 1,2 pour STA. Le second facteur est le niveau de protéine : 110 % des recommandations (HP) ou 80 % des recommandations (LP). Pour le régime LP, l'azote dégradable dans le rumen est 15 % en dessous des recommandations. Chaque vache a reçu consécutivement les 4 combinaisons de facteurs possibles (FIB – HP ; FIB – LP ; STA – HP ; STA – LP) sur 4 périodes de 28 jours. Après 23 jours d'adaptation, 1 prélèvement de contenu ruminal par animal et par jour pendant 3 jours a été effectués aux jours 24, 26 et 28, avant la distribution du matin à h = 0, à h = 2,5 ou à h = 5. Les analyses de la communauté microbienne ont été réalisées par analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (T-RFLP), par analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal (ARISA) pour la communauté fongique et par PCR quantitative. Concernant les fermentations ruminal, le tableau 7 reprend les principales différences entre traitements (Belanche et al., 2012).

Fermentation ruminale	Ration				Temps après repas			P-value		
	HP		LP							
	FIB	STA	FIB	STA	0 h	2.5 h	5 h	Protéine	Energie	Temps
ammoniaque mmol/L	9,54	6,57	6,62	1,54	4,46 ^b	11,1 ^a	2,66 ^b	<0,001	<0,001	<0,001
pH	6,56	6,46	6,63	6,44	7,04 ^a	6,38 ^b	6,15 ^b	0,54	<0,001	<0,001
AGV totaux mmol/L	107	102	102	101	75 ^b	113 ^a	120 ^a	0,2	0,28	<0,001
Acétate %	67,6	65,5	67,3	65,6	70,9 ^a	63,5 ^b	65,2 ^b	0,96	0,027	<0,001
Propionate %	18	17,4	18,5	17	15,6 ^c	20,0 ^a	17,5 ^b	0,93	0,008	<0,001
Butyrate %	10,7	12,6	10,7	13,7	9,7 ^b	12,7 ^a	13,4 ^a	0,26	<0,001	0,003
Isobutyrate %	0,79	0,86	0,68	0,63	1,07 ^a	0,59 ^b	0,55 ^b	<0,001	0,73	<0,001
Valérate %	1,15	1,34	1,14	1,48	0,92 ^c	1,39 ^b	1,51 ^a	0,57	0,028	0,006
Isovalérate %	1,25	1,47	0,94	1,04	1,43 ^a	1,10 ^b	1,01 ^b	<0,001	0,037	0,019

Tableau 7 : Fluctuations journalière des produits de fermentation de vaches laitières nourries avec 4 régimes à 2 niveaux de protéine et 2 sources d'énergie après 4 semaines d'adaptation (Belanche et al., 2012). HP : niveau de protéine à 110 % des besoins ; LP : niveau de protéine à 80 % des besoins ; FIB : régime riche en fibres ; STA : régime riche en amidon.

Le pH, la concentration en ammoniaque, le pourcentage molaire en acétate et en propionate sont plus élevés quand les vaches consomment l'aliment riche en NDF. En revanche, le pourcentage molaire en butyrate, valérate et isovalérate sont plus élevés quand les vaches consomment une ration riche en amidon. De moins nombreux effets sont observés concernant l'effet de la teneur en protéines. En effet, la concentration en ammoniaque le pourcentage molaire en isobutyrate et d'isovalérate sont plus élevés quand les animaux consomment une ration riche en protéines. Concernant le temps de mesure, il a

systématiquement un impact sur la concentration ou la proportion de produits de fermentation dans le rumen. Au niveau de la communauté microbienne la richesse bactérienne est identique entre les régimes FIB – HP, FIB – LP et STA – HP avec une valeur d'environ 149 alors qu'elle est significativement inférieure avec le régime STA – LP avec une valeur de 138. Les différences dans la communauté bactérienne sont présentées dans le tableau 8 (Belanche et al., 2012).

Concentration en ADN	Ration				Temps après repas			P-value			
	HP		LP		0 h	2.5 h	5 h	Protéine	Energie	Protéine x Energie	Temps
	FIB	STA	FIB	STA							
Bactéries mg/g de MS	2,93	2,95	2,59	2,53	3,21 ^x	2,37 ^z	2,67 ^y	0,004	0,86	0,73	0,001
Protozoaires mg/g de MS	0,71	0,47	0,54	0,44	0,86 ^x	0,39 ^y	0,36 ^y	0,021	0,005	0,27	0,003
Champignons µg/g de MS	1,70 ^a	1,40 ^b	1,58 ^{ab}	0,66 ^c	1,78 ^x	1,13 ^y	1,10 ^y	<0,001	<0,001	0,002	<0,001
Méthanogènes 10 ⁷ copies/g de MS	4,87	3,94	3,6	2,8	5,04 ^x	3,09 ^y	3,28 ^y	<0,001	<0,001	0,78	0,021
Abondances relatives 10 ³ x2 ^{-ΔCt}											
R. albus	1,08	0,94	0,72	0,5	0,89	0,81	0,73	<0,001	0,07	0,81	0,06
R. flavefaciens	3,01 ^b	4,13 ^a	1,89 ^c	4,61 ^a	3,78 ^x	3,47 ^y	2,98 ^z	0,06	<0,001	0,009	0,005
F. succinogenes	11,6 ^b	13,5 ^a	10,5 ^{bc}	9,27 ^c	14,3 ^x	10,3 ^y	8,89 ^y	<0,001	0,43	0,044	<0,001
B. fibrisolvens	14	15,7	10,9	10,6	14,0 ^x	11,2 ^y	13,3 ^x	<0,001	0,93	0,18	0,01
P. ruminicola	112	117	107	125	122	113	110	0,36	0,76	0,84	0,19
P. bryantii	1,64	1,53	1,21	0,77	1,31	1,22	1,34	0,014	0,93	0,77	0,84
S. ruminantium	0,2	0,36	0,26	0,29	0,3	0,26	0,26	0,92	0,035	0,15	0,11
S. bovis	0,9	0,77	1,59	0,46	0,73	1,02	1,04	0,49	0,025	0,07	0,47
M. elsdenii	0,001	0,1	0,05	0,37	0,08	0,14	0,17	0,11	0,025	0,28	0,28
A. lipolytica	0,15	0,18	0,1	0,15	0,19	0,13	0,13	0,24	0,49	0,84	0,08

Tableau 8 : Fluctuations journalières de 10 groupes microbiens chez des vaches laitières nourries avec 4 régimes à 2 niveaux de protéine et 2 sources d'énergie après 4 semaines d'adaptation. Les moyennes au sein d'une ligne sans avoir la même lettre en exposant différent ($P < 0.05$), entre les régimes (^{a, b, c}) ou entre les temps de prélèvement (^{x, y, z}) (Belanche et al., 2012). HP : niveau de protéine à 110 % des besoins ; LP : niveau de protéine à 80 % des besoins ; FIB : régime riche en fibres ; STA : régime riche en amidon.

Avec les rations aux teneurs en protéines à 80 % des recommandations, les concentrations de bactéries, de protozoaires, de la communauté fongique, des méthanogènes et des proportions de *R. albus*, *F. succinogenes*, *B. fibrosolvens*, et *P. bryantii* diminuent. Les rations riches en amidon par rapport aux rations riches en NDF ont des concentrations plus faible en protozoaires, champignons, et méthanogènes ainsi qu'une proportion plus faible de *S. bovis*. Au contraire, les proportions de *R. flavefaciens*, *S. ruminantium* et *M. elsdenii* sont plus élevées avec la ration riche en amidon. La communauté microbienne et la proportion de *F. succinogenes* sont particulièrement affectées avec la ration riche en amidon et pauvre en protéines par rapport aux 3 autres rations (Belanche et al., 2012). Les variations d'énergie et de protéines dans la ration entraînent, là encore, des changements dans la structure de la communauté microbienne ruminale. Des interactions entre sources énergétique et protéique sont ici mises évidence au niveau de la concentration en champignons et de l'abondance relative de *F. succinogenes*. Ceci indique une dépendance entre ces 2 facteurs pour le développement de ces groupes microbiens. Les espèces microbiennes ayant des niches écologiques larges comme *P. ruminicola* et *S. ruminantium* (Fonty et al., 1995) sont peu affectées par les changements de ration. Les bactéries cellulolytiques n'ont, dans cet essai,

pas l'évolution théorique présupposée. En effet, leurs abondances ne décroissent pas significativement avec les rations riches en amidon. Il ne faut toutefois pas oublier que les rations riches en amidon contiennent environ 26 % de NDF en moins que les rations riches en fibres. *A. lipolytica* est une espèce bactérienne ayant une niche écologique très restreinte sur la fraction lipidique de la ration, son abondance reste stable entre les rations car la teneur en lipide reste inchangée entre les rations.

La seconde étude présentée ici est celle de Zhou, Bao, & Zhao (2019). Huit jeunes bovins Simmental en croissance ont été utilisés pour étudier l'effet du taux de protéine sur les fermentations et la communauté bactérienne ruminale. Les 2 rations avaient des différences de protéines brutes de 25 g. La ration à faible teneur en protéines contenait 111 g/kg de MS alors que la ration riche en protéines en contenait 136 g/kg de MS. Dans ces 2 rations il y avait respectivement 98,5 et 120,9 g/kg de MS de protéines dégradables dans le rumen. Après des périodes d'adaptation de 14 jours, les contenus ruminiaux ont été échantillonnés pendant 5 jours. Le séquençage à haut débit a été utilisé pour étudier les communautés microbiennes ruminales. Concernant les produits de fermentations mesurés dans le rumen, seuls 3 varient significativement avec l'effet du taux de protéines. En effet, les teneurs en iso-Butyrate, iso-Valérate et en ammoniacque sont plus importantes avec le régime ayant un taux de protéines brutes plus important. La digestibilité des protéines brutes dans le rumen est augmentée de 6,7 % (passant de 61,22 à 67,90 %) de la ration à 111 g/kg de MS à celle à 136 g/kg de MS. Les changements de la communauté bactérienne au niveau phylum concernent *Proteobacteria* et *Terricutes* qui diminuent avec l'augmentation du taux de protéines brutes dans la ration. Au niveau des genres bactériens, les deux les plus abondants sont *Prevotella_1* et *Christensenellaceae_R-7_group* représentant respectivement 20 % et 33 % de l'ensemble des séquences. Seul *Saccharofermentans* voit son abondance relative significativement modifiée à la hausse avec l'augmentation de la teneur en protéines de la ration (Zhou et al., 2019). Dans cette étude, la modification de 25g de protéines brutes entraîne des changements au niveau des fermentations avec l'augmentation de la production d'ammoniacque ainsi qu'une amélioration de la digestibilité protéique et de légers changements dans la communauté microbienne ruminale.

En conclusion, à partir de ces 2 expérimentations, les modifications de composition chimique des aliments entraînent des modifications dans la composition du microbiote ruminal. Des interactions ont été observées dans l'étude de Belanche et al. (2012a) entre la source énergétique et la source protéique. Les changements ne sont pas toujours faciles à interpréter. Le lien entre la composition du microbiote et la fonction des populations qui le constituent reste difficile pour les genres non cultivables. Enfin, une variabilité entre individus semble être présente dans chacune de ces expérimentations.

3.4.2.2 Effet des additifs, extraits végétaux et des métabolites secondaires

Après avoir abordé les effets de changements de ration sur la composition de la communauté microbienne ruminale, nous allons maintenant présenter 3 catégories de facteurs de variation des fermentations ruminales. Premièrement, nous présenterons les effets des principaux additifs, puis nous verrons les effets des huiles essentielles avant de terminer sur l'effet des plantes à saponines.

La manipulation des fermentations ruminales est souvent réalisée pour atteindre un ou plusieurs des objectifs suivants (Nagaraja et al., 1997) :

- améliorer les processus bénéfiques (ex : digestion de la cellulose),

- minimiser, modifier ou supprimer les processus inefficaces (ex : production de méthane),
- minimiser, modifier ou supprimer les processus nuisibles à l'hôte (ex : acidose).

Le tableau 9 reprend les principaux additifs par catégorie et présentent les principaux sites d'action de chacun d'eux (Jouany, 1994).

Les antibiotiques présentés dans les 2 premières catégories, comme leurs noms l'indiquent, sont des substances détruisant ou bloquant la croissance des bactéries. Ils ont de nombreux sites d'actions améliorant les performances zootechniques des animaux. Mais suite au développement de l'antibio-résistance chez les animaux et dans la population humaine, le recours à ces produits n'est plus autorisé dans un cadre d'amélioration des performances. Ils ne doivent être utilisés qu'après une prescription basée sur un diagnostic vétérinaire. Leur usage est réservé aux épisodes infectieux (Sanders et al., 2011). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), avec le concept « One Health » (un monde, une santé), incite à la gestion globale de la santé ne focalisant pas les améliorations sur le secteur humain mais également sur les autres secteurs comme l'élevage pour lutter contre les bactéries résistantes aux antibiotiques et les zoonoses (OMS, 2017). Il est malgré tout possible de manipuler et d'améliorer les fermentations à divers niveaux avec des additifs n'étant pas des antibiotiques comme par exemple les agents défaunants, les stimulants de salivation, les substances à effet tampon, les facteurs de croissance, les inhibiteurs de protéases et désaminases ainsi que les inhibiteurs à méthane.

Parmi les substances dont les effets sur les fermentations ruminales font l'objet de nombreuses études, nous retrouvons les huiles essentielles. Ces substances liquides sont le plus souvent obtenues par distillation de molécules volatiles issues de plantes. Le qualificatif d'essentiel n'est toutefois pas à interpréter comme les acides aminés essentiels ou les acides gras essentiels. Ces huiles ne sont pas indispensables au fonctionnement de l'organisme. Le tableau 10 reprend l'effet de quelques-unes de ces huiles essentielles sur les caractéristiques des fermentations du rumen (Hart et al., 2008).

Mode d'action

Additif	Dégradation des parois végétales		Protéolyse	Désaminase	Production d'AGV	Production de méthane	Production de lactate	Nombre de protozoaires	Croissance microbienne et son efficacité	Cinétique microbienne dans le digesta	NH ₃ dans le rumen	Conversion du L-tryptophane en 3-méthylindole
Ionophores												
Monensin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lasalocide	X	X	X	X	X	X	X			X		X
Abiérixine		X						X				
Nigericine				X								
Cationomycine	X	X		X	X			X				
Tetronasine		X	X	X		X						
Autres antibiotiques												
Avoparcine		X	X	X	X							
Tylosine	X			X		X						
Chlortetracycline	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Penicilline	X	X										
Thiopeptine		X		X		X						
Flavomycine	X			X	X							
Virginiamycine		X	X	X	X	X		X				X
Inhibiteurs de méthane												
Cl- et Br-méthane analogues			X	X	X			X				X
Acides gras à chaîne longue	X			X	X		X	X	X	X		
Benzo [1,3] dioxines, sulphate-sulphite, acide de bromoethanesulphonique				X	X							
Nitrate-nitrite					X							
Inhibiteurs de protéase/désaminase												
Diarylodonium			X	X	X							
p-chloromercuribenzoate		X										
Dithiothreitol		X										
Chloromethyl ketone		X										
EDTA		X										
Facteurs de croissance												
Acide gras iso C4-C5								X				
Niacine								X				
Thiamine				X				X				
Acide phenylpropanoïque	X											
Acide phenylacétique	X											
Sels minéraux (tampons)												
NaHCO ₃ , Na ₂ CO ₃ , MgO, CaCO ₃ , alkatén				X				X	X			
Stimulants de salivation												
Slaframine	X			X				X	X			
Pilocarpine				X					X	X		
Carbachol				X					X			
Agents défaunants												
Sulfate de cuivre, sulfosuccinate de dioctyle et de sodium, éthoxylate d'alcool, peroxyde de calcium	X	X		X	X		X	X	X	X		

Tableau 9 : Composés utilisés pour modifier les fermentations du rumen et leurs sites d'action connus (Jouany, 1994).

Huile essentielle	Système de test	Dosage	Substrat	Ammoniac	Propionate	AGV totaux	Degradation de la matière sèche	Méthane	
Anéthol	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
Anis	Culture continue	0.2 mg/l	ration complète mélangée	=	=	=	ND	ND	
Huile de cade	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
Carvacrol	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	-	+	+	ND	ND	
Carvone	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	-	-	-	ND	ND	
Cinnamaldehyde	Batch	0.3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	=	=	ND	ND	
	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	-	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	-	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Culture continue	31.2 mg/l	fourrage : concentré (30 : 70)	=	+	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	ND	-	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (30 : 70)	=	=	=	ND	ND	
Cannelle	Culture continue	0.22 mg/l	ration complète mélangée	=	=	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	+	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	+	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	=	ND	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	ND	-	ND	ND	
Huile de girofle	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	+	=	ND	ND	
	RUSITEC	40 mg/j	luzerne, foin et orge	=	ND	=	ND	=	
	RUSITEC	40 mg/j	fourrage : concentré (80 : 20)	=	=	=	=	=	
	<i>In vivo</i> (ovins)	110 mg/j	ration complète mélangée	=	=	=/+	ND	ND	
	<i>In vivo</i> (ovins)	110 mg/j	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=/+	=	ND	
	<i>In vivo</i> (bovins)	750 mg/j	ration complète mélangée	=	=	+	=	ND	
	<i>In vivo</i> (bovins)	1000 mg/j	ration complète mélangée	=	=	=	-	=	
	Culture continue	1.5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	+	=	ND	
	Culture continue	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	-	+	=	ND	
	Culture continue	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	-	=	=	ND	
Culture continue	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	-	=	=	ND		
d-Carvone	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
Huile d'aneth	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	0.3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	+	-	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	+	=	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Culture continue	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	=	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Culture continue	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	=	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	ND	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	-	=	=	ND	ND	
	Batch	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	-	=	ND	ND	
	Batch	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	+	-	=	ND	
	Batch	3000 mg/l	fourrage : concentré (50 : 50)	-	+	-	ND	ND	
Batch	5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	=	-	ND	ND		
Huile de gingembre	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	=	=	ND	ND	
	Batch	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	=	=	ND	ND	
	Batch	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	=	=	ND	ND	
	Batch	5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	=	=	ND	ND	
Limonene	Batch	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	=	=	ND	ND	
	Batch	5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
Origan	Culture continue	0.22 mg/l	ration complète mélangée	=	=	=	ND	ND	
	Batch	0.3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	=	-	=	ND	ND	
	Batch	3 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	=	ND	ND	
	Batch	30 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	-	=	ND	ND	
	Batch	300 mg/l	fourrage : concentré (10 : 90)	-	ND	-	ND	ND	
Menthe poivrée	<i>In vivo</i> (bovins)	200 g/j	Foin de fléole des prés et concentré	-	-	=	=	ND	
Huile d'arbre à thé	Culture continue	2.2 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
Huile de thym	Daisy (ANKOM)	1.35 mg/l	fourrage : concentré (30 : 70)	ND	-	-	-	ND	
	Batch	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Culture continue	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Batch	50 mg/l	fourrage	ND	=	ND	ND	=	
	Batch	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND	
	Culture continue	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	=	ND	
	Batch	100 mg/l	fourrage	ND	=	ND	ND	=	
	Batch	200 mg/l	fourrage	ND	=	ND	ND	=	
	Batch	400 mg/l	fourrage	ND	-	ND	ND	-	
	Batch	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	-	-	ND	ND	
	Culture continue	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	+	-	-	ND	
	Batch	5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	+	-	ND	ND	
	Vanilline	Batch	5 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND
		Batch	50 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND
		Batch	500 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	=	=	=	ND	ND
Batch		5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	+	-	ND	ND	
Batch		5000 mg/l	fourrage : concentré (60 : 40)	-	+	-	ND	ND	

Tableau 10 : Effets d'huiles essentielles sur les fermentations ruminales. Effets sur les fermentations ruminales par rapport au témoin ($P < 0.05$) : augmentation (+), diminution (-), pas d'effet (=) et non déterminé (ND) (Hart et al., 2008).

De manière générale, les huiles essentielles ont peu d'effet à faibles doses. En revanche, pour la plupart des huiles, leur ingestion dans des concentrations importantes entraîne généralement une diminution de la concentration en ammoniacque et en AGV totaux dans le rumen. Ces effets sont très probablement dus aux propriétés bactéricides de ces substrats. D'ailleurs, des mélanges d'huiles essentielles sont proposés pour améliorer les performances des animaux tel que le produit CRINA que l'on peut retrouver dans ce tableau (DSM, 2019). Les composés organosulfurés à base d'ail sous ses différentes formes (huile essentielle d'ail, l'huile d'ail, l'ail en poudre et les extrait d'ail) ont des effets variables sur les fermentations ruminales. A ce jour, les effets de ces composés ne sont pas complètement compris et dépendent de la forme apportée, de la quantité et de l'association ou non avec d'autres huiles essentielles. Ils effectueraient une pression de sélection sur les populations microbiennes (Hart et al., 2008). Les effets des composés organosulfurés sur la production de méthane et la dégradation de la matière sèche ne sont que très rarement observés.

Une autre catégorie de substances est reconnue pour avoir des effets sur les fermentations. Il s'agit des saponines qui sont présentes notamment chez des plantes. En solution aqueuse, l'agitation d'un liquide contenant des saponines entraîne la formation de mousse car le produit a des propriétés émulsionnantes. Les saponines sont également connues pour leur propriété hémolytique. Elles affectent la perméabilité des membranes. Le tableau 11 reprend l'effet de quelques plantes à saponine sur les caractéristiques des fermentations ruminales (Hart et al., 2008).

Plante	Système de test	Dosage	Substrat					
				Protocéaires	Ammoniaque	Propionate	AGV totaux	Méthane
Camellia sinensis	<i>In vitro</i>	4-12 g/kg de MS	Farine de maïs et de foin (20:60)	-	-	+	+	ND
Enterolobium cyclocarpum	<i>In vitro</i>	100 g/kg	Foin et paille d'orge (84 : 16)	+	=	-	=	+
	<i>In vitro</i>	10-100 g/kg de MS	Luzerne	-	ND	ND	ND	ND
	<i>In vitro</i>	10 mg/kg	Sans substrat	-	ND	ND	ND	ND
	<i>In vitro</i>	0.5-10 g/l	Sans substrat	-	=	=	=	ND
	<i>In vivo</i> (bovins)	200 g/j	Pennisetum clandestinum	-	=	ND	ND	ND
	<i>In vivo</i> (buffles)	375 g/j	Herbes indigènes	-	ND	ND	ND	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	25-75 g/j	Ration complète mélangée	=	ND	ND	ND	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	100, 300 g/j	Foin de pennisetum	+	=	ND	ND	ND
Feuilles d'enterolobium timbouva	<i>In vitro</i>	10-100 g/kg de MS	Luzerne	-	ND	ND	ND	ND
	Culture continue	5-40 g/kg de MS	Cellulose/amidon	ND	ND	+	-	ND
Medicago sativa	<i>In vivo</i> (ovins)	20-40 g/kg de MS	Ration complète mélangée	-	-	=	-	ND
	<i>In vitro</i>	10 mg/l	Sans substrat	-	ND	ND	ND	ND
Fruits de Phytolacca dodecandra	<i>In vitro</i>	10 mg/l	Sans substrat	-	ND	ND	ND	ND
Fruits de pithecellobium saman	<i>In vitro</i>	100 mg/g	Foin et paille d'orge (84 : 16)	+	+	-	=	=
Quillaja saponaria	<i>In vitro</i>	1.2 g/l	Foin ou foi/concentré	-	-	=	ND	ND
	<i>In vitro</i>	1-4 g/kg de MS	Caséine	-	+	=	=	ND
Feuilles de samanea saman	<i>In vitro</i>	10 mg/l	Sans substrat	-	ND	ND	ND	ND
Extrait de sapindus rarak	<i>In vitro</i>	0.25-4 g/l	Foin : son de blé (70 : 30)	-	-	ND	+	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	0.07 % du poids vif	Pennisetum : concentré (80 : 20)	-	-	ND	ND	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	0-12 g/j	Pennisetum : son de blé (70 : 30)	-	-	+	=	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	0.2-0.7 g/kg de poids vif	dessus de canne à sucre : blé (75 : 25)	-	ND	ND	ND	ND
Péricarpe de sapindus saponaria	<i>In vivo</i> (ovins)	25-50 g/j	Ration complète mélangée	-	-	+	ND	ND
Fruit de saponaria saponaria	<i>In vitro</i>	100 g/kg	Foin et paille d'orge (84 : 16)	-	=	+	=	-
	RUSITEC	80 g/kg	Brachidiara	-	=	+	=	-
	<i>In vivo</i> (ovins)	8 g/kg de poids métabolique	Foin	+	=	+	=	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	5 g/kg de poids métabolique	Paille	-	=	=	=	-
Feuilles de sesbania spachycarpa	<i>In vitro</i>	100-600 g/kg	Paille d'orge	-	ND	ND	+	ND
Feuilles de sesbanis sesban	<i>In vitro</i>	10-100 mg/l	Luzerne	=	ND	ND	ND	ND
	<i>In vitro</i>	6 et 24 g/l	Paille de blé	-	ND	ND	-	ND
Yucca schidigera	<i>In vivo</i> (ovins)	200 g/j	Foin de sululta : son de blé (70 : 30)	=	+	+	+	ND
	<i>In vitro</i>	1 et 10 g/l	Sans substrat	-	-	ND	ND	ND
	RUSITEC	1-100 mg/kg	Ensilage d'herbe : foin (30 : 70)	=	=	=	=	ND
	<i>In vitro</i>	200 mg/l	Foin	ND	=	=	=	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	5-30 g/j	Ration complète mélangée	-	ND	ND	ND	ND
	<i>In vivo</i> (bovins)	125 mg/kg	Ration complète mélangée	ND	=	=	=	ND
	RUSITEC	0.5 g/l	Foin de luzerne : concentré (60 : 40)	-	-	=	=	=
	<i>In vitro</i>	1.2 g/l	Foin	-	-	ND	ND	ND
	<i>In vitro</i>	10g/l	Orge ou foin de luzerne	ND	-	-	+	ND
	<i>In vivo</i> (bovins)	20-60 g/j	Foin de luzerne : orge (39 : 61)	-	=	+	=	ND
<i>In vitro</i>	1-4 g/l	Caséine	=	-	=	=	ND	
Sarsaponine	<i>In vitro</i>	1.2-3.2 g/l	Amidon de pomme de terre	-	-	+	+	-
	<i>In vitro</i>	1.2-3.2 g/l	Amidon de maïs	-	-	+	+	-
	<i>In vitro</i>	1.2-3.2 g/l	Foin : concentré (60 : 40)	-	-	+	+	-
	<i>In vivo</i> (bovins)	77 mg/kg de MS	Concentré : sorgho (55 : 45)	ND	=	=	=	ND
	<i>In vivo</i> (ovins)	0.1-1 g/kg de MS	Foin : orge (50 : 50)	=	-	=	=	ND

Tableau 11 : Effets des plantes à saponine sur les fermentations ruminales. Effets sur les fermentations ruminales par rapport au témoin ($P < 0.05$) : augmentation (+), diminution (-), pas d'effet (=) et non déterminé (ND) (Hart et al., 2008).

Les effets des plantes à saponine sur les fermentations ruminales sont variables en fonction des plantes et des doses utilisées. En revanche, nous constatons son effet toxique pour les protozoaires, ce qui est très souvent illustré dans les exemples du tableau ci-dessus. Dans la plupart des cas, nous observons une diminution de l'ammoniaque. En revanche les effets sur la production de propionate et d'AGV totaux dépendent des plantes testées.

Dans l'ensemble, la modification des fermentations par un substrat est souvent contradictoire entre différentes études. Ceci est principalement lié au substrat utilisé dans chaque étude (variabilité) et à la ration distribuée aux animaux (Hart et al., 2008).

3.4.3 Variabilité en lien avec le phénotype

La présence d'une partie commune à tous les microbiotes, le « core microbiome », implique par opposition une partie variable. Après avoir présenté des exemples d'effets de l'alimentation sur la composition de la communauté microbienne ruminale, nous allons maintenant voir l'effet des caractéristiques de l'animal hôte. Nous allons présenter dans cette partie, l'effet de la race de l'animal à partir de différentes études en bovins, ovins et caprins.

Shi et al. (2008) ont étudiées les différences entre les races sur 9 chèvres. Parmi ces animaux, tous âgés de 3 ans, il y avait 3 chèvres à cachemire de Mongolie intérieure, 3 chèvres jaunes Nanjiang et 3 chèvres Boer. Les analyses de la communauté microbienne ont été réalisées par PCR DGGE. Les empreintes obtenues par électrophorèse sur gel en gradient dénaturant indiquent une importante variabilité individuelle. Le dendrogramme (figure 7) reprend les proximités entre individus (Shi et al., 2008).

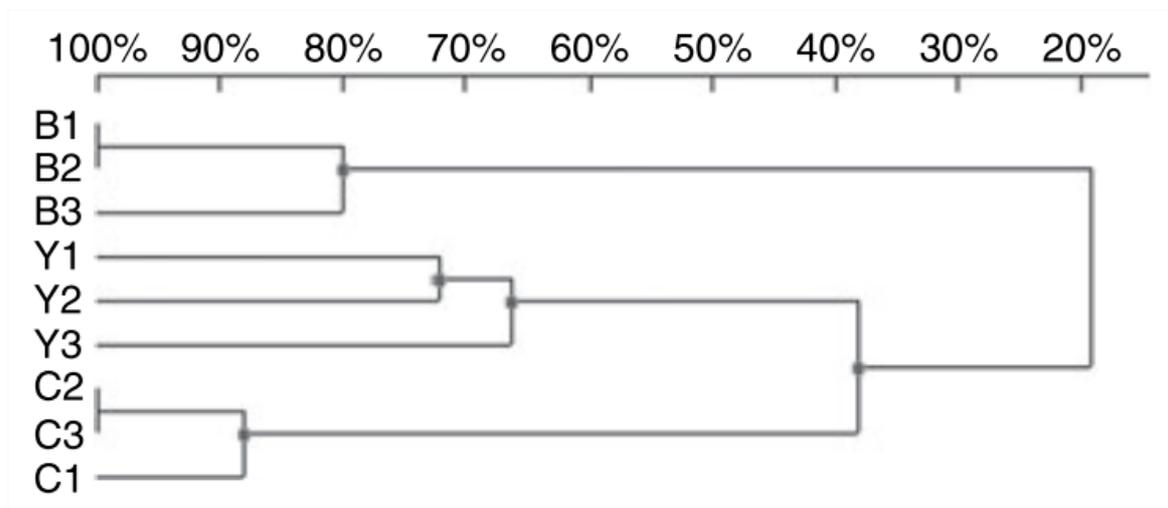


Figure 7 : Algorithme de groupement des paires non pondérées avec le dendrogramme des moyennes arithmétiques représentant l'analyse de classement hiérarchique des profils d'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant. B indique la race de chèvre Boer, Y indique la race de chèvre jaune Nanjiang et C indique la race de chèvre à cachemire de Mongolie intérieure (Shi et al., 2008).

Sur ce graphique, nous remarquons que les animaux ont été regroupés par race de chèvre. Les caractéristiques phénotypiques des chèvres, à travers la race, constitue une explication d'une partie de la variabilité des microbiotes observés entre les individus.

L'effet de la race des animaux a également été étudié chez les ovins (Douglas et al., 2016). Huit brebis de l'année ont été utilisées, 4 Beulah Speckled-Faced et 4 Suffolks. Les Beulah sont plus petites que les Suffolks avec un poids moyen de 38,2 kg et 52,8 kg respectivement. Ces animaux étaient logés en cases individuelles sur de la sciure et

consommait une ration d'entretien à base de granulés d'herbe. Ces animaux ont été nourris avec cette ration pendant 9 semaines avant d'être euthanasiés. Des prélèvements de contenus digestifs ont été réalisés sur 11 régions du tractus digestif (rumen, reticulum, omasum, abomasum, duodenum, jejunum, ileum, caecum, dans la partie large du colon, dans la partie étroite du colon et dans le rectum). Les communautés microbiennes ont été analysées à l'aide d'analyses PCR et TRFLP. Le tableau 12 synthétise les différences de composition des microbiotes le long du tube digestif (Douglas et al., 2016). Ce tableau ne souligne pas un effet de la race des animaux mais apporte une information importante sur la diversité entre les différents compartiments du tractus digestif.

	Rumen	Reticulum	Omasum	Abomasum	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Gros intestin (partie large)	Gros intestin (partie étroite)
Rumen										
Reticulum	0,031 ^{NS}									
Omasum	0,0129 ^{NS}	0,43 ^{NS}								
Abomasum	0,0001	0,0001	0,0002							
Duodenum	0,002	0,0002	0,0002	0,0004						
Jejunum	0,0002	0,0001	0,0002	0,0006	0,09 ^{NS}					
Ileum	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,002				
Caecum	0,0001	0,0002	0,0004	0,0001	0,0002	0,0001	0,0002			
Gros intestin (partie large)	0,0001	0,0001	0,0002	0,0001	0,0002	0,0002	0,0001	0,958 ^{NS}		
Gros intestin (partie étroite)	0,0001	0,0001	0,0003	0,0001	0,0004	0,0002	0,0001	0,969 ^{NS}	0,989 ^{NS}	
Rectum	0,0001	0,0003	0,001	0,0004	0,0003	0,0003	0,0007	0,876 ^{NS}	0,911 ^{NS}	0,991 ^{NS}

Tableau 12 : Comparaisons 2 à 2 des communautés microbiennes des différents organes. La mention NS en exposant indique les comparaisons dont la p-value est supérieure au seuil de 5 % (Douglas et al., 2016).

Le long du tractus digestif chez les brebis, les 3 pré-estomacs (rumen, reticulum et omasum) ont des communautés microbiennes qui ne sont pas significativement différentes. C'est également le cas entre le jejunum et le duodenum ainsi que pour la partie distale du tractus digestif (caecum, dans la partie large du colon, dans la partie étroite du colon et dans le rectum). Les comparaisons entre tous les autres organes sont significativement différentes indiquant de grandes différences entre la partie proximale et la partie distale du tractus digestif. En plus de ces différences au sein des animaux, une analyse PERMANOVA des données TRFLP a montré une différence significative des structures des communautés bactériennes entre les 2 races de brebis ($P=0,02$) et à l'intérieur des différentes régions du tractus digestif ($P = 0,0001$) (Douglas et al., 2016). Après les caprins, nous retrouvons ici à travers cette étude en ovin des différences de composition des microbiotes entre races.

Après les caprins et les ovins, l'effet de la race de l'animal hôte sur la composition de son microbiote ruminal a été étudié chez les bovins. Hernandez-Sanabria et al. (2013) ont utilisé 49 jeunes bovins mâles en croissance âgés de 10 mois et avec 3 origines paternelles différentes. Cinq avaient des pères Angus, 19 des pères Charolais et 25 provenaient de pères croisés (Angus x Charolais). Les animaux situés aux extrémités de la distribution gaussienne du critère de consommation alimentaire résiduelle (le RFI qui est la différence entre la prédiction de consommation alimentaire de la matière sèche ingérée et la consommation réelle) calculée sur 2 rations différentes ont été sélectionnés pour la suite de l'expérimentation. Ces animaux ont d'abord été alimentés avec une ration à faible densité énergétique (74 % d'avoine, 20 % de foin, 6 % de compléments (32 % de protéines brutes, 400mg/kg de Rumensin et 1.5 % d'huile de canola)) pendant 90 jours. Ils ont ensuite réalisé une semaine d'adaptation pour passer de l'aliment à faible à celui à haute densité énergétique

(28,3 % d'avoine, 56,7 % d'orge, 10 % de bouchons de luzerne déshydratés et 5 % du même complément alimentaire). Les animaux ont été alimentés avec cette 2^{ème} ration pendant 90 jours également. Les contenus ruminiaux ont été prélevés à la fin de chacune des 2 périodes. Les analyses des communautés microbiennes ont été réalisées à l'aide de PCR-DGGE et de PCR quantitatives en temps réel. Avec la ration à faible densité énergétique, 24 phylotypes bactériens sont significativement différents entre les races et avec la ration à plus forte densité énergétique 37 phylotypes bactériens sont significativement différents. Concernant les phylotypes appartenant aux archées, 7 sont significativement différents entre les races avec chacun des régimes. Pour mieux comprendre ces différences de composition du microbiote ruminal entre animaux ayant des pères de races différentes, des indicateurs du métabolisme ont été mesurés et sont présentés dans le tableau 13 (Hernandez-Sanabria et al., 2013).

Variable	Race			P-value
	Angus (n=5)	Charolais (n = 19)	Croisé (n = 25)	
Acétate (%)	57,3 ± 2,23	54,81 ± 1,15	53,96 ± 0,99	0,39
Propionate (%)	28,10 ± 2,59	32,89 ± 1,33	33,32 ± 1,16	0,18
Isobutyrate (%)	0,98 ± 0,11	0,82 ± 0,06	0,91 ± 0,05	0,3
Isovalerate (%)	2,99 ± 0,39	2,02 ± 0,20	2,09 ± 0,17	0,09
Acétate / Propionate	2,18 ± 0,26	1,71 ± 0,13	1,73 ± 0,12	0,27
Ammoniaque (mM)	0,16 ± 0,002	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,01
Matière sèche ingérée (kg MS)	7,38 ± 0,43	7,51 ± 0,22	7,97 ± 0,19	0,18
Indice de consommation	5,76 ± 0,39	6,22 ± 0,20	6,68 ± 0,17	0,06
Consommation alimentaire résiduelle (RFI)	-0,28 ± 0,31	-0,06 ± 0,16	0,24 ± 0,14	0,19

Tableau 13 : Indicateurs phénotypiques des différences métaboliques et mesures du métabolisme ruminal chez des jeunes bovins mâles en croissance de race différente avec un régime à faible densité énergétique. Les valeurs des AGV sont données en fonction de la concentration totale en AGV (Hernandez-Sanabria et al., 2013).

Des différences significatives importantes concernant la concentration en ammoniaque du rumen ont été observées. Pour les autres critères, des différences numériques sont à noter concernant les indicateurs phénotypiques (Hernandez-Sanabria et al., 2013). Les mesures du métabolisme ruminal sont des résultantes de l'activité de la communauté microbienne ruminale alors que les 3 indicateurs phénotypiques mesurés dans cette expérimentation (MSI (Matière Sèche Ingérée), IC (Indice de Consommation) et RFI) sont plutôt des caractéristiques de l'animal. Ici, chez les bovins en croissance, l'effet de la race sur la structure de la communauté microbienne a également été mis en évidence et quelques pistes d'indicateurs phénotypiques pouvant expliquer en partie cette variabilité inter-race observée ont pu être avancés.

Seize génisses gestantes d'environ 2 ans dont 8 Holstein frisonnes et 8 Blancs bleus belges ont été utilisées pour comparer les émissions de méthane de ces 2 races mises dans un même environnement avec la même alimentation (de Mulder et al., 2018). Les communautés de bactéries et d'archées ruminales ont été étudiées pour être mise en relation avec la race et la production de méthane. L'aliment est composé de 22,8 g/kg de matière grasse, 434 g/kg de NDF, 149 g/kg d'amidon, de 148 g/kg de protéines de 5,7 MJ/kg d'énergie nette et de 69 g de protéines digestibles dans l'intestin. Les contenus ruminiaux ont été échantillonnés 2 fois à 6 jours d'intervalle et ils ont été analysés à l'aide des technologies Illumina et de PCR quantitatives. Le tableau 14 reprend les caractéristiques journalières pour les 2 races (de Mulder et al., 2018).

		Race		P-value
		Blanc bleu belge	Holstein frisonne	
MSI (kg/j)	Totale	8,10 ± 0,67	10,43 ± 0,77	< 0,001
	fourrage	7,35 ± 0,66	9,57 ± 0,79	< 0,001
	concentré	0,74 ± 0,11	0,86 ± 0,04	< 0,05
Protéines digestibles dans l'intestin		565 ± 43	716 ± 43	< 0,001
Energie nette (MJ/j)		46,0 ± 3,7	59,2 ± 4,3	< 0,001
Efficacité alimentaire brute (kg/kg)		0,115 ± 0,029	0,116 ± 0,017	NS
CH ₄ (g/j)		223 ± 16	264 ± 12	< 0,001
CH ₄ /CO ₂ (moles/moles)		0,080 ± 0,006	0,091 ± 0,003	< 0,001

Tableau 14 : Caractéristiques d'ingestion d'aliment et de production de gaz ruminal issu des fermentations chez des génisses Blanc bleu belge et de des génisses Holstein frisonne en gestation (de Mulder et al., 2018).

Les 2 races de génisses diffèrent significativement sur l'ensemble des caractéristiques présentées dans le tableau sauf pour le critère d'efficacité alimentaire brute. La structure de la communauté bactérienne n'est pas différente en terme de richesse entre les deux races (2353 ± 142 OTU pour les Holstein frisonne et 2352 ± 126 OTU pour les Blancs bleus belges). Entre les 2 races, un « core microbiome » composé de 897 OTU a été observé. Toutefois une différence significative entre les races (P = 0.001) a été mise en évidence par un test de permutation sur une analyse PERMANOVA sur les indices de similarité de Bray-Curtis. L'analyse des différences d'abondance entre les 2 races a permis d'identifier 283 OTU, ce qui représente 11,2 % des OTU. Ces OTU appartiennent à 38 familles parmi lesquelles *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Spirochaetaceae*, *BS11 gut group*, *S24-7 (Bacteroidales)* et *RC9 gut group (Rikenellaceae)*. Les Blancs bleus belges ont des abondances relatives supérieures pour les OTU appartenant à *Coriobacteriaceae*, *Porphyromonas*, *Bergeyella*, *Candidata division TM7*, *Thalassospira*, *Mannheimia* et *Actinobacter* alors que les Holstein frisonnes ont des abondances relatives supérieures pour les OTU appartenant à *RF16 (Bacteroidales)*, *Fibrobacter*, *vadinBB60 (Clostridiales)*, *Veillonellaceae*, *Lentisphaerae*, *Planctomycetaceae* et *Succinivibrionaceae*. Concernant la structure de la communauté des archées, la richesse ne diffère pas entre les 2 races (17,0 ± 1,0 OTU pour les Blancs bleus belges et 16,7 ± 1,0 OTU pour les Holstein frisonnes). Les abondances de ces différents OTU ne diffèrent pas significativement entre les 2 races (de Mulder et al., 2018). Les phénotypes caractérisés dans cette expérimentation sont différents entre les races de génisses. La communauté bactérienne de ces 2 races diffère également sur un grand nombre de d'OTU. On peut se demander si ces différences sont liées entre elles.

Gonzalez-Recio et al. (2017) ont réalisé essai nutritionnel sur vaches laitières à partir de 10 Holstein et 8 Brown Swiss. Dans cette expérience, la moitié des effectifs de chaque race a été alimenté avec une ration contenant un concentré différent. Les auteurs se sont intéressés à l'effet du génotype de ces animaux sur la composition de leur microbiote ruminal. L'échantillonnage des contenus ruminiaux a été effectué 4 fois sur une plage de 48 h afin de couvrir le cycle circadien. Les échantillons ont été analysés grâce aux technologies Illumina. Le génotype des animaux a été analysé à l'aide de puce Illumina 9K. La figure 8 reprend la composition du microbiote chez ces 2 races (Gonzalez-Recio et al., 2017).

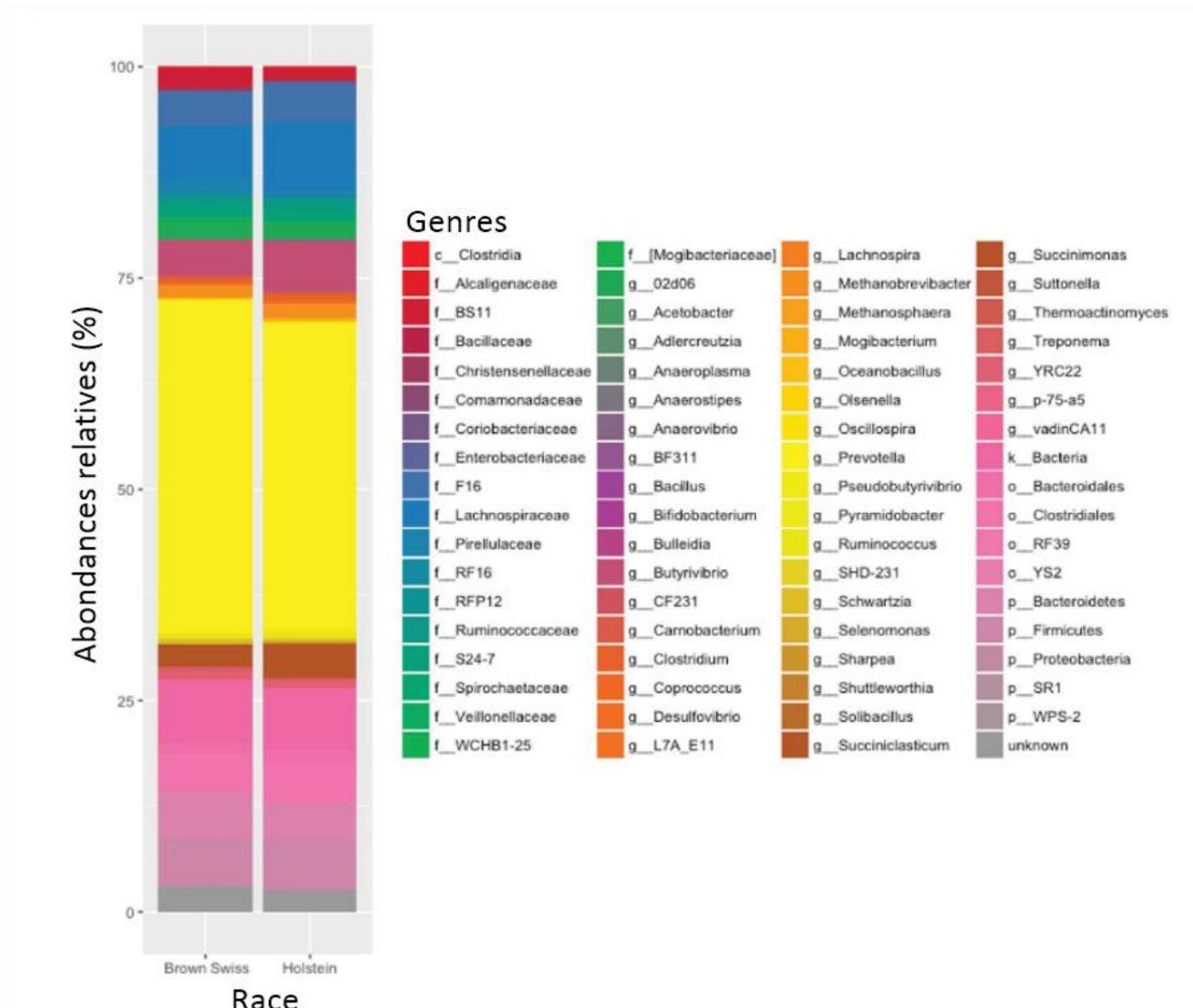


Figure 8 : Composition des microbiotes ruminaux en bactéries et en archées en fonction de la race des vaches (Holstein ou Brown Swiss). Abondances relatives des bactéries et archées ayant une abondance supérieure à 0.1 % dans les 2 races (Gonzalez-Recio et al., 2017).

Des différences d'abondances relatives entre les 2 races peuvent être observées directement dans la figure 8. L'association avec le génotype de l'animal basée sur les composantes principales d'une matrice de relation génomiques utilisant des marqueurs de polymorphisme mononucléique a été analysée à l'aide de méthodes bayésiennes. Cinquante pourcent des genres de bactéries et d'archées étaient associés au génotype de l'animal y compris *Butyrvibrio*, *Prevotella*, *Paraprevotella* et *Methanobrevibacter* en tant que genres principaux (Gonzalez-Recio et al., 2017). La relation entre la race et la composition du microbiote est retrouvée ici en utilisant des informations plus précises de l'hôte : son génotype. En effet, ce lien entre la race et la composition du microbiote passe par une expression du génome qui se traduit par des caractéristiques des phénotypes influençant le microbiote ruminal. Mais quels sont ces critères ?

Il a été constaté à plusieurs reprises dans cette partie et sur différentes espèces que des animaux de différentes races au sein d'une même espèce ont des différences de structure dans leur communauté microbienne ruminale. Ce lien entre génotype et microbiote a été mis

en évidence grâce à une étude sur des vaches laitières. Derrière l'effet de la race, des différences au sein des phénotypes et du métabolisme ruminal ont été mis en avant. Gleason & White (2018) ont analysé par méta-analyse si la composition du microbiote ruminal pouvait être utilisée comme un prédicteur des performances chez les vaches en lactation et les bovins en croissance. Les performances à expliquer étaient la production laitière, le gain moyen quotidien (GMQ), la matière sèche ingérée, l'efficacité alimentaire de lactation et l'efficacité alimentaire de croissance. Les variables explicatives étaient la composition de la ration D (MS, matière organique, NDF, ADF (Acid Detergent Fiber), PB (Protéines Brutes), extrait d'éther, les glucides non fibreux, l'amidon, et le pourcentage de fourrage), le microbiote ruminal M (les 3 principaux phyla bactériens, la richesse spécifique et la diversité spécifique) et le facteur d'expérimentation E (race à viande ou race laitière, fraction de contenus prélevés ...). Les données utilisées ont été extraites de 51 publications. Il en résulte que le modèle utilisant D + M + E prédit mieux la production laitière que les autres modèles ne prenant pas en compte ces 3 variables simultanément. Le GMQ est mieux prédit en utilisant seulement D. Le modèle M + E est plus intéressant que le modèle D pour prédire la MSI et l'efficacité alimentaire de lactation. Enfin, l'efficacité alimentaire de croissance ne peut être prédite que par le modèle D. La race a été identifiée comme étant un meilleur prédicteur de l'abondance relative des phyla que l'alimentation. Inversement, la richesse et la diversité spécifique ne sont pas influencées par la race mais seulement par l'alimentation (Gleason and White, 2018). Les performances pouvant être considérées comme des caractéristiques des phénotypes des animaux, des liens entre le microbiote ruminal et ce dernier sont là encore mis en avant. Le niveau taxonomique étudié (phylum) ne permet pas de faire de liens directs entre l'animal hôte et sa communauté microbienne. En revanche, l'ensemble de ces résultats sont à approfondir avec de nouvelles expérimentations pour connaître le rôle plus détaillé de l'animal sur la composition de son microbiote ruminal. Dernière l'effet race, le rôle du phénotype doit être décrit beaucoup plus précisément pour identifier les variables à effet majeurs.

3.4.4 Variabilité individuelle persistante

Après avoir présenté la partie commune des microbiotes ruminants et les principaux facteurs de variation, nous allons maintenant nous intéresser à la variabilité individuelle persistante en présentant quelques études ayant traité de ce sujet.

P. J. Weimer, Waghorn, Odt, & Mertens (1999) ont utilisé 4 vaches Holstein canulées au rumen dans un essai alimentaire en carré latin. Le premier facteur était la source de matière première utilisée : ensilage de luzerne (EL) ou ensilage de maïs (EM). Le 2^{ème} facteur était le pourcentage de NDF dans la ration : 24 % ou 32 %. Les 3 espèces bactériennes fibrolytiques analysées dans cet essai étaient *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* et *R. albus*. La concentration de ces 3 bactéries en fonction des différents facteurs est présentée dans le tableau 15 (Weimer et al., 1999).

	Ration				Fourrage		NDF		Vache				Erreur type regroupée
	EL24	EL32	EM24	EM32	EL	EM	24%	32%	749	2661	3691	3807	
Ruminococcus albus	1.19 ^a	1.37 ^a	0.63 ^a	1.33 ^a	1.28 ^a	0.98 ^a	0.91 ^a	1.35 ^a	0.59 ^a	1.49 ^a	0.94 ^a	1.59 ^a	0.64
Ruminococcus flavefaciens	0.19 ^a	0.16 ^a	0.10 ^a	0.20 ^a	0.18 ^a	0.15 ^a	0.15 ^a	0.18 ^a	0.06 ^b	0.32 ^a	0.07 ^b	0.21 ^{ab}	0.03
Fibrobacter succinogenes	0.20 ^a	0.19 ^a	0.18 ^a	0.32 ^a	0.20 ^a	0.25 ^a	0.19 ^a	0.26 ^a	0.19 ^a	0.21 ^a	0.09 ^a	0.40 ^a	0.19
Total	1.59 ^a	1.71 ^a	0.91 ^a	1.87 ^a	1.65 ^a	1.39 ^a	1.25 ^a	1.79 ^a	0.75 ^b	2.02 ^a ^b	1.08 ^{ab}	2.22 ^a	0.84

Tableau 15 : Valeur moyenne des pourcentages de 3 espèces bactériennes cellulolytiques dans les contenus ruminiaux collectés 3 heure après la distribution du repas sur 4 vaches nourries avec des aliments variant en teneurs en NDF et en sources de fourrage (EL : ensilage de luzerne et EM : ensilage de maïs). Les lettres a et b au sein d'un même groupe (ration, fourrage, NDF ou vache) indique des différences significatives quand celles-ci varient ($P < 0.05$) (Weimer et al., 1999).

La variabilité observée entre les 4 vaches est plus importante que la variabilité induite par le régime alimentaire. Ceci indique que les proportions de ces 3 bactéries fibrolytiques sont maintenues par l'animal hôte (Weimer et al., 1999). Malgré des changements de composition alimentaire dans cette étude l'individu est le principal facteur expliquant la variabilité observée.

L'étude de la variabilité individuelle a également été réalisée sur 6 yaks au pâturage provenant de la même ferme située à environ 3500 m d'altitude dans la province de Sichuan en Chine (Guo et al., 2015). Pour le prélèvement des contenus ruminiaux, les animaux ont été abattus. Les analyses de la communauté microbienne ruminale ont été réalisées à l'aide des technologies Illumina. Au total 7200 OTU ont été identifiés dans 23 *phyla* dont les 6 plus importants étaient *Firmicutes* avec 45,9 %, *Bacteroidetes* avec 39,68 %, *Proteobacteria* avec 4,85 %, *Spirochaetes* avec 2,47 %, *Tenericutes* avec 1,93 % et *Verrucomicrobia* avec 1,47 %. Le « core microbiome » de ces animaux est composé de 35 genres appartenant principalement à *Bacteroidetes* et *Firmicutes*. La variabilité entre les 6 yaks au niveau taxonomique des familles est présenté dans la figure 9 (Guo et al., 2015).

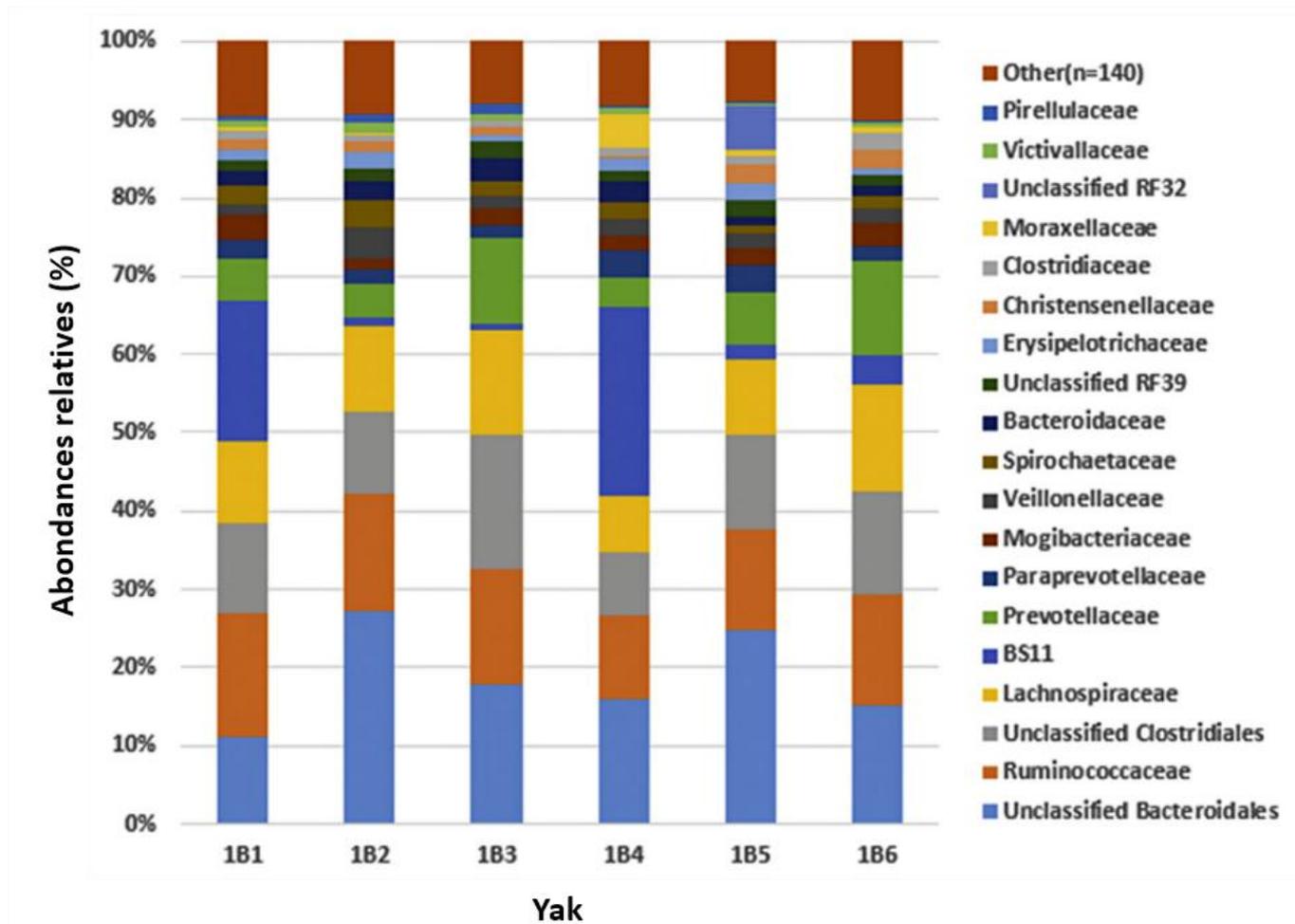


Figure 9 : Abondances relatives au niveau des familles de la composition de contenu ruminaux chez 6 yaks (Guo et al., 2015).

Sur cette figure nous constatons un très importante variabilité entre les yaks malgré un environnement et une alimentation commune (Guo et al., 2015).

Zeng et al. (2017) ont réalisé une expérimentation sur 5 ovins mâles de 2 ans nourris avec de l'ensilage de maïs. Ils ont étudié la variabilité des communautés microbiennes du tractus digestifs entre les différents compartiments (rumen, réticulum, omasum, abomasum, duodénum, jéjunum, iléon, caecum, colon et rectum) et entre les individus. Les prélèvements ont été réalisés, après abattage, le long du tractus digestif sur chacun des animaux. Les contenus ont été analysés à l'aide des technologies Illumina. Les auteurs ont trouvé des différences importantes de composition entre les différents compartiments digestifs mais les différences entre les 5 animaux au sein de chacun de ces compartiments ne sont pas ressorties significatives ($P > 0,05$) (Zeng et al., 2017).

Welkie, Stevenson, & Weimer (2010) ont étudié l'évolution des communautés microbiennes ruminales liées à la partie solide et à la partie liquide durant 4 cycles alimentaires de 12 heures sur 2 vaches Holstein en lactation. Les animaux ont reçu une ration composée de 32,5 % de NDF, 39,3 % de glucides non pariétaux et 17,4 % de protéines brutes (pourcentages en fonction de la matière sèche). Les prélèvements de contenus ruminaux ont été effectués à 2, 4, 6, 9 et 12 h après la distribution de la ration. Ces contenus ont été analysés grâce à la méthode ARISA. La consommation et la production laitière n'étaient pas différents entre les 2 vaches. Seuls l'urée, le lactose et le taux de protéines étaient significativement différents. Pour ce qui est des communautés microbiennes, le diagramme

de Venn (figure 10) synthétisent les différences observées entre les 2 vaches et les 2 phases (Welkie et al., 2010).

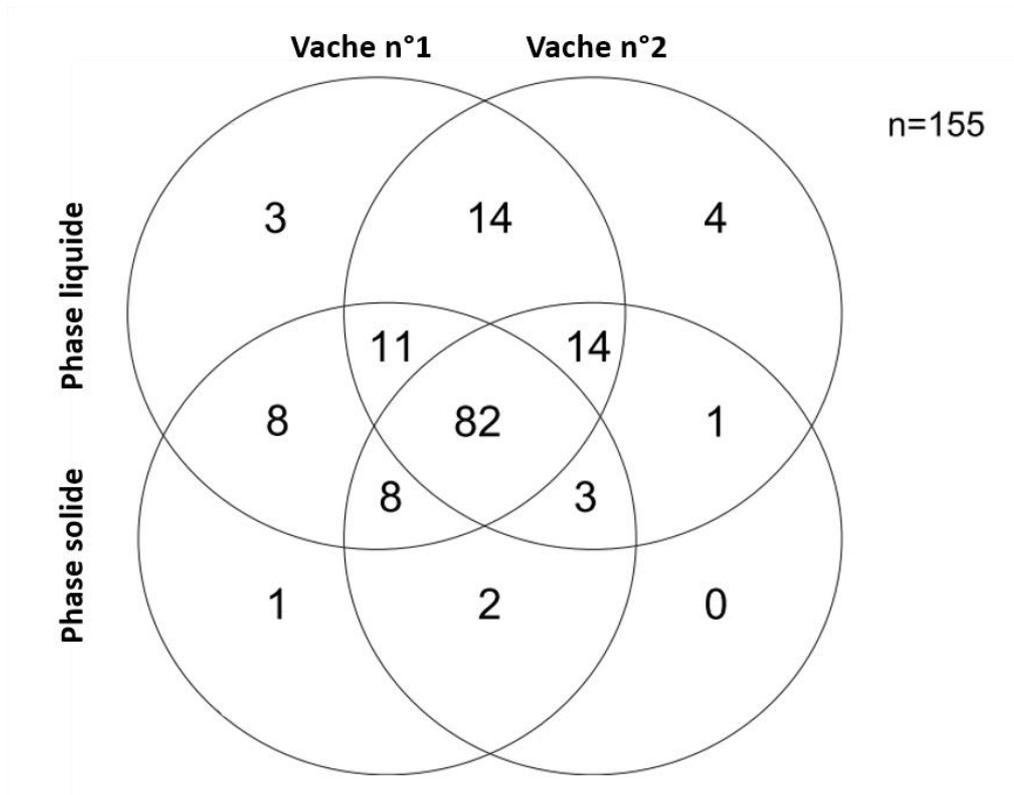


Figure 10 : Diagramme de Venn montrant la distribution des différentes tailles d'amplicons détectés par l'analyse ARISA dans les phases solides et liquides de la vache n°1 et n°2 (Welkie et al., 2010).

Ces données illustrent le fait que des animaux recevant la même alimentation peuvent avoir des différences importantes dans leur communauté microbienne ruminale. Le microbiote associé à la phase solide du rumen semble plus stable que celui associé à la phase liquide (Welkie et al., 2010).

Une étude de la similarité des communautés microbiennes ruminales a été réalisée sur 16 vaches des race Holstein (Jami and Mizrahi, 2012a). Ces animaux étaient nourris avec une ration à base de 70 % de concentrés et 30 % de fourrages contenant 17 % de NDF. Les prélèvements de contenus ruminiaux ont été réalisés 1 heure après la distribution de la ration. Ils ont été analysés par techniques ARISA et PCR quantitatives en temps réel. Au total 250 OTU ont été obtenus entre les 16 vaches. L'historgramme (figure 11) reprend les pourcentages d'OTU en fonction de leurs fréquences d'occurrence entre les vaches (Jami and Mizrahi, 2012a).

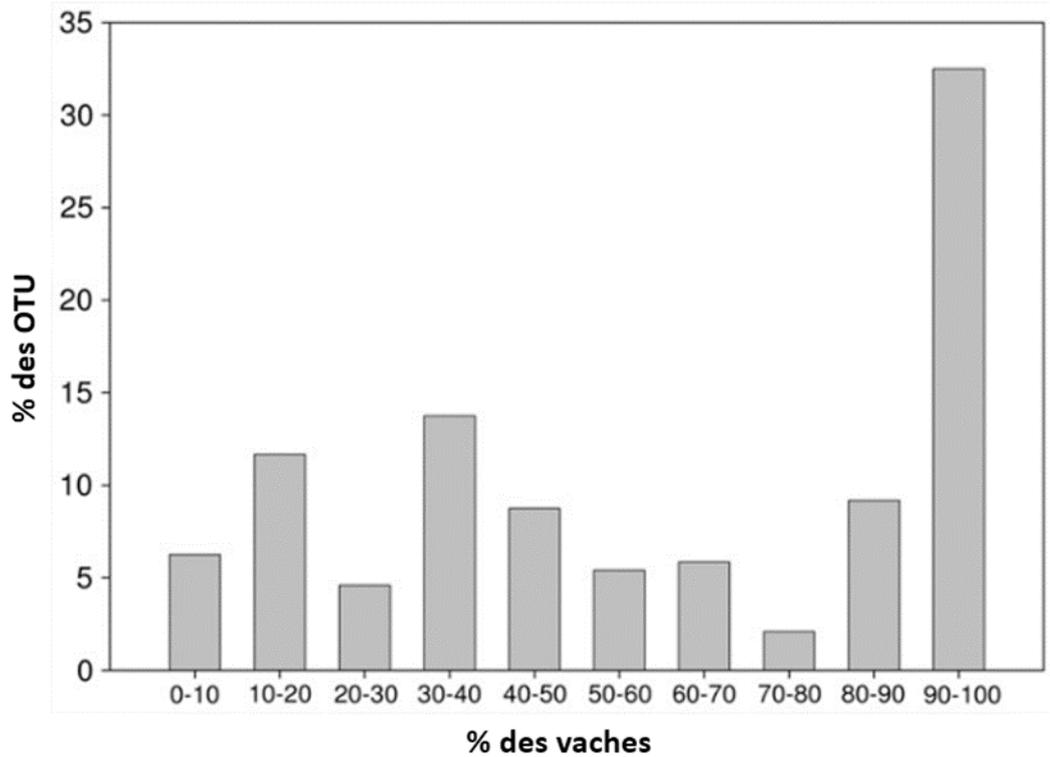


Figure 11: Occurrence des OTU entre les échantillons. Les différents OTU ont été additionnés au sein de catégorie en fonction de leurs fréquences d'occurrences entre les vaches. Le pourcentage de chaque catégorie a été calculé en fonction de la population totale des OTU. L'axe des abscisses représente le pourcentage de vaches partageant un OTU spécifique. L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'OTU dans chacune des catégories (Jami and Mizrahi, 2012a).

En terme de présence / absence, la fréquence de répartition des OTU est variable sur cet échantillon de 16 vaches. Seulement 19 % des OTU sont partagés par l'ensemble des animaux de l'échantillon. La figure 12 illustre la variabilité individuelle au niveau quantitatif de 13 bactéries représentant ici environ 3,4 % de l'ensemble de la communauté bactérienne ruminale (Jami and Mizrahi, 2012a).

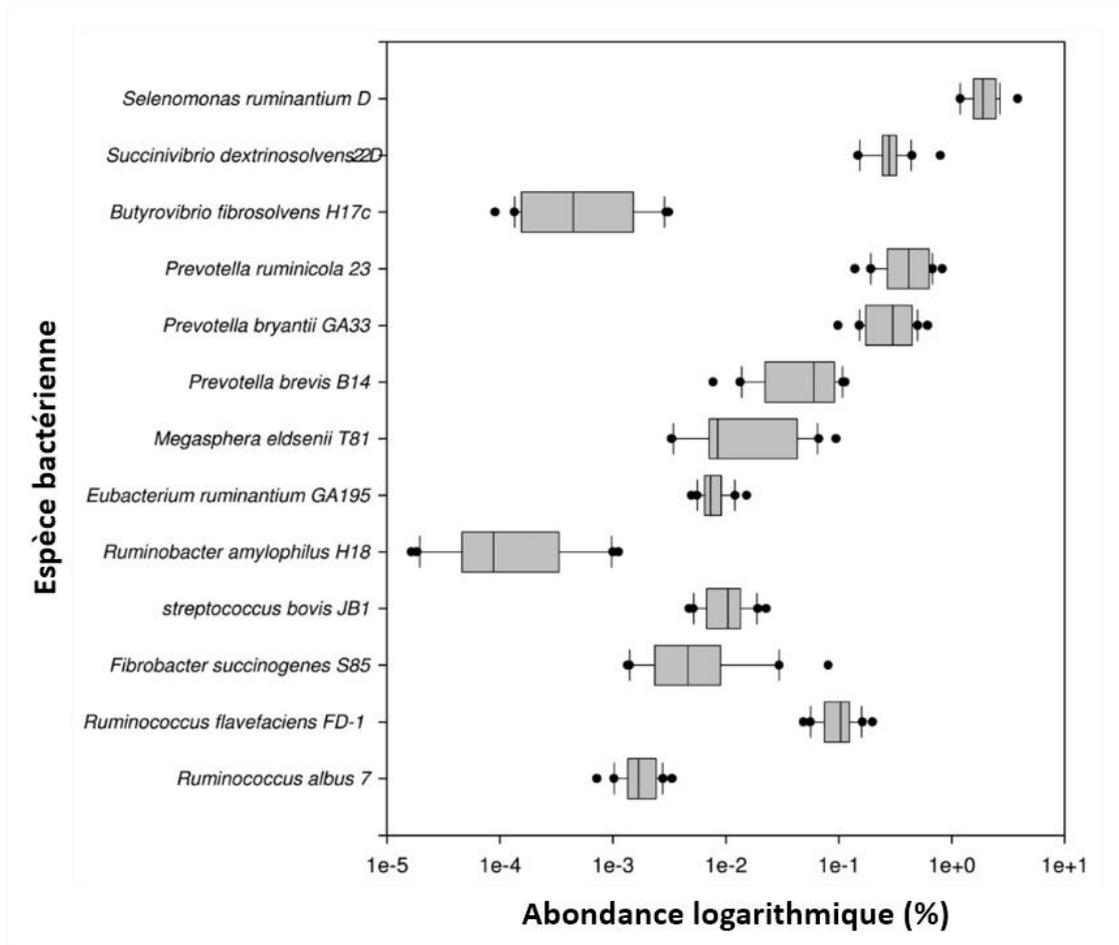


Figure 12: Abondances relatives de 13 espèces bactériennes obtenus par analyse PCR quantitative en temps réel en proportion de la population bactérienne totale (Jami and Mizrahi, 2012a).

Ces 13 bactéries ont des proportions soit très variables entre les individus, soit relativement proches. Par exemple, pour les 3 espèces bactériennes cellulolytiques, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* ont des proportions relativement stables alors que *Fibrobacter succinogenes* a une plage de variation beaucoup plus importante entre les différentes vaches (Jami and Mizrahi, 2012a). Ces auteurs ont réalisé une expérience en conditions similaires sur 16 vaches mais ajoutant l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel et la techniques de pyroséquençage 454 (Jami and Mizrahi, 2012b). La diversité qualitative est représentée au niveau des OTU par l'histogramme (figure 13).

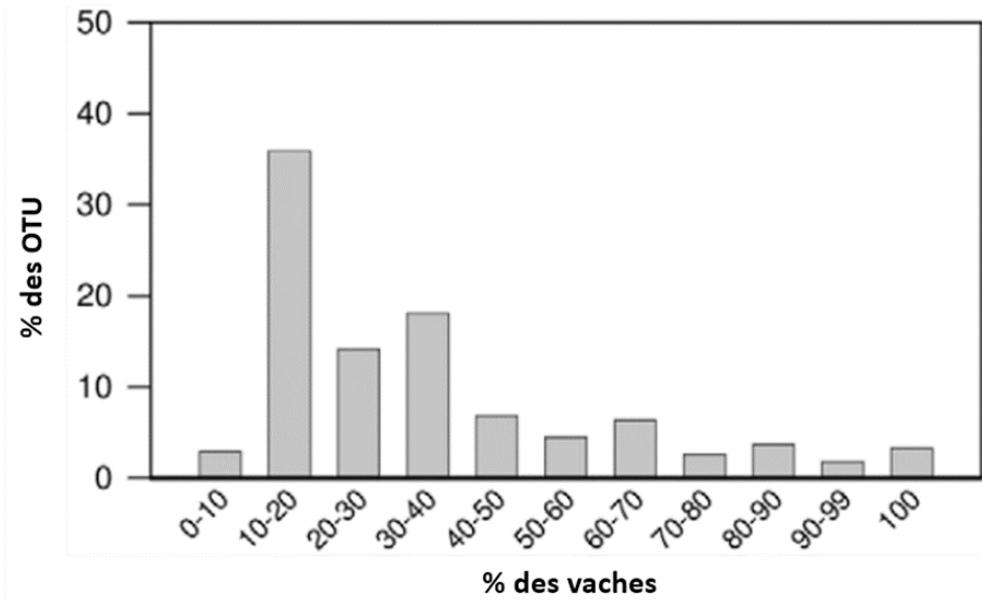


Figure 13: Occurrence des OTU entre les échantillons. Les différents OTU ont été additionnés au sein de chaque catégorie en fonction de leur fréquence d'occurrence entre les vaches. Le pourcentage de chaque catégorie a été calculé en fonction de la population totale des OTU. L'axe des abscisses représente le pourcentage de vaches partageant un OTU spécifique. L'axe des ordonnées représente le pourcentage d'OTU dans chacune des catégories (Jami and Mizrahi, 2012b).

Presque 50 % des OTU sont partagés par une petite portion des vaches étudiées. Seulement 4 % des OTU sont partagés par tous les animaux. Cette proportion comprend 32 genres représentant 157 OTU : le genre *Prevotella* (80 OTU), la famille *Lachnospiraceae* (14 OTU), le genre *Butyrivibrio* (16 OTU), etc. . La variabilité quantitative de ces genres est représentée sur la figure 14.

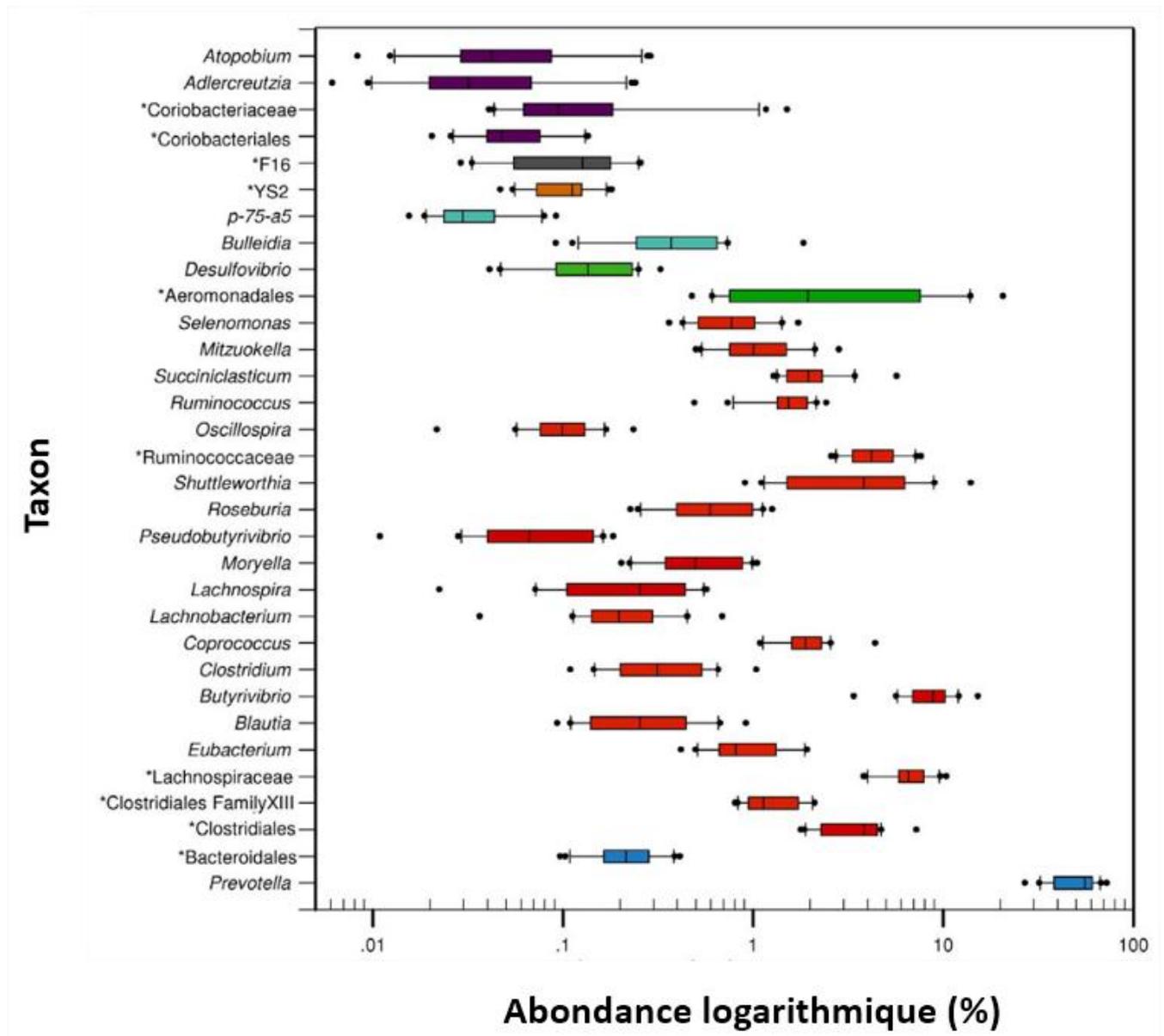


Figure 14 : Genres et abondances partagés entre les différents prélèvements. Les boîtes à moustaches indiquent les abondances relatives des genres bactériens partagés par l'ensemble des animaux de l'étude mesurées par qPCR. La couleur des boîtes à moustaches indique le phylum auquel appartient chaque genre (Bacteroidetes (bleu), Firmicutes (rouge), Proteobacteria (vert), Tenericutes (bleu clair), Cyanobacteria (orange), TM7 (gris) et Actinobacteria (violet)). Les taxons dont le genre est non-identifiés sont indiqués par une astérisque sur le dernier niveau taxonomique connu (Jami and Mizrahi, 2012b).

La plupart des genres varie beaucoup en abondance entre les différentes vaches (Jami and Mizrahi, 2012b). Dans ces 2 études (Jami & Mizrahi, 2012a et b), de la variabilité individuelle qualitative et quantitative a été mise en évidence dans 2 échantillons de 16 vaches Holstein provenant d'un même élevage, ce qui laisse supposer que dans un échantillon plus grand où les animaux viendraient de différents environnements nous pourrions retrouver cette variabilité individuelle.

La variabilité individuelle au niveau qualitatif (présence / absence) et au niveau quantitatif (différences en abondances relatives) observée dépend des conditions expérimentales, des technologies d'analyse utilisées et des espèces animales étudiées. Dans l'ensemble de ces études, seule celle sur les ovins ne montre pas de différences significatives entre les 5 animaux. Toutes les autres montrent des différences entre les individus.

3.5 L'INTERRELATION ENTRE L'ANIMAL HÔTE ET SON MICROBIOTE RUMINAL

Dans la partie précédente nous avons abordé la notion de « core microbiome », puis nous avons présenté différents facteurs influençant la structure de la communauté microbienne. L'alimentation, les additifs, les extraits végétaux et les métabolites secondaires sont les facteurs de variation les plus étudiés. Nous avons également vu que l'animal hôte avait un effet sur son propre microbiote ruminal. En effet, une variabilité liée à chaque individu a été mise en évidence chez plusieurs espèces. Cette interrelation entre la structure de la communauté microbienne ruminale et l'animal hôte a suscité l'intérêt des chercheurs pour mieux la comprendre. Nous allons, dans cette partie, présenter les études qui ont travaillé sur cette interrelation pour mieux la comprendre. Enfin nous aborderons les pistes actuelles qui ont amenées à ce travail de thèse.

Cette spécificité liée à l'animal hôte a été étudiée par l'équipe de P. J. Weimer au travers de plusieurs expériences. Pour ces études, des vaches Holstein en lactation et canulées au rumen ont été utilisées. Pour mieux comprendre l'interrelation « hôte - microbiote ruminal » conduisant à cette spécificité observée, les auteurs ont mis au point une technique d'échange des contenus ruminiaux. Cette technique consiste à vider manuellement le contenu du rumen par la canule (environ 95 % du contenu) de 2 animaux. Puis de remettre les contenus par la canule ruminal dans l'animal auquel ce contenu n'appartient pas. Cet échange au sein d'une paire d'individu dure environ 30 minutes. Pour suivre l'évolution de la composition du microbiote, des prélèvements ont été réalisés avant la distribution du repas, avant l'échange et après l'échange à des dates variables d'une expérimentation à l'autre. Le pH, la température, la composition en AGV et le lactate sont mesurés pour chacun des prélèvements. L'analyse du microbiote est réalisée par la technique ARISA.

Dans la première expérience, les animaux étaient nourris avec une ration complète mélangée composée de 35,1 % d'ensilage de maïs, de 23,1 % de fourrage de luzerne, 13,4 % de maïs moulu grossièrement, 10 % de drêches séchées, 6,4 % de tourteaux de soja, 3,2 % de gluten de maïs, 0,69 % de CaCO_3 , 0,63 % de coques de soja, 0,4 % de NaHCO_3 , 0,23 % de NaCl iodé, 0,12 % de Ca HPO_4 , 0,11 % de DynaMate, 0,09 % de MgO et des vitamines et oligo-éléments. Deux vaches parmi 5 ont été sélectionnées pour leurs différences de composition de leurs microbiotes ruminiaux. Dans la seconde expérience, les animaux étaient nourris avec une ration complète mélangée de 29,6 % d'ensilage de maïs, 27,9 % de luzerne, 25,5 % de maïs, 7,4 % de soja torréfié, 2,6 % de mélange de vitamines et minéraux, 1,9 % de graines de coton entières, 1,8 % de drêches séchées, 1,8 % de tourteau de soja, 1,5 % de farines de sang ainsi que du Rumensin 80 pour fournir du monensin à hauteur de 13 mg/kg de MS. Deux vaches parmi 18 ont été sélectionnées pour leurs différences de composition de microbiote ruminal. Pour ces 2 expérimentations aucun effet visible sur le comportement alimentaire n'a été observé. Il n'y a pas eu de problème sanitaire sur les animaux étudiés.

Pour la première expérience, concernant le pH et la production totale d'AGV, les animaux avaient des différences significatives. Juste après l'échange des contenus un inversement de situation a été observé, mais après 1 jour les valeurs sont retournées au niveau avant échange. L'évolution de structure de la communauté microbienne est présentée sur la figure 15.

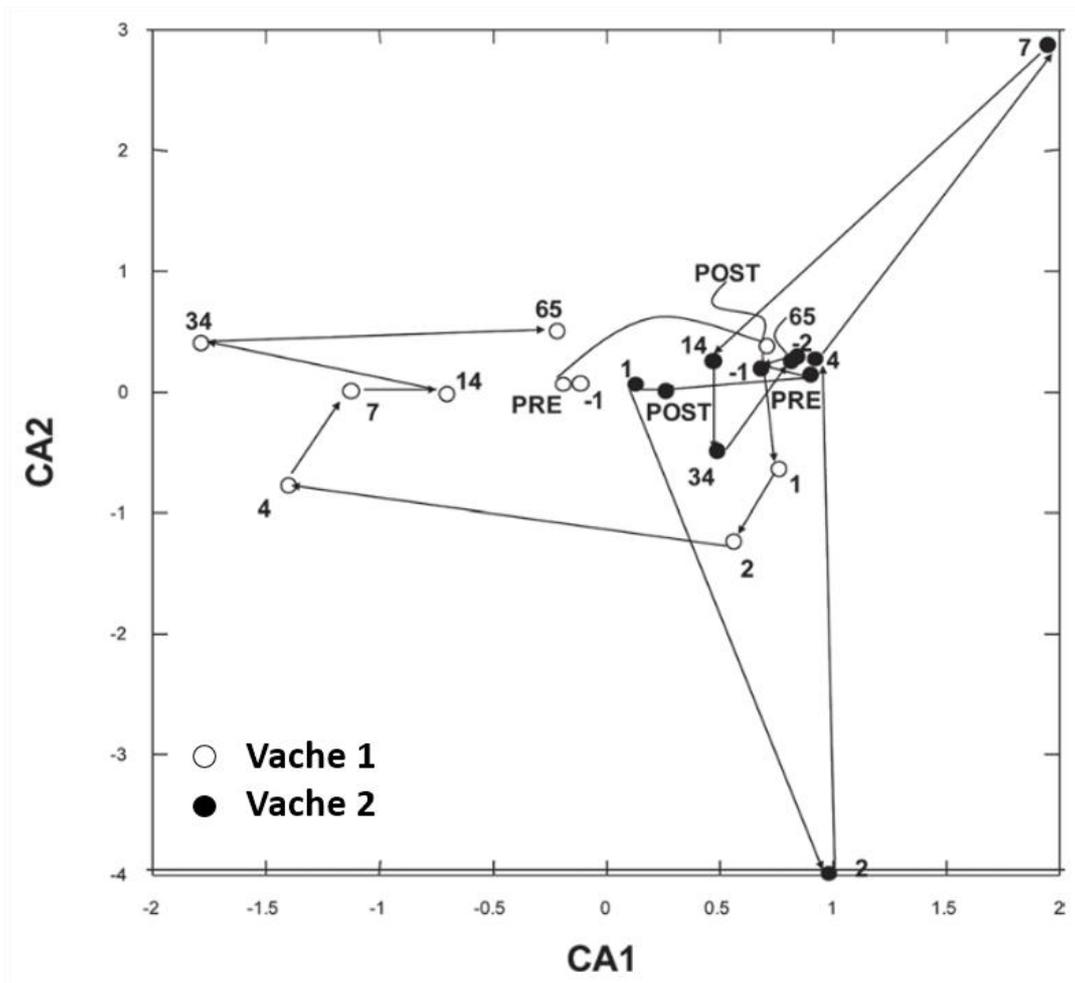


Figure 15 : Graphique d'ordination représentant l'évolution des communautés bactériennes de la phase liquide des contenus ruminiaux des 2 vaches de l'expérience. Les coordonnées des points ont été obtenues par une analyse de correspondance basée sur les résultats de l'analyse ARISA utilisant des amorces spécifiques aux bactéries. CA1 et CA2 représentent les 2 premiers axes de l'analyse de correspondance. Chaque point représente un échantillon et le nombre à côté de chacun indique le jour de prélèvement par rapport à l'échange des contenus ruminiaux. PRE et POST indique les échantillons prélevés immédiatement avant et immédiatement après l'échange. Les échantillons ont des communautés bactériennes davantage semblables lorsqu'ils sont proches sur ce graphique et inversement (Weimer et al., 2010).

Pour ces 2 vaches, 178 amplicons de tailles différentes ont été obtenus. Cette représentation représente 15 % de la variation totale dans le jeu de données. Après une évolution des compositions dans la première semaine suivant l'échange, les communautés microbiennes reviennent à des situations proches de celles avant l'échange des contenus. Pour mieux comprendre les évolutions des amplicons partagés et ceux trouvés uniquement chez une vache, le tableau 16 reprend l'ensemble de ces informations.

	Phase	Nombre d'amplicons de tailles différentes	
		Avant échange	Après échange
Vache n°1 uniquement	liquide	52	23
Vache n°2 uniquement	liquide	17	31
Les 2 vaches	liquide	34	21

Tableau 16 : Amplicons de différentes tailles obtenus par ARISA qui sont partagés ou non entre les 2 vaches avant et après l'échange des contenus ruminiaux. Pour qu'un amplicon soit pris en compte, il a dû être détecté sur tous les prélèvements avant échange ou sur les 2 derniers prélèvements après l'échange. Avant échange les 3 échantillons ont été prélevés 2 et 1 jours avant et le jour même avant la procédure d'échange. Les prélèvements après échange sont ceux à 34 et 65 jours après échange (Weimer et al., 2010).

Malgré cet apparent retour à la situation initial au niveau des amplicons, certains qui étaient spécifiques d'une vache avant l'échange ont réussi à s'implanter chez la vache receveuse alors que d'autres initialement présents n'ont pas été retrouvés après les échanges.

Concernant la deuxième expérimentation, Le pH des animaux était différent avant l'échange des contenus. Juste après l'échange, ils ont été temporairement similaires avant de revenir en une journée aux valeurs avant échange pour la vache n°1 et de revenir à une valeur de pH 0,3 plus haute pour la vache n°2. Pour ce qui est des AGV nous retrouvons un comportement proche de celui observé pour le pH. La vache n°1 retourne à sa valeur initiale de production d'AGV dans la journée alors que la vache n°2 a une production d'AGV réduite après l'échange des contenus en comparaison à sa production avant échange. Les évolutions des communautés bactériennes sont présentées dans la figure 16.

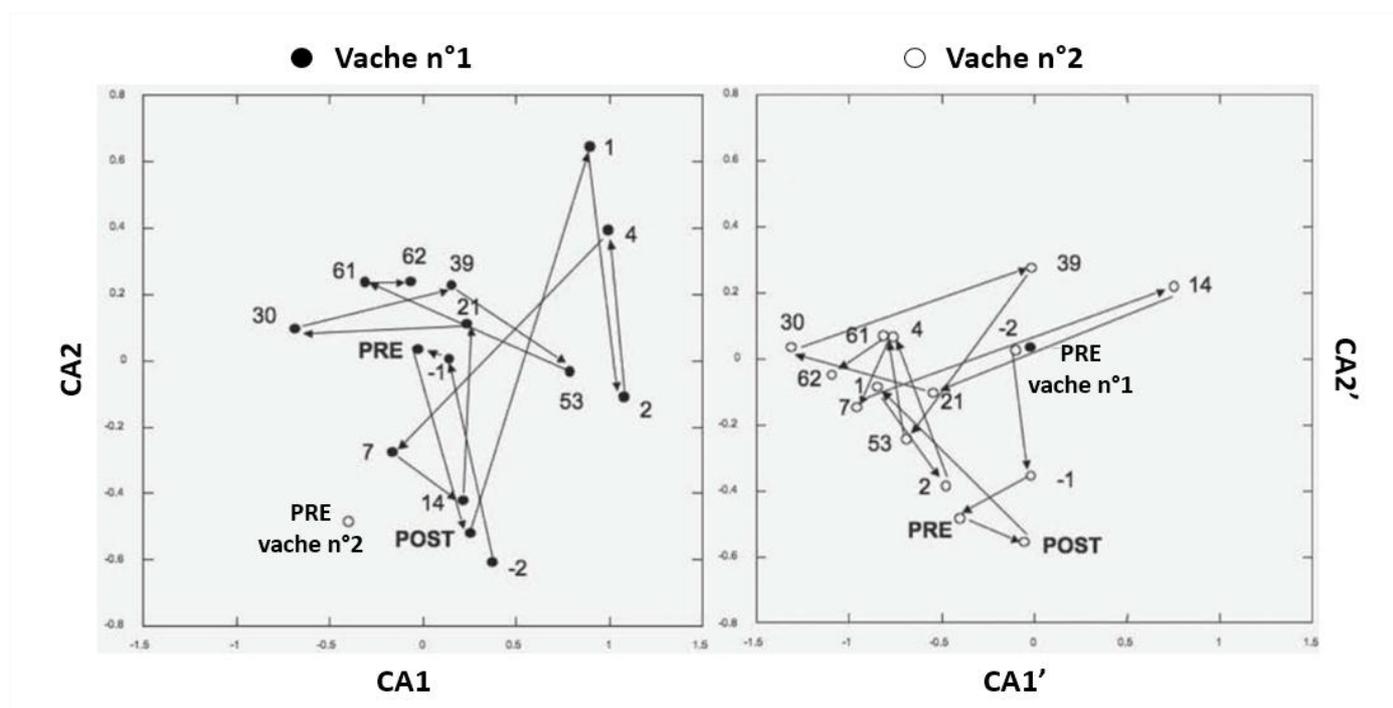


Figure 16 : Graphiques d'ordination représentant l'évolution des communautés bactériennes de la phase liquides des contenus ruminiaux des 2 vaches de l'expérimentation. Les coordonnées des points ont été obtenues par une analyse de correspondance basée sur les résultats de l'analyse ARISA utilisant des amorces spécifiques aux bactéries. CA1, CA2 et CA1', CA2' représentent les 2 premiers axes de l'analyse de correspondance. Chaque point représente un échantillon et le nombre à côté de chaque point indique le jour de prélèvement par rapport à l'échange des contenus ruminiaux. PRE et POST indique les échantillons prélevés immédiatement avant et immédiatement après l'échange. Les échantillons ont des communautés bactériennes davantage semblables lorsqu'ils sont proche sur ce graphique et inversement (Weimer et al., 2010).

Dans cette 2^{ème} expérimentation, le retour à la situation avant échange n'est pas aussi clair. La composition finale reste tout de même plus proche de la composition avant échange que celle de la vache donneuse. Pour mieux comprendre les évolutions des amplicons partagés et ceux trouvés uniquement chez une vache, le tableau 17 reprend l'ensemble de ces informations.

	Phase	Nombre d'amplicons de tailles différentes	
		Avant échange	Après échange
Vache n°1 uniquement	liquide	24	22
Vache n°2 uniquement	liquide	35	43
Les 2 vaches	liquide	19	76
Vache n°1 uniquement	solide	40	37
Vache n°2 uniquement	solide	8	12
Les 2 vaches	solide	2	24

Tableau 17 : Amplicons de différentes tailles obtenus par ARISA, qui sont partagés ou non entre les 2 vaches, avant et après l'échange des contenus ruminiaux. Pour qu'un amplicon soit pris en compte, il a dû être détecté sur tous les prélèvements avant échange ou sur les 2 derniers prélèvements après l'échange. Avant échange les 3 échantillons ont été prélevés 2 et 1 jours avant et le jour même avant la procédure d'échange. Les prélèvements après échange sont ceux à 61 et 62 jours après échange (Weimer et al., 2010).

Le nombre d'amplicons partagés par les 2 vaches suite à l'échange des contenus ruminiaux a augmenté. Les évolutions diffèrent d'un amplicon à un autre. Sur ces 2 expérimentations, les auteurs concluent que les animaux retrouvent rapidement le pH et la production d'AGV qu'ils avaient avant l'échange. Malgré une importante perturbation de l'écosystème ruminal les communautés microbiennes retournent à une composition relativement proche de leurs compositions initiales, appuyant l'hypothèse de spécificité de l'hôte (Weimer et al., 2010). Il y aurait une tendance au ré-établissement de la communauté bactérienne avant échange, mais il faut toutefois nuancer ces propos car la composition du microbiote ruminal de manière qualitative est encore bien différente et les méthodes ARISA utilisées n'ont pas une très grande finesse d'analyse.

Quelques années plus tard, l'équipe de P. J. Weimer a effectué à nouveau une étude d'échange de contenus ruminiaux (Weimer et al., 2017a). Dans cette étude, 6 vaches Holstein canulés dans leurs 3^{èmes} lactations ont été utilisées. Pour chacune des paires, les vaches avaient des MSI différentes pour une production de lait corrigée par l'énergie identiques et un stade de lactation similaire. Pour chaque paire, une vache avait une efficacité de production laitière élevée (HE) et l'autre avait une efficacité de production laitière faible (LE). La ration distribuée aux animaux contenait en pourcentage de la matière sèche 28,8 % de NDF, 44 % de glucides non-pariétaux, 5,5 % de lipides et 16,9 % de protéines brutes. La procédure d'échange des contenus ruminiaux est la même que celle présentée précédemment. Les prélèvements de contenu se font également avant la distribution de la ration, avant et après l'échange de contenus ruminiaux. Les analyses de la composition microbienne ont été réalisées à l'aide des technologies Illumina. Suite à l'échange de contenus, les efficacités de production laitière des vaches « LE » ont été augmentées pendant 1 semaine. Pour les vaches « HE », 2 ont vu leur efficacité de production laitière diminuer sans jamais remonter et 1 a vu son efficacité augmenter. L'évolution de cette dernière est atypique. Pour les 6 vaches, le pH ne diffère pas avant et après échange. La production d'AGV a été diminuée pour l'ensemble des vaches juste après échange, mais aucune variation de concentration ou de production n'est significativement différente. Concernant la communauté microbienne ruminale, la richesse est plus importante pour la communauté de la phase solide que celle de la phase liquide. Les vaches « LE » ont des microbiotes plus diversifiés que les vaches « HE ». Pour les vaches « HE », nous observons une augmentation de la richesse dans la semaine qui suit l'échange puis un retour à la normale. Pour les vaches « LE » nous observons exactement le comportement inverse. L'évolution des communautés microbiennes dans la phase liquide et la phase solide du rumen est présentée dans la figure 17.

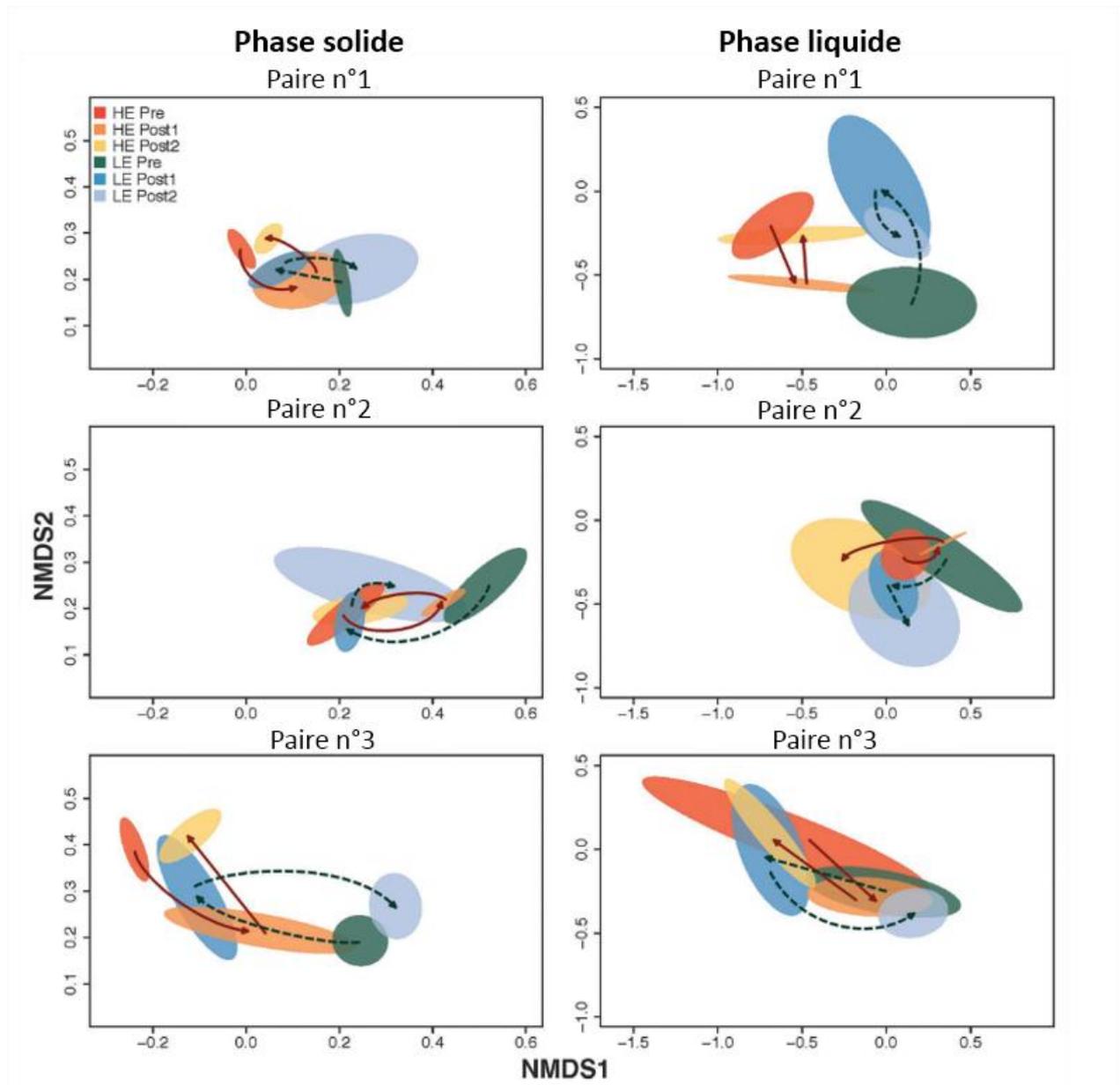


Figure 17 : Représentation sur une analyse NMDS (nonmetric multidimensional scaling) par des ellipses représentant l'intervalle de confiance à 95 % des coordonnées des mesures de diversité de Bray-Curtis pour la phase solide et la phase liquide de contenus ruminiaux pour 3 paires de vaches avant et après un échange de contenus ruminiaux. Les ellipses sont colorées en fonction de l'efficacité de l'animal, les couleurs froides indiquent une efficacité faible alors que les couleurs chaudes indiquent une efficacité élevée. La couleur la plus sombre indique la période avant échange. La couleur intermédiaire indique la première période après échange (0-7 jours post échange) et la couleur la plus claire indique la seconde période après échange (10-56 jours post échange). Les flèches indiquent le sens d'évolution chronologique (Weimer et al., 2017a).

Pour la phase solide, le microbiote après échange est proche de celui de l'animal donneur la première semaine, puis il revient à une situation proche de celle avant échange. Une exception concerne l'animal à faible efficacité de la paire n°2, l'ellipse d'avant échange et celle en fin d'essai ne sont pas proches. Les microbiotes entre les vaches efficaces et celles qui ne le sont pas sont toujours différents avant mélange. Le ré-établissement de la communauté microbienne ruminal n'est pas total à la fin de l'essai, mais la trajectoire d'évolution en prend la direction. Pour ce qui est de la phase liquide, le même comportement que pour la phase solide est observé mais avec un peu plus de variabilité. Là aussi, les microbiotes entre les vaches efficaces et celles qui ne le sont pas sont différents avant mélange. L'animal avec une efficacité faible dans la paire n°2 ne retourne pas à la situation initiale : il va vers un nouvel

état d'équilibre (Weimer et al., 2017b). Dans cette expérimentation, les auteurs observent que la trajectoire de la communauté microbienne ruminale tend à retourner vers la composition initiale après l'échange des contenus ruminiaux. Cependant un animal ne suit pas cette logique et semble trouver un nouveau point d'équilibre.

L'échange de contenus ruminiaux n'est pas la seule technique pour étudier l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote ruminal. Nous allons maintenant voir les résultats obtenus avec la technique d'inoculation de contenu. Dans cette étude, l'objectif était d'améliorer la dégradabilité ruminale des fibres de divers fourrages en tentant d'implanter un microbiote de bison chez les bovins. En effet, ce microbiote est plus efficace que celui des bovins concernant la digestion des fibres. L'expérimentation a été menée sur 16 génisses (Angus x Hereford) canulées au rumen (Griffith et al., 2017). Les génisses consommaient une ration à base de 70 % de paille d'orge et 30 % de concentrés. La ration contenait 15,9 % de protéines brutes et 65,9 % de NDF. L'expérimentation a duré 85 jours : 46 jours sans intervention suivis d'une période d'inoculation de 14 jours, puis d'une période de 12 jours de récupération et enfin 13 jours pour prélever les échantillons nécessaires aux mesures. Les matières premières testées pour leur dégradabilité ruminale étaient : la paille d'orge, la paille de canola, le foin de luzerne et un foin de fléole des prés. Les génisses ont reçu 2 inoculations de contenu ruminal de bison, la première à 46 jours et la seconde à 60 jours. Les bisons étaient nourris avec une ration contenant 75 % d'ensilage d'orge et 25 % d'avoine. Trente-deux bisons ont été abattus le matin de chaque inoculation. Les contenus des 32 animaux ont été mélangés et maintenu en anaérobie à 39°C. Le contenu ruminal de chaque génisse a été entièrement retiré par la canule, puis 30 % de son contenu ruminal lui a été remis et les 70 % manquants ont été remplacés par le contenu de bison mélangé. Les inoculations n'ont eu aucun effet significatif ($P > 0,1$) sur la dégradabilité effective du rumen, le NDF ou l'ADF des différentes matières premières testées (Griffith et al., 2017). Dans cette même expérience, les communautés microbiennes ont été analysées à l'aide des technologies Illumina avant les inoculations puis 1 jour et 27 jours après la seconde inoculation (Ribeiro et al., 2017). Des mesures d'ingestion, de rumination, de digestibilité totale, des taux de renouvellement et des fermentations ruminales ont été réalisées. Ces différentes mesures sont présentées dans le schéma (figure 18).

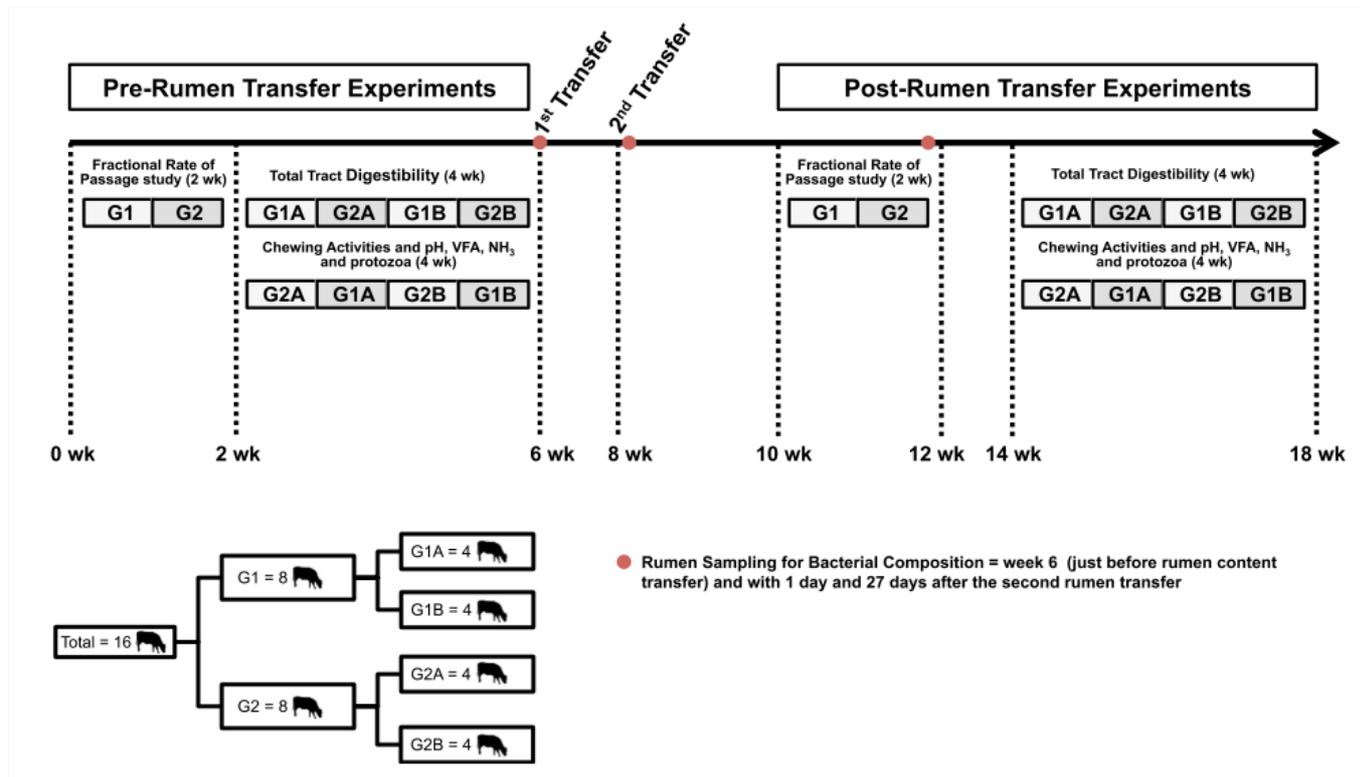


Figure 18 : Design expérimental. Les 16 génisses ont été divisées en 2 groupes de 8 de poids identiques pour permettre d'étudier les vitesses de passage des fibres dans le tractus digestif. Ces sous-groupes ont encore été divisés en 2 pour réaliser les autres mesures. Les prélèvements de microbiote ont été réalisés sur l'ensemble des animaux le même jour (Ribeiro et al., 2017).

La matière sèche ingérée a augmenté après les inoculations ($P < 0,05$). Les vitesses de passage de la phase liquide et de la phase solide n'ont pas été modifiées ($P > 0,1$). Les digestibilités totales apparentes de la matière sèche, de la matière organique, du NDF et de l'ADF n'ont pas été modifiées. Seule la digestibilité de l'azote a été améliorée, passant de 63,3 à 66,5 %. Concernant les flux d'azote, les génisses ont augmenté leur ingestion d'azote ainsi que leurs pertes fécales et urinaires, mais grâce à l'augmentation de la digestibilité la quantité d'azote retenue par l'animal est supérieure. Le flux d'azote microbien a lui aussi été augmenté. Les différences de pH mesurées sont très faibles, de l'ordre de 0,02. Le tableau 18 reprend les évolutions des caractéristiques de fermentations ruminales.

	Inoculation		écart-type	P-Value
	Avant	Après		
Juste avant la distribution de la ration				
pH	6,7	6,66	0,025	0,27
Ammoniaque (mM)	5,52	5,59	0,206	0,77
AGV totaux (mM)	88,8	104,7	2,37	<0,01
Acétate (mol / 100 mol)	74,7	72,5	0,27	<0,01
Propionate (mol / 100 mol)	18,2	18,5	0,2	0,24
Butyrate (mol / 100 mol)	5,5	6,68	0,15	<0,01
Isovalérate (mol / 100 mol)	0,95	1,04	0,022	<0,01
Valérate (mol / 100 mol)	0,38	0,48	0,018	<0,01
Isobutyrate (mol / 100 mol)	0,68	0,75	0,013	<0,01
Acetate : Propionate	4,1	3,93	0,058	0,02
6h après la distribution de la ration				
pH	6,24	6,07	0,039	<0,01
Ammoniaque (mM)	7,8	8,8	0,461	0,05
AGV totaux (mM)	106,4	123	3,08	<0,01
Acétate (mol / 100 mol)	71,2	69,6	0,27	<0,01
Propionate (mol / 100 mol)	20,1	20,4	0,173	0,17
Butyrate (mol / 100 mol)	6,81	8,02	0,124	<0,01
Isovalérate (mol / 100 mol)	0,64	0,59	0,028	0,13
Valérate (mol / 100 mol)	0,65	0,85	0,022	<0,01
Isobutyrate (mol / 100 mol)	0,57	0,55	0,013	0,24
Acetate : Propionate	3,55	3,42	0,042	<0,01

Tableau 18 : Caractéristiques des fermentations ruminales des génisses nourries à la paille d'orge avant et après l'inoculation de contenu ruminal provenant de bisons (Ribeiro et al., 2017).

La rumination des animaux n'a pas été affectée par les 2 inoculations. Concernant le microbiote, la richesse a augmenté entre avant l'inoculation (3 772 OTU), 1 jour après l'inoculation (4 301 OTU) et 27 jours après l'inoculation (4 159 OTU). Le tableau 19 reprend les évolutions du microbiote au niveau des principales familles bactériennes.

Phylum	Famille	Inoculum de bison	Inoculation des rumens			Ecart-type	P-value
			Avant	1 jour après	27 jours après		
<i>Fibrobacteres</i>	<i>Fibrobacteraceae</i>	23,09 ± 2,10	25,09 ^a	22,47 ^b	25,47 ^a	1,119	0,1
<i>Firmicutes</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	15,93 ± 0,52	16,17 ^a	15,61 ^a	14,15 ^b	0,479	0,02
	<i>Ruminococcaceae</i>	16,12 ± 0,80	15,26	16,3	15,46	0,465	0,21
	<i>Christensenellaceae</i>	6,90 ± 0,36	5,22 ^b	5,93 ^a	5,98 ^a	0,272	0,07
	<i>Family XIII</i>	2,48 ± 0,16	1,19 ^b	1,38 ^a	1,12 ^b	0,061	0,006
	<i>Acidaminococcaceae</i>	1,12 ± 0,07	0,93	0,86	0,93	0,039	0,3
	<i>Veillonellaceae</i>	0,61 ± 0,03	0,69 ^a	0,41 ^c	0,56 ^b	0,026	< 0,001
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Prevotellaceae</i>	7,87 ± 0,99	9,66 ^c	11,32 ^a	10,41 ^b	0,356	0,004
	<i>S24-7</i>	3,82 ± 0,25	4,30 ^a	3,83 ^b	4,41 ^a	0,146	0,008
	<i>Rikenellaceae</i>	2,92 ± 0,23	2,48	2,47	2,42	0,064	0,8
	<i>BS11 gut group</i>	2,85 ± 0,34	1,98 ^a	1,67 ^b	1,51 ^b	0,077	< 0,001
	<i>Bacteroidales</i>	0,61 ± 0,14	0,48 ^c	0,59 ^b	0,71 ^a	0,037	< 0,001
<i>Spirochaetae</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	5,73 ± 0,40	5,79 ^b	7,15 ^a	6,06 ^b	0,006	0,01
<i>Actinobacteria</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	1,74 ± 0,29	1,63 ^a	1,23 ^b	1,28 ^b	0,085	< 0,001
<i>Lentisphaerae</i>	<i>Victivallaceae</i>	0,40 ± 0,06	0,57 ^a	0,57 ^a	0,39 ^b	0,048	0,01
	<i>RFP12 gut group</i>	0,65 ± 0,08	0,46 ^b	0,60 ^a	0,44 ^b	0,032	0,001
Autres (< 0.5%)		7,18 ± 0,36	6,90 ^a	6,49 ^b	6,70 ^{ab}	0,147	0,04

Tableau 19 : Composition taxonomique au niveau des familles de communautés bactériennes des génisses canulées nourries avec une ration à base de paille d'orge avant et après l'inoculation de contenu ruminal de bison. Les p-value ont été ajustées par la méthode FDR (False discovery rate de Benjamini-Hochberg). Un seuil de 0,15 a été utilisé pour déterminer la significativité des résultats (Ribeiro et al., 2017).

Les 3 familles bactériennes les plus abondantes ont été *Fibrobacteraceae*, *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*. Quatre comportements différents ont été observés : les familles n'étant pas influencées par les inoculations ; les familles ayant une abondance qui augmente 27 jours après la 2^{ème} inoculation, celles qui diminuent 27 jours après la 2^{ème} inoculation et enfin les familles qui ont des abondances modifiées 1 jour après la 2^{ème} inoculation mais qui reviennent vers leurs compositions initiales. La figure 19 reprend visuellement l'évolution de l'ensemble des communautés bactériennes durant l'essai.

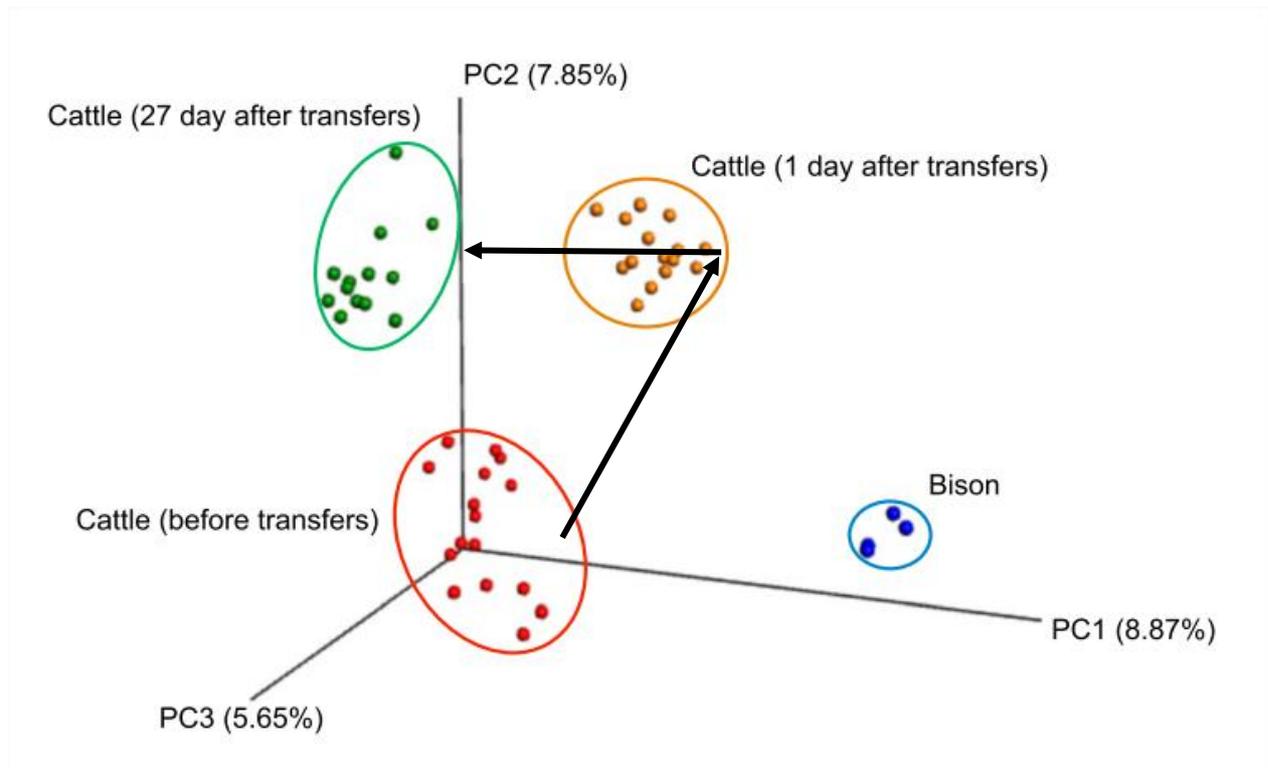


Figure 19 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) au niveau des OTU de génisses avant et après inoculation de contenu ruminal de bison, ainsi que la composition du second inoculum de bison utilisé. Les proportions de variance expliquées par les axes sont données entre parenthèses après le nom des axes (Ribeiro et al., 2017).

Quatre nuages de points distincts sont obtenus. La communauté bactérienne a tendance à retourner en direction de sa composition initiale, mais 27 jours après la seconde inoculation les communautés sont malgré tout encore différentes de la composition avant inoculation (Ribeiro et al., 2017). Le temps de suivi de la composition de la communauté bactérienne est moins long que les expériences de Weimer. Ici, la tendance est à un retour à la composition initiale, mais malgré tout, 1 mois après la dernière inoculation la composition reste différente de celle avant la première inoculation. La propriété de spécificité de l'animal hôte sur sa communauté bactérienne ne peut être déduite avec certitude de ces analyses. Les vitesses de transit de la phase liquide et solide n'ont pas été modifiées entre avant et après les inoculations. Ces vitesses semblent être des caractéristiques propres à l'animal hôte. Est-ce que ces variables peuvent expliquer une part de la variabilité entre les individus ? En revanche, la stabilité des principales caractéristiques fermentaires est retrouvée dans cet essai. La propriété de redondance fonctionnelle est donc à nouveau mise en avant dans cette expérimentation.

L'interrelation entre l'animal et son microbiote a également été étudié avec une approche différente de celle de Weimer (2010 et 2017) et Griffith (2017). Il s'agit du partage d'un contenu ruminal d'un animal donneur entre lui-même et 3 animaux receveurs (de Mulder et al. 2018). Cette étude à l'avantage de partir d'une même structure microbienne initiale. Cette dernière constituait un écosystème fonctionnel et stable au sein du rumen de l'animal donneur. La propriété de résilience observée dans le cas des échanges n'est pas observée dans cette expérimentation. La résilience concernant la diversité alpha est malgré tout observée et il a été constaté que les communautés bactériennes sont moins stables aux perturbations que les communautés d'archées méthanogènes (de Mulder et al. 2018). Cette expérimentation a mis en évidence que la résilience du microbiote n'est pas encore comprise et qu'elle doit être étudiée davantage.

Les expérimentations utilisant les nouvelles techniques d'analyse des communautés microbiennes ont permis de mieux comprendre les principaux concepts suivants (Bickhart and Weimer, 2017) :

- La diversité spécifique est très importante
- Un « core microbiome » est présent chez toutes les vaches
- Les communautés sont différentes entre les races
- Les communautés changent en fonction des modifications de la ration
- Les communautés changent en fonction de l'âge des animaux
- Les communautés changent au cours du cycle alimentaire
- Les communautés épimurales associées à la phase liquide et associées à la phase solide sont différentes
- Les communautés sont uniques pour chaque vache et sont très résilientes autour des perturbations
- Les différences de performances de production (production laitière, composition du lait et efficacité alimentaire) sont associées à des différences de composition de la communauté microbienne
- La composition des communautés microbienne est dépendante des méthodologies utilisées pour les analyser (échantillonnage, méthode d'isolation de l'ADN, le séquençage, ...).

Parmi ces 10 affirmations, la spécificité du microbiote ruminal lié à l'hôte peut toutefois être nuancée au vue des résultats obtenus après les inoculations successives de bison (Griffith et al., 2017; Ribeiro et al., 2017). Les hypothèses induites derrière la spécificité de l'hôte sur la composition de son microbiote sont : la sélection génétique ou physiologique de l'hôte ; une petite proportion initiale des contenus ruminiaux peut permettre d'établir à nouveau la composition initiale après l'échange des contenus ; le microbiote épimural peut éventuellement avoir un rôle. La salivation avec son pouvoir tampon (régulation du pH) et les taux de renouvellement sont potentiellement les forces majeures de ce retour à la composition initiale (Bickhart and Weimer, 2017). Ces différences entre individus peuvent être liées à des caractéristiques propres à chaque animal telles que le niveau d'ingestion, le comportement alimentaire et les taux de renouvellement du rumen. Face aux flux de contenu sortant du rumen, emportant avec lui les micro-organismes, ces derniers doivent avoir un métabolisme rapide pour se procurer des constituants et de l'énergie mais également pour se multiplier et maintenir leurs populations dans le rumen. Le flux de sortie de contenu ruminal a un impact sur l'équilibre des populations microbiennes en lien direct avec le temps de génération des micro-organismes (Van Soest, 2018). Les cinétiques de passage des phases solides et liquides sont variables entre les bovins, les ovins et les caprins. Au niveau intra-espèce chez les bovins, Udén, Rounsaville, Wiggans, & Van Soest (1982) ont constaté également une variabilité entre des génisses aux gabarits différents. L'affirmation indiquant que les performances de production sont associées à des différences de composition des microbiotes ruminiaux ne précise pas s'il y a un lien de causalité. Les perspectives pour améliorer nos connaissances sont de réaliser un grand nombre d'analyses de composition du microbiote pour utiliser les interactions génétique x environnement x microbiote afin d'expliquer la variance de la production laitière observée entre les individus (Bickhart and Weimer, 2017). Le schéma classique décrivant un phénotype comme étant la résultante de la génétique de l'hôte, de son environnement, des interactions entre les 2 ainsi que des mécanismes d'épigénétique risque d'être modifié avec les avancées en termes d'analyse de microbiote. Les informations issues de l'analyse des communautés microbiennes ruminales pourront être intégrées dans le schéma classique pour décrire les phénotypes des animaux (Rogel-Gaillard, 2014). Les premiers critères simples pris en compte pour modéliser les performances (abondance relative des *Bacteroidetes*, des *Firmicutes*, des *Proteobacteria*, du

ratio *Bacteroidetes* sur *Firmicutes*, de l'indice de chao1 et la diversité de Shannon) ont permis d'améliorer très nettement la prédiction de la Matière Sèche Ingérée (MSI), l'efficacité alimentaire pour la lactation et la production laitière (Gleason and White, 2018). Cette méta-analyse donne des résultats très encourageant pour poursuivre les efforts de recherche sur l'interrelation entre le microbiote ruminal et l'animal hôte.

Mieux comprendre cette interrelation permettrait d'identifier les possibilités ou non de modification(s) du microbiote pour améliorer les caractéristiques de production de l'animal hôte. Le principe de base est le suivant : les corrélations entre la présence, l'absence ou des variations d'abondances d'un taxon et une caractéristique de production de l'hôte laissent espérer que si nous arrivons à modifier l'importance de ce taxon dans la communauté microbienne, nous allons modifier la caractéristique de production si le lien entre les deux est causal. Les tentatives de manipulation du microbiote chez le ruminant adulte se soldent souvent par un « échec » à long terme. C'est-à-dire que la communauté inoculée ne reste pas identique à sa composition le jour de l'inoculation et évolue au fil du temps. Cependant, tous les individus d'une même expérience ne réagissent pas de la même façon pendant la phase de restauration (Malmuthuge and Guan, 2017). En effet, après l'échange des contenus de Weimer (Weimer et al., 2010; Weimer et al., 2017b), la vitesse de restauration était différente selon les individus et la composition finale de la communauté microbienne était légèrement différente de la composition initiale. La restauration de la communauté microbienne est donc influencée par l'hôte (Malmuthuge and Guan, 2017). Un mois après l'inoculation des contenus ruminiaux de bisons, la composition du microbiote ruminal n'était pas encore revenue à son état initial. Si la propriété de spécificité est vraie, le temps de retour à la situation avant perturbation est supérieur à un mois. A l'heure actuelle, la compréhension des interrelations entre l'animal hôte et son microbiote ainsi que les mécanismes de régulation ne sont pas clairement identifiés. Nous ne savons pas encore si les altérations dans le microbiote induisent des changements fonctionnels chez l'hôte ou bien si ce sont les changements physiologiques de l'hôte qui entraînent les changements dans la communauté microbienne. Pour le moment, les relations entre la composition du microbiote ruminal, la taille du rumen, les changements physiologiques, les taux de renouvellement du rumen ainsi que les liens avec la génétique de l'hôte sont une boîte noire (Malmuthuge and Guan, 2017).

Les résultats présentés dans cette étude bibliographique indiqueraient une forte influence de l'hôte sur son microbiote. Il a été montré que les caractéristiques de l'animal hôte ont des liens avec les communautés microbiennes de son rumen (Pitta et al., 2018). C'est pour cette raison que de nouveaux essais doivent être réalisés pour comprendre comment est régis l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote ruminal. L'échange de contenus ruminiaux ne permet pas d'identifier clairement les causes de cette variabilité entre les individus. Une approche novatrice permettant que les animaux aient le même microbiote à un instant t sera présentée dans cette thèse.

3.6 CONCLUSION DE LA BIBLIOGRAPHIE

La symbiose entre le microbiote ruminal et l'animal hôte procure aux ruminants la capacité de valoriser les fibres en acides gras volatiles utilisés en tant que substrat énergétique pour couvrir leurs besoins d'entretien et de production. Cette symbiose est la clé d'entrée pour mieux comprendre et ainsi manipuler la fermentation des aliments riche en cellulose. Les parois des cellules végétales étant de nature complexe, elles nécessitent un processus fermentaire long pour être dégradée. Le rumen étant un organe de grande dimension, les fibres les plus longues peuvent rester plusieurs jours dans cet organe alternant

entre fermentation et action mécanique via la rumination jusqu'à diminution de leurs tailles afin qu'elles sortent du rumen vers la suite du tractus digestif. Parmi les caractéristiques de l'animal hôte, ce sont celles qui influencent les taux de passage dans le rumen qui sembleraient être les plus pertinentes à étudier pour mieux comprendre l'interrelation entre l'hôte et son microbiote ruminal.

Un des éléments incontournable dans cette interaction dynamique entre l'hôte et son microbiote est la nature de l'aliment. Cela est d'autant plus pertinent aujourd'hui avec des systèmes d'élevage très contrastés utilisant le maximum de fourrage ou au contraire utilisant d'importante quantité de concentré. En effet les animaux à fort potentiel de production permis par la sélection génétique doivent avoir une ration complétée de concentré pour limiter l'encombrement dans le rumen. Les concentrés sont des fractions de plantes, souvent des graines où des extraits de graines, comme les tourteaux, qui sont dégradées beaucoup plus rapidement dans le rumen où qui peuvent rapidement traverser cet organe du fait de leur taille restreinte.

Au sein du microbiote ruminal les bactéries et les archées sont les principaux microorganismes rencontrés et ce sont eux qui seront étudiés dans ce travail de thèse. Parmi les archées les méthanogènes produisent du méthane impliqué dans le réchauffement climatique. La structure des communautés de bactéries et d'archées est modifiée avec des changements alimentaires. Il s'agit du principal facteur de variation. Pour cette raison dans ce travail de thèse nous nous sommes placés dans les deux contextes nutritionnels présentés ci-dessus (ration de type « entretien » principalement constituée de fourrages et ration de type « production » contenant une part plus importante de concentrés). Le microbiote ruminal a différentes propriétés telles que la redondance fonctionnelle, la résilience structurelle suite à l'échange de contenus ruminiaux et enfin la spécificité lié à l'hôte. La spécificité a été étudiée selon différents angles. L'effet de la race des animaux a déjà été mis en évidence. Des corrélations entre le génome de l'animal et la composition du microbiote ont elles aussi été mises en évidence. Pour étudier cette spécificité nous n'allons pas chercher à isoler la partie qui est spécifique à chaque animal mais nous allons étudier les covariations des abondances des différents taxons avec les caractéristiques mesurées chez les animaux. La sélection des animaux au hasard permet d'avoir une distribution des animaux sur chacun des critères mesurés. Dans cette thèse nous nous sommes intéressés à une seule facette qui n'a pas encore été étudiée. Il s'agit des cinétiques d'entrée dans le rumen et les taux de passage des phases liquides et solides du rumen. En effet ces caractéristiques peuvent avoir une influence sur l'activité microbienne. Cette facette de l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote permettra de mieux comprendre la variabilité entre les individus élevés et nourris dans un même environnement avec la même alimentation.

La résilience structurelle a été observée dans les expérimentations de Weimer et al. 2010 et 2017 mais ne l'a pas été dans le cas de l'expérimentation de de Mulder et al. 2018. Différentes techniques ont été élaborées pour étudier cette propriété (échanges de contenus et partage de contenu). Chaque technique dispose de ses avantages et ses inconvénients et ont été mise en place pour répondre à une question bien précise. Pour étudier le lien entre les caractéristiques des animaux et le microbiote il fallait que les animaux disposent d'un même microbiote dont il fallait suivre l'évolution et mettre en relation avec les paramètres d'intérêts. Seul le partage de contenu ruminal offrait cette possibilité mais il y avait un inconvénient principal. La quantité de contenu réintroduit dans les rumens était bien inférieure à celle retirée. Souhaitant travailler sur les taux de renouvellement, le niveau de remplissage des rumens était pour nous un critère important qui a conduit à la mise en place d'un nouveau dispositif expérimentale. L'étude d'une facette de l'interrelation entre l'animal et son microbiote et de la propriété de résilience suite à des perturbations des écosystèmes ruminiaux de chaque individu permettra de compléter une partie des connaissances sur le

microbiote ruminal qui permettront à moyen terme d'identifier les modulations envisageables du microbiote permettant d'optimiser cette symbiose ruminale.

4 SUJET DE THESE

Les ruminants ont la capacité de valoriser efficacement les fibres non digestibles par l'Homme et ainsi fournir via le lait et la viande des nutriments à l'Homme. Cependant, cette valorisation entraîne, au travers de fermentations, la production de méthane entérique et de dioxyde de carbone qui sont des gaz à effet de serre mis en cause dans le réchauffement climatique. Ce point fort et ce point faible sont deux caractéristiques liées au système digestif polygastrique de ces animaux équipés d'un fermenteur, le rumen, hébergeant tout un écosystème microbien. Ce microbiote ruminal est composé d'une partie commune entre tous les ruminants appelé « core microbiome » et d'une partie variable entre les individus. Il est probable qu'une partie de la variabilité observée pour les performances mesurées entre différents individus soit imputable à des différences de composition des communautés microbiennes ruminales. Dans le contexte actuel, l'optimisation de la symbiose entre l'animal et son microbiote ruminal peut améliorer l'équilibre entre la valorisation des fibres et la production de gaz à effet de serre. Des corrélations ont déjà été mises en évidence entre performances et microbiote ruminal, mais les dispositifs expérimentaux utilisés ne permettaient pas d'identifier les liens de causalité. Si ces liens sont mis en évidence entre les structures des communautés microbiennes et les performances, alors une optimisation favorable de ces deux composantes serait envisageable. Pour savoir si ces objectifs sont réalisables à moyen ou à long terme, il est essentiel de commencer par mieux comprendre l'interrelation entre l'animal et son microbiote. Dans un premier temps, il faut étudier l'évolution de la composition du microbiote suite à une perturbation de l'écosystème ruminal dans différents contextes afin d'identifier s'il est possible de modifier durablement cette composition. Ensuite, il faut améliorer nos connaissances pour savoir dans quelle mesure l'animal hôte, à travers ses différentes caractéristiques, peut moduler la composition de son microbiote ruminal. Les deux questions de recherche auxquelles nous allons tenter de répondre sont les suivantes :

Après une perturbation de l'écosystème ruminal, vers quelle composition la communauté microbienne se stabilise-telle ? Existe-t-il des facteurs alimentaires influençant l'état final obtenu ?

Quelles sont les éventuelles caractéristiques de l'animal hôte ayant une influence sur la composition du microbiote ruminal ?

La première question permettra d'approfondir la notion de résilience structurelle des microbiotes suite à une perturbation de l'écosystème ruminal. La deuxième aura pour but de mieux comprendre les raisons de la spécificité du microbiote associé à son hôte. Pour travailler sur ces 2 axes, une procédure nommée synchronisation et consistant à vider le contenu des rumens, les mélanger et réintroduire la chimère obtenue dans le rumen des animaux sera utilisée. Elle fournira un même microbiote à tous les ruminants de l'expérience et elle induira une perturbation de l'écosystème ruminal. Nous pourrons observer l'effet des caractéristiques mesurées de l'animal sur le microbiote après la synchronisation et nous pourrons également suivre l'évolution de la composition du microbiote afin d'étudier sa résilience. Ces questions sont étudiées sur 2 espèces. La partie I de cette thèse présentera 2 expérimentations sur chèvres. La première, présentée dans le chapitre 1, tentera de répondre à ces 2 axes de recherche avec 12 chèvres tarées nourries avec une ration riche en fibres. La deuxième expérimentation aura pour but de répondre également à ces 2 questions dans un contexte différent : celui de 10 chèvres en lactation nourries avec une ration de production. Dans la seconde partie de cette thèse, le modèle animal utilisé sera la vache tarée nourrie avec

2 rations différentes : une dont la source énergétique principale est constituée de fibres et l'autre dont la teneur en fibres est diminuée au profit d'une teneur en amidon plus élevée. Le premier chapitre avec cette espèce contribuera à répondre à la question de la résilience alors que le deuxième sera davantage axé sur la question de la spécificité. Ces 2 parties seront suivies d'une discussion générale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Alary, V., G. Duteurtre, and B. Faye. 2011. Élevages et sociétés : les rôles multiples de l'élevage dans les pays tropicaux. 24:145–156.
- Bartram, A. K., M. D. J. Lynch, J. C. Stearns, G. Moreno-hagelsieb, and J. D. Neufeld. 2011. Generation of Multimillion-Sequence 16S rRNA Gene Libraries from Complex Microbial Communities by Assembling Paired-End Illumina Reads. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3846–3852. doi:10.1128/AEM.02772-10.
- Beauchemin, K. A. 2018. Invited review : Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows 1. *J. Dairy Sci.* 101:4762–4784. doi:10.3168/jds.2017-13706. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13706>
- Bedrane, M. amine. 2019. Rappels d'anatomie et de physiologie de fonctionnement de l'appareil digestif de bovin. Available from: <https://agronomie.info/fr/rappels-danatomie-de-physiologie-de-fonctionnement-de-lappareil-digestif-bovins/>
- Belanche, A., M. Doreau, J. E. Edwards, J. M. Moorby, E. Pinloche, and C. J. Newbold. 2012. Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation. *J. Nutr.* doi:10.3945/jn.112.159574.
- Belbis, G. H. 2007. Flore du rumen : origine, composition, évolution, conséquences physiopathologiques.
- Berg Miller, M. E., C. J. Yeoman, N. Chia, S. G. Tringe, F. E. Angly, R. A. Edwards, H. J. Flint, R. Lamed, E. A. Bayer, and B. A. White. 2012. Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environ. Microbiol.* 14:207–227. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02593.x.
- Bickhart, D. M., and P. J. Weimer. 2017. Host–rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows 1. *J. Dairy Sci.* 101:1–10. doi:10.3168/jds.2017-13328. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021730958X>
- Bowen, R. Digestive Physiology of Herbivores. Available from: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/herbivores/index.html>
- Braly, J.-P. 2015. La révolution métagénomique. Available from: <https://lejournel.cnrs.fr/articles/la-revolution-metagenomique>
- Caporaso, J. G., C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith, and R. Knight. 2012. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* 6:1621–1624. doi:10.1038/ismej.2012.8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Charby, J., P. Hébel, and S. Vaudaine. 2017. Dairy products in France : market evolution and role in the diet. *Cah. Nutr. diététique.* 52:25–34.
- Chaucheyras-Durand, F., and F. Ossa. 2014. The rumen microbiome : abundance , diversity , and new investigative tools. *Prof. Anim. Sci.* 30:1–12. doi:[http://dx.doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30076-0](http://dx.doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30076-0).
- De Mulder, T., L. Vandaele, N. Peiren, A. Haegeman, T. Ruttink, S. De Campeneere, T. Van De Wiele, and K. Goossens. 2018. Cow responses and evolution of the rumen bacterial and methanogen community following a complete rumen content transfer. *J. Agric. Sci.* 156:1047-1058. doi: 10.1017/S0021859618001053.

- Dehority, B. A. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: Anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *J. Appl. Anim. Res.* 21:145–160. doi:10.1080/09712119.2002.9706367.
- Denman, S. E., D. P. Morgavi, and C. S. Mcsweeney. 2018. Review : The application of omics to rumen microbiota function. *animal*. s233–s245. doi:10.1017/S175173111800229X.
- Dollé, J.-B., and A. Gac. 2016. Impacts environnementaux et services écosystémiques de l'élevage bovin français. *Viandes Prod. carnés*. 1:12.
- Douglas, J. L., H. J. Worgan, G. L. Easton, L. Poret, B. T. Wolf, A. Edwards, E. Davies, D. Ross, and N. R. Mcewan. 2016. Microbial diversity in the digestive tract of two different breeds of sheep. *J. Appl. Microbiol.* 120:1382–1389. doi:10.1111/jam.13060.
- DSM. 2019. CRINA® – delivering essential digestive performance. Available from: https://www.dsm.com/markets/anh/en_US/products/products-eubiotics/products-eubiotics-crina.html
- Edgar, R. C. 2018. Updating the 97 % identity threshold for 16S ribosomal RNA OTUs. *Bioinformatics*. 34:2371–2375. doi:10.1093/bioinformatics/bty113.
- European Commission. 2018. EU agricultural outlook for markets and income 2018-2030. Brussels.
- FEFAC. 2016a. FEFAC Vision on animal feed industry.
- FEFAC. 2016b. FEFAC Vision on animal nutrition.
- Fernando, S. C., H. T. Purvis, F. Z. Najjar, L. O. Sukharnikov, C. R. Krehbiel, T. G. Nagaraja, B. A. Roe, and U. De Silva. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00388-10.
- Fonty, G., J.-P. Jouany, E. Forano, and P. Gouet. 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: *Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion*. INRA Editi. p. 299–347.
- Fraher, M., P. O'Toole, E. Quigley. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 9 (6):312-322. doi: 10.1038/nrgastro.2012.44.
- FranceAgriMer. 2017a. Les produits carnés : viande bovine - Données statistiques 2016 France / Union européenne / Monde. Available from: <https://www.franceagrimer.fr/filiere-viandes/Viandes-rouges/Eclairer/Etudes-et-Analyses/Chiffres-et-bilans?moteur%5BfiltreFiliere%5D=1507&page=1>
- FranceAgriMer. 2017b. Les produits laitiers - Données statistiques 2016 France / Union européenne / Monde. Available from: <https://www.franceagrimer.fr/fam/filiere-lait/Eclairer/Etudes-et-Analyses/Chiffres-et-bilans>
- Gleason, C. B., and R. R. White. 2018. Variation in animal performance explained by the rumen microbiome or by diet composition _ *Journal of Animal Science* _ Oxford Academic. doi:10.1093/jas/sky332.
- Godfray, H. C. J., J. R. Beddington, I. R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J. F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S. M. Thomas, and C. Toulmin. 2010. Food Security : The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* (80-.). 327:812–819.
- Gonzalez-Recio, O., I. Zubiria, A. García-Rodríguez, A. Hurtado, and R. Atxaerandio. 2017. Short communication: Signs of host genetic regulation in the microbiome composition in 2 dairy breeds: Holstein and Brown Swiss. *J. Dairy Sci.* 101:2285–2292. doi:10.3168/jds.2017-13179. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217311694>

Griffith, C., G. O. Ribeiro, M. Oba, T. A. McAllister, and K. A. Beauchemin. 2017. Potential for improving fiber digestion in the rumen of cattle (*Bos taurus*) through microbial inoculation from bison (*bison bison*): In situ fiber degradation. *J. Anim. Sci.* 95:2156–2167. doi:10.2527/jas2017.1403.

Grilli, D. J., K. Fliegerová, J. Kopečný, S. P. Lama, V. Egea, N. Sohaefer, C. Pereyra, M. S. Ruiz, M. A. Sosa, G. N. Arenas, and J. Mrázek. 2016. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe.* 42:17–26. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.07.002.

Gunaydin, M. 2017. Gut Microbiota: It is an Individual Identity Card and It's Like Our Fingerprint. Who is Big Boss? *Clin. Surg.* 2.

Guo, W., Y. Li, L. Wang, J. Wang, Q. Xu, T. Yan, and B. Xue. 2015. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology. *Anaerobe.* 34:74–79. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.04.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.010>

Hart, K. J., D. R. Yanez-Ruiz, S. M. Duval, N. R. McEwan, and C. J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147:8–35. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007.

Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pickup. 1998. Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb. Ecol.* 1–21.

Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, L. Abecia, E. Angarita, P. Aravena, G. Nora Arenas, C. Ariza, G. T. Attwood, J. Mauricio Avila, J. Avila-Stagno, A. Bannink, R. Barahona, M. Batistotti, M. F. Bertelsen, A. Brown-Kav, A. M. Carvajal, L. Cersosimo, A. Vieira Chaves, J. Church, N. Clipson, M. A. Cobos-Peralta, A. L. Cookson, S. Cravero, O. Cristobal Carballo, K. Crosley, G. Cruz, M. Cerón Cucchi, R. de la Barra, A. B. De Menezes, E. Detmann, K. Dieho, J. Dijkstra, W. L. S. dos Reis, M. E. R. Dugan, S. Hadi Ebrahimi, E. Eythórsdóttir, F. Nde Fon, M. Fraga, F. Franco, C. Friedeman, N. Fukuma, D. Gagić, I. Gangnat, D. Javier Grilli, L. L. Guan, V. Heidarian Miri, E. Hernandez-Sanabria, A. X. I. Gomez, O. A. Isah, S. Ishaq, E. Jami, J. Jelincic, J. Kantanen, W. J. Kelly, S.-H. Kim, A. Klieve, Y. Kobayashi, S. Koike, J. Kopecny, T. Nygaard Kristensen, S. Julie Krizsan, H. LaChance, M. Lachman, W. R. Lamberson, S. Lambie, J. Lassen, S. C. Leahy, S.-S. Lee, F. Leiber, E. Lewis, B. Lin, R. Lira, P. Lund, E. Macipe, L. L. Mamuad, H. Cuquetto Mantovani, G. A. Marcoppido, C. Márquez, C. Martin, G. Martinez, M. Eugenia Martinez, O. Lucía Mayorga, T. A. McAllister, C. McSweeney, L. Mestre, E. Minnee, M. Mitsumori, I. Mizrahi, I. Molina, A. Muenger, C. Muñoz, B. Murovec, J. Newbold, V. Nsereko, M. O'Donovan, et al. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* doi:10.1038/srep14567.

Hernandez-Sanabria, E., L. A. Goonewardene, Z. Wang, M. Zhou, S. S. Moore, and L. L. Guan. 2013. Influence of Sire Breed on the Interplay among Rumen Microbial Populations Inhabiting the Rumen Liquid of the Progeny in Beef Cattle. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0058461.

Hua, C., J. Tian, P. Tian, R. Cong, Y. Luo, Y. Geng, S. Tao, Y. Ni, and R. Zhao. 2017. Feeding a high concentration diet induces unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota and host response in a goat model. *Front. Microbiol.* 8:1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.00138.

Ibrahim, E. A., and J. R. Ingalls. 1971. Microbial Protein Biosynthesis in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 55:971–978. doi:10.3168/jds.S0022-0302(72)85604-2. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85604-2](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85604-2)

Jami, E., A. Israel, A. Kotser, and I. Mizrahi. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial

community from birth to adulthood. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2013.2.

Jami, E., and I. Mizrahi. 2012a. Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows. *Anaerobe*. 18:338–343. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.04.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.003>

Jami, E., and I. Mizrahi. 2012b. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One*. 7:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0033306.

Jouany, J. P. 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.* 7:207–225.

Jouany, J. P., L. Broudicou, R. A. Prins, and S. Komisarczuk-Bony. 1995. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In: *Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion*. INRA editi. p. 349–381.

Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89:124–135.

Kim, M., M. Morrison, and Z. Yu. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:49–63. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x.

Koboziev, I., C. R. Webb, K. L. Furr, and M. B. Grisham. 2014. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. *Free Radic Biol Med.* 0:122–133. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.008.Role.

Krause, D. O., S. E. Denman, R. I. Mackie, M. Morrison, A. L. Rae, G. T. Attwood, and C. S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1016/S0168-6445(03)00072-X.

Krause, D. O., T. G. Nagaraja, A. D. G. Wright, and T. R. Callaway. 2013. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 91:331–341. doi:10.2527/jas.2012-5567.

Laisse, S., R. Baumont, T. Turini, L. Dusart, D. Gaudre, B. Rouille, M. Benoit, P.-M. Rosner, and J.-L. Peyraud. 2017. Efficience alimentaire des élevages : un nouveau regard sur la compétition entre alimentation animale et humaine. In: *Colloque du GIS Elevages Demain, 17/10/2017*. Paris. p. 1–12.

Lang, A., P. Dupraz, Y. Tregaro, P. M. Rosner, and C. Perrot. 2015. Direct & indirect employment related to French Livestock Farming. *Rencontres autour des Rech. sur les Ruminants*. 301–304.

Li, F., and L. L. Guan. 2017. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 83:1–16. doi:10.1128/AEM.00061-17.

Loor, J. J., A. A. Elolimy, and J. C. McCann. 2016. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. *Anim. Front.* 6:22. doi:10.2527/af.2016-0030. Available from: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/af/abstracts/6/3/22>

Loor, J. J., M. Vailati-Riboni, J. C. McCann, Z. Zhou, and M. Bionaz. 2015. Nutrigenomics in livestock : systems biology meets nutrition. *J. Anim. Sci.* 5554–5574. doi:10.2527/jas2015-9225.

Malmuthuge, N., and L. L. Guan. 2017. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* doi:10.1186/s40104-016-0135-3.

Mardis, E. R. 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9:387–402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.

McCann, J. C., T. A. Wickersham, and J. J. Loor. 2014. High-throughput methods redefine

- the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinform. Biol. Insights*. 8:109–125. doi:10.4137/BBI.Ss15389.
- Meyer, R. M., E. E. Bartley, J. L. Morrill, and W. E. Stewart. 1964. Salivation in Cattle. I. Feed and Animal Factors Affecting Salivation and Its Relation to Bloat. *J. Dairy Sci.* 47(12):1339–1345.
- Michalet-Doreau, B., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, and G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Développement*. 41:187–194.
- Mountfort, D. O. 1987. The rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 46:401–408. doi:10.1016/0378-1097(87)90045-0.
- de Mulder, T., N. Peiren, L. Vandaele, T. Ruttink, S. De Campeneere, T. Van De Wiele, and K. Goossens. 2018. Impact of breed on the rumen microbial community composition and methane emission of Holstein Friesian and Belgian Blue heifers. *Livest. Sci.* 207:38–44. doi:10.1016/j.livsci.2017.11.009. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.11.009>
- Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, C. J. Van Nevel, and D. I. Demeyer. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, Dordrecht. p. 523–632.
- Nguyen, N., T. Warnow, M. Pop, and B. White. 2016. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *npj Biofilms Microbiomes*. doi:10.1038/npjbio.
- OMS. 2017. L'approche multisectorielle de l'OMS "Un monde, une santé." Available from: <https://www.who.int/features/qa/one-health/fr/>
- Orpin, C. G., and K. N. Joblin. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Springer, Dordrecht. p. 140–195.
- Park, W. 2018. Gut microbiomes and their metabolites shape human and animal health. *J. Microbiol.* 56:151–153. doi:10.1007/s12275-018-0577-8.
- Peyraud, J. L. 2016. How to implement Precision Livestock Farming into Practice ?
- Pitta, D. W., N. Indugu, L. Baker, B. Vecchiarelli, and G. Attwood. 2018. Symposium review : Understanding diet – microbe interactions to enhance productivity of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:7661–7679. doi:10.3168/jds.2017-13858. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13858>
- Pitta, D. W., S. Kumar, B. Vecchiarelli, L. D. Baker, J. D. Ferguson, N. Thomsen, D. J. Shirley, and K. Bittinger. 2014. Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. *J. Anim. Sci.* doi:10.2527/jas.2014-7621.
- Pitta, D. W., W. E. Pinchak, S. E. Dowd, J. Osterstock, V. Gontcharova, E. Youn, K. Dorton, I. Yoon, B. R. Min, J. D. Fulford, T. A. Wickersham, and D. P. Malinowski. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.* 59:511–522. doi:10.1007/s00248-009-9609-6.
- Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *Cell*. 108:557–572.
- Remond, D., C. Duchène, N. Hafnaoui, M. Oberli, V. Sante-Lhoutellier, and C. Gaudichon. 2014. Les 3 points forts des protéines de viande : composition en acides aminés, digestibilité et vitesse de digestion. Clermont-Ferrand.
- Ribeiro, G. O., D. B. Oss, Z. He, R. J. Gruninger, C. Elekwachi, R. J. Forster, W. Z. Yang, K. A. Beauchemin, and T. A. McAllister. 2017. Repeated inoculation of cattle rumen with bison

rumen contents alters the rumen microbiome and improves nitrogen digestibility in cattle. *Sci. Rep.* 7:1–16. doi:10.1038/s41598-017-01269-3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01269-3>

Ritchie, H., and M. Roser. 2017. Meat and Seafood Production & Consumption. Available from: <https://ourworldindata.org/meat-and-seafood-production-consumption>

Rogel-Gaillard, C. 2014. LE MICROBIOTE INTESTINAL : UN COMPARTIMENT BIOLOGIQUE À EXPLORER CHEZ LES ANIMAUX D'ÉLEVAGE. *Bull. Acad. Vét. Fr.* —. 167:131–136. Available from: <http://www.academie-veterinaire-defrance.org/>

Rosner, P.-M., J.-F. Hocquette, and J.-L. Peyraud. 2016. Peut-on encore légitimement manger de la viande aujourd'hui ? *Viandes Prod. carnés.* 1–4.

Rosselló-móra, R., and R. Amann. 2015. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* 38:209–216. doi:10.1016/j.syapm.2015.02.001. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2015.02.001>

Sanders, P., A. Bousquet-mélou, C. Chauvin, and P. Toutain. 2011. Utilisation des antibiotiques en élevage et enjeux de santé publique. *INRA Prod. Anim.* 24:199–204.

Sandri, M., C. Manfrin, A. Pallavicini, and B. Stefanon. 2014. Microbial biodiversity of the liquid fraction of rumen content from lactating cows. 572–579. doi:10.1017/S1751731114000056.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463–5467.

Sautet, J. 1995. L'appareil digestif et ses adaptations. In: *Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion.* INRA editi. p. 183–222.

Schären, M., K. Kiri, S. Riede, M. Gardener, U. Meyer, J. Hummel, T. Urich, G. Breves, and S. Dänicke. 2017. Alterations in the rumen liquid-, particle- and epithelium-associated microbiota of dairy cows during the transition from a silage- and concentrate-based ration to pasture in spring. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00744.

Shi, P. J., K. Meng, Z. G. Zhou, Y. R. Wang, Q. Y. Diao, and B. Yao. 2008. The host species affects the microbial community in the goat rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:132–135. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02274.x.

SNIA. 2018a. Production d'aliments composés en France. Available from: <https://www.nutritionanimale.org/Default.aspx?lid=1&rid=120&rvid=184>

SNIA. 2018b. Rapport d'activité mai 2018.

SNIA. 2018c. Un été marqué par l'augmentation du prix des matières premières pour l'alimentation des animaux d'élevage.

Van Soest, P. J. 2018. *Nutritional ecology of the ruminant.* (C. university Press, editor.).

Stackebrandt, E., and B. M. Goebel. 1994. Taxonomic Note : A Place for DNA-DNA Reassociation and s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:846–849.

Stewart, C. S., H. J. Flint, and M. P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem.* Springer, Dordrecht. p. 10–72.

Stratton, M. R., P. J. Campbell, and P. A. Futreal. 2009. The cancer genome. *Nature.* 458:719–724. doi:10.1038/nature07943. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07943>

Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura, and Y. Benno. 2001. Diet-

- Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2766–2774. doi:10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001.
- Tavoularis, G., and E. Sauvage. 2018. Les nouvelles générations transforment la consommation de viande. *CREDOC Consomm. modes vie.* 1–4.
- Tringe, S. G., and P. Hugenholtz. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr. Opin. Microbiol.* 11:442–446. doi:10.1016/j.mib.2008.09.011.
- Udén, P., T. R. Rounsaville, G. R. Wiggans, and P. J. Van Soest. 1982. The measurement of liquid and solid digesta retention in ruminants, equines and rabbits given timothy (*Phleum pratense*) hay. *Br. J. Nutr.* 329–339.
- Ward, D. M., R. Weller, and M. M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature.* 345:63–65.
- Weimer, P. J. 2015a. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* 6:1–16. doi:10.3389/fmicb.2015.00296.
- Weimer, P. J., M. S. Cox, T. Vieira de Paula, M. Lin, M. B. Hall, and G. Suen. 2017b. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high- and low-efficiency Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:7165–7182. doi:10.3168/jds.2017-12746. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217306392>
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, H. C. Mantovani, and S. L. C. Man. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *J. Dairy Sci.* 93:5902–5912. doi:10.3168/jds.2010-3500. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210006417>
- Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, and D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122–134. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75216-1. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75216-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75216-1)
- Welkie, D. G., D. M. Stevenson, and P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe.* doi:10.1016/j.anaerobe.2009.07.002.
- Williams, A. G., and G. S. Coleman. 1997. The rumen protozoa. In: *The Rumen Microbial Ecosystem.* Springer, Dordrecht. p. 73–139.
- Wirth, R., G. Kádár, B. Kakuk, G. Maróti, Z. Bagi, Á. Szilágyi, G. Rákhely, J. Horváth, and K. L. Kovács. 2018. The Planktonic Core Microbiome and Core Functions in the Cattle Rumen by Next Generation Sequencing. *Front. Microbiol.* 9:1–19. doi:10.3389/fmicb.2018.02285. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02285/full>
- Xia, Y., Y. Kong, R. Seviour, H. E. Yang, R. Forster, T. Vasanthan, and T. McAllister. 2015. In situ identification and quantification of starch-hydrolyzing bacteria attached to barley and corn grain in the rumen of cows fed barley-based diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91:1–11. doi:10.1093/femsec/fiv077.
- Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. 2001. Effect of dietary factors on distribution and chemical composition of liquid- or solid-associated bacterial populations in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 79:2736–2746.
- Zeng, Y., D. Zeng, X. Ni, H. Zhu, P. Jian, Y. Zhou, S. Xu, Y. Lin, Y. Li, Z. Yin, K. Pan, and B. Jing. 2017. Microbial community compositions in the gastrointestinal tract of Chinese Mongolian sheep using Illumina MiSeq sequencing revealed high microbial diversity. *AMB Express.* 7:1–10. doi:10.1186/s13568-017-0378-1.

Zhou, K., Y. Bao, and G. Zhao. 2019. Effects of dietary crude protein and tannic acid on rumen fermentation , rumen microbiota and nutrient digestion in beef cattle. *Arch. Anim. Nutr.* 73:30–43. doi:10.1080/1745039X.2018.1545502. Available from: <https://doi.org/10.1080/1745039X.2018.1545502>

Partie I : Etude de l'interrelation entre la chèvre et son microbiote ruminal

CHAPITRE 1 : INFLUENCE DE L'ANIMAL HOTE SUR LA COMPOSITION DE SON MICROBIOTE RUMINAL SUITE A UNE PERTURBATION DE L'ECOSYSTEME RUMINAL CHEZ LA CHEVRE TARIE RECEVANT UNE RATION RICHE EN FIBRES

1.1 INTRODUCTION

Ce premier chapitre de la partie I consacrée aux essais réalisés sur chèvres présente un essai réalisé en 2013 sur 12 chèvres taries. Nous allons ici apporter des éléments de réponse pour mieux comprendre l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote. La spécificité du microbiote ruminal liée à l'hôte observée entre les races (Shi et al., 2008; Hernandez-Sanabria et al., 2013; Douglas et al., 2016) et même entre les individus vivant dans un même environnement (Jami and Mizrahi, 2012) laisse espérer des modifications possibles du microbiote ruminal vers des structures de communautés microbiennes plus efficaces (Bickhart and Weimer, 2017). Les tentatives de modifications testées jusqu'à aujourd'hui n'ont pas persistées dans le temps (Weimer, 2015a). Des exceptions sont toutefois observées dans le cas d'une niche écologique non occupée au préalable (Jones and Megarritty, 1986). De toutes ces expérimentations, il en résulte que l'animal hôte exerce un contrôle important sur son microbiote. Les 2 propriétés observées sont la spécificité du microbiote liée à l'hôte et sa résilience. En effet, le microbiote après échange des contenus ruminiaux entre 2 congénères semble revenir à une structure proche de sa composition initiale (Weimer, 2015a). La propriété de résilience observée dans ce contexte expérimental précis est à vérifier dans d'autres contextes. Il est nécessaire de mieux comprendre ce contrôle de l'hôte sur le microbiote ruminal pour trouver d'éventuels leviers d'action permettant d'arriver à la modulation du microbiote. La dépendance réciproque entre le microbiote ruminal et l'animal hôte est liée à leur longue coévolution (Fisher et al., 2017) mais l'effet de l'hôte sur son microbiote n'est pas encore caractérisé. Dans le cas des ruminants, nous pouvons supposer que les caractéristiques de l'écosystème ruminal avec une température aux alentours de 39°C, un milieu anaérobie, un pH situé entre 6 et 7, etc. (Dehority, 2002) ainsi que les flux de substrats traversant cet écosystème influencent la composition de la communauté bactérienne. Ces flux de substrats peuvent être caractérisés à l'aide du comportement alimentaire et des quantités ingérées pour les flux entrant dans le rumen et par les taux de passage des phases liquide et solide pour les flux sortant.

L'objectif global de cet essai est de mieux comprendre l'effet de l'hôte sur son microbiote ruminal et d'identifier si les dynamiques d'entrée et de sortie du rumen de l'hôte entraînent cette spécificité individuelle observée dans la bibliographie. Nous étudierons également la résilience des microbiotes dans le contexte de cette expérimentation. Les deux questions auxquelles nous allons tenter de répondre sont les suivantes :

- En partant d'une même composition des microbiotes ruminiaux pour les différentes chèvres de l'essai à un même instant t, les microbiotes retournent-ils à une structure proche de la situation initiale (contrôle fort de l'animal hôte), ou bien iront-ils vers un même état d'équilibre pour tous les animaux (le microbiote a une évolution qui lui est propre), ou encore obtiendrons-nous une situation intermédiaire ?
- Quelles sont les caractéristiques des chèvres qui sont liées à la composition du microbiote ruminal après synchronisation ? Pour cette question nous allons prendre en compte les caractéristiques de l'animal hôte et les dynamiques des contenus ruminiaux.

Dans cet essai, pour répondre à ces objectifs, 12 chèvres taries nourries avec une ration à base de foin sont utilisées. Les dynamiques de leurs contenus ruminiaux ont été caractérisées. Une synchronisation des contenus ruminiaux par vidage, mélange et réintroduction de la chimère chez l'ensemble des chèvres a permis de mettre un contenu ruminal identique à chaque animal à un même instant. Après cette procédure, les chèvres disposaient de l'ensemble des taxons des animaux de l'essai. Ainsi seul l'animal pouvait exercer une pression de sélection sur son microbiote ruminal. L'évolution de la composition du microbiote ruminal a été suivie au fil de l'essai jusqu'à 5 mois après la synchronisation. Dans cette étude, nous avons étudié principalement les bactéries et les archées.

1.2 MATERIELS ET METHODES

Cette étude a été réalisée au sein de l'unité expérimentale de l'Unité Mixte de Recherche de Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants (UMR MoSAR). Les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité local d'éthique (COMETHEA n°12079) agréé par le ministère de l'éducation et de la recherche (agrément n° C2EA-45) et ont été réalisées par un personnel accrédité.

1.2.1 Animaux

12 chèvres taries, 3 de race Saanen et 9 de race Alpine ont été sélectionnées aléatoirement au sein d'un groupe d'animaux de 3 ans comprenant 27 chèvres (9 Saanen et 18 Alpines). Les 12 animaux de l'expérience étaient équipés de canules ruminales et duodénales. Au début de l'essai, les animaux avaient un poids moyen de $57,2 \pm 7,9$ kg. Les animaux étaient nourris 2 fois par jour avec une ration couvrant leurs besoins d'entretien. Deux tiers de la ration étaient distribués lors du repas de l'après-midi à 15h30 et un tiers au repas du matin vers 7h30. La description du rationnement, de la composition de l'alimentation et des périodes de distribution sont présentées dans le tableau 1. L'échelle de temps est basée sur le jour de la synchronisation des contenus ruminiaux à d 0.

	Période 1				Période 2					
	de d-80 à d-50 et de d-14 à d-6				de d-49 à d-20	de d-5 à d31 et de d98 à d139				de d32 à d97
PV (kg)	50 ≤ x < 55	55 ≤ x < 60	60 ≤ x < 65	65 ≤ x < 70		50 ≤ x < 55	55 ≤ x < 60	60 ≤ x < 65	65 ≤ x < 70	
Matière sèche ingérée (kg /jour)	1,39	1,51	1,63	1,74		1,78	1,89	2,01	2,19	
Ingrédients										
Foin (% MS)	86,1				ad libitum	73,7				ad libitum
Luzerne déshydratée brin long (% MS)						11,4				0,22 kg MS
Orge (% MS)	13,9				0,22 kg MS	14,9				0,29 kg MS
CMV (g)	20				20	20				20
Composition (% MS)										
NDF % de MS	59,4	59,3	59,2	59,3		57,8	58	58,1	58	
ADF % de MS	32,1	32	32	32,1		33	33,1	33,1	33,2	
ADL % de MS	4,2	4,2	4,2	4,2		4,5	4,4	4,4	4,5	
MAT % de MS	8,4	8,4	8,4	8,4		8,6	8,5	8,4	8,7	
Amidon % de MS	6,9	7	7,1	6,9		7,6	7,5	7,5	7,3	

Tableau 1 : Composition de l'alimentation, des quantités distribuées en fonction du poids des chèvres et des périodes de distribution sur l'ensemble de la période d'expérimentation. Le jour de synchronisation des contenus ruminiaux est considéré comme étant do. PV : Poids Vifs ; CMV : Complément en minéraux et Vitamines ; NDF : Neutral Detergent Fiber ; ADF : Acid Detergent Fiber ; ADL : Acid Detergent Lignin ; MAT : Matière Azotée Totale.

L'alimentation distribuée sur la période 1 a été modifiée car le foin distribué avait une composition variable risquant de ne pas couvrir tout à fait les besoins d'entretien des chèvres. La ration durant la période 1 contient $59,3 \pm 0,1$ % de NDF, $32,0 \pm 0,1$ % d'ADF, $4,2 \pm 0,0$ % d'ADL, $8,4 \pm 0,0$ % de MAT et $7,0 \pm 0,1$ % d'amidon. La ration durant la période 2 contient $58,0 \pm 0,1$ % de NDF, $33,1 \pm 0,1$ % d'ADF, $4,5 \pm 0,0$ % d'ADL, $8,6 \pm 0,1$ % de MAT et $7,5 \pm 0,1$ % d'amidon.

Les chèvres étaient logées en groupe sur aire paillée hormis durant les périodes où elles étaient en cases individuelles sur caillebotis en bois pour mesurer leurs cinétiques d'ingestion, caractériser leurs comportements alimentaires et faciliter les prises d'échantillons de contenu ruminal. Les mesures réalisées sur les animaux sont présentées dans la figure 1.

caractéristiques phénotypiques, nous avons choisi de consolider les différentes mesures en les moyennant pour obtenir une information sur le phénotype moyen. Durant l'essai les chèvres ont été pesées à 14h00 chaque semaine. La variable PV (kg) correspond au poids vif moyen des animaux sur l'ensemble de la période d'expérimentation. Les cinétiques d'ingestions ont été réalisées quand les animaux étaient en case individuelle avec une distribution d'aliment rationnée. Après le séchage de l'aliment à 87°C durant 24h dans une étuve pour déterminer la MS, la matière sèche ingérée (MSI) a été calculée. Cette variable MSI (kg/jour) correspond à la moyenne des ingestions sur les 3 périodes de mesures de d -84 à d -79, de d 26 à d 31 et de d 139 à d 144.

1.2.4 Dynamiques des contenus ruminiaux

La caractérisation des dynamiques des contenus ruminiaux est divisée en 2 groupes de mesures : les cinétiques d'ingestion et les taux de renouvellement des contenus. Les mesures de cinétique d'ingestion permettent de décrire le comportement alimentaire. Ces données sont mesurées sur 3 périodes : de d -84 à d -79, de d 26 à d 31 et de d 139 à d 144. Les auges des animaux étaient placées sur des balances enregistrant le poids toutes les 2 minutes. Les enregistrements ont été analysés sur le repas distribué l'après-midi durant 5 jours par période. Après la distribution de la ration, le comportement des chèvres alternaient entre des périodes de consommation et des périodes de repos. L'analyse des fréquences de ces pauses permet de distinguer les pauses intra-repas des pauses inter-repas (Martin et al., 1993). Cette méthode aussi appelée « Log survivorship method » consiste à dénombrer les pauses en fonction de leur durée, de faire une transformation logarithmique de ces valeurs et d'identifier la cassure entre les pauses intra et inter repas.

Les contenus ruminiaux ont été échantillonnés pour estimer le taux de renouvellement de la phase liquide et solide des contenus sur 3 périodes de mesures : de d -56 à d -51, de d 14 à d 19 et de d 133 à d 138. Le polyéthylène glycol (PEG) a été utilisé comme marqueur de la phase liquide. Le foin mordancé au chrome a été utilisé comme marqueur de la phase solide. Ce dernier a été préparé en une seule fois (Uden et al., 1980). La fraction conservée pour le marquage est comprise entre 0,212mm et 1 mm. Le premier jour de mesure 50g de foin mordancé et 15g de PEG dissout dans 100ml d'eau sont introduits par la canule à 9h00. La partie liquide du contenu des rumens est échantillonnée après 2, 4, 6, 8, 12, 24, 32, 36 et 47h. La partie solide du contenu est quant à elle échantillonnée après 6, 8, 12, 24, 32, 37, 47, 60, 72, 85, 96 et 112h avec 50g de contenu pris dans un pré-échantillon de 500g (le reste est ensuite réintroduit dans le rumen). Les échantillons liquides sont stockés à -20°C jusqu'à l'analyse. Les échantillons solides sont séchés à 80°C puis broyés avec un broyeur Culatti (Prolabo, Paris, France) avec une ouverture de 1mm puis stockés dans un endroit sec jusqu'à l'analyse. Ces échantillons de contenu solide ont été analysés pour connaître la concentration en chrome par spectroscopie d'absorption (Williams et al., 1962). Les échantillons de contenu liquide ont été analysés pour déterminer la concentration en PEG par turbidimétrie (Hyden, 1956).

Les variables associées aux taux de passage des phases liquides et solides des contenus ruminiaux sont calculées par un ajustement des données avec le modèle suivant :

$$[marker]_t = [marker]_{t_0} \cdot \exp \frac{-k \cdot t}{100}$$

Où t est le temps (h), k le taux de passage de la phase liquide (TPPL) ou le taux de passage de la phase solide (TPPS) (%/h) et $[marker]_{t_0}$ la concentration initiale en PEG ou en chrome dans le rumen. L'estimation précise de la concentration initiale du marqueur nécessite l'utilisation d'un modèle double exponentiel. Dans notre expérimentation, nous n'avons pas suffisamment de prélèvements suivant l'introduction du marqueur pour utiliser un tel modèle. Nous ne prendrons pas en compte cette concentration initiale pour la suite des analyses.

1.2.5 Composition du microbiote

Pour caractériser la composition du microbiote ruminal, 200g de contenu ruminal a été collecté pour chacune des chèvres avant le repas du matin aux jours d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141. Après homogénéisation de ce prélèvement, deux échantillons de 30g dans des tubes de 50 mL ont été immédiatement stockés à -23°C jusqu'à l'extraction.

L'ADN métagénomique a été extrait en double à partir des échantillons (Yu and Morrison, 2004) en utilisant les mini kit Qiaamp DNA stool (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les quantités et la pureté de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Lyon, France). Son intégrité a été contrôlée par électrophorèse sur gel (0.8% agarose sur un tampon TAE, 30 min à 100 V). Les répertoires des amplicons des régions hyper variables V4-V5 des ARNr 16S des bactéries et archées ont été générés avec l'amorce avant PCR1_515F (5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA) et avec l'amorce inverse PCR1_928R (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCGYCAATTCMTTTRAGT) en accord avec la procédure spécifiée par GeT-PlaGe (Les produits de PCR résultants ont été purifiés et chargés sur la cartouche Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) sur la plateforme génomique et transcriptomique (INRAE, Toulouse, France) selon les instructions du fabricant), la plateforme de séquençage de Toulouse en France. Les amorces comprenaient des adaptateurs Illumina. Le mélange d'amplification PCR contenait 10ng d'ADN matrice, 0.5µL de polymérase d'ADN 16S MolTaq à 5U/µL (Molzym GmbH, Bremen, Germany), 5µL de tampon 10X, 4µL de mélange d NTP à 2.5 mM, 1µL de chacun des primer à 20µM et de l'eau stérile pour compléter le volume de 50µL. La réaction a été réalisée dans un thermocycler Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne) avec le profil thermique suivant : la dénaturation initiale s'est faite à 94°C pendant 2 min, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 65°C pendant 40 secondes et 72°C pendant 30 secondes, l'élongation finale était à 72°C pendant 10 minutes et ensuite maintenu à 4°C. Les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel l'agarose (2%) pour contrôler la quantité et les tailles attendues. Après la première PCR, un multiplexage simple a été réalisé en utilisant un index fait maison de 6 paires de bases, qui a été ajouté à l'amorce inverse pendant une seconde PCR à 12 cycles utilisant l'amorce avant (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTCACTCTTCCCTACACGAC) et l'amorce inverse (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). Le mélange d'amplification PCR contenait 15ng de matrice PCR, 0,5µL de polymérase d'ADN 16S MolTaq à 5U/µL (Molzym GmbH, Bremen, Germany), 5µL de tampon 10X, 1µL de mélange dNTP à 10 mM, 1,5µL de chacun des primers à 20µM et de l'eau stérile pour compléter le volume de 50µL. Les produits issus de la PCR ont été purifiés et mis sur la cartouche Illumina MiSeq conformément aux instructions du fabricant. La qualité de l'analyse a été vérifiée en interne à

l'aide de PhiX, puis chaque séquence appariée aux extrémités a été affectée à son échantillon à l'aide de l'index préalablement intégré.

Les amplicons ont été traités et séquencés au format apparié de 2x250 pb au centre GeT-PlaGe (Toulouse, France) en utilisant un séquenceur MiSeq Illumina avec le kit v2 Reagent (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis). Le traitement de la séquence a été effectué à l'aide du pipeline FROGS sous Galaxy (Escudié et al., 2018). La longueur moyenne des séquences était de 410 pb. Après avoir été démultiplexées, les lectures appariées ont été fusionnées et toutes les séquences situées en dehors d'une plage allant de 380 à 480 pb ou présentant une ambiguïté ont été rejetées. Un total de 2 628 744 séquences a été obtenu. Les données ont été normalisées à 26 000 séquences par échantillon, le nombre minimal de séquences par échantillon étant de 26 389. L'étape de regroupement implémenté de Swarm (Mahé et al., 2014) a été définie avec un paramètre d'agrégation final $d = 3$. Les chimères ont été détectées avec UCHIME (Edgar et al., 2011). Nous avons conservé les groupes d'abondance supérieure à 0,005 % (Bokulich et al., 2013) puis effectué l'appartenance taxonomique des 1488 OTU détectées dans la base de données SILVA 16S v 128 filtrée à un score de 50 pntail.

1.2.6 Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, les 3 logiciels utilisés ont été R (R Development Core Team and R Foundation for statistical Computing, 2014), PAST (Hammer et al., 2001) et CANOCO 5 (Ter Braak and Šmilauer, 2012; Šmilauer and Lepš, 2014). L'effet de la race sur les variables descriptives a été testé avec l'analyse de Kruskal-Wallis réalisée par la fonction « `kruskal.test` » sous R. La sélection des variables a été réalisée à l'aide de matrices de corrélation (test de Pearson) du package R « `corrplot` » (Wei et al., 2017) et d'analyses en composantes principales (ACP) du package R « `FactoMineR` » (Lê et al., 2008). Les analyses de diversité du microbiote ont été réalisées au niveau des OTU. L' α -diversité a été étudiée à partir de 2 indices : le premier étant la richesse pour connaître le nombre d'OTU présent par échantillon et second prenant en compte les notions d'équitabilité avec l'indice de Shannon. Ces 2 critères ont été calculés à l'aide du package « `BiodiversityR` » (Kindt, 2016). L'analyse de Wilcoxon a été utilisée pour comparer les indices. Pour analyser la β -diversité la distance écologique de Bray-Curtis a été utilisée car elle a des caractéristiques intéressantes : la distance d'un échantillon avec lui-même est nulle et la distance est égale à 1 pour deux échantillons complètement différents. Ces distances ont été calculées à partir de la matrice d'OTU. La β -diversité a été étudiée à l'aide d'analyse en coordonnées principales (PCoA) pour visualiser les différences entre les échantillons, basées sur les distances de Bray-Curtis avec une matrice d'abondance relative des OTU log-transformée. L'analyse de similarité (one-way ANOSIM) et les comparaisons deux à deux des distances de Bray-Curtis ont été utilisées pour tester les changements de composition de la communauté bactérienne au cours du temps. Pour les analyses faites au niveau des familles et des genres, seuls les principaux taxons sont étudiés. Le seuil est basé sur le nombre de lecture de chaque séquence sur l'ensemble de l'expérimentation (1 560 000). Ce seuil a été fixé à 5 000 lectures. Les différences d'abondances relatives au niveau des genres et des familles entre les différents temps de prélèvement ont été testées à l'aide d'un modèle mixte utilisant le package « `nlme` » de R (Pinheiro et al., 2015). Le modèle en mesures répétées utilisé prenait en compte les jours comme un effet fixe et les chèvres comme un effet aléatoire avec une structure d'autocorrélation d'ordre 1 (`corCAR1`). Si ce test était significatif, un test sur les moyennes ajustées avec une

correction de Bonferroni était réalisé. L'effet du taux de passage de la phase solide dans le rumen sur les principales familles et les principaux genres ont été analysés à l'aide du test de corrélation de Spearman. Les relations entre les caractéristiques phénotypiques des chèvres et la structure de la communauté du microbiote ruminal ont été analysées à l'aide d'analyses de redondance (RDA) au niveau des OTU (matrice d'abondance relative log-transformée) et représentées à l'aide de graphiques d'ordination. La validité des modèles a été testée à l'aide de la procédure de permutation de Monte Carlo basée sur 999 permutations. Une sélection interactive en avant avec correction FDR (False discovery rate) a été réalisée (P-value ajustée < 0,05) pour connaître quelles étaient les variables caractérisant les chèvres ayant une influence sur la composition du microbiote ruminal.

1.3 RESULTATS

Dans cette partie nous présentons l'ensemble des informations collectées pour décrire les chèvres. La sélection des variables est nécessaire pour éviter de conserver des variables corrélées entre elles pour la suite des analyses.

1.3.1 Sélection des variables caractérisant les animaux hôtes

Pour cette expérimentation, 12 animaux ont été sélectionnés aléatoirement au sein de 27 animaux du même groupe d'âge pour conserver un maximum de diversité entre les chèvres. Deux races d'animaux étaient présentes : 3 Saanen et 9 Alpines. L'effet de la race des animaux a été incluse comme effet fixe sur les caractéristiques des animaux (**Race**).

Le poids des animaux a été mesuré chaque semaine sur l'ensemble de l'essai. Le tableau 2 reprend les valeurs moyennes et les écarts types de ces mesures.

	PV (kg)
G024	48,6 ± 3,0
G025	60,4 ± 3,4
G096	50,2 ± 2,4
G108	55,8 ± 2,3
G111	69,3 ± 2,1
G114	49,1 ± 3,5
G121	47,3 ± 2,6
G141	44,1 ± 2,0
G149	56,4 ± 3,2
G153	47,9 ± 2,3
G159	56,3 ± 2,7
G164	52,0 ± 3,4

Tableau 2 : Tableau indiquant le poids moyen des chèvres (PV) mesuré 1 fois par semaine pendant 32 semaines sur l'ensemble de l'essai ainsi que l'écart type associé.

Pour écarter d'éventuels problèmes de mesure des balances, un processus itératif a été mis en place pour supprimer les valeurs aberrantes. Pour chaque période de mesure comprenant 5 valeurs de consommation, l'enregistrement ayant l'écart le plus important avec la moyenne a été éliminé si celui était supérieur à 20 % en valeur absolue. La moyenne et les écarts étaient ensuite recalculés jusqu'au moment où toutes les valeurs étaient comprises entre -20 et + 20 % par rapport à la moyenne. Cette dernière était conservée pour caractériser la quantité de matière sèche ingérée sur cette période pour cette chèvre. Les valeurs des 3 périodes ont été moyennées pour caractériser l'ingestion durant l'expérimentation. Le tableau 3 reprend ces valeurs.

MSI (kg)
1,18 ± 0,11
1,46 ± 0,10
1,16 ± 0,08
1,25 ± 0,05
1,25 ± 0,02
1,20 ± 0,13
1,21 ± 0,04
1,08 ± 0,12
1,27 ± 0,05
1,18 ± 0,07
1,30 ± 0,16
1,24 ± 0,09

Tableau 3 : Tableau indiquant la matière sèche ingérée (MSI) par les chèvres moyennée sur trois périodes d'une semaine au cours de l'expérimentation (d -84 à d -79, d 26 à d 31 et d 139 à d 144 sachant que la synchronisation des contenus ruminiaux est considérée comme d 0).

Les chèvres étant rationnées en fonction de leur poids, la variable MSI et la variable PV ont un coefficient de corrélation égale à 0,67. Pour éviter la redondance d'information entre PV

et MSI, seule la variable MSI est conservée pour la mise en relation avec la composition des microbiotes ruminiaux.

La dynamique des contenus ruminiaux a été caractérisée par des flux d'entrée dans le rumen et des flux de sortie. Pour différencier les pauses intra-repas des pauses inter repas, nous avons représenté le logarithme du nombre de pause en fonction du temps de pause. L'intersection entre les 2 premiers alignements de point indique le temps différenciant ces 2 types de pauses. La figure 2 reprend cette analyse.

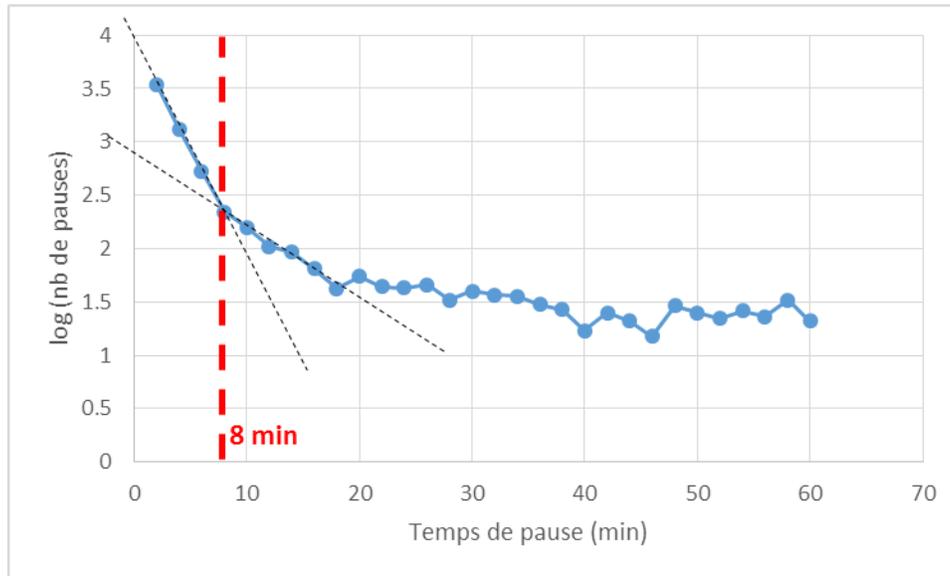


Figure 2 : Graphique représentant le logarithme du nombre de pauses observées sur les 3 périodes de mesures des cinétiques d'ingestion en fonction du temps de pause. Les mesures des balances sont obtenues toutes les 2 minutes. L'intersection entre les 2 droites en pointillés noir indique la limite entre les pauses intra-repas et les pauses inter-repas.

Les pauses intra-repas durent 8 minutes ou moins alors que les pauses inter-repas durent plus de 8 min. Connaissant ce critère nous avons calculés 4 critères pour décrire les cinétiques d'ingestion. Le temps de consommation correspondant à 80 % de la consommation effective du repas (**T80**), l'écart type de cette mesure (**et(T80)**), le nombre de repos inter-repas entre la distribution et T80 (**nb_repos**), le temps de repos inter-repas cumulé avant T80 (**tps_repos_cumul**). Ces critères ont été moyennés sur les 3 périodes par chèvre. Le tableau 4 reprend ces critères.

	T80 (min)	et(T80) (min)	nb_repos Sans unité	tps_repos_cumul (min)
G024	80	14	0,6	6
G025	118	40	1,2	43
G096	72	11	0,7	7
G108	67	26	0,7	15
G111	127	43	1,4	40
G114	115	60	1,0	27
G121	79	10	0,3	3
G141	118	14	1,4	17
G149	65	14	0,3	4
G153	87	26	0,4	9
G159	82	27	0,7	13
G164	99	39	0,7	20

Tableau 4 : Moyennes des caractéristiques des cinétiques d'ingestion des 12 chèvres sur l'ensemble de l'expérimentation concernant le repas distribué l'après-midi. Les 4 variables sont le temps où la consommation a atteint 80 % de sa consommation sur le repas du soir (T80), l'écart type de T80 (et(T80)), le nombre de repas inter-repas (> 8min) (nb_repos) et la moyenne des sommes journalières des repas inter-repas (tps_repos_cumul).

Pour éviter les redondances d'information nous regardons les corrélations entre les variables décrivant les cinétiques d'ingestion (figure 3).

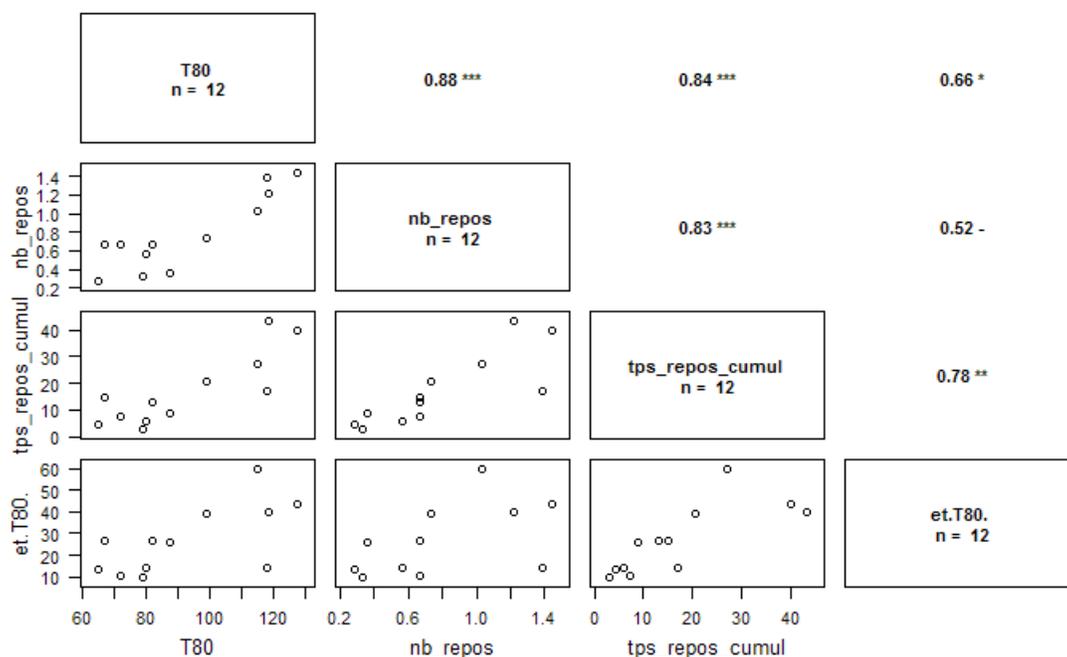


Figure 3 : Matrice de corrélations entre les variables décrivant les cinétiques d'ingestion des chèvres. Les coefficients de corrélation sont indiqués en haut à droite au-dessus de la diagonale. La signification du test de Pearson est indiquée par le code suivant : 0,1 > p-value > 0,05 = '-'; 0,05 > p-value > 0,01 = '*'; 0,01 > p-value > 0,001 = '**'; 0,001 > p-value = '***'. Les variables testées ici sont le temps où la consommation a atteint 80 % de sa consommation sur le repas du soir (T80), l'écart type de T80 (et(T80)), le nombre de repas inter-repas (> 8min) (nb_repos) et la moyenne des sommes journalières des repas inter-repas (tps_repos_cumul).

Les coefficients de corrélation entre T80 et nb_repos et tps_repos_cumul sont supérieurs à 0,8, donc nous conservons T80. La corrélation entre T80 et et(T80) est de 0,66, elles n'apportent pas tout à fait la même information et nous conservons ces 2 variables.

Les taux de passage de la phase liquide et solide du rumen ont été estimés grâce à l'évolution de la concentration des marqueurs de chacune de ces phases. Ces valeurs obtenues sur chacune des périodes sont moyennées sur l'ensemble de l'expérimentation pour décrire ces caractéristiques pour chacune des chèvres. Le tableau 5 reprend ces deux variables.

	TPPL (%/h)	TPPS (%/h)
G024	13,5	3,4
G025	17,1	4,4
G096	12,3	3,4
G108	13,5	3,3
G111	13,6	3,3
G114	16,6	3,1
G121	15,0	5,8
G141	18,7	4,1
G149	12,7	5,7
G153	13,4	4,7
G159	14,2	4,2
G165	18,7	5,2

Tableau 5 : Les 2 variables présentées ici sont : le taux de passage de la phase liquide (TPPL) et le taux de passage de la phase solide (TPPS) pour 12 chèvres tarées nourries avec une ration couvrant les besoins d'entretien de ces animaux.

Les corrélations entre ces variables sont représentées dans la figure 4.

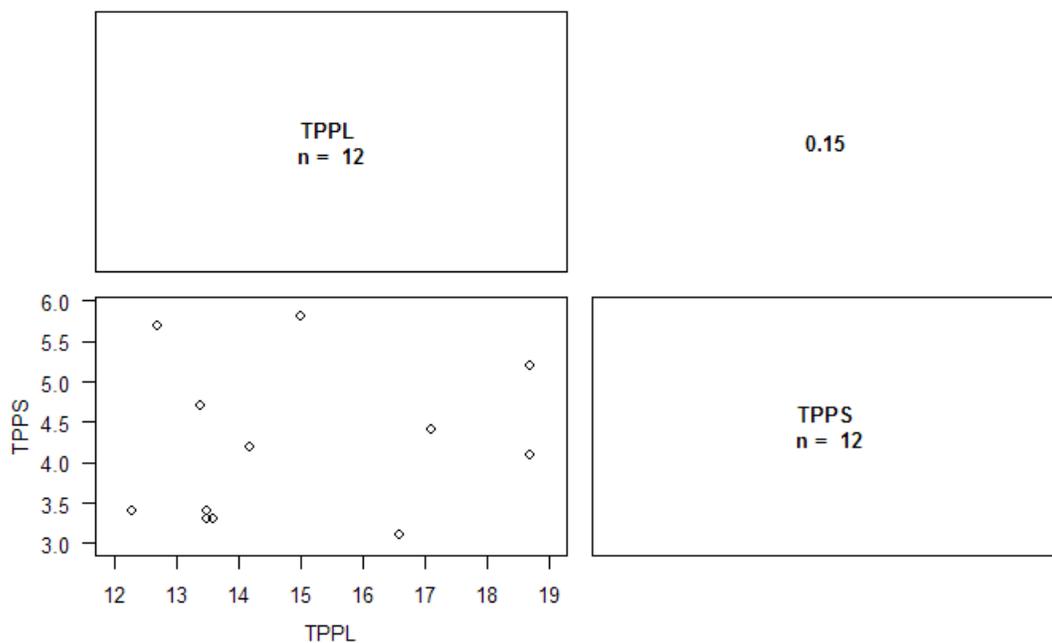


Figure 4 : Matrice de corrélations entre 2 variables décrivant les taux de passage de la phase liquide et solide TPPL et TPPS respectivement. Les coefficients de corrélation sont indiqués en haut à droite au-dessus de la diagonale. La significativité du test de Pearson est indiquée par le code suivant : $0,1 > p\text{-value} > 0,05 = \text{' '}$; $0,05 > p\text{-value} > 0,01 = \text{'*'}$; $0,01 > p\text{-value} > 0,001 = \text{'**'}$; $0,001 > p\text{-value} = \text{'***'}$.

Le coefficient de corrélation entre TPPL et TPPS est de 0,15, nous conservons donc ces deux variables pour caractériser les sorties du rumen.

Voici la matrice de corrélation des variables conservées (figure 5) pour décrire les chèvres ainsi que l'ACP de ces variables (figure 6).

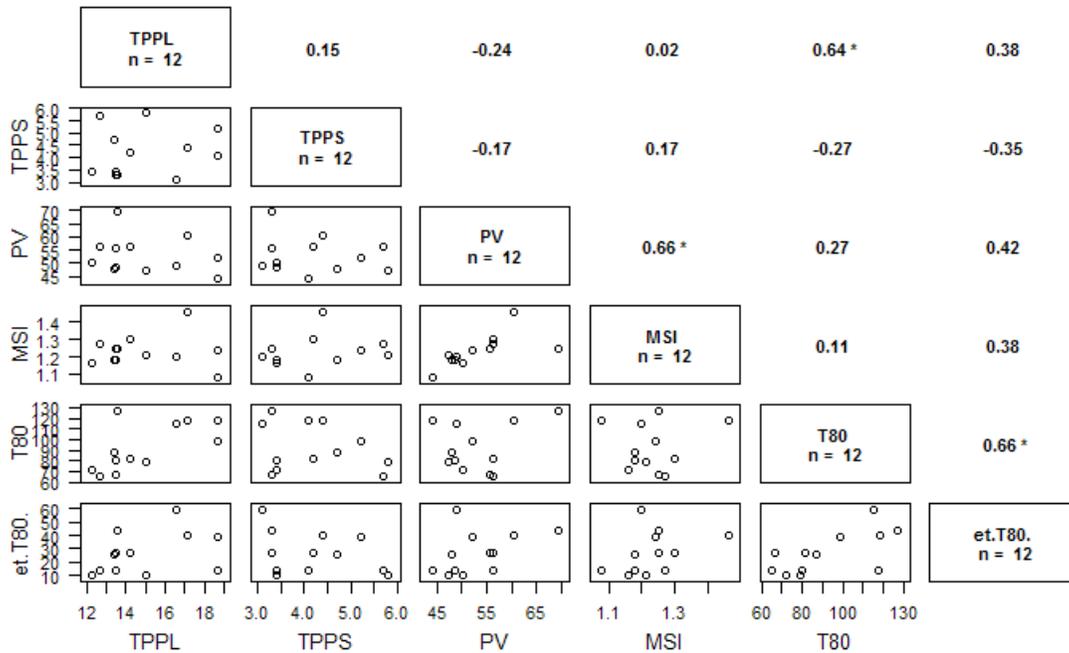


Figure 5 : Matrice de corrélations des variables conservées pour caractériser les chèvres. La significativité du test de Pearson est indiquée par le code suivant : $0,1 > p\text{-value} > 0,05 = ^{\cdot}$; $0,05 > p\text{-value} > 0,01 = ^{\cdot\cdot}$; $0,01 > p\text{-value} > 0,001 = ^{\cdot\cdot\cdot}$; $0,001 > p\text{-value} = ^{\cdot\cdot\cdot\cdot}$. Les 6 variables conservées sont : les taux de passage de la phase liquide (TPPL) ; Les taux de passage de la phase solide (TPPS) ; Le poids vif des chèvres (PV) ; la matière sèche ingérée (MSI) ; le temps où la consommation a atteint 80 % de la consommation total sur le repas du soir (T80) ; et l'écart type de T80 (et(T80)).

Les caractéristiques des animaux décrivant les flux de matière dans le rumen sont, concernant l'ingestion, MSI, T80 et et(T80). Les flux de sortie des rumens sont décrits par les variables TPPL et TPPS. La seule corrélation significative entre les variables caractérisant les entrées et les sorties concernent TPPL qui est corrélé positivement à T80. La figure 6 ci-dessous est une ACP reprenant ces variables permettant de voir la répartition des chèvres sur les 2 premières dimensions.

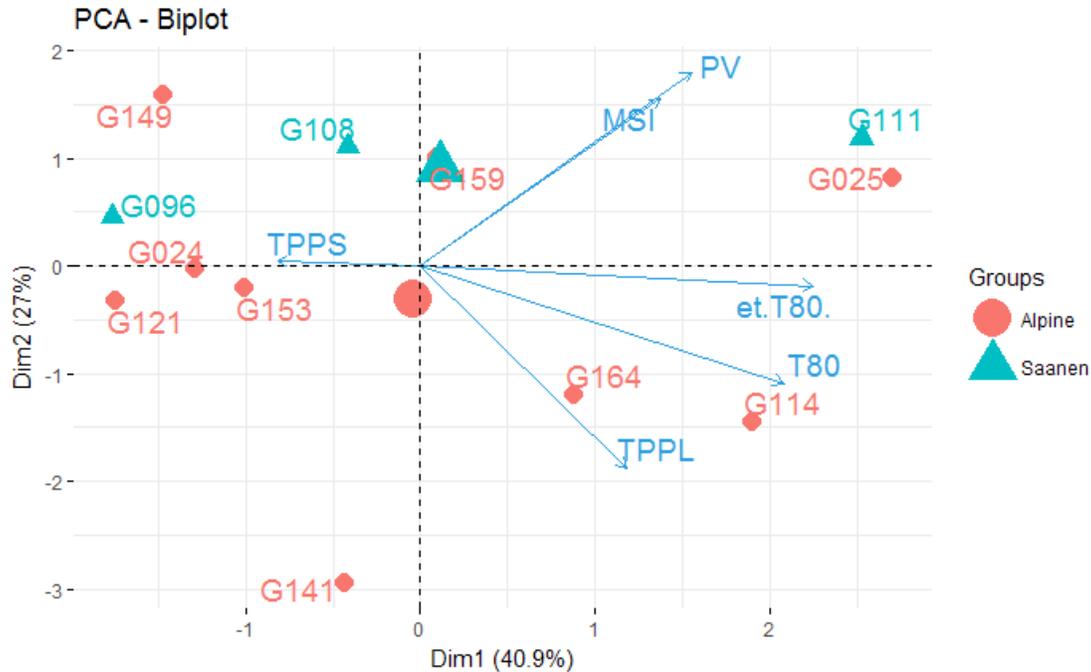


Figure 6 : Représentation d'une ACP avec les variables conservées pour décrire les 12 chèvres. Les chèvres sont représentées sur le graphique avec des ronds rouges pour les Alpines et des triangles verts pour les Saanen. Les barycentres de ces 2 groupes sont également représentés. Les variables conservées sont représentées par des flèches bleues. Il s'agit : des taux de passage de phase liquide (TPPL) ; des taux de passage de la phase solide (TPPS) ; du poids vif des chèvres (PV) ; de la matière sèche ingérée (MSI) ; du temps où la consommation a atteint 80 % de la consommation sur le repas du soir (T80) ; et de l'écart type de T80 (et(T80)). La dimension 1 représente 40,9 % de la variabilité et la dimension 2 représente 27 % de la variabilité.

Les 2 axes de l'ACP représentent près de 68 % de la variabilité totale. L'axe 1 représente 40,9% de cette variabilité. Les chèvres en haut à gauche sur le graphique ont un faible taux de passage de la phase liquide, consomment rapidement leur ration et ont peu de variabilité sur ce temps et inversement pour les animaux situés en bas à droite. L'axe vertical représente quant à lui 27 % de la variabilité. Les animaux en bas à gauche de cet axe sont plus légers et mangent moins et inversement pour les animaux représentés en haut à droite de cet axe. Le taux de passage de la phase solide n'est pas très bien représenté sur cette ACP. Les animaux sont plutôt bien répartis sur l'ensemble de l'espace représenté. La variable supplémentaire qualitative indiquant la race apporte peu d'information. Nous n'observons pas de différences significatives entre les races de chèvre sur ces 6 variables à l'exception d'une tendance ($P = 0,064$), à savoir un TPPS plus élevé chez les Alpines que chez les Saanen.

1.3.2 Evolution et composition des microbiotes ruminiaux

La composition du microbiote 53 jours avant la synchronisation au niveau des familles est représentée sur l'histogramme figure 7.

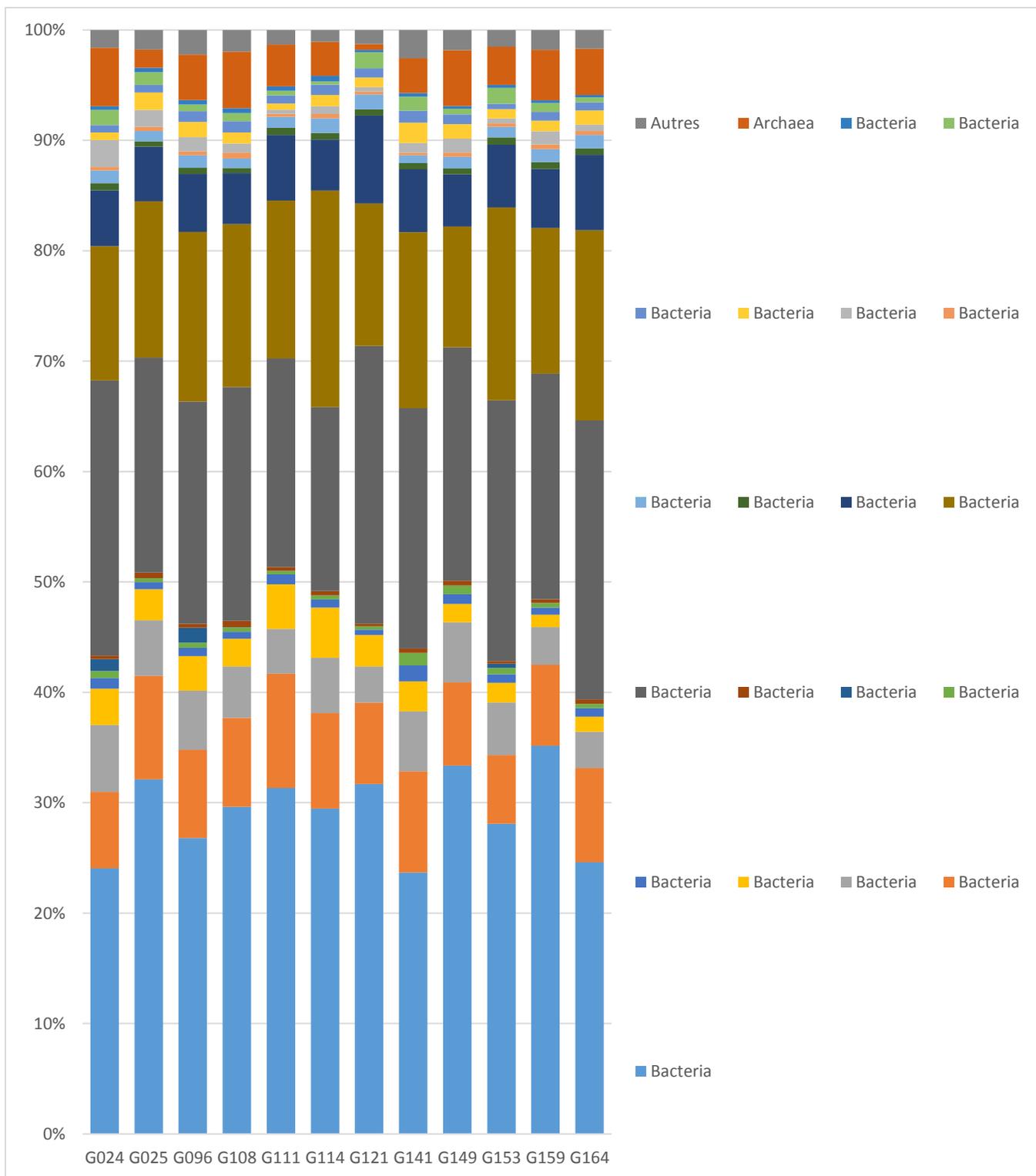


Figure 7 : Histogramme des abondances relatives des bactéries et archées au niveau des familles 53 jours avant la synchronisation des rumens. Les familles ayant été observées moins de 5 000 fois sont placées dans la catégorie « Autres ». Les 12 chèvres sont identifiées sur l'axe des abscisses.

Avant la synchronisation 20 familles principales sont identifiées au sein des contenus ruminiaux des 12 chèvres. Les 5 familles les plus représentées sont : les Bacteroidetes avec *Prevotellaceae* et *Rikenellaceae*, et les Firmicutes avec *Ruminococcaceae*, *Christensenellaceae* et *Lachnospiraceae*.

Dans un premier temps, pour avoir une première information sur l'évolution des communautés microbiennes, nous regardons la diversité intra-échantillon : la diversité alpha. Cette dernière peut être appréciée par la richesse qui nous indique le nombre d'OTU observés par temps. Nous disposons d'un prélèvement par chèvre pour les 12 animaux à 5 temps différents, soit 60 échantillons. Le graphique (figure 8) reprend la distribution des valeurs observée pour les chèvres par temps à l'aide de boîtes à moustaches :

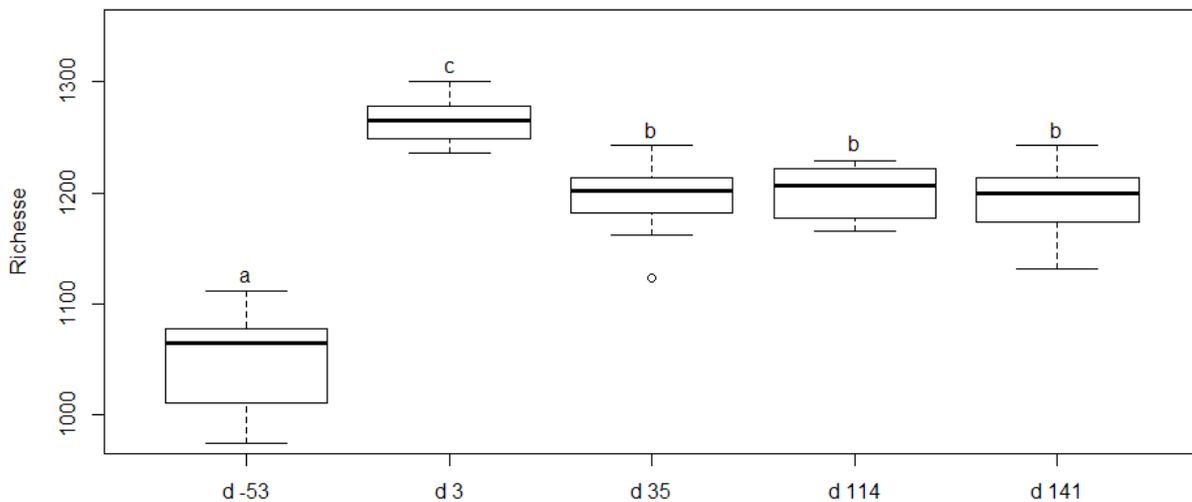


Figure 8 : Boîtes à moustaches représentant la richesse par temps des différents prélèvements de contenus ruminiaux. Ces 5 temps d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141 se situent autour d'une synchronisation du microbiote qui a eu lieu à d 0. Les comparaisons des richesses 2 à 2 ont été réalisées par un test de Wilcoxon. Si 2 groupes partagent une même lettre alors ils ne sont pas significativement différents, au contraire si 2 groupes ne partagent pas une lettre alors ils sont significativement différents.

Sur l'ensemble de l'essai nous avons observé 1488 OTU. Nous remarquons que 3 jours après la synchronisation des contenus ruminiaux, la richesse augmente significativement passant de 1 050 à 1 250 OTU en moyenne par chèvre. Le nombre d'OTU se stabilise à un niveau intermédiaire, significativement différent de la situation initiale et de la situation à d 3, aux alentours de 1200 OTU. Les moyennes des OTU identifiées par chèvre durant les 3 derniers prélèvements (d 35, d 114 et d 141) ne sont pas significativement différentes.

L' α -diversité peut également être regardée sous un autre angle avec l'indice de Shannon qui prend en compte en compte l'abondance des OTU. La figure 9 illustre à l'aide de boîtes à moustaches les diversités de Shannon par temps de prélèvement.

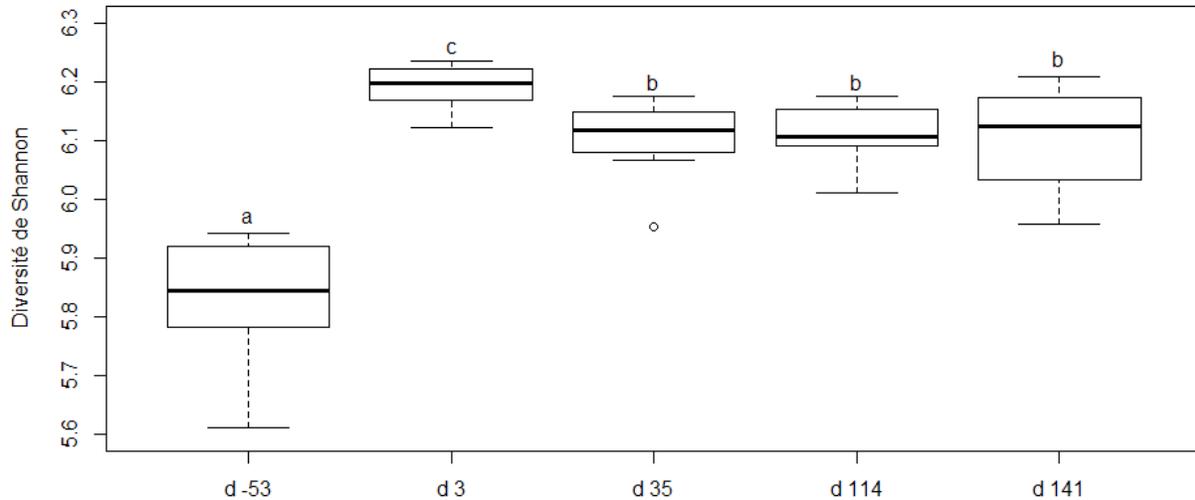


Figure 9 : Boîtes à moustaches représentant les indices de diversité de Shannon par temps des différents prélèvements de contenus ruminiaux. Ces 5 temps d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141 se situent autour d'une synchronisation du microbiote qui a eu lieu à d 0. Les comparaisons des richesses 2 à 2 ont été réalisées par un test de Wilcoxon. Si 2 groupes partagent une même lettre alors ils ne sont pas significativement différents, au contraire si 2 groupes ne partagent pas une lettre alors ils sont significativement différents.

Les indices de diversité de Shannon apportent une information similaire au graphique sur l'évolution de la richesse au cours de l'expérimentation. Trois jours après la synchronisation, nous constatons une augmentation significative de l'indice de Shannon avant de se stabiliser à un niveau intermédiaire. Seuls les 3 derniers prélèvements ne sont pas significativement différents.

Après avoir regardé l' α -diversité, nous nous intéressons aux évolutions des microbiotes ruminiaux au fil de l'expérimentation. Nous nous plaçons au niveau des OTU qui ont été observés au sein de ces 60 échantillons. Nous regardons ici la β -diversité (diversité inter-habitat) pour avoir un aperçu global de l'évolution des microbiotes. Nous avons réalisé une PCoA basée sur les distances de Bray-Curtis.

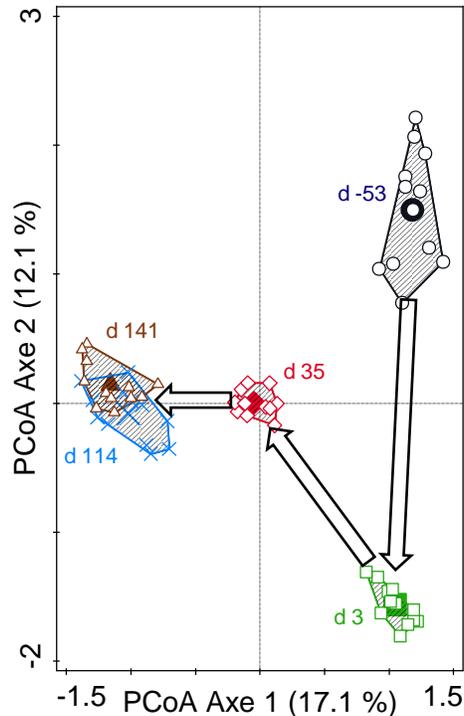


Figure 10 : Analyse d'ordination non contrainte des coordonnées principales (PCoA) des échantillons de contenus ruminiaux basée sur les dissimilarités des communautés de Bray Curtis. Les contenus ruminiaux des 12 chèvres ont été mélangés et homogénéisés à d 0. Les 5 jours de prélèvement sont 53 jours avant la synchronisation des contenus et 3, 35, 114 et 141 jours après. Les échantillons d'un même jour sont représentés avec le même symbole et entouré par un polygone de même couleur (d -53 : cercles noirs, d 3 : carrés verts, d 35 : losanges rouges, d 114 : croix bleues et d 141 triangles marron). Les flèches indiquent l'évolution chronologique.

Nous observons que la composition des microbiotes ruminiaux est différente entre tous les jours de prélèvement sauf pour d 114 et d 141 où les communautés semblent proches. Il n'y a pas de retour à l'état initial. Si nous nous focalisons sur les prélèvements suivant le mélange, nous remarquons qu'il y a encore des changements entre d 35 et d 114. La communauté microbienne n'est donc pas encore stabilisée un mois après la synchronisation des contenus. En revanche, nous ne pouvons pas identifier précisément le moment de stabilisation. Nous pouvons uniquement préciser que la stabilisation se fait entre le prélèvement à d 35 et celui à d 114. Nous avons la confirmation avec l'analyse de similarité (tableau 6) que seuls les prélèvements à d 114 et d 141 ne peuvent pas être décrits comme différents.

	d -53	d 3	d 35	d 114	d 141
d -53		R=0,613 (P=0,001)	R=0,782 (P=0,001)	R=0,896 (P=0,001)	R=0,886 (P=0,001)
d 3			R=0,940 (P=0,001)	R=0,969 (P=0,001)	R=0,990 (P=0,001)
d 35				R=0,947 (P=0,001)	R=0,947 (P=0,001)
d 114					R=0,045 (P=1)
d 141					

Tableau 6 : Analyse de similarité (one-way ANOSIM) testant les rangs des indices de dissimilarité de Bray-Curtis calculés à partir de la composition au niveau OTU des microbiotes des 12 chèvres entre les différents jours de prélèvement. La statistique R mesure la séparation entre 2 communautés. R = 1 indique des structures complètement différentes alors que R proche de 0 indique que les 2 communautés sont très proches. Ce critère est basé sur des comparaisons des rangs des distances intra et inter-groupes. Les R et P-values des comparaisons significativement différentes sont représentés en gras. Les p-values sont basées sur un test de permutation de Monte Carlo avec 999 permutations.

La quasi-superposition des 2 nuages de points des prélèvements de contenus ruminiaux à d 114 et d 141 sur la PCoA appuyé par un R très faible et non significatif dans l'analyse de similarité indique une proximité des structures de la communauté microbienne entre ces 2 jours de prélèvement. En s'appuyant sur cette analyse de similarité utilisant la distance écologique de Bray-Curtis tous les autres prélèvements ont des communautés différentes.

Après avoir observé les diversités alpha et bêta, nous allons identifier le nombre de familles et de genres qui diffèrent significativement en abondance relative entre les différents temps de prélèvement. Le tableau 7 reprend le nombre de familles, parmi l'ensemble des 20 familles ayant leurs séquences lues plus de 5 000 fois sur l'ensemble de l'essai, entre 2 temps qui ont une différence significative d'abondance relative.

	d -53	d 3	d 35	d 114	d 141
d -53		11	6	5	4
d 3			10	8	14
d 35				4	2
d 114					1
d 141					

Tableau 7 : Tableau présentant le nombre de familles parmi les 20 ayant leurs séquences lues plus de 5000 fois sur l'ensemble de l'expérimentation et ayant une différence significative entre 2 temps de prélèvement. Les temps de prélèvement sont 53 jours avant synchronisation et 3, 35, 114 et 141 jours après.

Nous constatons des évolutions très importantes entre les 3 premiers temps (d -53, d 3 et d 35) alors que les changements dans les communautés microbiennes sont plus limités entre les 3 derniers (d 35, d 114 et d 141). Le tableau 8 reprend la même approche pour les 36 genres dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois au cours de l'essai.

	d -53	d 3	d 35	d 114	d 141
d -53		13	8	6	9
d 3			16	16	21
d 35				9	4
d 114					2
d 141					

Tableau 8 : Tableau présentant le nombre de genres parmi les 36 dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois sur l'ensemble de l'expérimentation et ayant une différence significative entre 2 temps de prélèvement. Les temps de prélèvement sont 53 jours avant synchronisation et 3, 35, 114 et 141 jours après.

Nous constatons une analogie des évolutions qu'elles soient observées au niveau des genres ou au niveau des familles. Les différences de composition peuvent toucher entre 1 tiers et la moitié des genres les plus abondants entre deux points de prélèvement (d -53 et d 3 ; d 3 et d 35 ; d 3 et d 114 ; d 3 et d 141). Entre d 114 et d 141, parmi les 2 genres ayant des différences de composition, le genre *Prevotella 1*, qui est le genre avec l'abondance la plus élevée (supérieure à 20 %), passe de 24,7 à 20,9 %.

Les évolutions détaillées des familles et des genres dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois sur l'ensemble de l'expérimentation sont présentées dans les tableaux 9 et 10. La population des archées n'est pas significativement modifiée après la synchronisation des contenus ruminiaux. Les principales modifications de composition sont transitoires suivant la synchronisation. Un seul genre (*Erysipelotrichaceae UCG-004*) est modifié de façon stable après la synchronisation. D'autres genres ne sont pas stabilisés au prélèvement à d 3 tels que *Prevotellaceae UCG-004* et le genre *p-1088-a5 gut group* de la famille des *Planctomycetaceae* mais ils ont des proportions significativement différentes et stabilisées sur les 3 derniers prélèvements (d 35, d 114 et d 141).

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	d -53	d 3	d 35	d 114	d 141	P-value	
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	29.17 ^{ab}	32.19 ^c	27.13 ^a	29.69 ^{bc}	25.85 ^a	<0.0001	
				Rikenellaceae	8.13 ^{ab}	7.54 ^a	8.67 ^b	8.91 ^b	8.88 ^b	0.01	
				Bacteroidales BS11 gut group	4.65 ^{ab}	3.79 ^a	4.08 ^{ab}	4.24 ^{ab}	4.88 ^b	0.007	
				Bacteroidales S24-7 group	2.65 ^a	4.12 ^c	3.84 ^{bc}	2.60 ^a	3.00 ^{ab}	<0.0001	
				Bacteroidales UCG-001	0.80 ^c	0.32 ^a	0.53 ^b	0.54 ^{ab}	0.72 ^{bc}	<0.0001	
				Bacteroidales RF16 group	0.51 ^a	0.79 ^b	0.40 ^a	0.45 ^a	0.41 ^a	<0.0001	
				Bacteroidales_PeH15	0.23 ^{ab}	0.09 ^a	0.46 ^{ab}	0.75 ^b	0.97 ^b	0.008	
		Bacteroidetes BD2-2	unknown order	unknown family	0.38 ^b	0.19 ^a	0.22 ^a	0.42 ^{bc}	0.55 ^c	<0.0001	
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	21.55 ^c	17.62 ^a	20.68 ^{bc}	19.39 ^{ab}	20.11 ^{bc}	<0.0001	
				Christensenellaceae	14.84 ^{ab}	13.67 ^a	17.70 ^c	16.55 ^{abc}	17.46 ^{bc}	<0.0001	
				Lachnospiraceae	5.56 ^a	6.86 ^b	6.50 ^{ab}	6.03 ^{ab}	5.92 ^{ab}	0.007	
				Family XIII	0.57 ^a	0.72 ^c	0.60 ^{ab}	0.70 ^{bc}	0.75 ^c	<0.0001	
			Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	1.08 ^a	1.41 ^b	1.09 ^a	1.10 ^a	1.13 ^a	<0.0001
					Veillonellaceae	0.35	0.31	0.30	0.39	0.31	0.02*
			Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	1.00 ^b	0.48 ^a	0.36 ^a	0.38 ^a	0.45 ^a	<0.0001
		Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	1.11 ^a	1.80 ^b	0.86 ^a	0.98 ^a	0.98 ^a	<0.0001
		Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	0.82 ^{abc}	1.00 ^c	0.77 ^a	0.94 ^{bc}	0.80 ^{ab}	0.0004
	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF9	unknown family	0.87	1.03	0.73	0.75	0.79	NS	
	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	0.34 ^a	0.29 ^a	0.54 ^b	0.54 ^b	0.55 ^b	<0.0001	
	Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	3.67	4.01	2.99	3.18	3.84	0.03*

Légende :

1	diminution
2	
3	
4	
5	niveau initial
6	
7	augmentation
8	
9	

Tableau 9 : Abondances relatives en pourcentage des 20 familles dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois durant l'expérimentation aux différents temps de prélèvement des contenus ruminiaux (d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141) sachant qu'une synchronisation des contenus ruminiaux a été réalisée à d 0 (n = 12). La P-valeur de l'analyse testant l'évolution d'une famille en fonction du temps et prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite. Les lettres en exposant à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupes suite à un test de comparaison des moyennes ajustées avec une correction de Bonferroni quand le test était significatif. Un code couleur basé sur la composition initiale (d -53) facilite la lecture du tableau. Un écart de minimum 2 tons indique une différence significative avec la composition initiale. L'absence de couleur de fond ou les couleurs 4 et 6 indiquent un niveau non significativement différent du niveau initial. *Ce sont deux cas particuliers où le modèle général est significatif mais où le test de comparaison de moyennes ne montrait que des tendances sur la comparaison des valeurs extrêmes.

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	d -53	d 3	d 35	d 114	d 141	P-value				
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 1	24.41 ^{ab}	26.99 ^b	21.95 ^a	24.68 ^b	20.88 ^a	<0.0001				
					Prevotellaceae UCG-001	2.05	2.10	2.14	1.97	2.12	NS				
					Prevotellaceae UCG-003	1.44 ^b	1.15 ^{ab}	1.14 ^{ab}	1.18 ^{ab}	1.12 ^a	0.03				
					Prevotellaceae NK3B31 group	0.99 ^a	1.58 ^b	1.29 ^{ab}	1.11 ^a	1.03 ^a	0.0009				
					Prevotellaceae UCG-004	0.10 ^a	0.12 ^a	0.44 ^b	0.51 ^b	0.54 ^b	<0.0001				
				Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	7.79 ^{ab}	7.28 ^a	8.10 ^{ab}	8.54 ^b	8.43 ^{ab}	0.04				
				Multi-affiliation	0.26 ^{ab}	0.16 ^a	0.50 ^c	0.30 ^{ab}	0.38 ^{bc}	<0.0001					
				Bacteroidales BS11 gut group	unknown genus	4.65 ^{ab}	3.79 ^a	4.08 ^{ab}	4.24 ^{ab}	4.88 ^b	0.007				
				Bacteroidales S24-7 group	unknown genus	2.65 ^a	4.12 ^c	3.84 ^{bc}	2.60 ^a	3.00 ^{ab}	<0.0001				
				Bacteroidales UCG-001	unknown genus	0.80 ^c	0.32 ^a	0.53 ^b	0.54 ^{ab}	0.72 ^{bc}	<0.0001				
				Bacteroidales RF16 group	unknown genus	0.51 ^a	0.79 ^b	0.40 ^a	0.45 ^a	0.41 ^a	<0.0001				
				PeH15	unknown genus	0.23 ^{ab}	0.09 ^a	0.46 ^{ab}	0.75 ^b	0.97 ^b	0.008				
				Bacteroidetes BD2-2	unknown order	unknown family	unknown genus	0.38 ^b	0.19 ^a	0.22 ^a	0.42 ^{bc}	0.55 ^c	<0.0001		
				Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	14.78 ^{ab}	13.62 ^a	17.64 ^c	16.49 ^{abc}	17.40 ^{bc}	<0.0001	
								Ruminococcaceae NK4A214 group	5.53 ^{ab}	4.83 ^a	6.03 ^b	6.20 ^b	6.46 ^b	0.0004	
							Ruminococcaceae	Saccharofermentans	6.22 ^b	2.99 ^a	4.85 ^b	3.39 ^a	3.46 ^a	<0.0001	
								Ruminococcaceae UCG-014	2.53 ^a	3.28 ^b	2.18 ^a	1.82 ^a	1.87 ^a	<0.0001	
								Ruminococcus 1	2.16 ^{ab}	2.02 ^{ab}	2.58 ^b	1.76 ^a	1.60 ^a	0.0008	
	[Eubacterium] coprostanoligenes group	1.31 ^a	1.26 ^a					1.42 ^{ab}	1.29 ^a	1.62 ^b	0.0009				
	Ruminococcaceae UCG-005	0.99 ^b	0.59 ^a					0.81 ^{ab}	1.40 ^c	1.45 ^c	<0.0001				
	Papillibacter	0.58 ^{ab}	0.55 ^a					0.66 ^{abc}	0.80 ^{bc}	0.83 ^c	0.0005				
	Ruminococcus 2	0.48 ^{ab}	0.64 ^{ab}					0.45 ^a	0.83 ^b	0.84 ^{ab}	0.01				
	unknown genus	0.66	0.37					0.44	0.47	0.50	NS				
	Ruminococcaceae UCG-010	0.31	0.35					0.36	0.35	0.38	NS				
	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae XPB1014 group	1.45 ^{ab}					1.12 ^a	1.67 ^b	1.31 ^{ab}	1.57 ^{ab}	0.002			
	Lachnospiraceae AC2044 group	0.88 ^{ab}	0.95 ^b				0.63 ^a	0.94 ^b	0.80 ^{ab}	0.001					
	Butyrivibrio 2	0.45 ^a	0.81 ^b				0.66 ^{ab}	0.55 ^a	0.48 ^a	<0.0001					
	unknown genus	0.35	0.38				0.45	0.38	0.36	NS					
	Lachnospiraceae NK3A20 group	0.24 ^a	0.61 ^b				0.30 ^a	0.31 ^a	0.28 ^a	<0.0001					
	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae				Succiniclasticum	1.08 ^a	1.41 ^b	1.09 ^a	1.10 ^a	1.13 ^a	<0.0001		
	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae				Erysipelotrichaceae UCG-004	0.85 ^b	0.31 ^a	0.19 ^a	0.21 ^a	0.23 ^a	<0.0001		
	Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales				Fibrobacteraceae	Fibrobacter	1.11 ^a	1.80 ^b	0.86 ^a	0.98 ^a	0.98 ^a	<0.0001	
	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF9				unknown family	unknown genus	0.87	1.03	0.73	0.75	0.79	NS	
	Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales				Spirochaetaceae	Treponema 2	0.66 ^{ab}	0.83 ^b	0.66 ^a	0.79 ^{ab}	0.67 ^{ab}	0.004	
	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales				Planctomycetaceae	p-1088-a5 gut group	0.23 ^a	0.25 ^a	0.44 ^b	0.46 ^b	0.47 ^b	<0.0001	
	Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria				Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	3.66	3.89	2.92	3.10	3.77	0.03 [*]

Légende :

1	diminution
2	
3	
4	niveau initial
5	
6	
7	augmentation
8	
9	

Tableau 10 : Abondances relatives en pourcentage des 36 genres dont les séquences ont été lues plus de 5 000 fois durant l'expérimentation aux différents temps de prélèvement des contenus ruminiaux (d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141) sachant qu'une synchronisation des contenus ruminiaux a été réalisée à d 0 (n = 12). La P-value de l'analyse testant l'évolution d'un genre en fonction du temps et prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite. Les lettres majuscules à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupes suite à un test de comparaison des moyennes ajustées quand le test était significatif. Un code couleur basé sur la composition initiale (d -53) facilite la lecture du tableau. Un écart de minimum 2 tons indique une différence significative avec la composition initiale. L'absence de couleur de fond ou les couleurs 4 et 6 indiquent un niveau non significativement différent du niveau initial. *C'est un cas particulier où le modèle général est significatif mais le test de comparaison de moyennes ne montrait qu'une tendance sur la comparaison des valeurs extrêmes.

1.3.3 Relations entre la composition des microbiotes ruminiaux et les caractéristiques des chèvres

Les liens entre les variables précédemment sélectionnées pour caractériser les chèvres (TPPL, TPPS, MSI, T80 et et(T80)) et la composition du microbiote ruminal ont été testés aux différents temps de prélèvements (d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141) grâce à une analyse d'ordination contrainte.

Le résultat du test réalisé pour chacune des variables à chaque temps est présenté dans le tableau 11.

	d -53	d 3	d 35	d 114	d 141
TPPL	NS	-	NS	NS	NS
TPPS	-	NS	NS	**	**
MSI	NS	NS	NS	NS	NS
T80	*	NS	NS	NS	NS
et(T80)	-	NS	NS	NS	NS

Tableau 11 : Tableau reportant la significativité des variables caractérisant les chèvres testées une à une par temps de prélèvement avec une analyse de redondance (RDA) avec une procédure de permutation de Monte Carlo. La significativité des tests est indiquée : non significatif « NS » ; en tendance $0,1 > p\text{-value} > 0,05$ « - » ; $0,05 > p\text{-value} > 0,01$ « * » et $0,01 > p\text{-value}$ « ** ». Les variables testées sont : les taux de passage de la phase liquide (TPPL) ; les taux de passage de la phase solide (TPPS) ; la matière sèche ingérée (MSI) ; le temps où la consommation a atteint 80 % de la consommation sur le repas du soir (T80) ; et l'écart type de T80 (et(T80)). Les temps de prélèvement sont 53 jours avant synchronisation et 3, 35, 114 et 141 jours après.

Avant la synchronisation à d -53 le comportement alimentaire avec T80 et et(T80) et les taux de passage avec la variable TPPS ont des liens significatifs ou en tendance avec la composition du microbiote. Trois jours après la synchronisation, seule une tendance pour le taux de passage de la phase liquide TPPL est observée. Aucun lien n'est trouvé 35 jours après synchronisation mais pour les 2 derniers prélèvements le taux de passage de la phase solide (TPPS) a un lien significatif avec la composition du microbiote ruminal.

Pour compléter ces résultats, une analyse d'ordination contrainte avec sélection de variable a été réalisée par jour de prélèvement. Pour un temps donné, cette procédure classe par ordre décroissant de leurs effets partiels (effet du prédicteur en plus des prédicteurs sélectionnés aux étapes précédentes) les prédicteurs potentiels (TPPL, TPPS, MSI, T80 et et(T80)) à chaque étape de sélection. Le prédicteur avec l'effet partiel le plus important est intégré si sa p-value corrigée est significative. Dans ce cas, la procédure recommence le classement selon les effets partiels des prédicteurs potentiels non-sélectionnés aux étapes précédentes et ainsi de suite. Le processus itératif s'arrête quand la p-value corrigée des prédicteurs potentiels restant est non significative. Les résultats obtenus pour d -53, d 3, d 35, d 114 et d 141 sont présentés ci-dessous.

Pour les 3 premiers jours de prélèvement d -53, d 3, et d 35, parmi les 5 prédicteurs potentiels TPPL, TPPS, MSI, T80 et et(T80), aucun n'a d'effet significatif sur la composition de la communauté des bactéries et des archées du rumen des 12 chèvres. En revanche pour le prélèvement à d 114, environ 4 mois après la synchronisation des contenus ruminiaux, la variable

TPPS ressort significative de la procédure de sélection de variable indiquant un lien avec la communauté microbienne ruminale. Le graphique RDA obtenu est présenté figure 11.

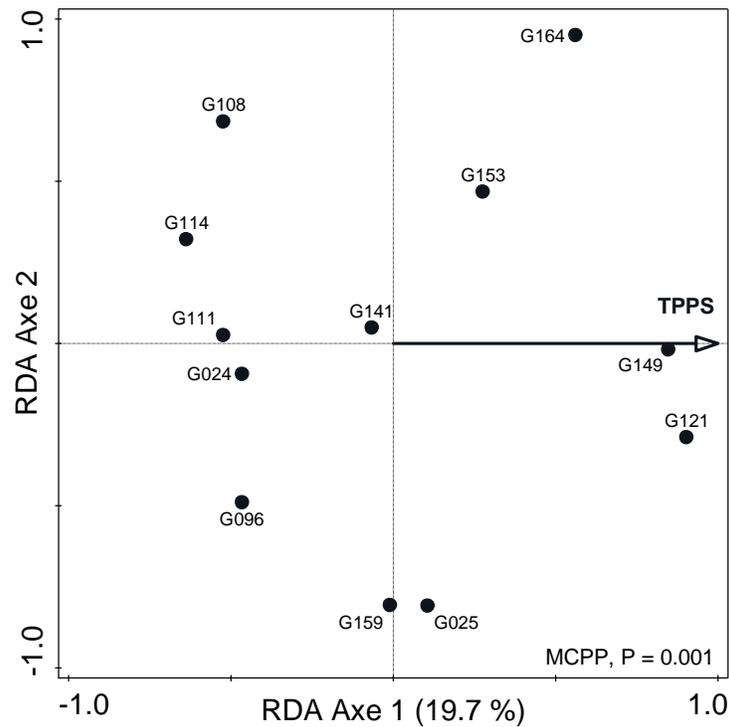


Figure 11 : Graphique de l'analyse de redondances (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 12 chèvres 114 jours après la synchronisation des contenus ruminiaux. Les échantillons de chaque chèvre sont identifiés par la lettre G suivie des 3 derniers chiffres de leurs numéros d'identification. Le diagramme d'ordination est contraint par les variables caractérisant les chèvres sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où cette variable augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. La variable sélectionnée ici est le taux de passage de la phase solide (TPPS). Les variables non sélectionnées sont le taux de passage de la phase liquide (TPPL), la matière sèche ingérée (MSI), le temps pour consommer 80% de la ration (T80) et la variabilité de ce temps (et(T80)). Le premier axe représente 19,7 % de la variabilité. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».

Pour le prélèvement à d 141, environ 5 mois après la synchronisation des contenus ruminiaux, nous retrouvons un résultat semblable à celui obtenu à d 114. La variable TPPS ressort significative de la procédure de sélection de variable indiquant un lien avec la communauté microbienne ruminale. Le graphique RDA obtenu est présenté figure 12.

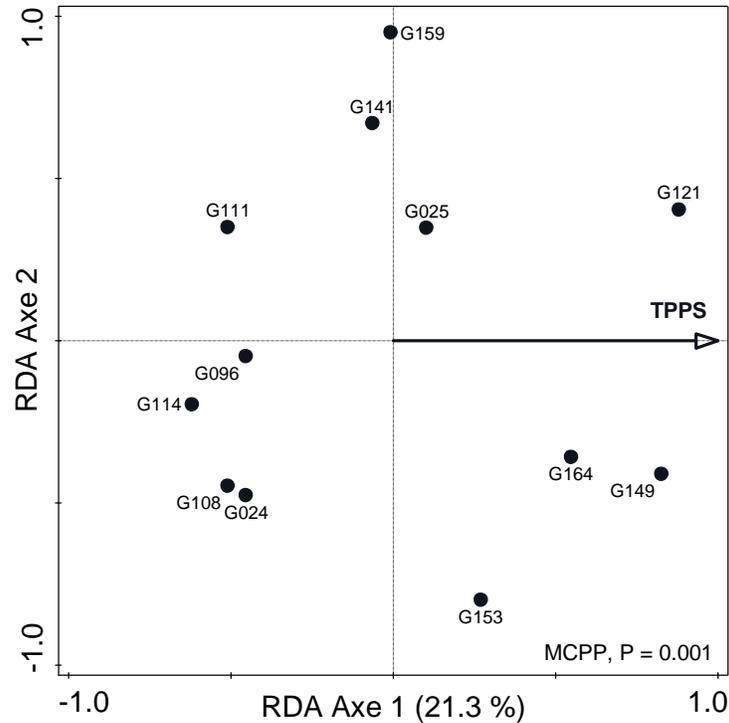


Figure 12 : Graphique de l'analyse de redondances (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log transformées du microbiote ruminal des 12 chèvres 141 jours après la synchronisation des contenus. Les échantillons de chaque chèvre sont identifiés par la lettre G suivie des 3 derniers chiffres de leurs numéros d'identification. Le diagramme d'ordination est contraint par les variables caractérisant les chèvres sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où cette variable augmente. La p-value obtenu par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. La variable sélectionnée ici est le taux de passage de la phase solide (TPPS). Les variables non sélectionnées sont le taux de passage de la phase liquide (TPPL), la matière sèche ingérée (MSI), le temps pour consommer 80% de la ration (T80) et la variabilité de ce temps (et(T80)). Le premier axe représente 21,3 % de la variabilité. MCP : « Monte Carlo permutation procedure ».

La variable TPPS explique, ici, un petit peu plus de variabilité avec 21,3 % à d 141. L'effet du TPPS étant retrouvé lors des 2 derniers prélèvements de contenus ruminiaux. Nous cherchons à mettre en évidence les familles et les genres associés à cette variable sur ces prélèvements. Les tableaux 12 et 13 synthétisent ces résultats au niveau des familles et au niveau des genres.

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	d114	d141
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	NS	NS
				Rikenellaceae	-0.54-	NS
				Bacteroidales BS11 gut group	NS	0.54*
				Bacteroidales S24-7 group	NS	NS
				Bacteroidales UCG-001	NS	0.78*
				Bacteroidales RF16 group	NS	0.69*
				Bacteroidales_PeH15	-0.73*	-0.72*
	Bacteroidetes BD2-2	unknown order	unknown family	0.50-	0.63*	
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NS	NS
				Christensenellaceae	NS	NS
				Lachnospiraceae	0.52-	0.70*
				Family XIII	NS	NS
		Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	0.50-	NS
		Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	NS	0.63*
		Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	0.57-
	Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	NS	0.69*
Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF9	unknown family	NS	0.59*	
Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	-0.64*	-0.69*	
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	NS	-0.55-

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des corrélations entre le taux de passage de la phase solide (TPPS) des 12 chèvres et la composition des 20 familles principales observées dans leurs microbiotes ruminiaux 114 (d 114) et 141 jours (d 141) après synchronisation de leur contenu. Dans les colonnes d 114 et d 141 sont indiqués la significativité du test : non significatif « NS » ; en tendance $0,1 > p\text{-value} > 0,05$ « - » ; $0,05 > p\text{-value}$ « * ». Dès que le test est au moins en tendance, le coefficient de corrélation de Spearman rho est indiqué. Ainsi, un coefficient positif indiquera une augmentation de la famille avec une augmentation du TPPS alors qu'un coefficient négatif indiquera une diminution de la famille avec l'augmentation du TPPS.

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	d 114	d 141		
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 1	NS	NS		
					Prevotellaceae UCG-001	NS	NS		
					Prevotellaceae UCG-003	NS	0.65*		
					Prevotellaceae NK3B31 group	NS	NS		
					Prevotellaceae UCG-004	NS	NS		
				Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	-0.56-	NS		
				Multi-affiliation		NS	NS		
				Bacteroidales BS11 gut group	unknown genus	NS	0.54-		
				Bacteroidales S24-7 group	unknown genus	NS	NS		
				Bacteroidales UCG-001	unknown genus	NS	0.78*		
				Bacteroidales RF16 group	unknown genus	NS	0.69*		
				PeH15	unknown genus	-0.73*	-0.72*		
				Bacteroidetes BD2-2	unknown order	unknown family	unknown genus	0.50-	0.63*
				Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	NS
	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae NK4A214 group	NS				-0.68*		
	Saccharofermentans		0.73*				NS		
	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-014	NS				0.54-		
	Ruminococcus 1		NS				0.87*		
	[Eubacterium] coprostanoligenes group		NS				NS		
	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-005	NS				NS		
	Papillibacter		NS				NS		
	Ruminococcus 2		NS				NS		
	unknown genus		NS				NS		
	Ruminococcaceae	Ruminococcaceae UCG-010	NS				NS		
	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae XPB1014 group	0.57-				0.54-		
	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae AC2044 group	NS				NS		
	Butyrivibrio 2		0.58*				0.67*		
	unknown genus		NS				NS		
	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK3A20 group	NS				NS		
	Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae				Succiniciasticum	0.50-	NS
	Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae				Erysipelotrichaceae UCG-004	NS	0.53-
	Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	Fibrobacter	0.57-	0.80*		
	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF9	unknown family	unknown genus	NS	0.59*		
	Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema 2	NS	0.56-		
	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	p-1088-a5 gut group	-0.55-	-0.75*		
	Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	NS	-0.55-	

Tableau 13 : Tableau récapitulatif de l'effet du taux de passage de la phase solide (TPPS) des 12 chèvres sur la composition des 36 genres principaux observés dans leurs microbiotes ruminiaux 114 (d 114) et 141 jours (d 141) après synchronisation de leur contenu. Dans les colonnes d 114 et d 141 sont indiqués la significativité du test : non significatif « NS » ; en tendance $0,1 > p\text{-value} > 0,05$ « - » ; $0,05 > p\text{-value}$ « * ». Dès que le test est au moins en tendance le coefficient de corrélation de Spearman rho est indiqué. Ainsi, un coefficient positif indiquera une augmentation du genre avec une augmentation du TPPS alors qu'un coefficient négatif indiquera une diminution du genre avec l'augmentation du TPPS.

Les familles et les genres qui nous intéressent sont celles et ceux pour qui nous retrouvons un lien significatif lors des 2 prélèvements à d 114 et d 141. Sur les 20 familles, 5 sont corrélées avec TPPS et sur 36 genres 6 sont corrélés avec TPPS. Les deux taxons corrélés négativement sont des familles *Bacteroidales-PeH15* et *Planctomycetaceae p-1088-a5 gut group*. Les genres corrélés positivement à TPPS sont *Fibrobacter*, *Butyrivibrio 2*, *Lachnospiraceae XPB1014 group* et un genre non identifié de la classe *Bacteroidetes BD2-2*.

1.4 DISCUSSION

Pour contribuer à une meilleure compréhension de l'effet de l'hôte sur son microbiote ruminal, l'objectif principal de notre essai était de suivre l'évolution de la composition de la communauté microbienne après la synchronisation des contenus ruminiaux. En effet, ce suivi, après la perturbation de l'écosystème microbien induite par la synchronisation, permet de tester les hypothèses de spécificité (composition liée à l'animal hôte) et de résilience (restauration de la composition initiale après perturbation) des microbiotes (Weimer, 2015b) de chèvres tarées.

Dans cette expérimentation, avec cette ration riche en fibres, il semblerait que la plasticité de la communauté microbienne soit privilégiée par rapport à la résilience, c'est-à-dire la stabilisation de la communauté microbienne ruminale à un état différent de celui avant synchronisation, environ 5 mois après cette dernière. En effet, les microbiotes ruminiaux des 12 chèvres ont suivi une même trajectoire d'évolution. Il a été montré que l'alimentation est un facteur influençant la structure du microbiote (McCann et al., 2014). Dans notre situation, nous ne pouvons pas exclure l'effet du changement alimentaire moins d'une semaine avant la synchronisation. Le prélèvement à d -53 a donc été réalisé pendant la distribution d'un aliment qui n'est pas celui distribué pendant les autres prélèvements. La composition chimique des 2 aliments est suffisamment proche pour penser que les résultats auraient été similaires avec un même aliment. L'ajout d'une matière première, la luzerne déshydraté brins long peut malgré tout entraîner des besoins potentiellement différents en quantité et en qualité d'enzymes pour fractionner et dégrader la structure végétale. Les deux composants les plus impactés sont ADL et amidon qui ont augmenté de 7,1 % pour ADL passant de 4,2 à 4,5 % et pour l'amidon passant de 7,0 à 7,5 %.

Le second objectif de notre essai était de mieux comprendre l'effet de l'animal hôte sur la structure de sa communauté microbienne ruminale. Avant la synchronisation, les flux d'entrée (T80 et et(T80)) et de sortie (TPPS) étaient liés à la communauté microbienne ruminale. Ces relations résultaient de l'historique de l'animal. En revanche, après la synchronisation, les microbiotes ruminiaux ont une même composition de départ pour l'ensemble des chèvres de l'essai. En supposant que les interactions biologiques entre les microorganismes composants la chimère (mutualisme, commensalisme, neutralisme, amensalisme, parasitisme et compétition) aboutiraient en un même résultat dans des environnements identiques, les seules pressions de sélection après la synchronisation pouvant amener à des différences de structure des communautés microbiennes sont les caractéristiques propres à chaque chèvre. Seul TPPS est lié significativement à la composition du microbiote lors des prélèvements réalisés 114 et 141 jours après la synchronisation. Les chèvres sembleraient contrôler par leur TPPS 6 genres bactériens parmi les 36 majoritaires.

Pour contextualiser nos résultats avec la bibliographie, voici les principales caractéristiques de nos chèvres mises en relation avec de précédentes expérimentations. La moyenne des taux de passage de la phase solide des rumens est de 4,2 %. h^{-1} dans notre essai. Ces valeurs sont très proches de 4,1 %. h^{-1} , observé comme taux de renouvellement du foin dans le rumen de chèvres laitières (Santini et al., 1992). Concernant les taux de renouvellement de la phase liquide du rumen, nous trouvons une moyenne de 14,9 %. h^{-1} ce qui est largement supérieur aux valeurs observées dans la même étude de 1992 indiquant une valeur moyenne de 4,4 %. h^{-1} (Santini et al., 1992). En plus des différences de méthode d'estimation de ces taux de renouvellement, il a été montré sur des ovins (De Vega and Poppi, 1997) et sur des bovins (Krizsan et al., 2010) que ces derniers diffèrent selon les matières premières composants la ration donnée aux animaux. Par exemple, les taux de passage pour les fourrages suivant sont du plus petit au plus grand pour l'herbe fraîche, l'ensilage d'herbe, la luzerne sèche ou ensilée et les mélanges de luzerne et d'ensilage de maïs (Krizsan et al., 2010). En plus de la composition de la ration, le niveau d'ingestion influence les taux de passage. En effet plus un animal consomme de matière sèche, plus ses taux de passage de la phase solide et liquide sont élevés (Sauvant et al., 2018). Une autre étude de 1993 sur des chèvres Saanen consommant une ration riche en fibres présente un taux moyen de passage de la phase liquide de 9,9 %. h^{-1} (Silanikove et al., 1993), ce qui est beaucoup plus proche de nos mesures.

Concernant le comportement alimentaire des chèvres taries rationnées consommant une ration d'entretien, il est difficile de faire des comparaisons avec la bibliographie. Nos chèvres mangent vite avec un T80 moyen de 92 minutes. Cette vitesse de consommation est proche de la durée moyenne d'un repas d'une chèvre consommant du foin, estimé à 108 minutes (Morandferh et al., 1991). Nous observons peu de variabilité entre les chèvres dans leurs cinétiques d'ingestion, sans doute en raison du rationnement des animaux sur les périodes de cases individuelles. Pour que les animaux puissent pleinement exprimer leurs comportements alimentaires, une alimentation distribuée *ad libitum* serait préférable.

La méthode de synchronisation des contenus ruminiaux est une nouvelle méthode qui n'a pas été utilisée dans la bibliographie. La méthodologie utilisée par l'équipe de de Mulder (2018) avait déjà pour avantage de fournir un même microbiote à 4 animaux (division d'un contenu en quatre). En revanche cette méthode ne pouvait pas être utilisée pour donner le même microbiote à 12 individus. Les quantités reçues pour chacune des chèvres auraient été trop faibles. Nous avons préféré utiliser des contenus mélangés pour donner à chaque individu une quantité très proche de celle qui lui a été retirée. Cela a pour avantage de limiter les modifications sur les taux de passage qui sont des caractéristiques d'intérêt dans notre expérimentation. Nous avons donc peu de recul sur cette méthode de synchronisation. Nous constatons qu'elle a une influence sur la richesse du microbiote, c'est-à-dire sur le nombre d'OTU différents observés au sein de la communauté microbienne ruminale. Avec un contenu contenant l'intégralité des espèces composant les microbiotes de 12 chèvres juste après la synchronisation, nous constatons une richesse plus importante à d 3 par rapport à d -53. Plus d'un mois après la synchronisation, à d 35, d 114 et d 141, la richesse semble être stabilisée à une valeur intermédiaire. La synchronisation conduit donc à une augmentation de près de 14 % de la richesse. Les avantages de cette technique de synchronisation sont : (1) de fournir un même microbiote à un instant t aux animaux, (2) de leur fournir l'ensemble des espèces microbiennes du groupe d'animaux participant à la procédure et (3) d'étudier l'effet de l'hôte sur son microbiote pour mieux comprendre les interrelations entre l'hôte et son microbiote.

Le microbiote ruminal de nos 12 chèvres 53 jours avant la synchronisation des contenus ruminiaux représente la composition sans expérimentation de ces animaux, élevés dans le même bâtiment depuis leur naissance avec le même historique environnemental. Il est constitué majoritairement de 20 familles et 36 genres de bactéries et d'archées. Les 5 familles prédominantes par ordre décroissant sont : *Prevotellaceae* ($29,2 \pm 3,8$ %), *Ruminococcaceae* ($21,6 \pm 2,7$ %), *Christensenellaceae* ($14,8 \pm 2,5$ %), *Rikenellaceae* ($8,1 \pm 1,2$ %) et *Lachnospiraceae* ($5,6 \pm 1,0$ %). Ces 5 familles représentent près de 80 % du microbiote ruminal de ces chèvres. Ces résultats sont en accord avec les résultats observés sur 37 échantillons de contenus ruminiaux de chèvres à travers le monde (Henderson et al., 2015). Une comparaison précise de la composition n'est pas possible car de nombreux facteurs dont la composition de l'alimentation a un effet sur la composition du microbiote (Loor et al., 2016). Le moment de prélèvement des contenus ruminiaux par rapport à la distribution de l'aliment a également un effet sur la composition du microbiote. En effet, les différences concernant la présence ou l'absence des microorganismes sont moins marquées que les différences concernant leurs abondances (Li et al., 2009; Welkie et al., 2010). Enfin, les technologies utilisées pour extraire et analyser les gènes d'ARNr 16S, ainsi que les régions ou l'intégralité du gène séquencé ou même la procédure pour obtenir les OTU à partir des données brutes entraînent des différences sur les résultats obtenus.

L'analyse de la β -diversité dans notre essai va à l'encontre des résultats observés pour les échanges de contenus ruminiaux chez la vache. L'évolution des microbiotes ruminiaux des différentes chèvres suit une même trajectoire pour se stabiliser sur un nouveau point d'équilibre différent de la situation avant échange. Au contraire, P. J. Weimer a observé sur 3 paires de vaches en lactation après échange des contenus ruminiaux un ré-établissement de la communauté microbienne proche de la situation avant échange (Weimer et al., 2017). Ce retour à la situation initiale est plus mitigé sur ses expériences conduites en 2010 où il a réalisé, avec son équipe, un échange de contenus pour 2 paires de vaches en lactation. Les structures des microbiotes ruminiaux de la première paire de vaches sont revenues à une situation proche de celle avant échange. Pour ce qui est de la 2^{ème} paire une évolution différente est observée. Les communautés microbiennes ont évolué vers une nouvelle situation, certes plus proches des compositions initiales que de celles du microbiote de l'animal donneur mais malgré tout différentes (Weimer et al., 2010). La caractéristique de résilience attribuée à la composition du microbiote ruminal d'un animal n'est pas retrouvée systématiquement, comme le montrent nos résultats obtenus sur les chèvres. Ce phénomène d'évolution vers un nouvel état stable plus de 100 jours après la synchronisation nous amène à conclure plutôt à une propriété de plasticité des communautés microbiennes. La résilience et la spécificité du microbiote ruminal liées à l'hôte (Weimer, 2015a) sont vraies pour certaines situations, mais le problème est plus complexe qu'il n'y paraît. L'identification du ou des facteurs qui influencent le résultat obtenu doivent être identifiés et testés pour mieux comprendre l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote. S'agit-il de l'alimentation et/ou du statut physiologique de l'animal ? Le fait que l'animal étudié dans les expérimentations d'évolution des microbiotes soit des chèvres ou des vaches influence-t-il le résultat obtenu ? Ce résultat atypique observé dans cet essai est-il lié au changement de ration entre le premier prélèvement de microbiote et la synchronisation ? Ces éléments sont à étudier pour mieux comprendre les évolutions observées.

Le microbiote ruminal peut être assimilé à une biocénose et le rumen peut être considéré comme un biotope. Les caractéristiques du biotope conditionnent la biocénose qui la compose. Les flux d'entrée et le TPPS sont corrélés significativement ou en tendance avec la composition du microbiote avant synchronisation. Ces relations sont issues de l'historique de l'animal avec son microbiote. Elles ne sont plus observées après la synchronisation à d3 ce qui atteste de la bonne homogénéisation des contenus. Ayant réintroduit un microbiote de même composition au sein du rumen de chacune des chèvres, théoriquement, aucune relation ne peut être trouvée entre les caractéristiques du rumen et cette composition commune. Cependant, nous observons une tendance pour la variable TPPL. L'hypothèse que nous pouvons faire est la suivante : le microbiote ruminal peut être modifié rapidement, en quelques jours, sous la contrainte du taux de passage de la phase liquide. Les quantités, la qualité, les fréquences, et les cinétiques d'ingestion de l'eau sont peut-être des facteurs modulant la composition de la structure microbienne. L'eau est une ressource primordiale pour l'élevage des ruminants. Nous savons que le niveau de production, la salivation, l'ingestion sont rapidement diminués après un manque de disponibilité en eau de boisson. Nous savons également que des qualités d'eau différentes n'entraînent pas la même consommation (Beede, 2012). Dans une expérimentation sur des chèvres, la composition de l'eau de boisson, en l'occurrence contenant une importante concentration de sel, a été identifiée comme étant potentiellement l'explication de la présence de certains taxons de microorganismes (Cunha et al., 2011). Un lien entre la variable TPPS et la composition du microbiote lors des prélèvements de d 114 et d 141 a été observée. Cette variable TPPS est intéressante car nous observons une importante variabilité entre les animaux, allant de

3,1 à 5,8 %·h⁻¹. La figure 13 illustre les mesures de TPPS pour chacune des chèvres faites sur les 3 périodes de mesures.

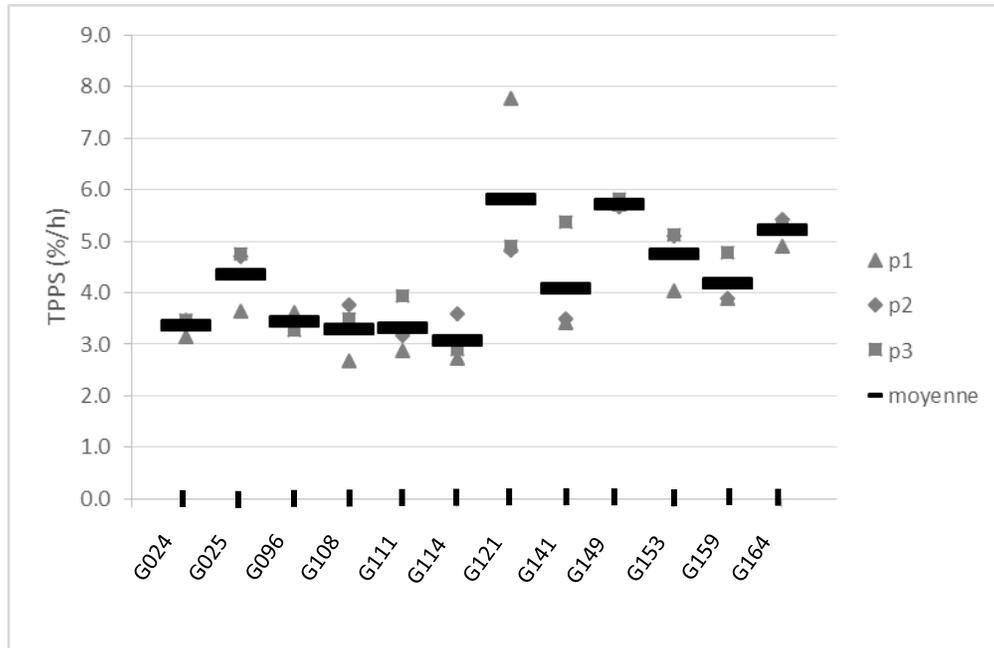


Figure 13 : Graphique illustrant la variabilité des mesures de taux de passage de la phase solide (TPPS) pour les 12 chèvres sur 3 périodes : p1 (de d -56 à d -51 représenté par des triangles gris), p2 (de d 14 à d 19 représenté par des losanges gris) et p3 (de d 133 à d 138 représenté par des carrés gris) avec d 0 correspondant à la synchronisation des contenus ruminiaux. Les moyennes de TPPS pour chacune des chèvres sont représentées par les rectangles noirs.

L'analyse de variance de l'effet chèvre sur la variable TPPS nous indique que la variabilité intra-chèvre est inférieure à la variabilité inter-chèvres. La p-value de ce modèle est inférieure à 0,001. Nous pouvons supposer que la variable TPPS est une caractéristique propre à l'animal. Concernant le lien entre ce taux de renouvellement et la composition du microbiote, nous constatons que pour les archées *Methanobrevibacter*, il est lié au TPPS à d 141. Plus le taux de renouvellement est élevé moins l'abondance de *Methanobrevibacter* est élevée. Ces résultats sont cohérents avec les premiers résultats observés *in vitro*, où l'augmentation du taux de passage de la phase solide en culture contribuait à la diminution du pH et de la production de méthane (Wenner et al., 2017). Les genres bactériens dont l'abondance est plus faible chez les animaux ayant des TPPS élevés sont : dans la famille *Planctomycetaceae* le genre *p-1088-a5 gut group* et la famille *PeH15* dans l'ordre *Bacteroidales*. Les genres qui ont une abondance plus élevée chez les animaux avec des TPPS élevés sont les 3 genres : *Lachnospiraceae XPB1014 group*, *Butyrivibrio 2* et *Fibrobacter*. Ces 3 genres seraient impliqués pour certaines des espèces qui les composent dans la digestion des fibres (cellulose pour *Fibrobacter succinogenes* et cellobiose pour *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrosolvens* et *Lachnospira multiparus*) (Fonty et al., 1995).

1.5 CONCLUSION

L'objectif de cette expérimentation était d'étudier la spécificité du microbiote liée à l'hôte ainsi que la résilience des microbiotes suite à une perturbation de l'écosystème ruminal. La synchronisation des contenus est une procédure novatrice qui permet d'étudier ces 2 questions en parallèle. En effet, la vidange, le mélange et la réintroduction de la chimère, dans chacun des rumens, fournit un même microbiote à un même moment à tous les animaux et induit une perturbation de l'écosystème ruminal. Pour des animaux nourris avec la même alimentation, quand ils reçoivent le même microbiote, seul l'animal exerce une pression de sélection sur son microbiote. Dans cette expérimentation, le taux de passage de la phase solide a été identifié comme une caractéristique influençant la composition de 5 familles et 6 genres bactériens parmi les 20 familles principales et les 36 genres principaux. Cette caractéristique participe certainement à la spécificité du microbiote lié à l'hôte. Le suivi de l'évolution de la composition microbienne sur l'ensemble de l'essai a montré que la composition du microbiote s'est stabilisée sur un nouvel état d'équilibre différent de celui avant synchronisation. La stabilisation n'était pas atteinte 35 jours après la synchronisation. Ces résultats indiquent qu'il est possible de modifier durablement la composition du microbiote dans les conditions de cet essai. Notre étude nous amène à conclure sur une propriété de plasticité du microbiote plutôt que sur une propriété de résilience. Cependant, le changement alimentaire entre le premier prélèvement et la synchronisation est un facteur de confusion avec la synchronisation. La composition chimique de l'aliment n'a que très peu été impactée par ce changement laissant supposé que les résultats auraient été les mêmes si ce changement n'avait pas eu lieu. Toutefois des résultats complémentaires doivent être obtenus avant de conclure. Dans la suite, nous pouvons nous demander si ces résultats seront les mêmes dans un contexte nutritionnel différent, par exemple avec des chèvres en lactation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beede, D. K. 2012. What will our ruminants drink? *Anim. Front.* 2:36–43. doi:10.2527/af.2012-0040.
- Bickhart, D. M., and P. J. Weimer. 2017. Host–rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows 1. *J. Dairy Sci.* 101:1–10. doi:10.3168/jds.2017-13328. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021730958X>
- Bokulich, N. A., S. Subramaniam, J. J. Faith, D. Gevers, J. I. Gordon, R. Knight, D. A. Mills, and J. G. Caporaso. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods.* 10:57.
- Ter Braak, C. J., and P. Šmilauer. 2012. Canoco reference manual and user’s guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer power.
- Cunha, I. S., C. C. Barreto, O. Y. A. Costa, M. A. Bomfim, A. P. Castro, R. H. Kruger, and B. F. Quirino. 2011. Bacteria and Archaea community structure in the rumen microbiome of goats (*Capra hircus*) from the semiarid region of Brazil. *Anaerobe.* 17:118–124. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.04.018.
- Dehority, B. A. 2002. Gastrointestinal tracts of herbivores, particularly the ruminant: Anatomy, physiology and microbial digestion of plants. *J. Appl. Anim. Res.* 21:145–160. doi:10.1080/09712119.2002.9706367.
- Douglas, J. L., H. J. Worgan, G. L. Easton, L. Poret, B. T. Wolf, A. Edwards, E. Davies, D. Ross, and N. R. Mcewan. 2016. Microbial diversity in the digestive tract of two different breeds of sheep. *J. Appl. Microbiol.* 120:1382–1389. doi:10.1111/jam.13060.
- Edgar, R. C., B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, and R. Knight. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27:2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- Escudié, F., L. Auer, M. Bernard, M. Mariadassou, L. Cauquil, K. Vidal, S. Maman, G. Hernandez-Raquet, S. Combes, and G. Pascal. 2018. Sequence analysis FROGS : Find , Rapidly , OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics.* 34:1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
- Fisher, R. M., L. M. Henry, C. K. Cornwallis, E. T. Kiers, and S. A. West. 2017. The evolution of host-symbiont dependence. *Nat. Commun.* 8:1–8. doi:10.1038/ncomms15973. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15973>
- Fonty, G., J.-P. Jouany, E. Forano, and P. Gouet. 1995. L’écossystème microbien du réticulo-rumen. In: *Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion.* INRA Editi. p. 299–347.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:1–9.
- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, L. Abecia, E. Angarita, P. Aravena, G. Nora Arenas, C. Ariza, G. T. Attwood, J. Mauricio Avila, J. Avila-Stagno, A. Bannink, R. Barahona, M. Batistotti, M. F. Bertelsen, A. Brown-Kav, A. M. Carvajal, L. Cersosimo, A. Vieira Chaves, J. Church, N. Clipson, M. A. Cobos-Peralta, A. L. Cookson, S. Cravero, O. Cristobal Carballo, K. Crosley, G. Cruz, M. Cerón Cucchi, R. de la Barra, A. B. De Menezes, E. Detmann, K. Dieho, J. Dijkstra, W. L. S. dos Reis, M. E. R. Dugan, S. Hadi Ebrahimi, E. Eythórsdóttir, F. Nde Fon, M. Fraga, F. Franco, C. Friedeman, N. Fukuma, D. Gagić, I. Gangnat, D. Javier Grilli, L. L. Guan, V. Heidarian Miri, E. Hernandez-Sanabria, A. X. I. Gomez, O. A. Isah, S. Ishaq, E. Jami, J.

Jelincic, J. Kantanen, W. J. Kelly, S.-H. Kim, A. Klieve, Y. Kobayashi, S. Koike, J. Kopecny, T. Nygaard Kristensen, S. Julie Krizsan, H. LaChance, M. Lachman, W. R. Lamberson, S. Lambie, J. Lassen, S. C. Leahy, S.-S. Lee, F. Leiber, E. Lewis, B. Lin, R. Lira, P. Lund, E. Macipe, L. L. Mamuad, H. Cuquetto Mantovani, G. A. Marcoppido, C. Márquez, C. Martin, G. Martinez, M. Eugenia Martinez, O. Lucía Mayorga, T. A. McAllister, C. McSweeney, L. Mestre, E. Minnee, M. Mitsumori, I. Mizrahi, I. Molina, A. Muenger, C. Muñoz, B. Murovec, J. Newbold, V. Nsereko, M. O'Donovan, et al. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* doi:10.1038/srep14567.

Hernandez-Sanabria, E., L. A. Goonewardene, Z. Wang, M. Zhou, S. S. Moore, and L. L. Guan. 2013. Influence of Sire Breed on the Interplay among Rumen Microbial Populations Inhabiting the Rumen Liquid of the Progeny in Beef Cattle. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0058461.

Hyden, S. 1956. A turbidimetric method for determination of higher polyethylene glycols in biological materials. *K. Lantbrukshogskolans Ann.* 22:139–145.

Jami, E., and I. Mizrahi. 2012. Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows. *Anaerobe.* 18:338–343. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.04.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.003>

Jones, R. J., and R. G. Megarrity. 1986. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of *Leucaena*. *Aust. Vet. J.* 63:259–262. doi:10.1111/j.1751-0813.1986.tb02990.x.

Kindt, R. 2016. BiodiversityR: package for community ecology and suitability analysis. R version. 2.

Krizsan, S. J., S. Ahvenjärvi, and P. Huhtanen. 2010. A meta-analysis of passage rate estimated by rumen evacuation with cattle and evaluation of passage rate prediction models. *J. Dairy Sci.* 93:5890–5901. doi:10.3168/jds.2010-3457.

Lê, S., J. Josse, and F. Husson. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25:1–18.

Li, M., G. B. Penner, E. Hernandez-Sanabria, M. Oba, and L. L. Guan. 2009. Effects of sampling location and time, and host animal on assessment of bacterial diversity and fermentation parameters in the bovine rumen. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04376.x.

Loor, J. J., A. A. Elolimy, and J. C. McCann. 2016. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. *Anim. Front.* 6:22. doi:10.2527/af.2016-0030. Available from: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/af/abstracts/6/3/22>

Mahé, F., T. Rognes, C. Quince, C. De Vargas, and M. Dunthorn. 2014. Swarm : robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ.* 2:e593. doi:10.7717/peerj.593.

Martin, P., P. P. G. Bateson, and P. Bateson. 1993. *Measuring behaviour: an introductory guide.* Cambridge university press.

McCann, J. C., T. A. Wickersham, and J. J. Loor. 2014. High-throughput methods redefine the rumen microbiome and its relationship with nutrition and metabolism. *Bioinform. Biol. Insights.* 8:109–125. doi:10.4137/BBI.Ss15389.

Morand-fehr, P., E. Owen, and S. Giger-Reverdin. 1991. Feeding behaviour of goats at the trough. In: *Goat nutrition.* p. 3–12.

De Mulder, T., L. Vandaele, N. Peiren, A. Haegeman, T. Ruttink, S. De Campeneere, T. Van De Wiele, and K. Goossens. 2018. Cow responses and evolution of the rumen bacterial and

- methanogen community following a complete rumen content transfer. *J. Agric. Sci.* 156:1047-1058. doi: 10.1017/S0021859618001053.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, and R. C. Team. 2015. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Packag. version 3.1. 1–122.
- R Development Core Team, and R Foundation for statistical Computing. 2014. R: A language and environment for statistical computing. Available from: <http://www.r-project.org>
- Santini, F. J., C. D. Lu, M. J. Potchoiba, J. M. Fernandez, and S. W. Coleman. 1992. Dietary Fiber and Milk Yield, Mastication, Digestion, and Rate of Passage in Goats Fed Alfalfa Hay. *J. Dairy Sci.* 75:209–219. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77755-8. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77755-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77755-8)
- Sauvant, D., S. Lemosquet, P. Chapoutot, and P. Nozière. 2018. Protein and amino acids supply. In: *INRA Feeding System for Ruminants*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. p. 61–63.
- Shi, P. J., K. Meng, Z. G. Zhou, Y. R. Wang, Q. Y. Diao, and B. Yao. 2008. The host species affects the microbial community in the goat rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:132–135. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02274.x.
- Silanikove, N., H. Tagari, and A. Shkolnik. 1993. Comparison of rate of passage, fermentation rate and efficiency of digestion of high fiber diet in desert Bedouin goats compared to Swiss Saanen Goats. *Small Rumin. Res.* 12:45–60. doi:10.1016/0921-4488(93)90037-I.
- Šmilauer, P., and J. Lepš. 2014. *Multivariate Analysis of Ecological Data using Canoco 5*. Second edi. Cambridge university press.
- Uden, P., P. E. Colucci, and P. J. Van Soest. 1980. Investigation of Chromium , Cerium and Cobalt as Markers in Digesta . Rate of Passage Studies. *J. Sci. Food Agric.* 625–632.
- De Vega, A., and D. P. Poppi. 1997. Extent of digestion and rumen condition as factors affecting passage of liquid and digesta particles in sheep. *J. Agric. Sci.* 128:207–215. doi:10.1017/S0021859696004078.
- Wei, T., V. Simko, M. Levy, Y. Xie, Y. Jin, and J. Zemla. 2017. Package “corrplot.” *Statistician.* 56:316–324.
- Weimer, P. J. 2015a. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* 6:1–16. doi:10.3389/fmicb.2015.00296.
- Weimer, P. J. 2015b. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00296.
- Weimer, P. J., M. S. Cox, T. Vieira de Paula, M. Lin, M. B. Hall, and G. Suen. 2017. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high- and low-efficiency Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:7165–7182. doi:10.3168/jds.2017-12746. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217306392>
- Weimer, P. J., D. M. Stevenson, H. C. Mantovani, and S. L. C. Man. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents1. *J. Dairy Sci.* 93:5902–5912. doi:10.3168/jds.2010-3500. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210006417>

Welkie, D. G., D. M. Stevenson, and P. J. Weimer. 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe*. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.07.002.

Wenner, B. A., J. de Souza, F. Batistel, T. J. Hackmann, Z. Yu, and J. L. Firkins. 2017. Association of aqueous hydrogen concentration with methane production in continuous cultures modulated to vary pH and solids passage rate. *J. Dairy Sci.* 100:5378–5389. doi:10.3168/jds.2016-12332. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217303570>

Williams, C. H., D. J. David, and O. Iismaa. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci.* 59:381–385.

Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*. 36:808–812.

CHAPITRE 2 : INFLUENCE DE L'ANIMAL HOTE SUR LA COMPOSITION DE SON MICROBIOTE RUMINAL ET SUIVI DE CETTE STRUCTURE AUTOUR D'UNE PERTURBATION DE L'ECOSYSTEME RUMINAL CHEZ LA CHEVRE EN LACTATION RECEVANT UNE RATION RICHE EN GLUCIDES RAPIDEMENT FERMENTESCIBLES

1.1 LES ENJEUX DE L'ETUDE :

Dans l'expérimentation menée sur les chèvres tarées nourries avec une ration riche en fibres développée au chapitre précédent, les microbiotes ruminiaux se sont stabilisés à un état d'équilibre différent de celui avant perturbation de l'écosystème ruminal. Le microbiote n'est pas revenu à son état initial et cela a pu être empêché éventuellement par une légère modification de la ration. Néanmoins, cette expérimentation a plutôt mis en évidence la plasticité que la résilience du microbiote ruminal. Malgré une trajectoire d'évolution commune, des différences de compositions entre les animaux ont été mises en évidence environ 4 mois après la synchronisation des contenus. Cette variabilité était en partie corrélée au taux de passage de la phase solide des contenus ruminiaux. La spécificité des microbiotes liée à l'animal hôte vient probablement en partie de cette caractéristique ruminale. Ces premiers résultats donnent des débuts de réponses à nos objectifs initiaux mais une nouvelle expérimentation doit être menée pour mieux comprendre le résultat atypique obtenu concernant cette plasticité de la communauté ruminale microbienne. La procédure de synchronisation, le modèle « chèvre » et les caractéristiques mesurées chez l'animal hôte présentées précédemment seront de nouveau utilisées mais les animaux seront cette fois-ci en lactation. Les caractéristiques de production viendront compléter les caractéristiques déjà mesurées. Ce stade physiologique différent a nécessité une ration distribuée *ad libitum* ayant une composition plus riche en concentré. Le suivi de l'évolution de la composition du microbiote suite à la synchronisation et l'identification des caractéristiques corrélées à la variabilité individuelle des compositions nous donneront des réponses dans un autre contexte physiologique et nutritionnel. Nous pourrons ainsi approfondir notre connaissance de l'interrelation entre la chèvre et son microbiote ruminal en ce qui concerne la spécificité liée à l'hôte et la résilience/plasticité. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique écrit en anglais. Le résumé ci-dessous reprend les points importants de ce chapitre en français.

1.2 RESUME :

Comprendre comment l'animal contrôle son propre microbiote ruminal est essentiel pour réussir à moduler les fermentations ruminales. A terme, l'objectif est d'augmenter la digestibilité des polysaccharides et de réduire la production de méthane. Ces orientations permettront d'améliorer d'un point de vue économique et environnemental la durabilité des systèmes de production des ruminants pour la production de viande et de lait. Chez les vaches, des relations entre la génétique de l'animal et son microbiote ont été mises en évidence mais les mécanismes impliqués n'ont pas encore été identifiés. La restauration rapide de la communauté microbienne après un échange de contenus ruminiaux avec un congénère suggère une importante résilience et une spécificité liée à l'hôte. Les dynamiques des contenus dans le rumen sont des facteurs potentiels pouvant influencer la composition de la communauté microbienne, tout comme les cinétiques d'ingestion pour les entrées ou encore les taux de passage des phases liquide et solide pour les sorties. Chez le mouton, la production de méthane est influencée par la taille du rumen et les taux de renouvellement de cet organe. L'objectif de cette expérimentation était de savoir si les caractéristiques dépendantes de l'hôte comme le comportement alimentaire, les taux de passage et les caractéristiques décrivant la production laitière pouvaient expliquer les variations de structure du microbiote ruminal entre les individus ? Pour répondre à cette question, une procédure innovante de vidage, mélange et réintroduction du mélange dans les rumens a permis de donner un même microbiote à un même moment à tous les animaux de l'essai et d'induire une perturbation de l'écosystème ruminale afin d'étudier l'évolution des communautés microbiennes. L'équipe de de Mulder (2018) avait mis en place une procédure de partage d'un contenu ruminal entre 4 animaux dont le donneur. Ce dispositif fournissait un microbiote de même composition aux 4 animaux après un rinçage soigné de l'épithélium permettant de suivre des différentes évolutions des microbiotes et des fonctions ruminales pour mieux comprendre l'interrelation entre l'hôte et son microbiote. Nous intéressant aux dynamiques des contenus dans le rumen, nous souhaitons que la quantité de contenu réintroduite dans le rumen soit très proche de la quantité retirée. Nous avons repris la procédure de synchronisation utilisée dans l'essai sur les chèvres tarries pour perturber les écosystèmes ruminiaux individuels et fournir un microbiote de même composition à tous les animaux dans les mêmes quantités que celles retirées pour chaque chèvre. Dix chèvres en lactation canulées au rumen ont été utilisées. La composition du microbiote a été suivie 2 jours après la synchronisation et 5 mois après.

L' α -diversité, étudiée à travers la richesse et l'indice de Shannon, n'a pas été modifiée au cours de l'expérimentation. En revanche, l'analyse de la β -diversité, représentée par une analyse des coordonnées principales, indique une séparation franche entre les prélèvements de microbiote réalisés avant et 5 mois après synchronisation et le prélèvement réalisé 2 jours après la synchronisation. Ces résultats indiquent que le microbiote est largement modifié après la synchronisation mais revient à une composition proche de celle avant la synchronisation des contenus. Une comparaison deux à deux confirme ces résultats, indiquant que le prélèvement réalisé 5 jours avant la synchronisation n'est pas différent des prélèvements réalisés 8 jours avant, 139 et 148 jours après la synchronisation. Au niveau des principales familles de bactéries et d'archées, nous constatons une augmentation de *Prevotellaceae* et une diminution de *Fibrobacteraceae* et *Methanobacteriaceae* deux jours après la synchronisation. Pour l'étude des relations entre les caractéristiques de l'animal hôte et la composition du microbiote, un grand nombre de paramètres sont corrélés à la composition avant synchronisation. Il s'agit, pour les flux entrant et sortant du rumen, du taux de passage des phases solide et liquide du rumen et des cinétiques d'ingestion. Pour les caractéristiques générales de l'hôte, il s'agit de la race, du poids vif des animaux et de

l'ingestion de matière sèche des animaux. Juste après la synchronisation, aucune relation n'a été identifiée. Pour l'étude de la spécificité du microbiote liée à l'hôte, mesurée 5 mois après la synchronisation ; le taux de passage de la phase solide et les cinétiques d'ingestion sont mises en évidence pour les caractéristiques des flux entrant et sortant du rumen. Concernant les caractéristiques générales, l'effet de la race est retrouvé alors que la persistance laitière est une nouvelle caractéristique identifiée. Dans cette expérimentation, la procédure de synchronisation des contenus a été préférée à la technique des échanges car la synchronisation permet d'éviter une sélection a priori des animaux. De plus, le fait de réintroduire une portion du microbiote initial de chaque animal via le mélange permet à l'écosystème de revenir éventuellement à sa composition initiale. La composition du microbiote est dominée par les *phyla* Bacteroidetes et Firmicutes. Contrairement à d'autres études avec le modèle « chèvre » nous avons trouvé les Fibrobacteres comme un des *phyla* principaux avec 1.8 % mais nous n'avons pas trouvé de Proteobacteria, ce dernier étant souvent lié à la nature du fourrage distribué. La différence entre race a été observée à plusieurs reprises dans différentes espèces. Deux jours après la synchronisation, la variabilité de composition du microbiote entre les animaux a explosé suggérant un état chaotique transitoire. La restauration du microbiote après la synchronisation observée dans cette étude conforte la propriété de résilience du microbiote. Ce retour à une composition proche de celle avant synchronisation est peut-être dû à la portion du microbiote initial réintroduit dans la procédure de synchronisation ou au microbiote épimural qui n'a pas été éliminé pendant le processus de synchronisation. Concernant l'étude de la spécificité de l'hôte sur son microbiote, le taux de passage de la phase solide et les cinétiques d'ingestion sont corrélés à la composition du microbiote ainsi que la race et la persistance laitière. L'effet associé à ce dernier critère reste inconnu. Le nombre de chèvres de notre étude ne permet pas d'étudier en détail l'effet de la race des animaux car les caractéristiques phénotypiques mesurées ici ne diffèrent pas significativement entre les 2 races. Pour conclure sur cette étude, les chèvres en lactation élevées dans les mêmes conditions environnementales et nutritionnelles sont capables de reconstituer leur microbiote ruminal après une importante perturbation de l'écosystème. Cela illustre la propriété de résilience du microbiote ruminal et le contrôle de l'hôte sur son microbiote. Les dynamiques des matières organiques sont des paramètres importants contribuant à la spécificité de l'animal sur son microbiote. La race et la persistance de lactation sont également impliquées, mais les mécanismes sous-jacents restent à identifier. Ces résultats remettent en question la possibilité de modifier le microbiote ruminal sur le long terme.

1.3 DOES THE GOAT PHENOTYPE IN TERMS OF FEEDING BEHAVIOR, RUMEN DYNAMICS AND PRODUCTION TRAITS SHAPE THE RUMEN MICROBIOTA COMPOSITION? FIRST CASE STUDY

P. Gomes^{1,2}, P. Mosoni³, M. Taghipoor², O. Bouchez⁴, L. P. Broudiscou^{2,*}, V. Berthelot^{2,*}

1: NEOVIA, Saint-Nolff, F56250, France

2: UMR Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Paris, France

3: Université Clermont Auvergne, INRAE, MEDIS, Clermont-Ferrand, France

4: US 1426 GeT-PlaGe, INRAE, Auzeville, France

*: These authors contribute equally to this work.

Competing interests: the authors declare no competing financial interests

Abstract

For decades, the host microbiome symbiosis has been investigated in ruminants to develop strategies to control rumen microbiota, direct fermentation in the most optimal way and eventually promote economically and environmentally sustainable animal production. So far, dietary, probiotic or other interventions to manipulate rumen microbiota have produced limited beneficial effects. A possible explanation is that, in mature animals, the microbiota is more controlled by the host than by external factors. Our objective was to assess whether host traits like feeding behavior, rumen contents kinetics and milk production, explain the structural variations in rumen microbiota across individual goats. Ten lactating rumen cannulated goats (4 Saanen and 6 Alpine) under the same environmental conditions had their rumens emptied and re-inoculated with the pooled rumen contents. The microbiota composition was followed using 16S rRNA gene sequencing, along with quantification of host traits. Our results show that five months after re-inoculation, the rumen microbiota almost returned to its initial composition. They highlight host-specific traits that tend to shape the microbiota structure such as organic matter dynamics through the rumen, individual capacity to maintain milk yield, and breed. Hence we suggest individual host control over its symbiotic microbial ecosystem in goats fed the same diet and kept in the same environment.

Importance

Unlike the studies which looked at the influence of the microbiota on e.g. feed efficiency and production of greenhouse gases, we investigated the role of the host animal in shaping its rumen microbiota. We characterized the rumen bacterial and archaeal microbiota of 10 dairy goats. Then we emptied the rumen, pooled the rumen contents and inoculated the goats with an identical microbiota. Five months later, the microbiota had returned to a composition similar to the one before pooling. The speed of eating, the time between meals and the time feed particles spent in the rumen were among the host characteristics that affected the rumen microbiota. This work provides new knowledge of the role feeding behavior and rumen dynamics play in shaping microbiota composition and might help understand the individual variability of rumen microbiota structure.

Introduction

Ruminants harbor in their reticulo-rumen a complex anaerobic community (bacteria, archaea, protozoa, fungi and viruses) that is able to convert low quality plant resources rich in structural polysaccharides indigestible for humans, into absorbable nutrients for the animals' tissue metabolism. The microbial proteins synthesized in the rumen also provide amino acids for the animal that are used to produce human-digestible high quality nutritional food (milk and meat) (1). However, these microbial fermentations lead to an excess of hydrogen production used by methanogenic archaea. This methane production represents a loss of energy in term of animal digestive efficiency and is a major cause of anthropogenic greenhouse gas. Understanding the symbiotic association between the host animal and its rumen microbiota, and how the host may shape its own rumen microbiota is therefore essential to drive degradation and fermentation towards a higher digestibility of structural polysaccharides and lower methane production, and ultimately to promote economically and environmentally sustainable dairy and meat production.

The host animal and the microbiota co-evolve from birth to adulthood (2) and are subjected to environmental factors like feed and housing conditions (3, 4). It is now well established that each adult animal harbors its own microbiota even when animals are reared and fed identically (5-7), suggesting that the host has a significant impact on its microbiota composition. A genetic influence of the host on the ruminal microbial community was measured in cattle (8, 9). However, the mechanisms behind this genetic influence still need to be elucidated. Using experimental approaches of near-total rumen content exchanges between pairs of cannulated dairy cows, Weimer et al. (10, 11) showed that ruminal bacteria communities moved toward re-establishment of the pre-exchange communities within days to weeks suggesting a high specificity and resilience of the rumen microbiota within its host (12). The more rapid restoration of the solid-phase community compared to the liquid-phase community observed by P. J. Weimer et al. (11) suggests that animals might exert some control over rumen content dynamics which consist of factors influencing input into the rumen (daily feed intake, meal patterns), and outflows from the rumen (digesta passage rates). These are also influenced by the rumen size. These parameters are all expected to have an influence on the rumen microbial community. In sheep, lower methane emissions were associated with smaller rumens that had higher particulate and liquid phases turnover rates (13). It suggests that host biological factors and especially those closely related to rumen function drive the microbial community structure and its fermentation end-products. If this assumption is true, then attempts to direct microbiota composition in the long term by intervening in early life might be in vain (14). In consequence, we still need to better understand the impact of host animal phenotypic traits on its commensal digestive microbiota. The objective of our study was to assess whether host-dependent variables, i.e. inter animal differences in feeding patterns, rumen contents passage rate, and averaged production trait descriptors, can explain the structural variations in rumen microbiota across individual animals. To address this question, we developed an innovative experimental approach. Ten cannulated lactating goats had their rumens emptied and re-inoculated with the same microbiota which consisted of a homogenized pool of the 10 rumen contents, and the microbiota compositional changes were assessed two days and 5 months later, along with host biological parameters, to compare the individual equilibriums reached under the same environmental and nutritional conditions.

Results

Taxonomic composition of the goat rumen microbiota

The taxonomic composition of the goat rumen microbiota was estimated by Illumina sequencing of the v4-v5 region of the archaeal and bacterial 16S rRNA before, 2 days and 5-months after the rumen contents pooling (Figure 1). The number of sequences obtained per sample are presented in the table S1.

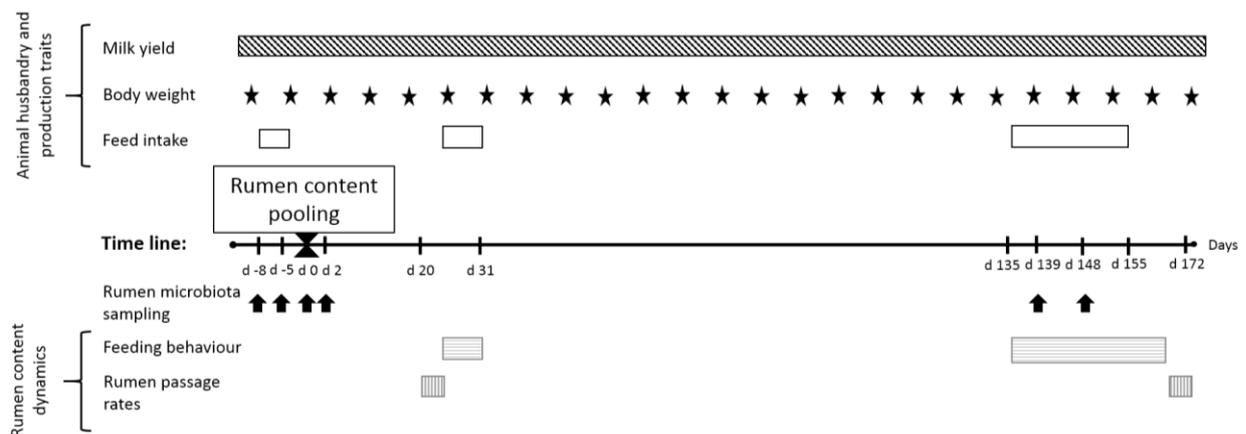


Figure 1: Overview of the experiment. Ten lactating goats receiving a nutritionally equivalent feed, were milked twice a day (hatched rectangle) and weighed each week (black star) throughout the experiment. The rumen contents pooling was carried out on d 0. Rumen microbiota sampling days are indicated by arrows. Horizontal hatched rectangles represent the recording periods of intake patterns. Vertical hatched rectangles represent rumen fractional passage rate measurement periods. Empty rectangles represent feed intake measurement periods with measurements of dry matter intake expressed as kg/day (DMI) and as % BW (DMI_{BW}). Milk yield information was used to estimate the milk yield at the peak (MYPeak) and milk yield persistency (MYPer). Goat feeding behavior was characterized with 3 parameters: estimation of intake rate (T80) and its variability ($sd(T80)$), and between eating bout intervals (BBI). Rumen passage rate measurements were characterized with 2 variables: the liquid passage rate (LPR), and the solid passage rate (SPR).

Prior to rumen contents pooling, Bacteroidetes and Firmicutes were the dominant bacterial phyla and represented 52% and 37% of total sequences, respectively. Three other phyla were quantified at 1.7-1.8% i.e. Fibrobacteres, Tenericutes and Spirochaetae, while other phyla were detected at much lower levels like Planctomycetes (0.4%), Chloroflexi (0.2%), Proteobacteria, Verrucomicrobia, Synergistetes and Actinobacteria (approx. 0.1% each). Among the top 15 bacterial families, the Prevotellaceae were the most abundant (36%), followed by the Ruminococcaceae (14%), the Christensenellaceae (11%) and the Lachnospiraceae (9%) (Figure 2, Table S2). The Fibrobacteraceae which represent a significant group of fiber-degrading bacteria was also in the top 15 bacterial families (1.8%). The Archaea kingdom was mostly represented by the Methanobacteriaceae family (4%). Some significant differences were seen at the family taxonomic rank between the two goat breeds: Veillonellaceae, and the Bacteroidales BS11, and RF16 groups were more abundant in Alpine than in Saanen goats (Figure 2, Table S3).

α - and β -diversities were then evaluated to determine whether the microbiota composition returned to its initial state in each animal after a short (2 days) and long (five months) period of time after rumen contents pooling. The analyses were performed at the OTU taxonomic rank in order to underline subtle compositional changes that would not be seen at higher taxonomy levels.

First of all, α -diversity estimated with Shannon and richness indices was not modified by the rumen contents pooling procedure as there were no significant differences between each sampling time

(Figure S1). In contrast, β -diversity evaluated by PCoA clearly showed that two distinct clusters existed along the principal coordinate 1 (Figure 3). The first cluster was represented by goat rumen samples on d -8, d -5, d 139 and d 148 and the second cluster by goat rumen samples on d 2. These results indicate that microbiota composition was greatly modified shortly after rumen contents pooling (d 2) and was restored in the long term (d 139/d 148). To confirm the latter observation, a day-to-day pairwise comparison was performed and showed that the microbiota composition on d -5 did not differ from the microbiota composition on d -8, d 139 and d 148 (Table 1). Furthermore, the microbiota composition was very similar between d -8 and d -5 samples and between d 139 and d 148 samples. In consequence, α -diversity analysis provides strong evidence that individual rumen microbiota diversity 5 months after rumen contents pooling is close to that before rumen contents pooling. This is also illustrated in Figure 2 when looking at the relative abundances of the top 15 families. The major changes on d 2 were an increase in Prevotellaceae and a decrease in several families including Fibrobacteraceae and Methanobacteriaceae, compared with d -8/d -5 and d 139/d 148 (Figure 2, Table S2).

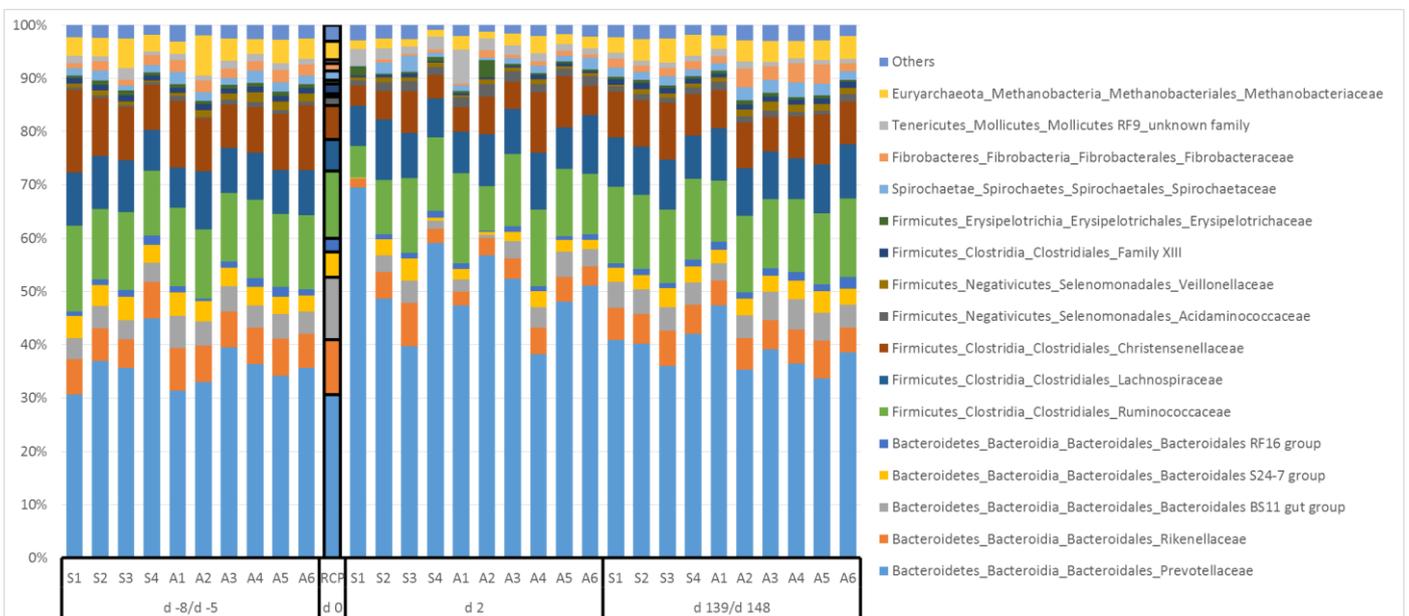


Figure 2: Individual rumen bacterial and archaeal relative abundances at family taxonomic rank. The families under 5,000 reads are into "Others". The 10 goats are identified by their breed (S: Saanen; A: Alpine) and a number. In addition to the rumen contents pool (RCP) at d 0, three histograms per goat display its rumen community composition before (average of d -8 and d -5), two days after rumen contents pooling (d 2) and at the end of the experiment (average of d 139 and d 148).

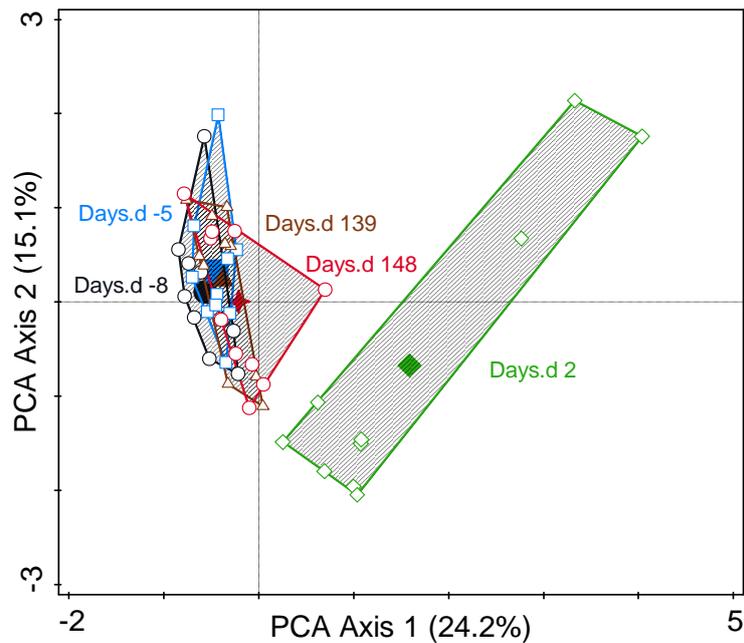


Figure 3: Principal coordinates analysis ordination of rumen microbiota samples based on OTU community dissimilarities (Bray Curtis). The rumen contents of 10 goats were pooled on day d 0. Sampling days before (d -8 and d -5), 2 days (d 2) and 5 months after (d 139 and d 148) are included as supplementary variables to show their relative positions. The samples of a given day are marked with a symbol (d -8: black circle; d -5: blue square; d 2: green diamond; d 139: brown triangle; d 148: red star) and surrounded by a polygon.

	d -8	d -5	d 2	d 139	d 148
d -8		R=0.027 ($p=1$)	R=0.592 ($p=0.002$)	R=0.370 ($p=0.004$)	R=0.397 ($p=0.002$)
d -5			R=0.555 ($p=0.001$)	R=0.125 ($p=0.296$)	R=0.144 ($p=0.152$)
d 2				R=0.568 ($p=0.001$)	R=0.457 ($p=0.001$)
d 139					R=0.028 ($p=1$)
d 148					

Table 1: One-way ANOSIM (Analysis of Similarity) testing ranked Bray-Curtis dissimilarity indices between the 10 goats microbiota compositions at OTU taxonomic rank and between days, i.e. d -8 and d -5 (before rumen contents pooling) and d 2, d 139 and d 148 (after rumen contents pooling = d 0). The R-test statistic measures whether separation of community structure is found ($R = 1$) or not ($R = 0$). It is based on the comparison of the ranks of distances between and within groups. The R and Bonferroni-corrected P-values (P) of the pairwise comparisons with significant differences are depicted in bold; P-values are based on a 999 Monte Carlo permutations procedure.

Selection of host traits and relationships between ruminal microbial composition and host traits

After describing the goat rumen microbiota and its evolution over time after triggering a drastic rumen ecosystem perturbation by pooling the 10 animal rumen contents and re-inserting the pool into empty rumens, our objective was to investigate whether animal-level phenotypic traits could influence the composition of the microbiota. Twelve animal traits related to husbandry, milk production and rumen content dynamics were monitored throughout the experiment (Figure 1). The

average BW, DMI, DMI_{BW} , MYPeak and MYPer were 63 ± 7 kg, 2.7 ± 0.3 kg/day, 4.4 ± 0.5 % BW, 4.0 ± 0.7 l and -9.4 ± 3.1 ml/day², respectively. The LPR, SPR, T80, sd(T80) and BBI were 23.7 ± 3.2 %/h, 7.8 ± 1.6 %/h, 314 ± 86 min, 65 ± 23 min and 29.8 ± 7.3 min, respectively (Table 2). All these goat traits did not differ significantly between breed. To avoid collinearity, DMI_{BW} and MYPeak were discarded because of their high correlations with BW and DMI respectively (data not shown). Therefore, the Breed, BW, DMI, MYPer, LPR, SPR, T80, sd(T80) and BBI were kept among host traits for further redundancy analyses with the microbiota composition.

To assess the extent of variation in microbiota community composition linked with host traits, traits were first selected with interactive forward selection using a FDR lower than 0.05 (cf. Materials and Methods). RDA was then performed using these selected traits as 'host variables' and the relative abundances of OTU as 'microbiota variables'.

On d -8 and d -5, before rumen contents pooling, breed, BW and DMI were selected among the traits related to husbandry and milk production. In total, 33.7% of the total variation in the microbiota composition was related to the 3 selected traits with most of the variation plotted on the 2 first axes (26.8%) (Figure 4a). The variation partitioning method was then used to estimate how much microbiota variation was explained by each group of host traits: the BW and DMI explained more microbiota variation (19.6%) than the breed (11.4%) with almost no shared effect as the overlap was 2.7% (data not shown). Among rumen content dynamics, LPR, SPR, T80, and BBI, but not sd(T80) were selected. In total, 39.6% of the total variation in the microbiota composition was related to these 4 selected traits with most of the variation (28.3%) projected on the two first axes (Figure 4b). The feed intake pattern and digesta passage rates explained similar variations (21.1% and 19.7% respectively) (data not shown).

goat	Husbandry and production traits						Rumen contents dynamics				
	breed	BW (kg)	DMI (kg/day)	DMI _{BW} (DMI, %BW)	MYPeak (l)	MYPer (ml/day ²)	LPR (%/h)	SPR (%/h)	T80 (min)	sd(T80) (min)	BBI (min)
S1	Saanen	58.1	2.4	4.2	3.4	-6.9	26.0	8.2	335	69	35.8
S2	Saanen	69.3	2.9	4.2	3.7	-10.8	26.0	7.7	282	76	27.4
S3	Saanen	59.5	2.6	4.4	4.4	-11.2	21.3	6.0	258	54	25.6
S4	Saanen	79.4	3.0	3.8	4.7	-11.9	18.0	6.5	274	40	37.1
A1	Alpine	56.3	2.8	4.9	4.1	-13.4	22.6	11.2	221	42	34.1
A2	Alpine	62.7	3.0	4.9	4.8	-9.2	28.5	8.8	267	70	23.0
A3	Alpine	64.2	2.8	4.4	4.7	-9.6	25.1	7.3	267	94	21.1
A4	Alpine	63.8	2.2	3.5	2.7	-8.1	25.8	9.2	519	103	43.3
A5	Alpine	57.0	2.8	5.0	3.8	-10.4	23.4	7.4	388	33	24.4
A6	Alpine	59.2	2.7	4.6	3.2	-2.4	20.2	6.1	331	72	25.9
mean		63.0	2.7	4.4	4.4	-9.4	23.7	7.8	314	65	29.8
SD		7.0	0.3	0.5	0.5	3.1	3.2	1.6	86	23	7.3

Table 2: Animal husbandry and production traits as well as rumen contents dynamics of the 10 lactating goats. The values are the averages per goat throughout the experiment; body weight (BW), dry matter intake (DMI, in kg/d and DMI_{BW} in % BW), milk yield at peak (MYPeak), milk yield persistency (MYPer), rumen liquid (LPR) and solid (SPR) fractional passage rate, intake rate estimate (T80), intake rate estimate variability (sd(T80)) and between eating bout interval (BBI).

Two days after rumen contents pooling, none of these host traits influenced the microbiota composition.

At d 139 and d 148 after rumen contents pooling, breed and MYPer were selected among husbandry and milk production traits. 23.1% of the total variation in the microbiota composition was related to these selected host traits (Figure 5a) with most variation explained by the first axis (16.6%). The Breed explained more variation (15.9%) than the MYPer (8.8%). Among rumen content dynamic traits, BBI, T80, and SPR had a FDR P-value that was not significant ($P = 0.14$). However, the P-value of the global model with these 3 variables was 0.001. In total, 28% of the total variation in the microbiota composition was related to the 3 selected traits with most of the variation (22.6%) projected on the two first axes (Figure 5b).

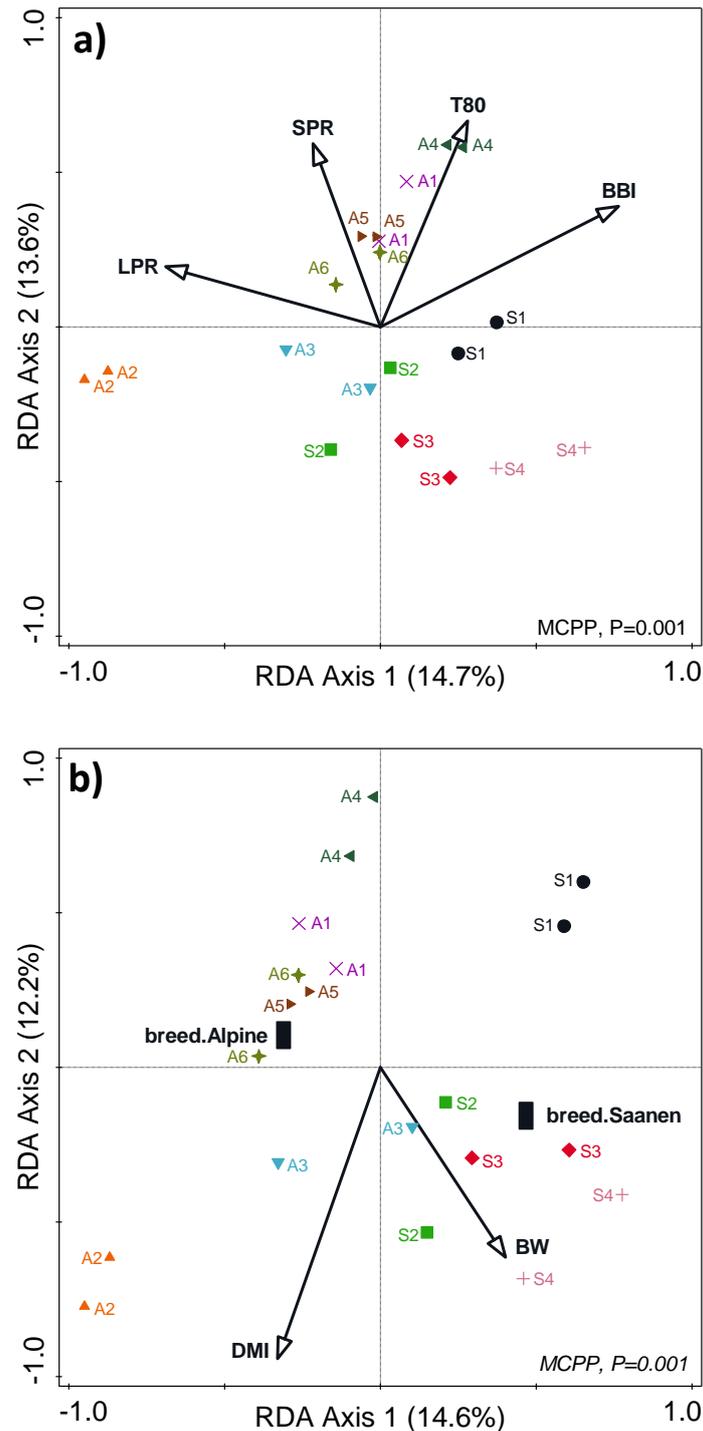


Figure 4: Biplot of RDA based on the log transformed OTU relative abundances of rumen microbiota relative to hosts traits in 10 lactating goats before rumen contents pooling (d -8 and d -5). The samples from each goat are identified by a symbol and the goat's breed (S: Saanen; A: Alpine) and number. Ordination diagrams are constrained by the host traits selected by an interactive forward selection with FDR corrected P-value ($P < 0.05$). Arrows represent the directions in which host traits increase. Bottom-right, Pvalue obtained by Monte Carlo Permutation Procedure (MCPP) is reported. **a.** The selected rumen dynamic variables are the rumen liquid passage rate (LPR), solid passage rate (SPR), intake rate (T80), and between eating bout intervals (BBI). The discarded variable is the intake rate variability ($sd(T80)$). **b.** The selected host traits are the body weight (BW) and dry matter intake (DMI) along with the breed (black rectangles). The discarded variables are the milk yield persistency (MYPer) and dry matter intake expressed as % of BW (DMI_{BW}). First and second ordination axes are plotted, representing 14.6% and 12.2% of the total variation in the microbiota composition related to the 3 selected traits, respectively. First and second ordination axes are plotted, representing 14.7% and 13.6% of the total variation in the microbiota composition related to the 4 selected traits, respectively.

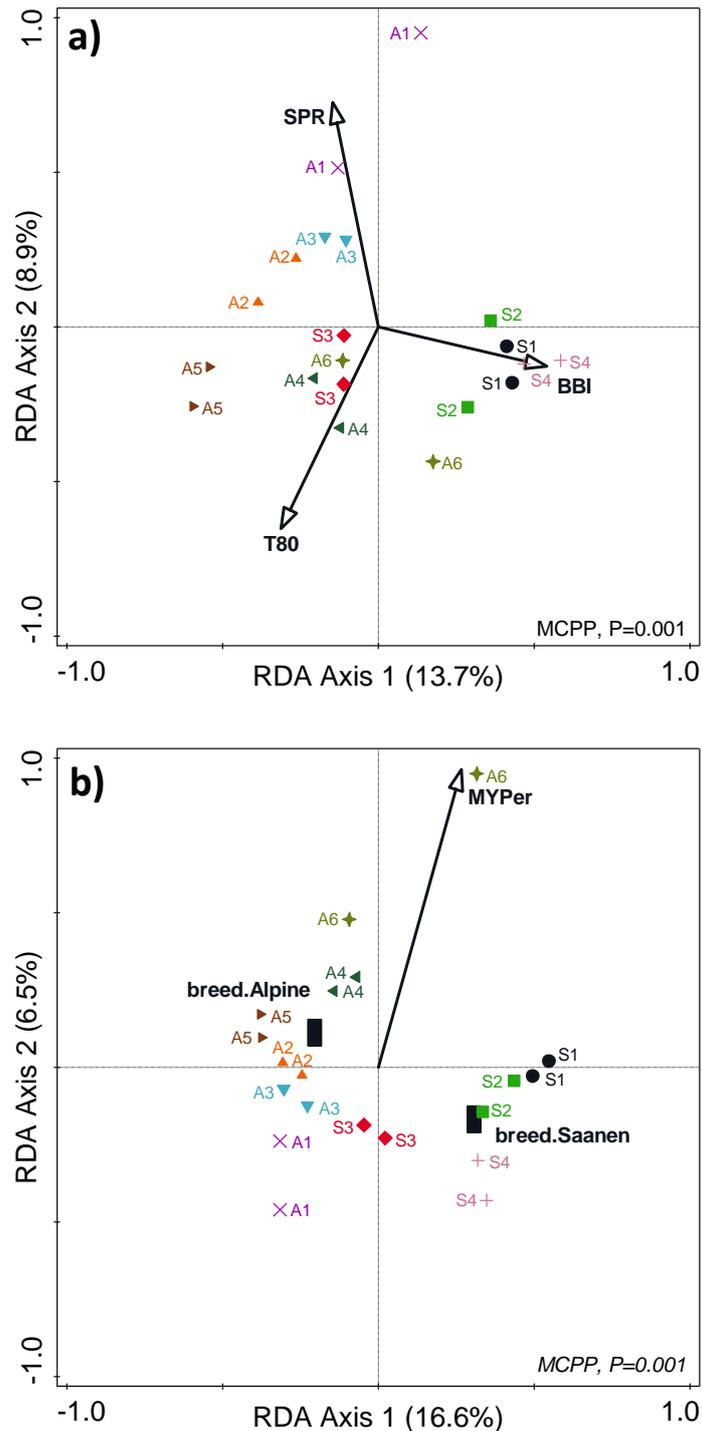


Figure 5: Biplot of RDA based on the log transformed OTU relative abundances of rumen microbiota relative to hosts traits in 10 lactating goats after rumen contents pooling (d 139 and d 148). Both samples of each goat are identified by a symbol and the goat's breed (S: Saanen; A: Alpine) and number. Arrows represent the directions in which host traits increase. Bottom-right, P-value obtained by Monte Carlo Permutation Procedure (MCP) is reported. **a.** The ordination diagram is constrained by the solid passage rate (SPR), intake rate estimate (T80) and between eating bout interval (BBI). The corrected p value associated to these variables in the forward selection process equal 0.14. The discarded variables are the intake rate variability ($sd(T80)$) and the liquid passage rate (LPR). **b.** The ordination diagram is constrained by the host traits selected by an interactive forward selection with FDR corrected p value ($P < 0.05$). The selected host trait is the milk yield persistency (MYPer) along with the breed (black rectangles). The discarded variables are the body weight (BW), and dry matter intake in kg/d (DMI) and in % of BW (DMI_{BW}). First and second ordination axes are plotted, representing 16.6% and 6.5% of the total variation in the microbiota composition related to the 2 selected traits. First and second ordination axes are plotted, representing 13.7% and 8.9% of the total variation in the microbiota composition related to the 3 selected traits.

Discussion

We tested the existence of a sustained host specificity in the rumen microbiota composition by refilling the emptied and washed rumens of 10 adult goats with the same microbiota i.e. the homogenized pool of all rumen contents. We then tracked the microbiota compositional changes in a 5-month follow-up to compare the individual microbial equilibriums reached. To go further than the observation, to study the relationships between the rumen microbiota composition and host characteristics, the team of P.J. Weimer (10, 11) has implemented a technique of content exchange to study if animal characteristics will change the microbiota composition or if it will go back to its original composition. The main advantage of this technique is that the microbiota communities exchanged are already stable ecosystems. We preferred not to benefit from this advantage in favor of using the same inoculum for all animals, as was done by de Mulder et al. (2018) (15) but in the proportions of the content removed from each of the animals so as not to interfere with the rates of passages of the liquid and solid phases of the rumen. Our experimental design is less sensible to the animal selection step. For rumen content exchanges, results obtained may depend on the initial pairing step. The last advantage of rumen content pooling is to provide all animals with all the taxa present in each of the initial contents. Furthermore, the reintroduction in every goat of a portion (9%) of its own rumen microbiota during the pooling procedure provides a good basis for allowing each rumen ecosystem to return to its original state. It should be noted that in the rumen emptying procedure, the epithelium was not scrubbed, meaning that epimural bacteria were not removed.

One week before disrupting the individual symbiosis between host and microbiota, the rumen of the 10 goats was 90% dominated by the Bacteroidetes and Firmicutes phyla in agreement with previous reports in ruminants (16) and goats (17). The other dominant phyla identified in this study i.e. Fibrobacteres, Tenericutes and Spirochetes were also described in another study on Cashmere goats using shotgun metagenomics (18). Our data differ from other 16S metabarcoding data obtained on goats (17, 19, 20) as we found Fibrobacteres as a dominant phylum (1.8%) and did not detect any Proteobacteria. This discrepancy could be due to differences in husbandry and feeding practices, animal physiology or breed. The relative abundance of Proteobacteria may be related to the nature of the diet as a strong influence of forage types and proportions on the ruminal abundance of this phylum has been reported in cows (21). Inter-breed differences have also been observed by comparing denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of rumen bacteria from 3 breeds of goats i.e. Mongolia cashmere, Nanjiang yellow and Boer (22). Here, Saanen and Alpine goats harbored a similar microbiota at the family taxonomic rank, although differences in the relative abundances of Veillonellaceae, and the Bacteroidales BS11 and RF16 groups were observed between the two breeds. Given the small number of goats used for this experiment we cannot conclude whether this difference is a general breed effect outwith the conditions of the present experiment.

Two days after rumen contents pooling, the rumens had returned to a normal functioning whatever their size, and yet on day 2 rumen microbiota differed significantly from all other sampling days. In addition, an important inter-animal variability was observed as illustrated by the PCoA, whereas all rumens had been reinoculated with the same microbial pool. These discrepancies could stem from a transitory chaotic state of microbial communities in ecosystems pushed far from equilibrium. Oxygen exposure during the rumen contents pooling procedure could also explain the decrease in obligate anaerobes such as Fibrobacteraceae and Methanobacteriaceae. However, the relative abundances of the latter were not correlated among goats and were linked neither to reinoculation ranks (data not shown) nor to inocula amounts which could both affect the extent of a possible oxygen absorption by rumen contents.

Five months after rumen contents pooling, most microbiota returned close to their initial structural states. Our results are consistent with those obtained by near-total exchanges of rumen contents between pairs of cows (10, 11). In consequence, our results agree with those of Weimer's group highlighting the fact that each animal can control the composition of its own microbiota. Before discussing the effects of other host traits, it is important to remember that our method returned 9% of the host's original microbiota and left the host epimural flora intact (23). While the epimural bacteria are facultative and the main rumen bacteria are strict anaerobes, this does not exclude the possibility that they have an impact on the restoration of the microbiota in addition to the host traits that we discuss below.

The purpose of this study was more specifically to quantify the impact of a number of possible host characteristics influencing rumen microbiota composition, thus we do not consider the overall feed efficiency implications in this paper. Regarding the host traits quantified in this study, the husbandry and milk production variables, as well as their variations, were within the range usually observed in indoors-housed dairy goat farms (24). The rumen contents kinetics were characterized with two standard methods implementing well documented non-radioactive markers (25, 26). The Cr-labelled hay fiber whose size ranged from 0.2 to 1 mm, accounted for the feed particle pool able to leave the rumen without delay, the smaller particles being subjected to the dynamics of the liquid phase and the larger ones being prevented from leaving the rumen (27). Because Cr labelling rendered hay fiber indigestible (28), the particle passage rate measured was insensitive to rumen microbial activity and mostly depended on the host's anatomical features. For both rumen phases, the estimated passage rates were in the higher range of normal values in goats (29). The increase in specific gravity of particles due to chromium is likely to increase their ruminal passage rate as observed in sheep (30). The high feeding level of lactating animals, fed ad-libitum, associated with a high sugar beet pulp silage content, supplying highly digestible fiber, may also explain these high passage rates. In any case, averaging each parameter per goat led to an unbiased estimate of its host-specific component. In sheep, the particle retention time in the rumen appeared to be an inherent characteristic of the animal, susceptible to respond to selection pressure (31).

Before rumen contents pooling, the host-specific variables in addition to goat body weight and breed (discussed later), which significantly influenced the microbiota composition were related to the feed input (DMI, BBI, T80) and rumen contents output patterns (LPR, SPR). The animal traits related to feeding behavior and rumen passage rates might act as determinants in the establishment and resilience of microbial niches within the rumen. The frequency, rate and amount of substrates provided to rumen microbes by the animal, the time left to microbes to colonize and degrade plant cell walls, the dynamics of soluble substrates and their subsequent availability to microorganisms can affect the microbiota structure, directly or through interspecies interactions. The lack of relationship between host and microbial data two days after rumen contents pooling was consistent with our assumption that driving rumen microbial communities to equilibrium through feed intake and rumen kinetics characteristics required time after a major ecosystem perturbation.

Five months after rumen contents pooling, the most influential host traits on microbiota composition were T80, BBI and SPR, in addition to MYP_{er} and breed. Thus, traits related to rumen contents dynamics appeared to act persistently on the rumen microbiota structure in animals raised under the same environmental conditions. In addition, MYP_{er} explained part of the variation of the community. The driving force associating MYP_{er} to rumen microbiota remains unknown.

Finally, the breed was a determining factor both before and 5 months after rumen contents pooling. The nature and extent of its determinism on the symbiotic rumen microbiota is unclear, especially considering that none of the phenotypic variables monitored in this study differed significantly

between breed. A larger sample will be needed to study breed effects. Our speculative explanation is that breed may relate to differences in sorting behaviors during feed intake (32), in epimural microbiota whose several functions impact critically the rumen ecology (33) or to physiological or morphological characters acting on rumen contents kinetics in a more subtle way than might be observed with our conventional methods (34).

To conclude, our study shows that adult lactating goats raised under the same environmental and nutritional conditions are able to reconstitute their rumen bacterial and archaeal communities five months after a drastic ecosystem perturbation. Hence, it suggests that some host characteristics influence the ruminal microbiota composition. Our study also provides important insights into the host traits that may shape the rumen bacterial and methanogen communities. One of the important parameters which reflects animal feeding behavior and rumen physiological and anatomical function is the organic matter dynamics through the rumen. It would be interesting to confirm these results and also study the kinetics of water ingestion. Breed as well as individual goat capacity to maintain its milk yield also seem to affect the rumen microbiota structure but the underlying mechanisms still need to be elucidated. These findings question the possibility of altering and programming the rumen microbiota in the long-term by nutritional interventions in early life.

Materials and methods

The study was conducted at the experimental facilities of the MoSAR Joint Research Unit (Paris, France) run under the veterinary license B78-615-1002. The experimental procedures were approved by the local Ethics Committee (COMETHEA approval number 12079) agreed by the French Ministry of Higher Education and Research (agreement code C2EA-45) and they were performed on animals by accredited personnel.

Animals

Ten dairy goats, 4 Saanen and 6 Alpine in their 3rd lactation, were randomly selected from a group of 9 Saanen and 18 Alpine 4-year-old goats. They were fitted with ruminal and duodenal (Y-type) cannulas. At the start of the trial, the goats were at 84.8 ± 3.3 days in milk with a milk yield of 3.7 ± 1.0 kg/d. The goats were fed a total mixed ration ad libitum twice daily, two-thirds of the diet in the afternoon and one-third in the morning after milking. On a dry matter (DM) basis for diet 1, the total mixed ration contained 23% grass hay, 29% sugar beet pulp silage, 28% alfalfa hay and 20% commercial concentrate (FLUVIA SELECTUNIC, Sanders, France). The organic matter, neutral detergent fiber, crude protein and starch contents of this diet were 906, 456, 118, and 48 g/kg DM respectively. Then 86 days following the rumen contents pooling described below, the ration was changed (diet 2) due to alfalfa hay shortage as follows: 30% grass hay, 30% sugar beet pulp silage, 20% alfalfa hay, 15% commercial concentrate (FLUVIA SELECTUNIC, Sanders, France) and 5% rapeseed meal. The corresponding organic matter, neutral detergent fiber, crude protein and starch contents were 912, 461, 121 and 40 g/kg DM respectively. Both diets were formulated to meet INRA guidelines for dairy goats (24). The table 3 summarizes principal characteristics of these diets. The goats were housed in straw-bedded group pens, except during two 5-week periods when they were held on wooden slatted floors in individual pens to measure individual daily feed intakes and carry out various measurements and samplings (Figure 1).

	diet 1	diet 2
Dry matter intake (kg of DM / day)	2,7 ± 0,3	
Feed components (% DM)		
grass hay	23	30
sugar beet pulpe silage	29	30
alfalfa hay	28	20
commercial concentrate	20	15
rapeseed meal	-	5
Chemical composition (% DM)		
organic matter	90,6	91,2
NDF	45,6	46,1
crude protein	11,8	12,1
starch	4,8	4

Table 3: Principal characteristics of diets concerning dry matter intake, feed components, and chemical composition. The feed change took place à d 86.

Rumen contents pooling procedure

The study was designed to characterize individual rumen microbiota, then make them identical by pooling all rumen contents on a day referred to as d 0, and finally observe individual compositional changes in rumen microbiota during five months, along with the description of hosts' rumen contents dynamics and production traits (Figure 1). The rumen contents pooling was performed as follows. The evening before, goats were fasted with free access to water. In the morning, each goat had its rumen emptied through the cannula into a bag, the rumen was then rinsed with 5 l of warm water then filled with 5 l of saline at $38 \pm 2^\circ\text{C}$. Meanwhile, the rumen contents were immediately weighed and poured into a 100 l sealed bag in an 80 l cylindrical container held at $38 \pm 2^\circ\text{C}$ in a water bath. Between each animal withdrawal, the recipient bag was kept with minimal headspace and flushed with CO₂ to maintain anaerobiosis. Once all rumen contents had been pooled, they were thoroughly homogenized by manual manipulation outside the bag, and immediately reinoculated in the rumen of each goat after saline removal. For each goat, the inoculum equaled 90% (w/w) of its previous rumen content (average 3.98 ± 1.65 kg).

Animal husbandry and production traits

The following set of individual traits are currently used to phenotype livestock in farm conditions. Throughout the experiment, the goats were weighed at 14:00 each week and milked twice daily, at 7:00 and 15:30 with recording of milk yield. The body weights of each goat over the trial were averaged to characterize their size (BW, in kg). Feed intakes were recorded daily when goats were held in individual pens. After feed drying at 87°C during 24h in an oven, individual daily dry matter intakes were calculated. Dry matter intakes were calculated as the average dry matter intakes on days with no other sampling procedure i.e. from d -8 to d -3, d 24 to d 30 and d 135 to d 155. It was calculated as kg/d (DMI) and as % of BW (DMI_{BW}).

To characterize the milk production of each goat, two traits were estimated. The first one was the milk yield at the peak of lactation (MYPeak). The second one referred to the average daily milk yield decrease post peak of lactation, this criteria is the milk yield persistency (MYPe) (ml/day²). It indicates the individual goat's capacity to maintain its milk production. Both were estimated using an alternative form of the Wood model (35) proposed by Dhanoa (36) with a reparametrization (37).

The description of this reparametrization and the estimations of individual theoretic milk yield curves are given in the Supplementary Materials and Methods and Table S4.

Rumen contents dynamics

A set of 5 traits grouped under the term “rumen content dynamics” have been measured to describe the flows of organic matter through the rumen, i.e. the feed intake pattern and the particle and liquid outflows. They are described below.

The dynamic patterns of intake, corresponding to feeding behavior, were recorded from d 24 to d 31 and from d 135 to d 169 by weighing devices placed under the feed trough, which recorded the weight of feed in the trough every 2 min (38). The recordings were analyzed during several consecutive afternoon meals. The main characteristics to describe the feeding behavior are the intake rate and the individual variability in ingestive behavior, including inter-meal bout intervals (32). The intake rate was estimated by the Time to eat 80% of the DMI during the afternoon meal (T80) and its variability as the standard deviation of T80 (sd(T80)). Feeding behavior was not randomly distributed, but expressed in temporal clusters called bouts, separated by periods of non-feeding. Using log-survivorship analysis (39), we identified the bout criterion interval as 10 minutes, i.e. if there was a non-feeding period of more than 10 minutes, we considered the bout to be finished. Often, these bouts of feeding behavior are referred to as meals (40). Not wanting to enter a discussion on what constitutes a meal, we use the terms ‘bout’ and between-bout-interval (BBI) in this paper.

Rumen contents were sampled to estimate rumen liquid and solid phase fractional passage rates from d 20 to d 25 and from d 167 to d 172. Polyethylene glycol 6,000 (PEG) was used as the marker of liquid phase. Chromium-mordanted hay was prepared in a single batch (28). The fraction of mordanted hay retained between dry sieves of 1 mm and 0.212 mm aperture was used as the particulate marker. On the first day, 50 g mordanted hay and 15 g PEG dissolved in 100 ml water were introduced through the cannula at 9:00. Rumen liquid phases were sampled prior to marker administration then 2, 4, 6, 8, 12, 23, 33, 37, and 46 hours later. Rumen particle pools were sampled prior to marker administration and 6, 8, 12, 23, 33, 37, 46, 60, 70, 86, 95, and 109 hours later, by collecting 50 g from a mixed 500 g sample of rumen contents (the remainder was reintroduced to the rumen). Liquid samples were stored at -20°C until analysis. Solid samples were dried at 80°C, ground through a Culatti-mill (Prolabo, Paris, France) fitted with a 1 mm aperture screen and stored in a dry place until analysis. Rumen solid samples and mordanted hay were analyzed for Chromium concentration by absorption spectroscopy (41). Rumen fluid samples were analyzed for PEG concentration by turbidimetry (42).

The variables associated to liquid and particulate rumen outflows were calculated by adjusting PEG or Cr ruminal concentrations to the following model:

$$[marker]_t = [marker]_{t_0} \cdot \exp \frac{-k \cdot t}{100}$$

Where t was the time (h), k the Liquid Passage Rate (LPR) or Solid Passage Rate (SPR) (%/h) and $[marker]_{t_0}$ the initial PEG or Cr concentration in the rumen. Due to the high rumen solid passage rate in our goats, and to the practical impossibility of shortening the early sampling intervals, our dataset could not be fitted to a bi-exponential model even though such a model would have led to better estimates of pool sizes. This information was thus not retained in the statistical analyses. The passage rates were averaged per goat.

Microbiota composition

In order to characterize the composition of rumen liquid- and solid-associated microbiota, 200 g of rumen contents were collected through the rumen cannula from each goat prior to the morning meal on d -8, d -5, d 2, d 139 and d 148, thoroughly homogenized and 2 samples of 30 g in 50 mL centrifugation tubes were immediately stored at -23°C until processed. This procedure was also applied to the rumen content pool on d 0.

Metagenomic DNA was extracted in duplicate from rumen samples according to (43) using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). DNA purity and amount were measured on a Nanodrop-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Lyon, France). Its integrity was checked by gel electrophoresis (0.8% agarose in TAE buffer, 30 min under 100 V). Amplicon libraries of the V4-V5 hyper-variable regions of archaeal and bacterial 16S rRNA genes were generated using the forward primer PCR1_515F (5'-CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTA) and the reverse primer PCR1_928R (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCGYCAATTCMTTTRAGT) according to the procedure specified by the GeT-PlaGe sequencing platform (Toulouse, France). Primers included a part of Illumina adapters. The PCR amplification mix contained 10 ng template DNA, 0.5 µL MolTaq 16S DNA polymerase at 5 U/µL (Molzym GmbH, Bremen, Germany), 5 µL 10X buffer, 4 µL 2.5 mM dNTP mix, 1 µL of each primer at 20 µM and sterile water up to a final volume of 50 µL. The reactions were performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) under the following thermal profile: an initial denaturation step at 94°C for 2 min, 30 cycles at 94°C for 60 sec, 65°C for 40 sec and 72°C for 30 sec, a final elongation at 72°C for 10 min and 4°C hold. The PCR products were subjected to agarose (2%) gel electrophoresis to check their amounts and expected size. After the first PCR, single multiplexing was performed using homemade 6 bp index, which was added to reverse primer during a second PCR with 12 cycles using forward primer (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC) and reverse primer (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). The PCR amplification mix contained 15 ng template PCR, 0.5 µL MolTaq 16S DNA polymerase at 5 U/µL (1U incorporates 10 nmoles of dNTPs into an acid-insoluble form in 30 min at 72°C under standard assay conditions, Molzym GmbH, Bremen, Germany), 5 µL 10X buffer, 1 µL 10 mM dNTP mix, 1.5 µL of each primer at 20 µM and sterile water up to a final volume of 50 µL. The resulting PCR products were bead purified and loaded onto the Illumina MiSeq cartridge according to the manufacturer instructions. The quality of the run was checked internally using PhiX, then each pair-end sequences were assigned to its sample with the help of the previously integrated index.

The amplicons were processed and sequenced in a 2x250 bp paired-end format at the GeT-PlaGe core facility (Toulouse, France) using a Miseq Illumina sequencer with the Reagent Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). The sequence processing was performed using the FROGS pipeline under Galaxy (44). The average length of the sequences was 410 bp. After being demultiplexed, paired-end reads were merged and all sequences out of the range of 380 to 480 bp or presenting an ambiguous base were discarded. A total of 2,775,657 sequences were obtained. The data were normalized to 29,000 sequences per sample as the minimum number of sequences per sample was 29,632. The clustering step implemented Swarm (45) set at a final aggregation parameter $d=3$. Chimeras were detected using UCHIME (46). We retained the clusters of abundance higher than 0.005% (47) then performed the taxonomic affiliation of the 1,558 OTU detected on the database SILVA 16S v128 filtered at a pintail score of 50.

Statistical analyses

Difference in the bacterial and archaeal relative abundances at the family taxonomic rank between sampling days was tested using linear mixed model with R package 'nlme' (48). The model included sampling days as fixed effect and goat as random effect with the autocorrelation structure of order 1 (corCAR1) to take into account the effect of repeated sampling. The nlLM function of the package R 'minpack.lm' (49) was used to fit rumen markers with time. The residual standard errors for PEG curve adjustment (LPR) ranged from 0.002 to 0.015 g/kg and averaged 0.007 g/kg. The residual standard errors for Cr curve adjustment (SPR) ranged from 3.3 to 46.1 g/kg DM and averaged 21.5 g/kg DM.

Alpha diversity was calculated using Shannon and richness indices. As values within a group did not pass the Shapiro-Wilk normality, the Kruskal–Wallis analysis was used to compare indices. Beta-diversity was assessed using principal coordinate analysis (PCoA) scaling to visualize differences between goat samples calculated on the Bray-Curtis distances with log transformed OTU relative abundance. Analysis of similarities (one-way ANOSIM) and pairwise comparisons on Bray-Curtis distances were used for testing the temporal changes.

A subset of uncorrelated host trait variables was selected for subsequent analyses using Principal Component Analysis and correlation matrix (Pearson test). The breed differences on bacterial and archaeal relative abundances at the family taxonomic rank, husbandry, milk production, and rumen content dynamics data were assessed using the Mann-Whitney Test.

The relationships between individual rumen bacterial and archaeal community structures and selected host trait variables were modelled using redundancy analysis (RDA) on log transformed OTU relative abundances and visualized in ordination biplots. The validity of the model was tested with a Monte Carlo permutation procedure based on 999 permutations. An interactive forward selection RDA with false discovery rate (FDR) correction (adjusted P-value < 0.05) was performed to test which variable among host animal or rumen dynamics traits significantly influenced the rumen microbiota composition. Variation partitioning were used to resolve the contribution of each group of host traits to the total variance (49). We tested four groups (1) Breed; 2) DMI and BW, 3) LPR and SPR, 4) BBI and T80, 5) MYPPer).

PCoA, RDA, and variation partitioning were performed using Canoco v.5.0 for windows (50, 51), while the Bray–Curtis similarity ANOSIM analyses were implemented in the statistical package PAST (52). The other analyses were performed using R software 3.5.0.

Acknowledgements

We are most grateful to A. Eymard, J. Tessier, and the staff of the experimental farm for animal care, O. Dhumez, A. Hagneau, and A. Neveu for laboratory analyses, Pr F. Enjalbert and M.-L. Chemit for atomic absorption spectroscopy, N. Friggens, C. Gérard, and H. Erhard for useful advice and reviewing, to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees and Sigenae group for providing help and/or computing and/or storage resources thanks to Galaxy <http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>. This work was performed in collaboration with the GeT core facility, Toulouse, France (<http://get.genotoul.fr>), and was supported by the France Génomique National infrastructure, funded as part of the Investments for the future program managed by the French National Research Agency [ANR-10-INBS-09]. We declare no competing financial interests.

References

1. Wilkinson JM, Lee MRF. 2018. Review: Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. *Animal* 12:1735-1743.
2. Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J* 7:1069-1079.
3. Deusch S, Camarinha-Silva A, Conrad J, Beifuss U, Rodehutschord M, Seifert J. 2017. A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Front Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01605.
4. Loor JJ, Elolimy AA, McCann JC. 2016. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. *Anim Front* 6:22-29.
5. Zhou M, Hernandez-Sanabria E, Guan LL. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Appl Environ Microbiol* 76:3776-3786.
6. Jami E, Mizrahi I. 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS ONE.* 7(3):doi:10.1371/journal.pone.0033306.
7. Soellinger A, Tveit AT, Poulsen M, Noel SJ, Bengtsson M, Bernhardt J, Hellwing ALF, Lund P, Riedel K, Schleper C, Hojberg O, Urich T. 2018. Holistic assessment of rumen microbiome dynamics through quantitative metatranscriptomics reveals multifunctional redundancy during key steps of anaerobic feed degradation. *Msystems.* 3(4):doi:10.1128/mSystems.00038-18.
8. Roehe R, Dewhurst RJ, Duthie CA, Rooke JA, McKain N, Ross DW, Hyslop JJ, Waterhouse A, Freeman TC, Watson M, Wallace RJ. 2016. Bovine Host Genetic Variation Influences Rumen Microbial Methane Production with Best Selection Criterion for Low Methane Emitting and Efficiently Feed Converting Hosts Based on Metagenomic Gene Abundance. *PLoS Genet.* 12(2):doi:10.1371/journal.pgen.1005846.
9. Sasson G, Ben-Shabat SK, Seroussi E, Doron-Faigenboim A, Shterzer N, Yaacoby S, Margret EBM, Bryan AW, Eran HC, Mizrahi I. 2017. Heritable Bovine Rumen Bacteria Are Phylogenetically Related and Correlated with the Cow's Capacity To Harvest Energy from Its Feed. *MBio.* 8(4):doi:10.1128/mBio.00703-17.
10. Weimer PJ, Stevenson DM, Mantovani HC, Man SLC. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *J Dairy Sci* 93:5902-5912.
11. Weimer PJ, Cox MS, de Paula TV, Lin M, Hall MB, Suen G. 2017. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high- and low-efficiency Holstein cows. *J Dairy Sci* 100:7165-7182.
12. Weimer PJ. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00296.
13. Goopy JP, Donaldson A, Hegarty R, Vercoe PE, Haynes F, Barnett M, Oddy VH. 2014. Low-methane yield sheep have smaller rumens and shorter rumen retention time. *Br J Nutr* 111:578-585.
14. Morais S, Mizrahi I. 2019. The Road Not Taken: The Rumen Microbiome, Functional Groups, and Community States. *Trends Microbiol* 27:538-549.
15. De Mulder T, Vandaele L, Peiren N, Haegeman A, Ruttink T, De Campeneere S, Van De Wiele T, Goossens K. 2018. Cow responses and evolution of the rumen bacterial and methanogen community following a complete rumen content transfer. *J. Agric. Sci.* 156:1047-1058. doi: 10.1017/S0021859618001053.

16. Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Collaborators GRC, Janssen PH. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep*. doi:10.1038/srep14567.
17. Grilli DJ, Fliegerová K, Kopečný J, Lama SP, Egea V, Sohaefer N, Pereyra C, Ruiz MS, Sosa MA, Arenas GN. 2016. Analysis of the rumen bacterial diversity of goats during shift from forage to concentrate diet. *Anaerobe* 42:17-26.
18. Lei ZM, Zhang K, Li C, Jiao T, Wu JP, Wei YB, Tian KC, Li C, Tang DF, Davis DI, Casper DP, Jiang H, Wang XL, Wang JF. 2019. Ruminal metagenomic analyses of goat data reveals potential functional microbiota by supplementation with essential oil-cobalt complexes. *BMC Microbiol* 19:30.
19. Wang L, Wu D, Yan T, Wang L. 2018. The impact of rumen cannulation on the microbial community of goat rumens as measured using 16S rRNA high-throughput sequencing. *J Anim Physiol Anim Nutr* 102:175-183.
20. Zhong S, Ding Y, Wang YY, Zhou GC, Guo HR, Chen YL, Yang YX. 2019. Temperature and humidity index (THI)-induced rumen bacterial community changes in goats. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:3193-3203.
21. Indugu N, Vecchiarelli B, Baker LD, Ferguson JD, Vanamala JKP, Pitta DW. 2017. Comparison of rumen bacterial communities in dairy herds of different production. *BMC Microbiol* 17:190.
22. Shi PJ, Meng K, Zhou ZG, Wang YR, Diao QY, Yao B. 2008. The host species affects the microbial community in the goat rumen. *Lett Appl Microbiol* 46:132-135.
23. Bickhart DM, Weimer PJ. 2018. Symposium review: Host-rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows. *J Dairy Sci* 101:7680-7689.
24. INRA. 2018. INRA feeding system for ruminants. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
25. Faichney GJ, Poncet C, Boston RC. 1989. Passage of internal and external markers of particulate matter through the rumen of sheep. *Reprod Nutr Dev* 29:325-337.
26. Marais JP. 2000. Use of markers, p 255-277. *In* J.P.F. DM (ed), Farm animal metabolism and nutrition. CABI Publishing, Wallingford.
27. Lindberg JE. 1988. Retention times of small feed particles and of water in the gut of dairy goats fed at different levels of intake. *J Anim Physiol Anim Nutr* 59:173-181.
28. Uden P, Colluci PE, Van Soest PJ. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of passage studies. *J Sci Food Agric* 31:625-632.
29. Clauss M, Hummel J, Streich WJ. 2006. The dissociation of the fluid and particle phase in the forestomach as a physiological characteristic of large grazing ruminants: an evaluation of available, comparable ruminant passage data. *Eur J Wildlife Res* 52:88-98.
30. Lindberg JE. 1985. Retention time on chromium-labeled feed particles and of water in the gut of sheep given hay and concentrate at maintenance. *Br J Nutr* 53:559-567.
31. Smuts M, Meissner HH, Cronje PB. 1995. Retention Time of Digesta in the Rumen - Its Repeatability and Relationship with Wool Production of Merino Rams. *J Anim Sci* 73:206-210.
32. Goetsch AL, Gipson TA, Askar AR, Puchala R. 2010. Invited review: Feeding behavior of goats. *J Anim Sci* 88:361-373.
33. Malmuthuge N, Guan LL. 2017. Understanding host-microbial interactions in rumen: searching the best opportunity for microbiota manipulation. *J Anim Sci Biotechnol* 8:300-306.
34. Bernard L, Chaise JP, Baumont R, Poncet C. 2000. The effect of physical form of orchardgrass hay on the passage of particulate matter through the rumen of sheep. *J Anim Sci* 78:1338-54.
35. Wood PDP. 1967. Algebraic model of lactation curve in cattle. *Nature* 216:164.
36. Dhanoa MS. 1981. A note on an alternative form of the lactation model of Wood. *Anim Prod* 32:349-351.
37. Ratkowsky DA, Giles DE. 1990. Handbook of nonlinear regression models. M. Dekker, New York.
38. Desnoyers M, Duvaux-Ponter C, Rigalma K, Roussel S, Martin O, Giger-Reverdin S. 2008. Effect of concentrate percentage on ruminal pH and time-budget in dairy goats. *Animal* 2:1802-1808.
39. Martin P, Bateson P. 2007. Measuring Behaviour: An Introductory Guide. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

40. Tolkamp BJ, Allcroft DJ, Austin EJ, Nielsen BL, Kyriazakis I. 1998. Satiety splits feeding behaviour into bouts. *J Theor Biol* 194:235-250.
41. Williams CH, David DJ, Iismaa O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J Agric Sci* 59:381-385.
42. Hyden S. 1955. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycols in biological materials. *Ann K Lantbrukshögskolan* 22:139-145.
43. Yu ZT, Morrison M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques* 36:808-812.
44. Escudie F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S, Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34:1287-1294.
45. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*. doi:10.7717/peerj.593.
46. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27:2194-2200.
47. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG. 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Meth* 10:57.
48. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Team RC. 2013. nlme: Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3:111.
49. Elzhov T, Mullen K, Spiess A, Bolker B. 2015. Minpack.lm: R interface to the Levenberg-Marquardt nonlinear least-squares algorithm found in MINPACK. Plus Support for Bounds R.
50. Šmilauer P, Lepš J. 2014. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO 5*. Cambridge university press, Cambridge, UK.
51. ter Braak CJ, Šmilauer P. 2012. *Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0*. Microcomputer power.
52. Hammer Ø, Harper DA, Ryan PD. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:1-9.

Supplementary Materials and Methods

The alternative form of the Wood model (35) proposed by Dhanoa (36) was used:

$$\text{Milk Yield}(t) = a \cdot t^{b \cdot c} \cdot \exp(-c \cdot t),$$

Where t is the time in days (0 was the first milking day), and a , b , and c are parameters of the model. Each set of (a , b , and c) describes the production phenotype of individuals and should be estimated by fitting the model to individual goat's milk yield. To avoid statistical difficulties related to initialization of model parameters and also to make the model parameters biologically meaningful, the model was reparametrized into 3 new parameters (Table S4) (37) : Milk Yield Peak (MYPeak) for the production at the peak of lactation, Milk Yield Persistency (MYPer) (ml/day²) which stands for the slope between lactation peak and the end of milk production (estimation of the individual goat capacity to maintain its milk production). The last one, t_i , for the time, different from 0, associated to a production value in the growing part of the curve. As milk yield was disturbed just after the rumen contents pooling, two principal steps were followed to estimate the theoretic milk yield curve and phenotypic parameters of milk yield for each goat: (1) the model was fitted to actual milk yield data. (2) Because series of negative residuals are associated to potential perturbations, an auto-correlation test (Dublin-Watson test, R software version 3.5.0) was applied on residuals and in case of P -value < 0.05, 1 percentile of residuals was removed and the model was again fitted to remaining data. This procedure has pushed up the curve at each iteration and stopped when P -value > 0.05.

Trait	Formula	Definition
MY_{Peak}	$MY_{Peak} = a \cdot t_{Peak}^{b \cdot c} \cdot e^{-c \cdot t_{Peak}}$	Milk yield production at lactation peak
t_{init}	$MY_{init} = a \cdot t_{init}^{b \cdot c} \cdot e^{-c \cdot t_{init}}$	Beginning of milk production
MY_{Per}	$MY_{Per} = \frac{MY_{final} - MY_{Peak}}{t_{final} - t_{Peak}}$	Milk yield persistency, with MY_{final} the milk yield production at the end of lactation (t_{final})

Table S4: Reparametrization of the milk production model into 3 new biologically meaningful traits with their formulas and definitions.

Supplementary Tables and Figures

Table S1. Number of sequences obtained per sample.

	d -8	d -5	d 2	d 139	d 148
S1	39004	37390	56050	39825	44728
S2	43424	53562	52044	48637	41370
S3	42889	47484	42226	40569	41620
S4	46872	37502	56123	36954	48805
A1	55425	47723	50020	47180	45218
A2	44464	55413	57543	41720	66942
A3	44033	38256	49843	29614	38862
A4	45122	32518	44422	51377	52302
A5	39410	39698	41645	45811	53194
A6	43216	43981	43459	44356	38735

Table S2. Bacterial and archaeal relative abundances at family taxonomic rank according to sampling days.

Domain	Phylum	Class	Order	Family	d -8/d -5		d 0	d 2		d 139/d 148		P-value
					Mean	SD		Mean	SD	Mean	SD	
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	<i>Prevotellaceae</i>	35.8 ^a	4.13	30.7	51.1 ^b	9.20	39.0 ^a	3.96	<0.0001
				<i>Rikenellaceae</i>	6.7 ^a	0.66	10.2	4.0 ^b	1.83	5.8 ^a	0.8	0.0002
				<i>Bacteroidales BS11 gut group</i>	4.4 ^a	0.72	11.7	2.7 ^b	1.51	4.6 ^a	0.70	0.0002
				<i>Bacteroidales S24-7 group</i>	3.7 ^a	0.48	4.7	1.9 ^b	1.28	3.1 ^a	0.46	<0.0001
				<i>Bacteroidales RF16 group</i>	1.2 ^a	0.41	2.7	0.8 ^b	0.40	1.3 ^a	0.38	0.0001
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	<i>Ruminococcaceae</i>	13.9	1.17	12.6	12.1	3.26	13.8	1.04	NS
				<i>Lachnospiraceae</i>	9	1.11	5.8	9	1.56	9	0.75	NS
				<i>Christensenellaceae</i>	10.7 ^a	2.27	6.4	6.5 ^b	2.44	8.3 ^b	1.15	0.0003
				<i>Family XIII</i>	1.0 ^a	0.12	1.8	0.4 ^b	0.18	1.0 ^a	0.13	<0.0001
		Negativicutes	Selenomonadales	<i>Acidaminococcaceae</i>	0.6 ^a	0.23	1.6	1.7 ^b	0.36	1.1 ^c	0.28	<0.0001
				<i>Veillonellaceae</i>	1.1	0.50	0.6	0.7	0.21	1	0.39	NS
				<i>Erysipelotrichia</i>	Erysipelotrichales	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.7	0.13	0.7	0.8	0.98	0.6
	Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales	<i>Spirochaetaceae</i>	1.6	0.45	1.7	1.3	0.85	1.9	0.50	NS
Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	<i>Fibrobacteraceae</i>	1.8 ^a	0.50	1.4	0.6 ^b	0.36	2.2 ^a	1.02	<0.0001	
Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF9	<i>unknown family</i>	1.3 ^a	0.44	0.7	2.3 ^b	1.54	1.0 ^a	0.23	0.0071	
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	<i>Methanobacteriaceae</i>	4.1 ^a	1.50	3.5	1.9 ^b	0.62	3.7 ^a	0.61	0.0001
				Others	2.4 ^a	0.36	3.1	2.0 ^b	0.59	2.5 ^a	0.44	0.0277

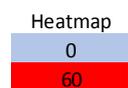


Table S2: Bacterial and archaeal relative abundances at family taxonomic rank according to sampling days. Family relative abundances (in %) were calculated in the rumen contents pool (d 0), and the 10 goat rumen contents before pooling (average of d -8 and d -5), two days after (d 2) and at the end of the experiment (average of d 139 and d 148). Families under 5,000 reads are into "Others". Superscript letters show significant differences with a Bonferroni correction between sampling days (d 0 excluded; linear mixed model). SD: standard deviation to the mean. NS: not significant (P-value > 0.1). The heatmap visualizes relative abundances from 0% (blue) to 60% (red).

Domain	Phylum	Class	Order	Family	d -8/d -5			d 2			d 139/d 148		
					Saanen	Alpine	P-value	Saanen	Alpine	P-value	Saanen	Alpine	P-value
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	37.08	35.01	NS	54.25	49.01	NS	39.78	38.45	NS
				Rikenellaceae	6.22	6.96	0.08	4.35	3.77	NS	5.93	5.68	NS
				Bacteroidales BS11 gut group	3.83 ^a	4.75 ^b	0.03	2.23	3.03	NS	4.51	4.65	NS
				Bacteroidales S24-7 group	3.97	3.57	NS	1.96	1.89	NS	2.99	3.22	NS
				Bacteroidales RF16 group	1.22	1.21	NS	0.83	0.77	NS	1.05	1.53	0.06
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	14.04	13.83	NS	10.97	12.92	NS	14.3	13.45	NS
				Lachnospiraceae	9.32	8.74	NS	8.66	9.21	NS	8.97	9.08	NS
				Christensenellaceae	11.23	10.33	NS	5.41	7.2	NS	8.93	7.91	NS
				Family XIII	1.05	1.04	NS	0.44	0.46	NS	1.03	0.95	NS
		Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	0.46	0.71	0.10	1.47	1.82	NS	1.06	1.15	NS
				Veillonellaceae	0.63 ^a	1.37 ^b	0.008	0.76	0.68	NS	0.69 ^a	1.28 ^b	0.007
		Erysipelotrichia	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	0.7	0.67	NS	0.77	0.81	NS	0.51	0.58	NS
		Spirochaetae	Spirochaetes	Spirochaetales	Spirochaetaceae	1.39	1.82	NS	1.48	1.25	NS	1.55	2.1
	Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	1.35 ^a	2.03 ^b	0.03	0.4	0.75	NS	1.49	2.69	0.06
	Tenericutes	Mollicutes	Mollicutes RF9	unknown family	1.33	1.21	NS	2.23	2.42	NS	1	1.02	NS
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	3.9	4.22	NS	1.58	2.17	NS	3.88	3.63	NS
				Others	2.27	2.55	NS	2.22	1.83	NS	2.34	2.6	NS

Table S3: Bacterial and archaeal relative abundances at family taxonomic rank according to breed and sampling days. Family relative abundances of Saanen (n=4) and Alpine (n=6) goats (in %) were determined before rumen contents pooling (average of d -8 and d -5), two days after (d 2) and at the end of the experiment (average of d 139 and d 148). Families under 5,000 reads were into "Others". Superscript letters were added to the mean values when significant differences were observed between the two breeds (Mann-Whitney test). NS: not significant (P-value > 0.1)

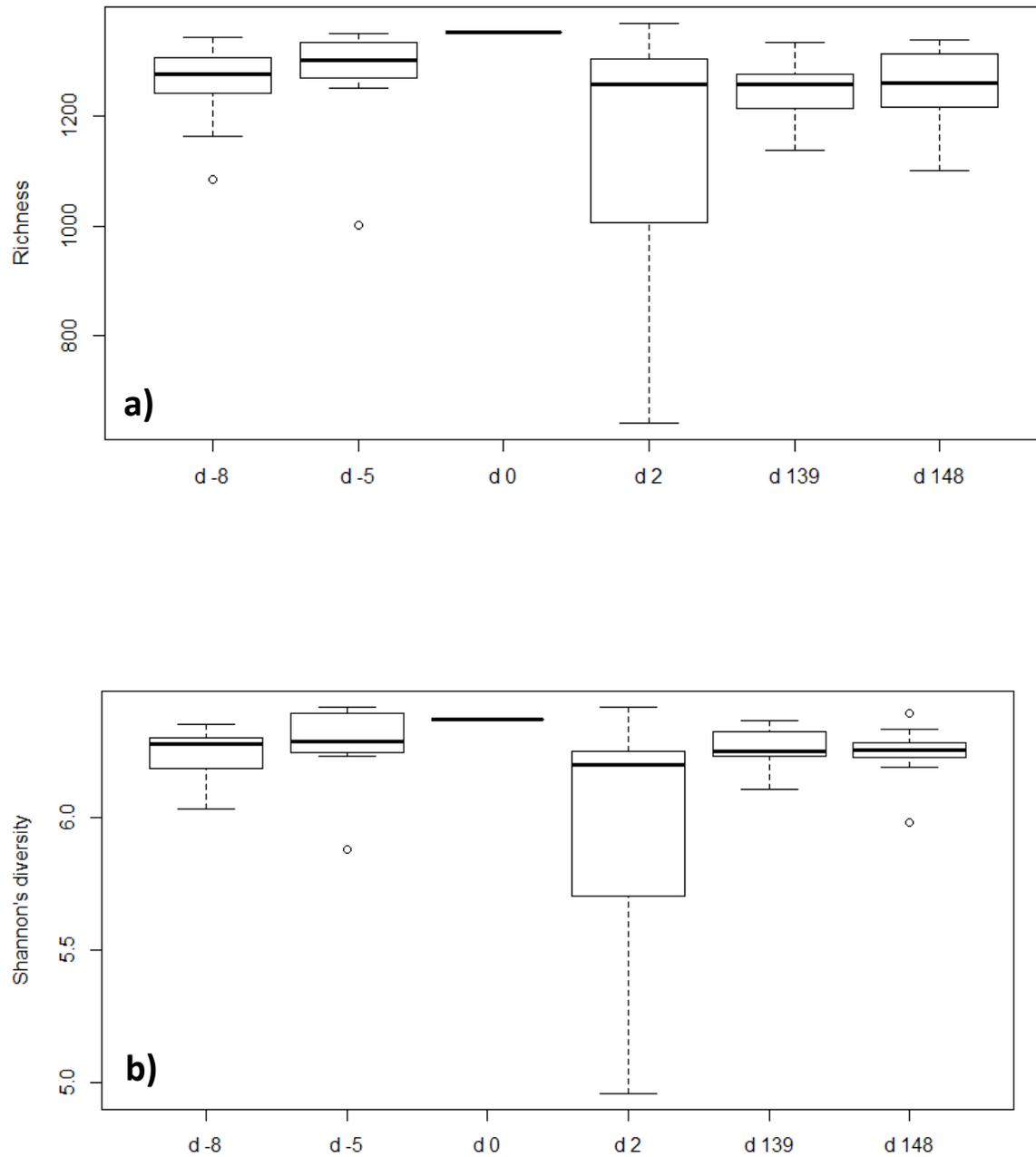


Figure S1: Alpha diversity boxplots of 10 lactating goats at OTU taxonomic rank before (d -8 and d -5) and after (d 139 and d 148) the rumen contents pooling (d 0). The bar at d 0 indicates the indice of the pool. Indices were represented per day. **a)** Richness **b)** Shannon diversity indices. There was no significant differences between each sampling time (Kruskal–Wallis test).

Partie II : Etude de l'interrelation entre la vache et son microbiote ruminal

1.1 INTRODUCTION

Dans cette seconde partie du mémoire de thèse, nous poursuivons nos recherches pour mieux comprendre l'interrelation entre le microbiote ruminal et l'animal hôte, en nous basant sur les résultats observés avec les chèvres. Pour rappel de l'état de l'art, les travaux de l'équipe de P. J. Weimer énonçaient l'hypothèse suivante : les communautés microbiennes ruminales sont uniques pour chaque animal hôte et sont très résilientes aux perturbations (Weimer et al., 2010). En effet, les expérimentations consistant à échanger les contenus ruminiaux de vaches en lactations nourries avec des rations contenant de 10 à 26 % de maïs grain ont montrées un retour de la communauté microbienne à une composition proche de celle avant échange. Les résultats obtenus dans la première partie de cette thèse, menés sur des chèvres taries nourries avec une ration riche en fibres, semblent modérer cette hypothèse car les communautés microbiennes se sont stabilisées sur un nouvel état d'équilibre 4 mois après la synchronisation des contenus ruminiaux. Dans cet essai, la composition chimique des aliments, avant et après la synchronisation, était légèrement différente suite à l'ajout d'une matière première dans la ration (luzerne déshydratée brins longs) qui reste un point de vigilance à propos de ces résultats. Durant la seconde expérimentation, menée sur des chèvres en lactation nourries avec une ration à base de fourrage et de 30% de pulpe de betteraves riche en glucides rapidement fermentescibles, la communauté microbienne ruminale est retournée à une composition proche de la composition initiale malgré, là aussi, un changement léger de la ration des chèvres. Ces seconds résultats sont en accord avec l'hypothèse de Weimer et al. (2010). Les différences entre ces deux expérimentations avec des chèvres sont liées à la ration distribuée et au statut physiologique (tari ou en lactation) des animaux. Nous ne disposons pas d'un dispositif expérimental suffisant pour tester dans une même expérimentation l'effet du statut des animaux et de la ration. Dans cette seconde partie, nous avons choisi d'étudier l'effet de la ration sur l'évolution de la composition du microbiote suite à une perturbation de l'écosystème ruminal. Les deux rations qui ont été testées avaient pour objectif de correspondre à une ration d'entretien et une ration de production. Les deux étaient constituées de fourrages mais la ration de production contenait en plus du maïs grain pour accroître la teneur en amidon. La vache tarie a été choisie comme modèle animal de l'expérimentation afin de tester l'effet de ces deux rations.

Cette expérimentation a été conduite pour étudier deux questions qui vont constituer chacune un chapitre : la résilience structurelle et la spécificité du microbiote lié à l'animal hôte. La procédure de synchronisation des contenus ruminiaux, utilisée dans la partie I, a également été utilisée avec les vaches taries. Cette procédure a une double fonction : entraîner une perturbation importante de l'écosystème ruminal et fournir à l'ensemble des animaux un même microbiote à un même moment. Elle a été réalisée au sein d'une période d'étude de 4 mois où les animaux étaient nourris avec une ration à base de foin, riche en fibres. Avant et après cette période d'étude de 4 mois avec cette ration, les animaux ont été nourris pendant 1 mois avec une ration à base d'ensilage de maïs, riche en amidon, pour comparer la composition du microbiote avec cette ration entre ces 2 périodes. Dans le premier chapitre, nous avons cherché à savoir si l'évolution de la composition du microbiote après une perturbation importante de l'écosystème ruminal (la synchronisation) était dépendante de la ration distribuée aux vaches. Notre hypothèse était la suivante : avec la ration à base de foin, riche en fibres, plusieurs états d'équilibre sont possibles après la perturbation de l'écosystème ruminal alors qu'avec la ration à base d'ensilage de maïs, riche en amidon, le nombre d'états d'équilibre possible est beaucoup plus limité, conduisant à un retour très probable à un équilibre très proche de la composition

initiale. Les évolutions de composition du microbiote ruminal entre les 2 rations et au cours du temps ont été mises en relation avec des paramètres fermentaires pour évaluer à quel point les fermentations étaient affectées par ces changements de composition de la communauté microbienne ruminale. Les paramètres fermentaires qui ont été mesurés *in vivo* étaient le pH du contenu ruminal et la concentration en AGV et en NH₃. Ces paramètres sont des résultantes de l'action du microbiote et de l'animal hôte. La production, la cinétique et la composition des gaz fermentaires ont été mesurés *in vitro*. Ces paramètres sont uniquement liés au microbiote pour un substrat donné. Dans le second chapitre, nous avons poursuivi notre étude de l'effet de l'animal hôte sur l'évolution de son microbiote ruminal après la synchronisation. Nous avons étudié l'impact des caractéristiques individuelles des vaches sur la composition des microbiotes aux deux états stables observés avant et après synchronisation. Les caractéristiques des vaches étudiées étaient le poids vif, la quantité de contenu ruminal juste avant la synchronisation, les taux de passage des phases solide et liquide. Ces taux ont été mesurés sur les 2 rations distribuées avant et après synchronisation. Notre hypothèse supposait que ces paramètres influenceraient la composition du microbiote après la perturbation de l'écosystème ruminal indépendamment de la ration distribuée aux vaches.

Cet essai sur vaches taries a été réalisé de novembre 2018 à mai 2019. Cette fin tardive par rapport au calendrier de thèse, ajoutée à plusieurs complications inopinées concernant les analyses des échantillons pour la composition des microbiotes, a conduit à l'obtention des résultats seulement en toute fin de thèse, le 3 février 2020. L'approfondissement de cette partie n'a pas pu être réalisé comme il aurait dû l'être.

1.2 MATERIEL ET METHODES

Le matériel et méthodes, présenté ci-après, décrit les procédures utilisées pour l'ensemble de cette partie.

Cette expérimentation s'est déroulée du 12 novembre 2018 au 17 mai 2019 dans les installations expérimentales de la société NEOVIA, basées à Saint-Nolff (Morbihan, France). Elle a été réalisée sous le projet de recherche APAFIS#1528-2018051708553818 v3.

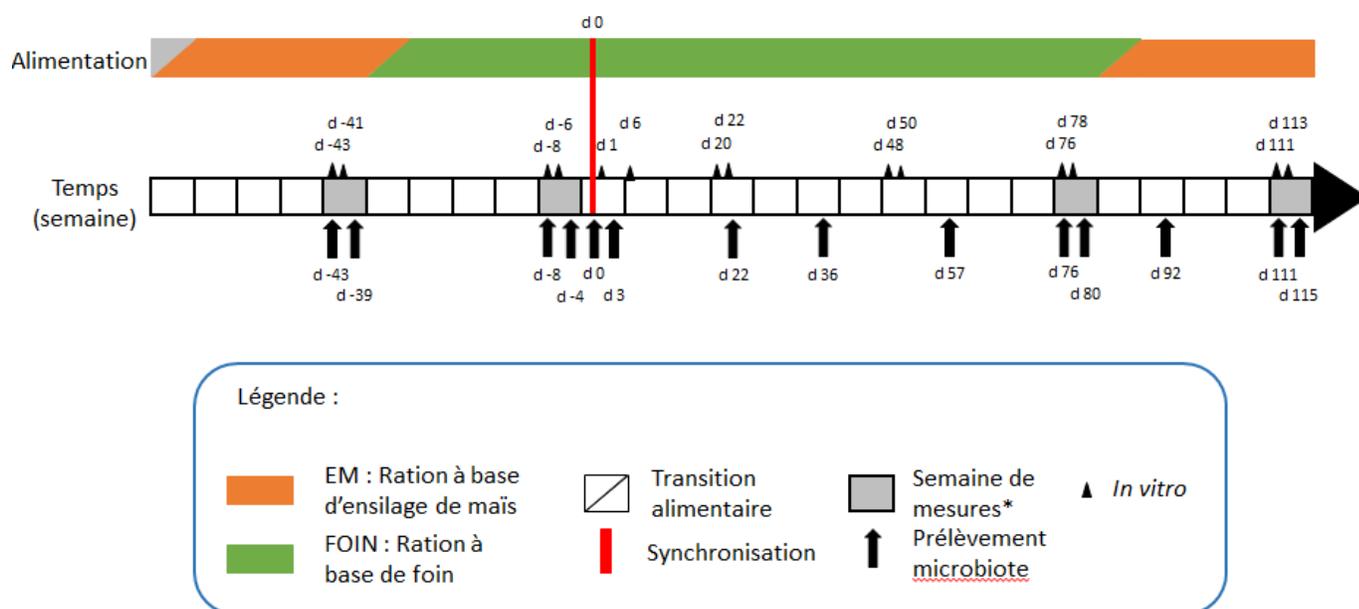
1.2.1 Animaux

Les animaux qui ont été utilisés pour cette expérimentation étaient 6 vaches Holstein taries, hystérectomisées et canulées au rumen. Ces 6 animaux sont présentés dans le tableau 1.

Vache	Poids (kg)	Date de naissance
2115	830	27/07/2007
1899	753	17/09/2004
2141	840	20/12/2007
3286	580	19/11/2014
3238	651	20/08/2014
2377	900	08/03/2007

Tableau 1 : Description des vaches utilisées. Les poids sont issus d'une pesée des animaux le 6 novembre 2018, avant le début de l'expérimentation.

Ces animaux étaient âgés de 4 à 14 ans et pesaient de 580 à 900 kg. La variable **Poids Vif (PV)** reprend ces pesées en kilogrammes pour caractériser le gabarit des animaux. Les vaches étaient logées pour toute la période de l'essai en stabulation libre à logettes. Chaque animal disposait d'une logette équipée de tapis. L'accès à l'eau était permanent grâce à des abreuvoirs individuels. Pour avoir une vision globale du déroulement de l'expérimentation, un schéma synthétique du dispositif expérimental est présenté dans la figure 1.



* Durant ces 4 semaines, les concentrations d'acides gras volatils et d'ammoniac dans le rumen sont mesurées à d -42, d -7, d 77 et d 112. Des prélèvements de contenu de rumen ont été réalisés durant toute la semaine pour estimer les taux de passage de la phase liquide et solide.

Figure 1 : Schéma des principales mesures réalisées sur les vaches au cours de l'expérimentation. Chacun des tronçons de la ligne de temps représente une semaine. La synchronisation des contenus ruminiaux indique une procédure de vidange, mélange et réensemencement des contenus ruminiaux des 6 vaches. Les triangles noirs indiquent les incubations réalisées in vitro.

L'échelle de temps présenté sur ce graphique est en jours et d 0 est considéré comme étant le jour de la procédure de synchronisation des contenus ruminiaux.

1.2.2 Rations

Les animaux étaient nourris 2 fois par jour avec une ration couvrant leurs besoins d'entretien. La moitié de la ration était distribuée le matin à 8h30 et la seconde moitié était distribuée en fin d'après-midi à 16h30. Durant les 4 semaines de mesures présentées sur le schéma du dispositif expérimental (figure 1), les horaires ont légèrement été décalés en fonction des prises d'échantillons. Sur l'ensemble de l'essai, 2 aliments ont été distribués. Le premier est une ration riche en concentré (**ration EM**) à base de 2,6 kg de MS d'ensilage de maïs, 1,3 kg de MS de foin, 1,8 kg de MS de concentré à 37,6 % de MAT (voir annexe 1) et 1,3 kg de MS de maïs grain grossièrement broyé. Le second est une ration riche en fibres (**ration FOIN**) à base de 3,4 kg de MS de foin, 0,8 kg de MS d'ensilage de maïs, 3,1 kg de MS de concentré à 26,7 % de MAT (voir annexe 1). La composition chimique de ces 2 rations est de 15,9 et 16,3 % de MAT, 17 et 24,6 % de cellulose et de 27,1 et 6,5 % d'amidon respectivement. Les informations sur ces 2 rations sont présentées dans le tableau 2.

	Ration	
	FOIN	EM
Matière sèche ingérée (kg de MS/jour)	7,2	7,0
Ingrédients (% de MS)		
Ensilage de maïs	11,0	37,1
Concentré FOIN	42,5	-
Concentré MAÏS	-	25,7
Foin	46,5	18,6
Maïs grain broyé	-	18,6
Composition (% de MS)		
MAT	16,3	15,9
Cellulose	24,6	17,0
MG	2,3	1,6
Amidon	6,5	28,7

Tableau 2 : Récapitulatif des quantités de matière sèche ingérée sur les 2 rations (EM et FOIN) des ingrédients composant ces 2 rations et de leur composition chimique.

L'alternance des rations s'est faite selon le schéma (Figure 1). Deux transitions alimentaires ont eu lieu. La première consistait à passer de l'aliment EM à l'aliment FOIN selon les modalités présentées dans le tableau 3.

Kg de MS	Avant	Transition							Après
	d -65 < x < d -36	d -36	d -35	d -34	d -33	d -32	d -31	d -30	d -30 < x < d 83
Ensilage maïs	2,6	2,3	2,3	1,9	1,9	1,3	1,3	0,8	0,8
Concentré FOIN	0	0,9	0,9	1,8	1,8	2,6	2,6	3,1	3,1
Concentré MAÏS	1,8	1,3	1,3	0,9	0,9	0,4	0,4	0,0	0,0
Foin	1,3	1,7	1,7	1,7	2,5	2,5	2,5	3,4	3,4
Maïs grain broyé	1,3	1,0	1,0	0,7	0,7	0,3	0,3	0	0
Total ingéré	7,0	7,2	7,2	6,9	7,7	7,3	7,3	7,2	7,2

Tableau 3 : Transition alimentaire de l'aliment riche en concentré (ration EM) à l'aliment riche en fibres (ration FOIN). Ce tableau indique les quantités distribuées de chaque composant des rations pendant cette semaine de transition alimentaire.

La seconde transition alimentaire consistait à passer de l'aliment FOIN à l'aliment EM selon les modalités présentées dans le tableau 4.

Kg de MS	Avant	Transition							Après
	d -30 < x < d 83	d 83	d 84	d 85	d 86	d 87	d 88	d 89	d 89 < x
Ensilage maïs	0,8	1,3	1,3	1,9	1,9	2,3	2,3	2,6	2,6
Concentré FOIN	3,1	2,6	2,6	1,8	1,8	0,9	0,9	0	0
Concentré MAÏS	0	0,4	0,4	0,9	0,9	1,3	1,3	1,8	1,8
Foin	3,4	2,5	2,5	2,5	1,7	1,7	1,7	1,3	1,3
Maïs grain broyé	0	0,3	0,3	0,7	0,7	1,0	1,0	1,3	1,3
Total ingéré	7,2	7,3	7,3	7,7	6,9	7,2	7,2	7,0	7,0

Tableau 4 : Transition alimentaire de l'aliment riche en fibres (ration FOIN) à l'aliment riche en concentré (ration EM). Ce tableau indique les quantités distribuées de chaque composant des rations pendant cette semaine de transition.

- Synchronisation des contenus ruminiaux (d o)

La veille de la synchronisation, les vaches n'ont reçu que le repas du matin avec un accès libre à l'eau. Le matin, pour la réalisation de cette manipulation, les animaux ont été maintenus dans les logettes. Chaque vache a eu son rumen vidangé par la canule ruminale. Les rumens ont été rincés avec 20 litres d'eau à $39 \pm 1^\circ\text{C}$ deux fois de suite. La partie du rumen au-dessus du niveau de l'eau de rinçage a été lavée par pulvérisation. Les rumens ont ensuite été remplis avec 40 litres de liquide physiologique à $39 \pm 1^\circ\text{C}$ pour la mise en attente. Les contenus ruminiaux de chaque animal ont été pesés (variable « CR » utilisée par la suite) puis immédiatement introduits dans des bidons saturés en CO_2 et maintenus à $39 \pm 1^\circ\text{C}$ au bain marie. Après élimination de la solution saline dans les rumens, l'inoculum réintroduit était égal à 90 % du poids du contenu ruminal initialement retiré. Cet inoculum a été réalisé avec le contenu ruminal des 6 vaches selon des proportions équivalentes aux contributions de chaque rumen à la quantité totale de contenu retiré. Cet inoculum a été mélangé, puis échantillonné pour analyser sa composition. Les conditions anaérobies et la température ont été maintenues durant toute la procédure. Le schéma de l'organisation spatiale est présenté en annexe 2. Juste après cette procédure de synchronisation, en fin de matinée, les animaux ont reçu leur ration du matin.

1.2.3 Procédure de prélèvement de contenu ruminal (cf. figure 1, flèches noires)

Le protocole de prélèvement avait une durée d'environ 10 minutes. Le matériel de prélèvement était spécifique à chaque vache ou désinfecté entre 2 animaux pour éviter les contaminations microbiennes. Il consistait à bloquer les animaux dans leurs logettes, puis à ouvrir la canule ruminale et à prélever à l'aide d'un bécher de 250 mL en 6 points pour obtenir un échantillon le plus représentatif possible du contenu ruminal. La diversité le long de l'axe antéro-postérieur a été représentée par 3 emplacements de prélèvement : un crânial, un caudale et un au centre du rumen. La diversité le long de l'axe dorso-ventrale a été représentées sur 2 hauteurs pour chacun des 3 emplacements cités précédemment, en surface du contenu ruminal, juste sous cette dernière, et au fond de l'organe. Pour chacun de ces points de prélèvement, 250 ml de contenu a été prélevé et regroupé dans un même récipient saturé au préalable avec du CO₂.

1.2.4 Mesure des paramètres fermentaires

Les mesures présentées dans cette partie sont utilisées pour contribuer à la caractérisation des phénotypes des animaux.

- pH

Le pH des contenus ruminiaux a été mesuré, à l'aide d'un pH-mètre, pour chacune des 6 vaches le matin avant la distribution de la ration aux jours suivants : d -43, d -39, d -36, d -34, d -32, d -29, d -27, d -25, d -20, d -18, d -15, d -13, d -11, d -8, d -4, d -1, d 1, d 6, d 10, d 15, d 22, d 29, d 36, d 43, d 50, d 57, d 64, d 77, d 80, d 83, d 85, d 87, d 92, d 94, d 101, d 104, d 108, d 111 et d 115.

- AGV et NH₃

Les mesures des concentrations ruminales en AGV et en NH₃ ont été réalisées simultanément à 4 reprises pendant l'expérimentation à d -42, d -7, d 77 et d 112. Durant ces journées, 4 prélèvements ont été réalisés pour estimer les concentrations moyennes journalières par vache. Le premier prélèvement a été réalisé juste avant la distribution du repas du matin, puis 4h, 6,5h et 9h après la distribution de ce repas. Une fois le contenu ruminal échantillonné, il a été filtré à travers une toile en nylon de porosité 50 µm. Cinq millilitres de ce jus ont été transférés dans un tube contenant 1 ml d'acide métaphosphorique et stockés immédiatement à -20°C pour les analyses d'AGV (Hünerberg et al., 2013). Cinq millilitres de ce jus ont été transférés dans un tube contenant 0,5 ml d'acide orthophosphorique et stockés immédiatement à -20°C pour les analyses de NH₃ (Guyader et al., 2015). Les concentrations d'acétate, de propionate et de butyrate dans le jus de rumen ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse (CPG) dans le laboratoire Upscience (Saint Nolff, Morbihan, France). Le chromatographe en phase gazeuse est équipé d'un injecteur *on-column* et d'un détecteur FID Agilent 689. L'échantillon est centrifugé au préalable. Le passeur d'échantillon est automatique, le gaz *make up* est l'hydrogène et la colonne est semi-capillaire (Agilent CP7624). La concentration de NH₃ dans les jus de rumen a été mesurée à l'aide d'une sonde spécifique (Broudicou and Papon, 1994) au laboratoire MoSAR (Paris, France).

- *In vitro* (IV)

Pour obtenir des caractéristiques uniquement liées aux microbiotes ruminiaux, des fermentations *in vitro* ont été réalisées. Les 6 vaches de cette expérimentation ont servi d'animaux donneurs d'inoculum. Il y a eu 14 incubations associées à l'alimentation distribuée aux animaux. Les incubations n°1, 2, 13 et 14 ont été réalisées avec l'aliment EM à d -43, d -41, d 111 et d 113 respectivement. Les incubations n°3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12 ont été réalisées avec la ration FOIN à d -8, d -6, d 1, d 6, d 20, d 22, d 48, d 50, d 76 et d 78 respectivement comme indiqué sur la figure 1. Pour chaque incubation, 12 traitements étaient répartis entre 30 flacons. Cinq flacons étaient attribués par vache dont 2 « sans substrat » pour connaître le potentiel fermentaire de l'inoculum et 3 « avec substrat ». Les réplicats pour une même vache et pour un même substrat ont été moyennés. Chaque inoculum a été traité individuellement avec du matériel séparé pour éviter les contaminations microbiennes. Pour chacun des flacons, il a fallu 24 ml d'inoculum. Pour chaque incubation dans les 18 flacons « avec substrat », ce dernier était composé des mêmes matières premières que la ration distribuée le jour du prélèvement de contenu ruminal avec exactement les mêmes proportions de matière sèche. Tous les ingrédients ont été broyés à 3 mm sauf le foin qui a été broyé à 1 mm. Pour ces 18 flacons, 2,4 g de matière sèche ont été disposés dans chaque flacon. Un liquide tampon a été préparé (Mould et al., 2005). Le détail du protocole de préparation est présenté en annexe 3. Le tampon (216 mL) a été ajouté au flacon contenant le substrat afin de le pré-hydrater. Le matin de l'inoculation, les flacons ont été réchauffés au bain-marie à 39°C et connectés à l'AMPTS (Automatic Methane Potential Test System) de chez Bioprocess Control (Lund - Suède) avant d'ajouter l'inoculum (24 mL). Le système AMPTS était saturé avec du CO₂. Après cette étape, la sortie de chaque cellule de l'AMPTS a été connectée à des poches pour collecter le gaz produit. L'incubation a duré 47h et les flacons n'ont pas été agités. Les volumes de gaz totaux produits ont été mesurés en continu. Ces données mesurées en fonction du temps ont été ajustées sur une adaptation du modèle d'Orskov sans temps de latence (Orskov and McDonald, 1979) :

$$V(t) = a + b \cdot (1 - \exp^{-c \cdot t})$$

Avec V(t) le volume de gaz (en ml) produit à l'instant t (en h), a la fraction soluble (en ml), b la fraction insoluble (ml) et c le taux fractionnaire associé à la fraction b (en h⁻¹).

A la fin des incubations la composition des gaz a été analysée par le GEOTECH biogas 5000 (Coventry – Royaume-Uni). Pour chacune des poches de gaz, 3 fois 50 ml de gaz sont prélevés pour mesurer leur teneur en CO₂ et en CH₄.

1.2.5 Mesure des taux de passage de la phase liquide et solide dans le rumen

La caractérisation des dynamiques des contenus ruminiaux se traduit dans cette expérimentation uniquement par la mesure des taux de passage de la phase liquide et solide des contenus ruminiaux. Les cinétiques d'ingestion ne sont pas étudiées pour ces 6 animaux car le rationnement mis en place dans cette expérimentation conduit à une très faible variabilité du comportement d'ingestion entre les 6 vaches. Les contenus ruminiaux ont été échantillonnés pour estimer les taux de passage sur 4 périodes de d -43 à d -39, de d -8 à d -4, de d 76 à d 80 et de d 111 à d 115. Le polyéthylène glycol (PEG) a été utilisé comme marqueur de la phase liquide. Le suivi de la concentration en matière minérale insoluble dans l'acide chlorhydrique (AIA) a été utilisé comme marqueur de la phase solide (Egan and Doyle, 1984). Durant ces 4 semaines de mesures, 150 g de PEG préalablement dissout dans 1 L d'eau et 1 500 g de balle de riz (source

d'AIA) pré-hydratée avec 6 L d'eau ont été introduits le mardi matin avant la distribution des repas dans le rumen. La partie liquide du contenu a été échantillonnée à 3, 5,5, 8, 9, 23, 32 et 47 heures après introduction du marqueur. La partie solide du contenu ruminal a été échantillonnée 25, 19 et 16 h avant l'introduction de la balle de riz et 5,5, 8, 23, 29, 32, 47, 56, 71 et 80 h après l'introduction. Les contenus ruminiaux ont été prélevés selon la méthodologie décrite précédemment (procédure de prélèvement de contenu ruminal). L'échantillon a été filtré sur une toile en nylon de porosité 50 µm. A partir de la fraction liquide, 3 fois 10 ml ont été introduits dans 3 flacons de 15 ml et ont été stockés à -20°C jusqu'à l'analyse. La fraction solide a été séchée à l'étuve pendant 48h à 80°C dans des barquettes aluminium et ces contenus séchés ont été conservés dans des pots hermétiques à température ambiante. Les échantillons de contenu liquide ont été analysés (MoSAR, Paris, France) pour déterminer la concentration en PEG par turbidimétrie (Hyden, 1956). Les échantillons de contenu solide pour l'analyse des insolubles chlorhydriques ont été réalisés selon le règlement CE 152/2009 (Upscience, Saint-Nolff, Morbihan, France). L'échantillon est incinéré puis les cendres ont été traitées à ébullition par l'acide chlorhydrique et le résidu insoluble ont été filtré puis pesé.

- Taux de passage de la phase liquide

La variable associée au taux de passage de la phase liquide (TPPL) est estimée par un ajustement des données avec le modèle suivant :

$$[marker]_t = [marker]_{t_0} \cdot \exp \frac{-k \cdot t}{100}$$

Où t est le temps (en h), k est TPPL (en %/h) et $[marker]_{t_0}$ la concentration initiale en PEG dans le rumen. L'estimation précise de la concentration initiale du marqueur nécessite l'utilisation d'un modèle double exponentiel. Dans notre expérimentation, nous n'avons pas suffisamment de prélèvements suivant l'introduction du marqueur pour utiliser un tel modèle. Nous ne prendrons pas en compte cette concentration initiale pour la suite des analyses.

- Taux de passage de la phase solide

Pour obtenir le taux de passage de la phase solide (TPPS) les concentrations analysées ont été ajustées sur un modèle prenant en compte l'apport de cendres insolubles à chaque repas et l'incorporation de balle de riz dans le rumen. Une loi d'action de masse modélise la sortie des cendres insolubles du rumen. Le repas du matin est toujours distribué à la même heure alors que le repas du soir n'est pas distribué exactement aux mêmes heures à cause des prélèvements à réaliser sur les animaux lors de ces semaines de mesure. Pour ajuster au mieux le modèle aux données mesurées, l'heure exacte des repas est prise en compte. Le modèle démarre une semaine avant l'incorporation de balle de riz afin qu'il soit complètement stabilisé au moment de l'introduction de cette dernière. Le diagramme du modèle est présenté dans la figure 2.

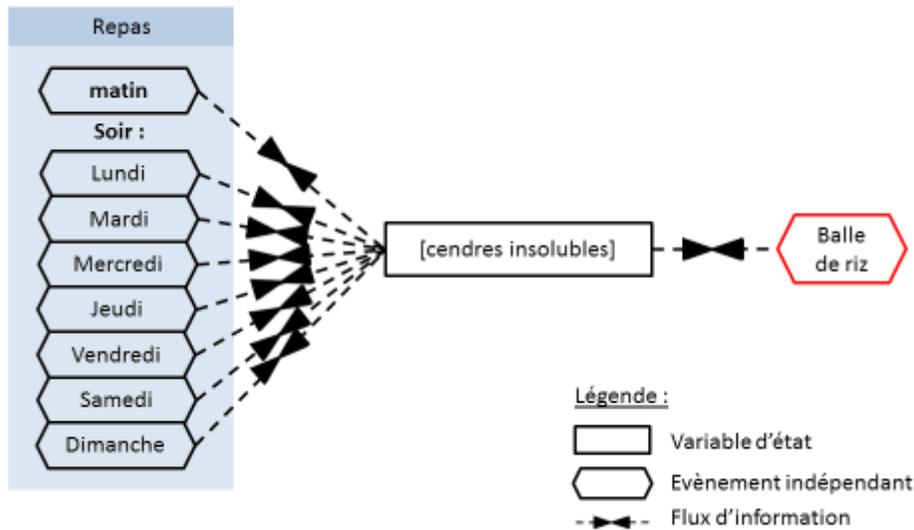


Figure 2 : Diagramme du modèle de l'évolution de la concentration des cendres insolubles dans le rumen en fonction du temps, des apports périodiques par les repas et d'un apport ponctuel avec l'incorporation de balle de riz.

Dans ce modèle la concentration en cendres insolubles dans le rumen est une variable d'état définie par une équation différentielle et modulée par des évènements. L'équation différentielle est basée sur une loi d'action de masse présentée ci-dessous :

$$\frac{d[\text{cendres insolubles}]}{dt} = \frac{-TPPS}{100} \cdot [\text{cendres insolubles}]$$

Les repas sont des évènements indépendants et périodiques définis de la manière suivante :

- repas du matin

$$[\text{cendres insolubles}] = [\text{cendres insolubles}] + \text{repas}$$

Où *repas* est une variable à estimer par le modèle pour chaque animal comme étant l'augmentation de concentration des cendres insolubles dans le rumen après chaque repas. Cet évènement a une période égale à 24 h et commence à 9 h.

- repas du soir

$$[\text{cendres insolubles}] = [\text{cendres insolubles}] + \text{repas}$$

Cet évènement est défini pour chacun des jours de la semaine. Ces évènements ont une période de 168 h et commencent à 17 h pour le lundi, 42 h pour le mardi, 65 h pour le mercredi, 89 h pour le jeudi, 113 h pour le vendredi, 137 h pour le samedi et 161 h pour le dimanche.

Le seul évènement indépendant ponctuel concerne l'incorporation de la balle de riz dans le rumen.

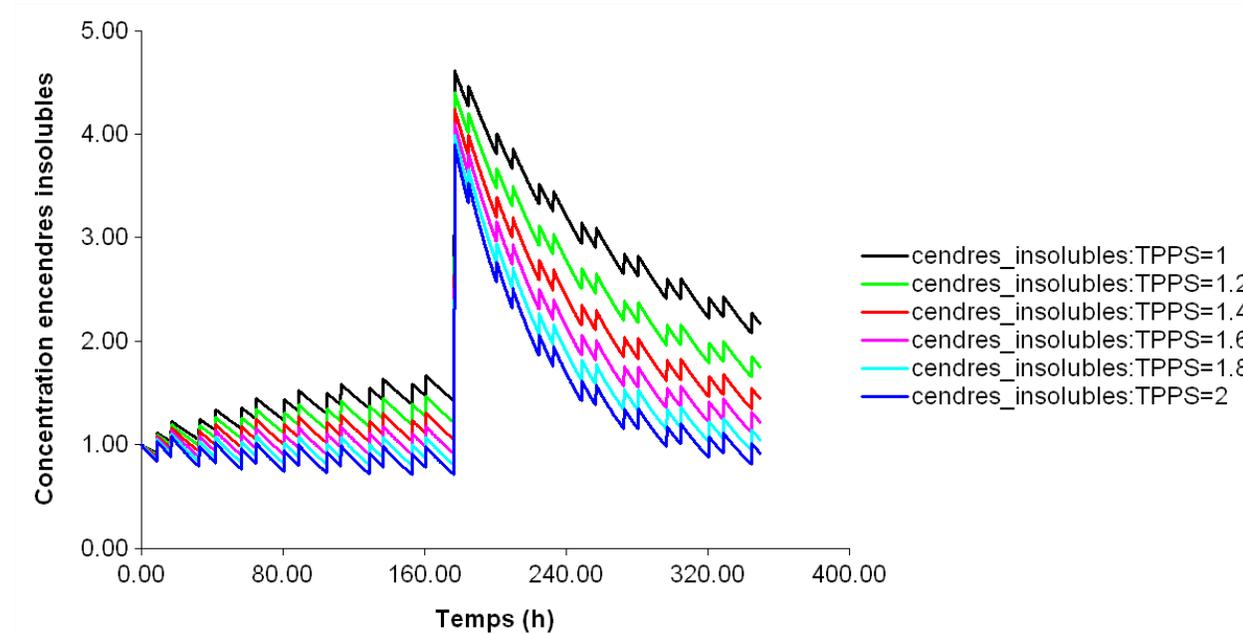
$$[\text{cendres insolubles}] = [\text{cendres insolubles}] + \text{incorpo_bdr}$$

Où *incorpo_bdr* est une variable à estimer par le modèle qui correspond à l'augmentation de la concentration de cendres insolubles dans le rumen dû à la mise en place de la balle de riz dans le

rumen de chacune des vaches. C'est un évènement indépendant et ponctuel qui intervient à 177 h.

La concentration initiale en cendres insolubles dans le rumen indiquée dans le modèle correspond à la moyenne des 3 premiers prélèvements avant l'incorporation de balle de riz.

Une stabilisation du modèle est réalisée pendant 8 jours avant l'incorporation de balle de riz. L'ajustement du modèle aux données mesurées se fait période par période et vache par vache. Les heures de prélèvement initiales -25, -19, -16, 5.5, 8, 23, 29, 32, 47, 56, 71 et 80 h sont basées par rapport à l'incorporation de la balle de riz à 0 h et sont ensuite décalées artificiellement de +177 heures ($\approx + 8$ jours) afin de stabiliser le modèle. Les horaires de prélèvements appliqués au modèle sont donc : 152, 158, 161, 182,5, 185, 200, 206, 209, 224, 233, 248 et 257 h. Le modèle estime 3 paramètres : *repas*, *incorpo_bdr* et *TPPS*. La méthode du simplexe est utilisée pour l'ajustement et le nombre d'étapes de convergence est défini à 100. La figure d'analyse de sensibilité du paramètre TPPS (figure 3) dans le modèle permet de visualiser les trajectoires des concentrations en cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique dans le rumen en fonction de différents TPPS en gardant l'ensemble des autres paramètres constants.



1.2.6 Composition du microbiote

Pour caractériser la composition du microbiote ruminal, les contenus ont été échantillonnés en 6 points comme décrit précédemment. Les prélèvements ont été strictement effectués avant le repas du matin 14 fois au cours de l'expérimentation sur les 6 vaches aux jours d -43, d -39, d -8, d -4, d 0, d 3, d 22, d 36, d 57, d 76, d 80, d 92, d 111 et d 115. Après mélange et homogénéisation des contenus échantillonnés par vache par jour de prélèvement, 3 échantillons ont été conservés dans des tubes de 50 ml stockés immédiatement à -23°C jusqu'à l'extraction du matériel génétique.

L'ADN métagénomique a été extrait en double à partir des échantillons (Yu and Morrison, 2004) en utilisant les mini kit Qiamp DNA stool (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les quantités et la pureté de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, Lyon, France). Son intégrité a été contrôlée par électrophorèse sur gel (0.8% agarose sur un tampon TAE, 30 min à 100 V). Les répertoires des amplicons des régions hyper variables V4-V5 des ARNr 16S des bactéries et archées ont été générés avec l'amorce avant PCR1_515F (5'-CTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGYCAGCMGCCGCGGTA) et avec l'amorce inverse PCR1_928R (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCGYCAATTCMTTTRAGT) en accord avec la procédure spécifiée par GeT-PlaGe, la plateforme de séquençage de Toulouse en France. Les amorces comprenaient des adaptateurs Illumina. Le mélange d'amplification PCR contenait 10ng d'ADN matrice, 0,5µL de polymérase d'ADN 16S MolTaq à 5U/µL (Molzym GmbH, Bremen, Germany), 5µL de tampon 10X, 4µL de mélange dNTP à 2,5 mM, 1µL de chacun des *primers* à 20µM et de l'eau stérile pour compléter le volume de 50µL. La réaction a été réalisée dans un thermocycler Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne) avec le profil thermique suivant : la dénaturation initiale s'est faite à 94°C pendant 2 min, 30 cycles à 94°C pendant 60 secondes, 65°C pendant 40 secondes et 72°C pendant 30 secondes, l'élongation finale était à 72°C pendant 10 minutes et ensuite maintenu à 4°C. Les produits de PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (2%) pour contrôler la quantité et les tailles attendues. Après la première PCR, un multiplexage simple a été réalisé en utilisant un index fait maison de 6 paires de bases, qui a été ajouté à l'amorce inverse pendant une seconde PCR à 12 cycles utilisant l'amorce avant (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC) et l'amorce inverse (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). Le mélange d'amplification PCR contenait 15ng de matrice PCR, 0,5µL de polymérase d'ADN 16S MolTaq à 5U/µL (Molzym GmbH, Bremen, Germany), 5µL de tampon 10X, 1µL de mélange dNTP à 10 mM, 1,5µL de chacun des primer à 20µM et de l'eau stérile pour compléter le volume de 50µL. Les produits issus de la PCR ont été purifiés et mis sur la cartouche Illumina MiSeq conformément aux instructions du fabricant. La qualité de l'analyse a été vérifiée en interne à l'aide de PhiX, puis chaque séquence appariée aux extrémités a été affectée à son échantillon à l'aide de l'index préalablement intégré.

Les amplicons ont été traités et séquencés au format apparié de 2x250 pdb au centre GeT-PlaGe (Toulouse, France) en utilisant un séquenceur Miseq Illumina avec le kit v2 Reagent (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis). Le traitement de la séquence a été effectué à l'aide du pipeline FROGS sous Galaxy (Escudié et al., 2018). La longueur moyenne des séquences était de 410 pdb. Après avoir été démultiplexés, les lectures appariées ont été fusionnées et toutes les séquences situées en dehors d'une plage allant de 380 à 480 pdb ou présentant une ambiguïté

ont été rejetées. Un total de 3 501 492 séquences a été obtenu. Après filtrage par élimination des OTU absents dans plus de 40 échantillons, les données ont été normalisées à 4 500 séquences par échantillon, le nombre minimal de séquences par échantillon étant de 4 821. L'étape de regroupement implémentée de Swarm (Mahé et al., 2014) a été définie avec un paramètre d'agrégation final $d = 3$. Les chimères ont été détectées avec UCHIME (Edgar et al., 2011). Nous avons conservé les groupes d'abondance supérieure à 0,005 % (Bokulich et al., 2013) puis effectué l'appartenance taxonomique des 1 732 OTU détectées dans la base de données SILVA 16S v 128 filtrée à un score de 50 pintail.

1.2.7 Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, les 4 logiciels utilisés sont R (R Core Team, 2018), PAST (Hammer et al., 2001), CANOCO 5 (Ter Braak and Šmilauer, 2012; Šmilauer and Lepš, 2014) et Modelmaker 3.0 (Cherwell Scientific Ltd, 2000).

Pour les paramètres ayant été caractérisés pendant les 4 semaines de mesures (figure 1), avant et après la synchronisation sur la ration FOIN et la ration EM, les variables qualitatives animal, ration, moment de prélèvement (avant ou après synchronisation) ainsi que l'interaction entre la ration et le moment de prélèvement ont été testées par une analyse de variance. Si un modèle était significatif ($P < 0,05$) un test sur les moyennes ajustées avec application de la correction de Bonferroni a été appliqué à l'aide du package « emmeans » de R (Lenth et al., 2019). Les paramètres ayant été mesurés plusieurs fois au cours de l'essai ont été étudiés à partir d'un modèle en mesures répétées. Le modèle prenait en compte la variable vache comme un effet aléatoire avec une structure d'autocorrélation d'ordre 1 (corCAR1). Le package R utilisé a été « nlme » (Pinheiro et al., 2015). Les relations entre les variables quantitatives ont été étudiées à travers des analyses en composantes principales (ACP) avec le package « FactoMineR » de R (Lê et al., 2008). Le test de corrélation de Pearson a été utilisé pour étudier la corrélation entre 2 variables quantitatives. Les α -diversités ont été analysées avec la richesse et l'indice de Shannon grâce au package « BiodiversityR » (Kindt, 2016). L'évolution de ces diversités au cours du temps a été analysée par une analyse de variance et les comparaisons deux à deux ont été effectuées par un test sur les moyennes ajustées avec correction de Bonferroni. L'effet de la ration, du moment de prélèvement (avant ou après synchronisation) et de l'interaction entre ces deux variables ont été testés à partir d'un modèle en mesures répétées comme celui présenté précédemment. La β -diversité a été étudiée à l'aide de l'analyse en coordonnées principales (PCoA) pour visualiser les différences entre les échantillons basées sur les distances de Bray-Curtis avec une matrice d'abondance relative des OTU log-transformée. L'analyse de similarité (one-way ANOSIM) et les comparaisons deux à deux des distances de Bray-Curtis sont utilisées pour tester les changements de composition de la communauté bactérienne au cours du temps. Les différences d'abondance relative au niveau des genres et des familles entre les différents temps de prélèvement ont été testées à l'aide d'un modèle mixte utilisant le package « nlme » de R (Pinheiro et al., 2015). Le modèle prend en compte les jours comme un effet fixe et les vaches comme un effet aléatoire avec une structure d'autocorrélation d'ordre 1 (corCAR1) pour prendre en compte ces mesures répétées. Si ce test est significatif, un test sur les moyennes ajustées avec une correction de Bonferroni est réalisé. Les relations entre les caractéristiques phénotypiques des chèvres et la structure de la communauté du microbiote ruminal sont analysées à l'aide d'analyses de redondance (RDA) au niveau des OTU (matrice d'abondance relative log-

transformée) et elles sont représentées à l'aide de graphiques d'ordination. La validité des modèles est testée à l'aide de la procédure de permutation de Monte Carlo basée sur 999 permutations. Une sélection interactive en avant avec correction FDR (False discovery rate) est réalisée (P-value ajustée < 0,05) pour connaître les variables caractérisant les chèvres qui ont une influence sur la composition du microbiote ruminal.

1.3 IMPREVU SURVENU PENDANT L'EXPERIMENTATION

La vache n°2377 a perdu le bouchon de sa canule ruminale le mardi de la dernière semaine de l'expérimentation (d 112). La perte d'une partie de son contenu ruminal et le contact prolongé entre ce contenu et l'air ne permet pas d'utiliser les données récoltées sur cet animal à partir de cette date. Les données concernant les taux de passage des phases liquides et solides de cette vache pour la période d 111 à d 115, les concentrations en AGV et NH₃ mesuré à d 112, les dernières incubations *in vitro* à d 113 et le prélèvement de contenu ruminal pour analyse microbiote à d 115 ont été éliminées pour la suite de l'étude.

CHAPITRE 1. SUIVI DE LA COMPOSITION DU MICROBIOTE ET DE SES ACTIVITES FERMENTAIRES AUTOUR D'UNE PERTURBATION DE L'ECOSYSTEME RUMINAL CHEZ LA VACHE TARIE RECEVANT SUCCESSIVEMENT UNE RATION RICHE EN FIBRES OU RICHE EN AMIDON

Dans ce chapitre, nous avons étudié la propriété de résilience des microbiotes suite à une perturbation de l'écosystème ruminal provoquée par la procédure de synchronisation. La résilience caractérise la réponse à une perturbation. La synchronisation a été réalisée avec une ration riche en fibres (ration FOIN). Nous avons souhaité tester l'hypothèse suivante : la communauté microbienne ruminale peut se stabiliser sur un état stable différent de celui observé avant la synchronisation. Nous voulions également comparer la composition du microbiote ruminal entre avant et après la perturbation de l'écosystème ruminal quand les animaux consommaient une ration riche en amidon (ration EM). Cet axe de recherche a été mis en place au regard des résultats obtenus dans les expérimentations avec les chèvres. Le modèle utilisé pour cette expérimentation était la vache tarie. Pour évaluer l'effet des rations et des différences de composition des microbiotes entre ces rations au cours du temps, des paramètres fermentaires mesurés *in vivo* (pH ruminal, concentration en AGV et concentration en NH_3) et *in vitro* (production, cinétique et composition des gaz fermentaires) seront mis en relation avec la structure de la communauté microbienne.

1.4 RESULTATS

- pH ruminal *in vivo* :

Le tableau 5 synthétise les mesures de pH effectuées sur les 6 vaches durant les 4 semaines principales de mesures réalisées pendant cette expérimentation.

	pH			
	EM_av	EM_ap	FOIN_av	FOIN_ap
1899	6,94 ± 0,15	6,62 ± 0,04	6,83 ± 0,24	6,73 ± 0,04
2115	6,72 ± 0,01	6,77 ± 0,00	6,73 ± 0,02	6,78 ± 0,02
2141	6,66 ± 0,02	6,83 ± 0,10	6,48 ± 0,01	6,84 ± 0,00
2377	6,81 ± 0,19	6,80 ± 0,07	6,74 ± 0,04	6,83 ± 0,04
3238	6,50 ± 0,05	6,47 ± 0,00	6,41 ± 0,14	6,45 ± 0,02
3286	6,64 ± 0,12	6,57 ± 0,02	6,61 ± 0,01	6,74 ± 0,04
moyenne	6,67	6,72	6,59	6,73

Tableau 5 : pH des contenus ruminaux mesurés le matin avant la distribution du repas pendant les 4 semaines principales de mesures sur les deux rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminaux.

Pendant les 4 semaines de mesures, le pH ruminal n'est pas modifié significativement en fonction de la ration et du moment de prélèvement. En revanche, nous observons des différences significatives entre les vaches. Le graphique (figure 4) reprend ces différences. La vache n°3238 a un pH significativement plus bas que les vaches numéros 1899, 2115, 2141 et 2377. La vache n°3286 a un pH intermédiaire qui n'est pas significativement différent des 5 autres vaches.

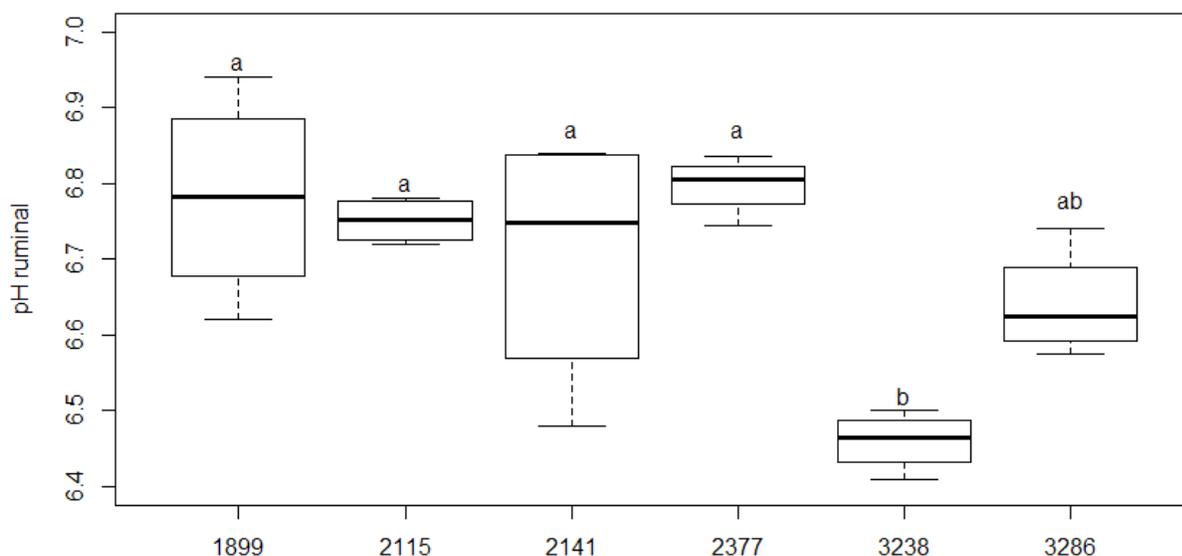


Figure 4 : Graphiques de boîtes à moustaches du pH ruminal mesuré pendant les 4 semaines de mesures en fonction des vaches. Le modèle cherchant à expliquer le pH en fonction des vaches est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences entre vaches. Deux vaches partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

Si nous focalisons sur les évolutions du pH après synchronisation sur la ration foin, nous constatons qu'il y a des variations significatives en fonction du temps ($P < 0,05$) (figure 5).

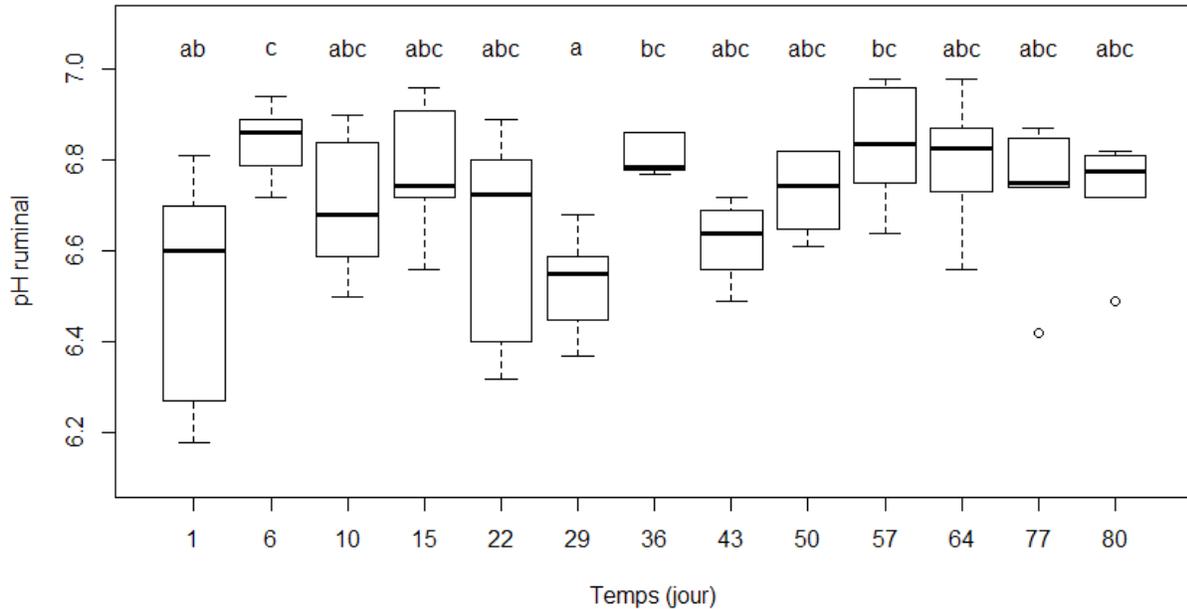


Figure 5 : Graphiques de boîtes à moustaches du pH ruminal mesuré après la synchronisation des contenus ruminiaux avec la ration FOIN en fonction des jours de prélèvement. Le modèle décrivant le pH en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

Le pH en fonction du temps n'est pas stable sur cette période de 80 jours. Les pH semblent suivre une trajectoire similaire entre les animaux alternant des élévations et des diminutions de pH malgré une alimentation distribuée équivalente en quantité et qualité au fil du temps.

- NH_3 *in vivo* :

Le tableau 6 reprend les valeurs de concentration ruminale en NH_3 au cours de l'expérimentation.

	NH ₃			
	EM_av	EM_ap	FOIN_av	FOIN_ap
1899	5,9	8,5	11,3	7,4
2115	6,1	6,4	9,9	7,3
2141	10,9	7,1	13,3	10,4
2377	6,0	-	9,0	5,4
3238	10,1	9,0	16,8	8,9
3286	7,5	5,1	14,3	6,8
Moyenne	7,8	7,2	12,4	7,7

Tableau 6 : Concentrations ruminales moyennes journalières en NH₃ (mmol/L) mesurées pendant les 4 semaines principales de mesures pour les deux rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux.

Durant les 4 périodes de mesure de la concentration ruminale en NH₃, il n'y a pas de différence significative entre les vaches. L'interaction entre la ration et le moment de prélèvement (avant ou après la synchronisation) est significative. Les différences sont présentées dans la figure 6.

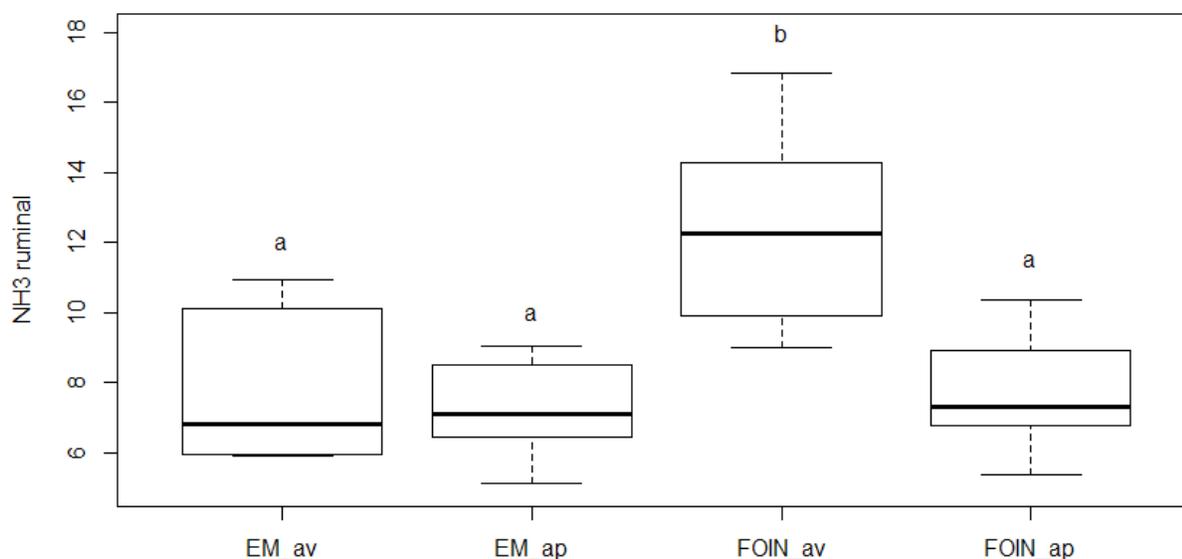


Figure 6 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration en NH₃ ruminale en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en NH₃ en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.

La concentration ruminale en NH₃ est supérieure pour la ration riche en fibres avant la synchronisation par rapport aux 3 autres temps de prélèvement.

- Acide gras volatils *in vivo* :

Le tableau 7 reprend les valeurs de concentration ruminale en acide acétique, propionique et butyrique au cours de l'expérimentation.

		1899	2115	2141	2377	3238	3286	Moyenne
C2	EM_av	53,5	54,0	69,4	59,4	60,4	65,9	60,4
	EM_ap	60,9	64,9	50,0	-	54,0	57,5	57,5
	FOIN_av	38,5	39,5	36,0	37,5	41,0	37,5	38,3
	FOIN_ap	49,5	46,0	47,5	51,0	44,0	42,0	46,6
C3	EM_av	10,5	10,9	14,2	13,4	16,2	15,4	13,4
	EM_ap	13,0	15,4	10,5	-	15,8	14,2	13,8
	FOIN_av	8,9	9,3	8,5	9,3	11,3	9,7	9,5
	FOIN_ap	10,1	9,7	9,7	14,2	11,3	11,3	11,1
C4	EM_av	7,2	7,5	4,1	7,8	11,9	9,5	8,0
	EM_ap	6,5	10,2	6,1	-	10,9	6,8	8,1
	FOIN_av	4,1	3,7	4,4	4,4	5,4	4,4	4,4
	FOIN_ap	4,1	5,4	3,4	5,1	6,1	6,5	5,1

Tableau 7 : Concentrations ruminales moyennes journalières (mmol/L) en acide acétique (C2), acide propionique (C3) et acide butyrique (C4) mesurées pendant les 4 semaines principales de mesures pour les rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de Foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux.

Sur les 4 périodes de mesures, la concentration ruminale totale en AGV (somme des concentrations molaires en acide acétique, propionique et butyrique) n'est pas significativement différente entre les vaches. Entre l'aliment EM et l'aliment FOIN, la différence est significative. En moyenne, la concentration totale en AGV pour la ration EM est de 80,7 mmol/L contre 57,5 mmol/L pour la ration FOIN. Cette différence importante de concentration totale ne se traduit par une différence de profil selon le ratio acide acétique sur acide propionique. Ce ratio n'est pas différent entre les deux aliments et ne varie pas entre avant et après la synchro. En revanche, des différences significatives sont observées entre vaches. La vache 3238 a un ratio plus faible que les vaches 1899, 2115 et 2141. La vache 3286 à un ratio plus petit que la vache 1899 (figure 7).

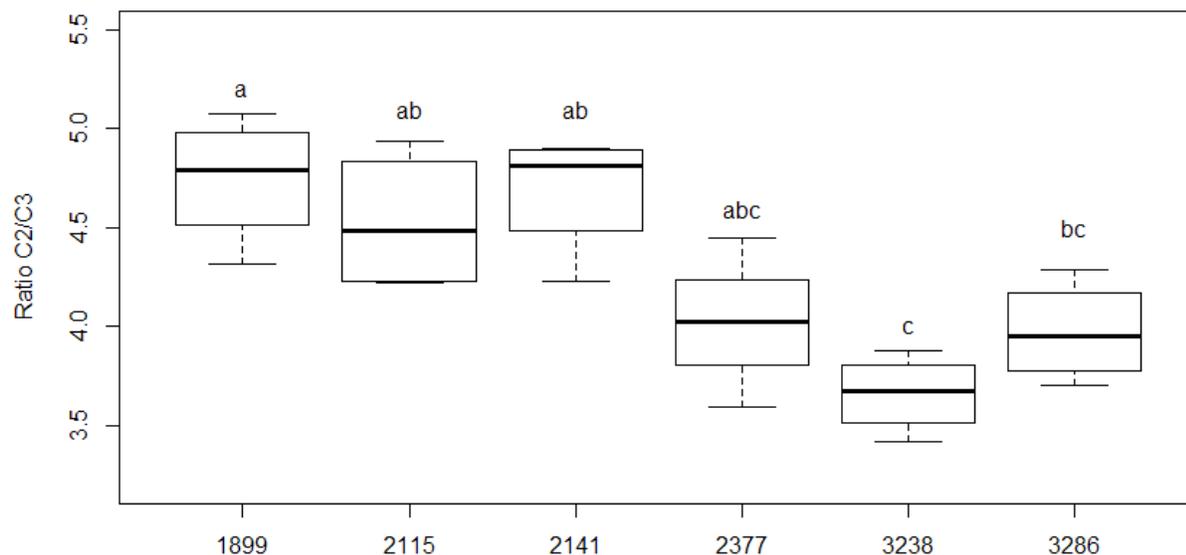


Figure 7 : Graphiques de boîtes à moustaches du ratio de la concentration ruminale d'acide acétique sur acide propionique mesuré pendant les 4 semaines de mesures en fonction des vaches. Le modèle expliquant ce ratio en fonction des vaches est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences entre vaches. Deux vaches partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

La concentration des AGV dans le contenu ruminal suit une évolution semblable entre les 3 acides gras principaux (l'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique). Pour ces trois AGV, nous observons un effet de la ration et pour l'acide acétique, nous observons également un effet de l'interaction entre cette dernière et le moment de prélèvement. Les graphiques de ces trois AGV sont présentés figure 8, 9 et 10.

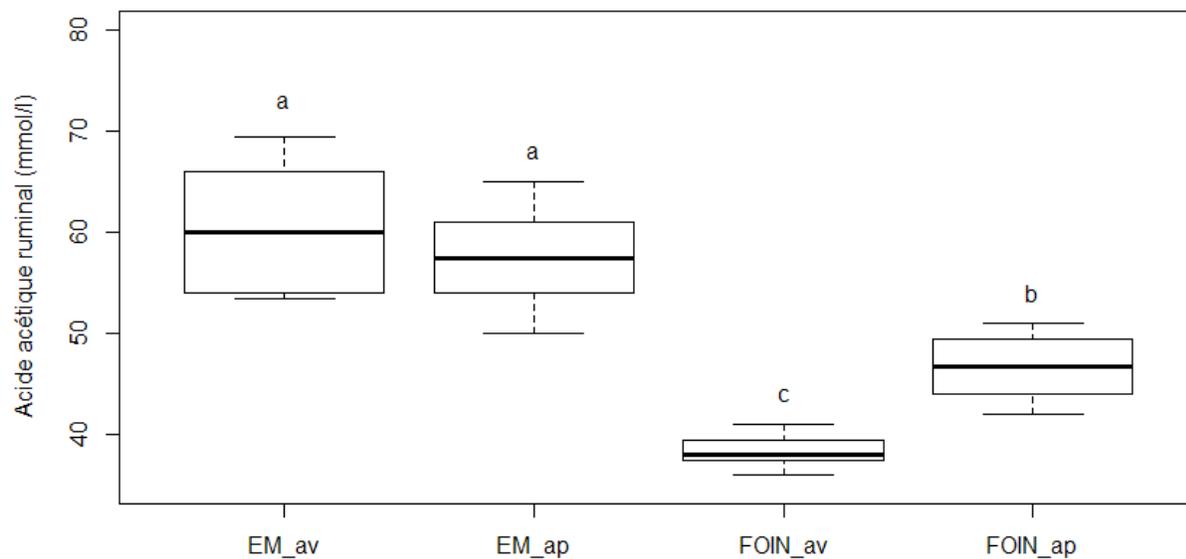


Figure 8 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration ruminale en acide acétique en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en acide acétique en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.

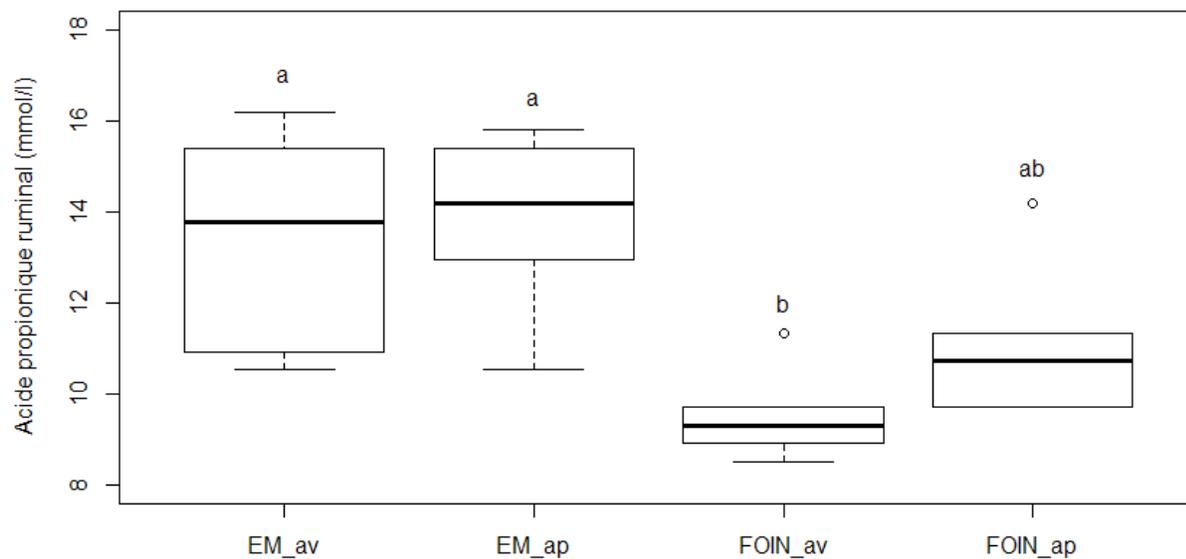


Figure 9 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration ruminale en acide propionique en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en acide propionique en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.

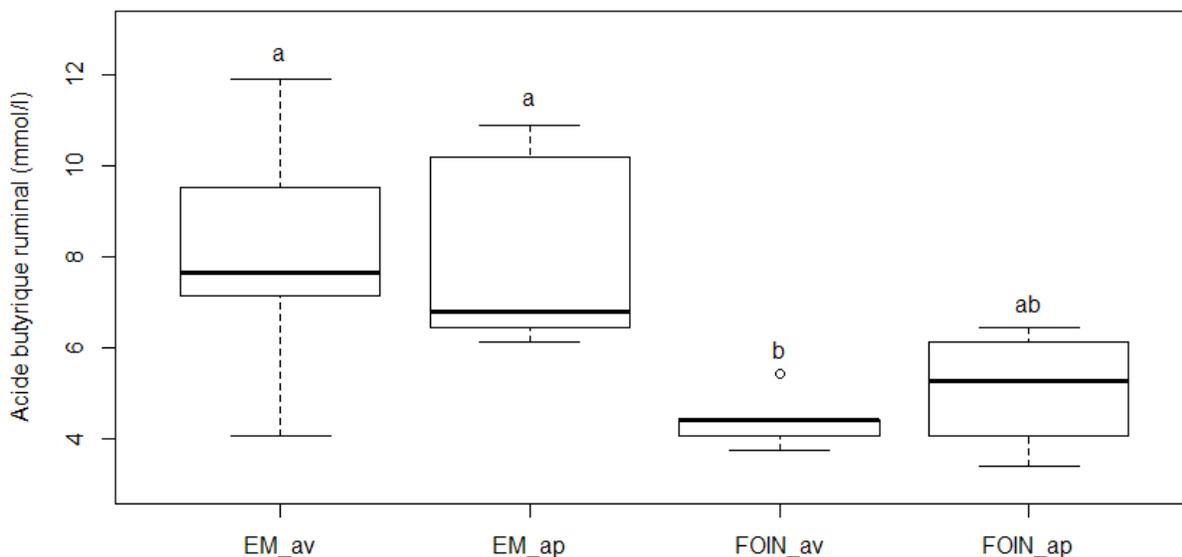


Figure 10 : Graphiques de boîtes à moustaches de la concentration ruminale en acide butyrique en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant la concentration ruminale en acide butyrique en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : Ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.

Systématiquement, pour ces 3 AGV, la concentration est supérieure dans la ration EM par rapport à la ration FOIN. Le moment de prélèvement n'a pas d'incidence quand il s'agit de la ration EM. En revanche, pour la ration FOIN, les valeurs observées sont plus élevées après synchronisation qu'avant, mais cette différence n'est significative que pour l'acide acétique.

- Paramètres fermentaires mesurés *in vitro* :

La variabilité de ces paramètres mesurés *in vitro* est uniquement due aux différences de composition de la communauté microbienne. Le contenu ruminal n'étant plus dans le rumen de l'hôte, les interactions entre ce dernier et le microbiote n'interfèrent pas sur les résultats contrairement aux mesures de concentrations d'acides gras dans le contenu ruminal *in vivo*. Nous avons obtenu trois paramètres par vache pour chacune des 14 incubations. Il s'agit de la production de gaz total (mmol) au bout de 47 h d'incubation, de la production de méthane (mmol) et d'un paramètre caractérisant la cinétique de production de gaz, le taux fractionnaire « c » (h^{-1}) du modèle d'Orskov. Plus ce paramètre est élevé, plus la production de gaz est rapide. A l'inverse, plus il est faible, plus la production de gaz est lente. Les valeurs de ces 3 paramètres obtenus durant les 4 semaines principales de mesures (figure 1) sont présentées dans le tableau 8.

		1899	2115	2141	2377	3238	3286	Moyenne
gaz_tot	EM_av	16,4	19,4	18,2	18,0	17,5	18,3	18,0
	EM_ap	17,7	18,9	18,0	20,0	18,2	19,0	18,6
	FOIN_av	11,0	11,6	10,9	11,0	10,7	11,5	11,1
	FOIN_ap	11,9	13,4	12,3	11,8	11,7	12,0	12,2
CH4_tot	EM_av	4,8	5,2	4,6	4,7	4,4	4,7	4,7
	EM_ap	5,3	5,1	5,6	5,8	4,9	5,5	5,4
	FOIN_av	4,2	4,4	4,1	4,1	4,1	4,4	4,2
	FOIN_ap	4,3	4,3	3,7	3,5	3,9	3,9	3,9
taux_Orskov	EM_av	0,062	0,066	0,070	0,069	0,070	0,071	0,068
	EM_ap	0,070	0,071	0,070	0,075	0,069	0,068	0,070
	FOIN_av	0,054	0,052	0,047	0,057	0,053	0,054	0,053
	FOIN_ap	0,057	0,060	0,054	0,060	0,055	0,055	0,057

Tableau 8 : Production de gaz totale (gaz_tot (mmol)), production de méthane totale (CH₄_tot (mmol)) et le taux fractionnaire de la fraction insoluble (taux_Orskov (h⁻¹)) mesurés pendant des incubations in vitro de 47h pendant les 4 semaines principales de mesures sur les deux rations à base d'ensilage de maïs (EM) et à base de foin (FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux.

La production de gaz totale est significativement différente en fonction de la ration et ce peu importe le moment de prélèvement (avant ou après la synchronisation). La figure 11 illustre cette différence.

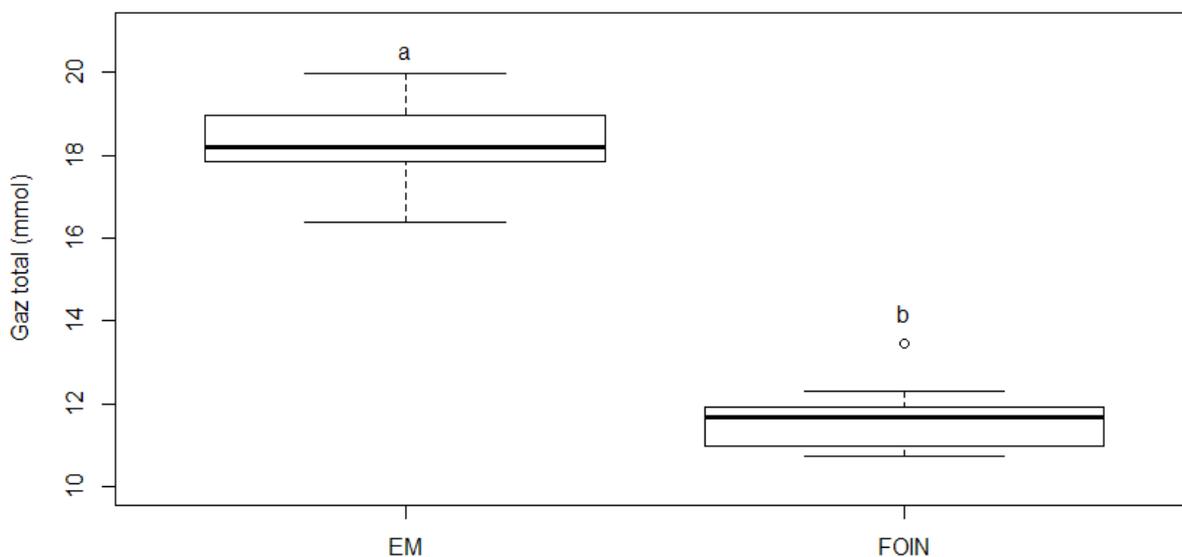


Figure 11 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production de gaz totale mesurée durant les incubations in vitro en fonction de la ration. Le modèle expliquant cette production de gaz en fonction de la ration est significatif ($P < 0,05$). Un test de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni a permis d'identifier les différences entre rations à l'aide de lettres (deux variables une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes). EM : Ration riche en concentrés; FOIN : Ration riche en fibres.

La production de gaz est nettement supérieure avec la ration EM par rapport à la ration FOIN. Il n'y a pas de chevauchement pour ces 2 nuages de points. Pour la ration FOIN suite à la synchronisation, nous observons également des différences de production en fonction du jour. Ces différences sont représentées sur la figure 12.

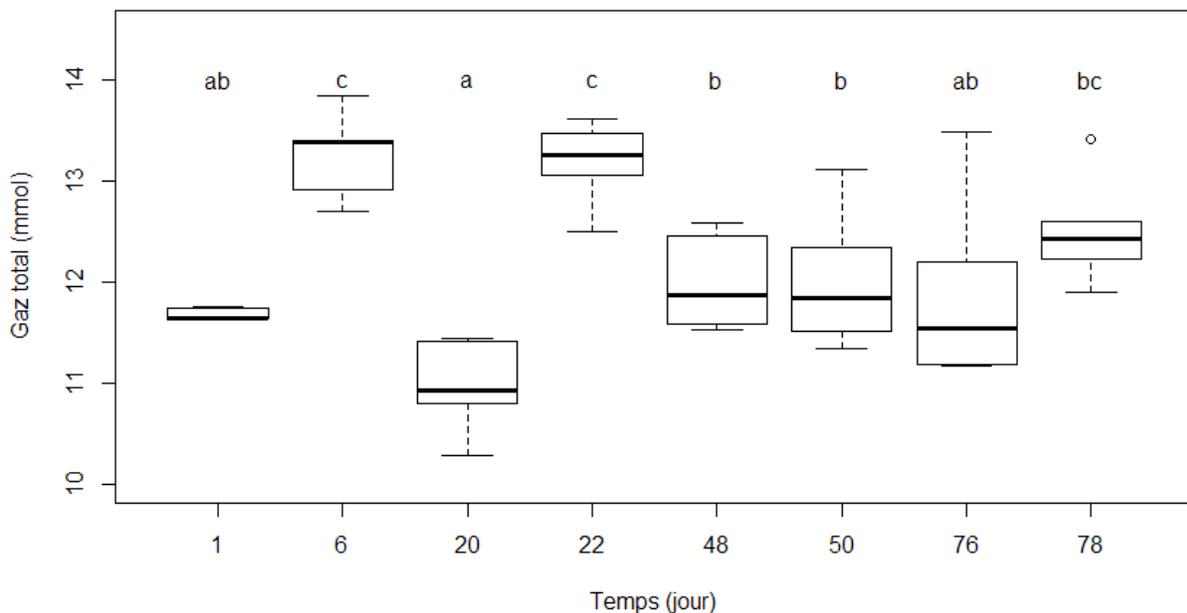


Figure 12 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production de gaz totale avec la ration FOIN après la synchronisation des contenus ruminiaux en fonction du jour de la réalisation des incubations *in vitro* (Temps). Le modèle expliquant cette production de gaz en fonction du temps est significative ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences dans le temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

Juste après la synchronisation des contenus ruminiaux à d 1, nous constatons que la production de gaz totale est très proche entre les animaux. Ensuite, la production de gaz oscille avant de se stabiliser pour les quatre dernières incubations de d 48 à d 78.

Pour la production de méthane, nous retrouvons une situation proche de celle pour la production de gaz totale avec un effet de la ration sur les incubations réalisées pendant les 4 semaines de mesures, auquel s'additionne un effet de l'interaction entre la ration et le moment de prélèvement (avant ou après la synchronisation). La figure 13 synthétise ces résultats.

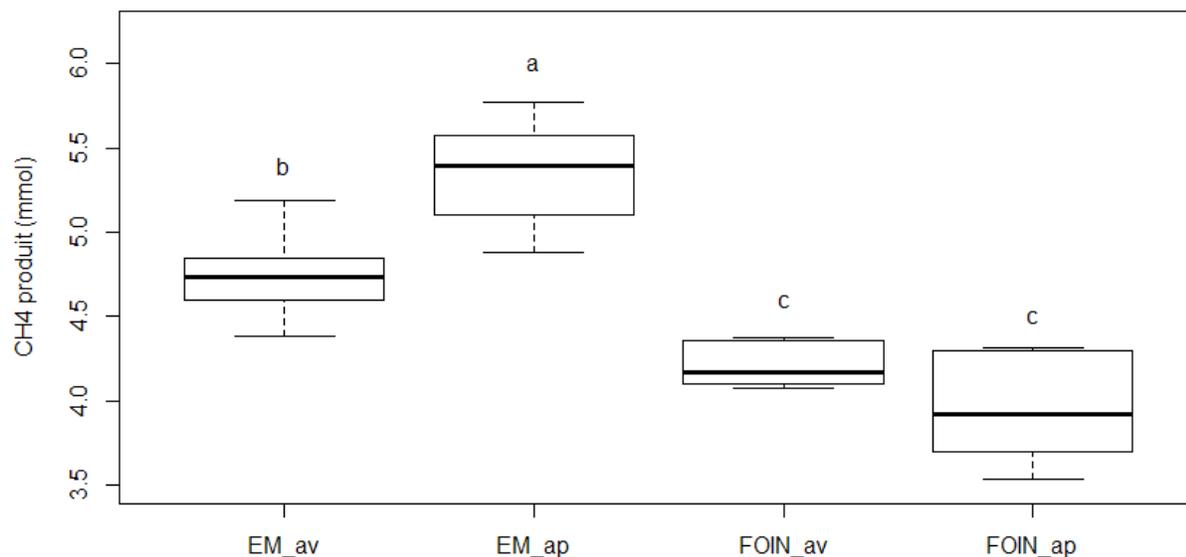


Figure 13 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production de méthane mesurée durant les incubations *in vitro* en fonction de la ration et du temps de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant cette production de méthane en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : Ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : Ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_av : Ration riche en fibres avant la synchronisation.

La quantité de méthane produite est plus faible avec la ration FOIN. Avec cette ration, la production de méthane ne varie pas entre avant et après synchronisation. Pour la ration EM, la production de méthane est plus importante après la synchronisation des contenus ruminiaux qu'avant. La production de méthane après la synchronisation avec la ration FOIN n'est pas constante. Il y a des différences significatives de production de méthane entre les différents jours. Ces différences sont synthétisées dans la figure 14. La proportion de méthane sur la somme de la production du dioxyde de carbone et du méthane est supérieure pour la ration FOIN. Les valeurs moyennes sont 0,265, 0,288, 0,382 et 0,326 pour EM_av, EM_ap, FOIN_av et FOIN_ap respectivement.

La production de méthane semble être fluctuante d'une incubation à une autre sans vraiment se stabiliser. L'ensemble des animaux subissent ces évolutions de manière similaire.

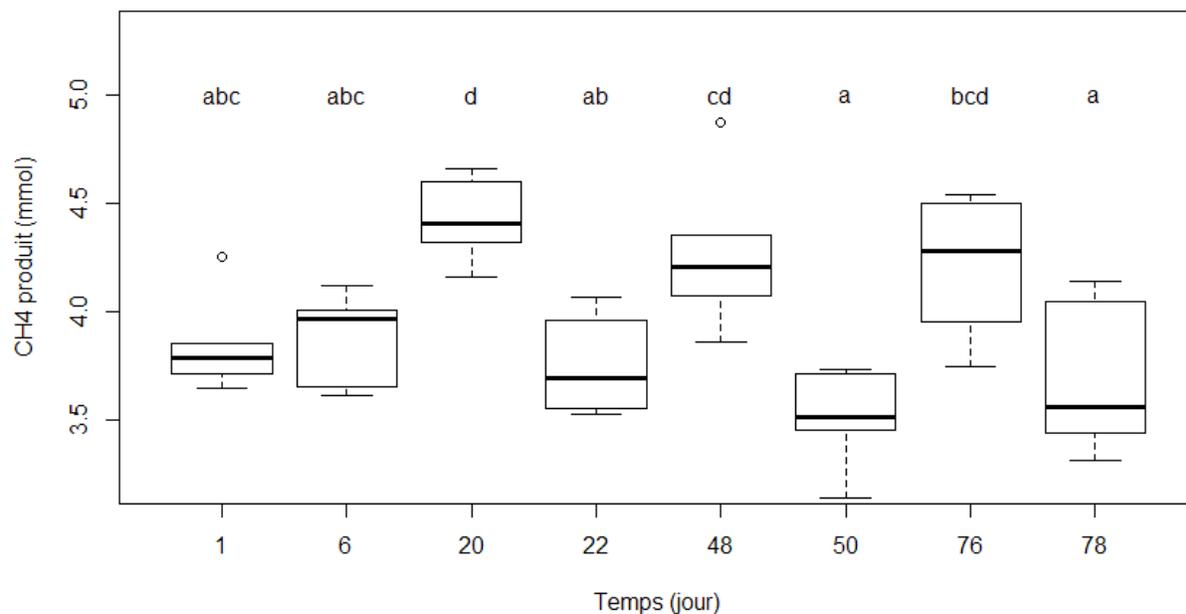


Figure 14 : Graphiques de boîtes à moustaches de la production totale de méthane avec la ration FOIN après la synchronisation des contenus ruminiaux en fonction du jour de réalisation des incubations in vitro. Le modèle expliquant cette production de méthane en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

La production de méthane semble être fluctuante d'une incubation in vitro à une autre sans vraiment se stabiliser. Ces évolutions sont similaires pour l'ensemble des animaux. Pour la cinétique de production de gaz, nous observons seulement un effet de la ration durant les 4 semaines de mesures (figure 15).

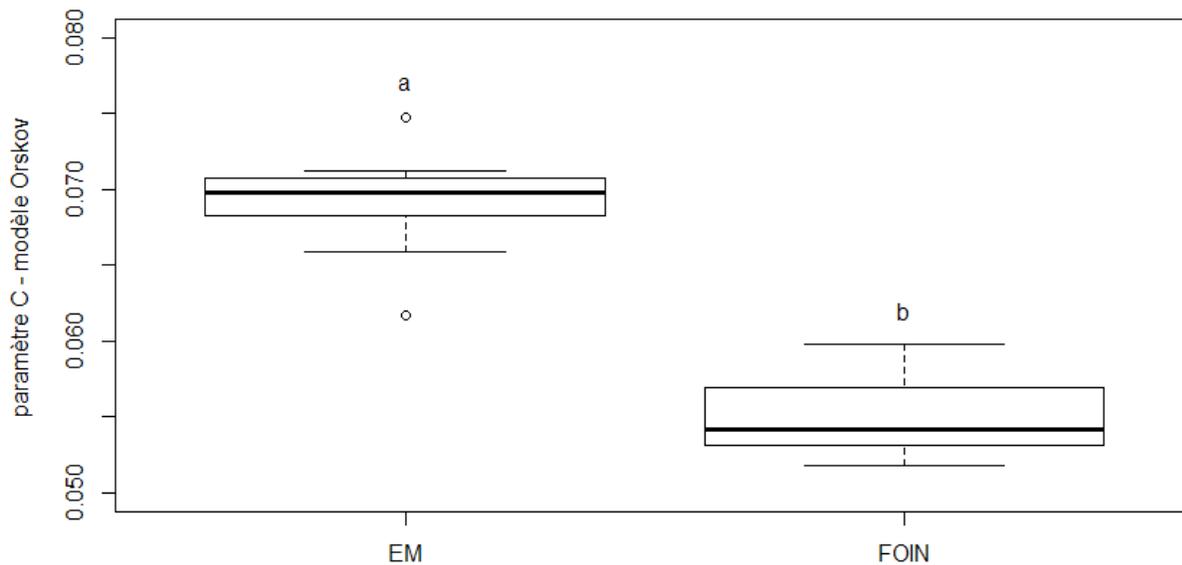


Figure 15 : Graphiques de boîtes à moustaches du taux fractionnaire associé à la phase insoluble (h^{-1}) (paramètre c du modèle d'Orskov) durant les incubations *in vitro* en fonction de la ration. Le modèle expliquant ces taux en fonction de la ration est significatif ($P < 0,05$). Un test de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni a permis d'identifier les différences pour chaque ration. Deux rations partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM : Ration riche en concentrés; FOIN : Ration riche en fibres.

La production de gaz avec la ration EM est plus rapide qu'avec la ration FOIN. Nous observons des différences significatives entre les temps avec la ration FOIN après la synchronisation. Les différences entre les temps sont synthétisées sur la figure 16.

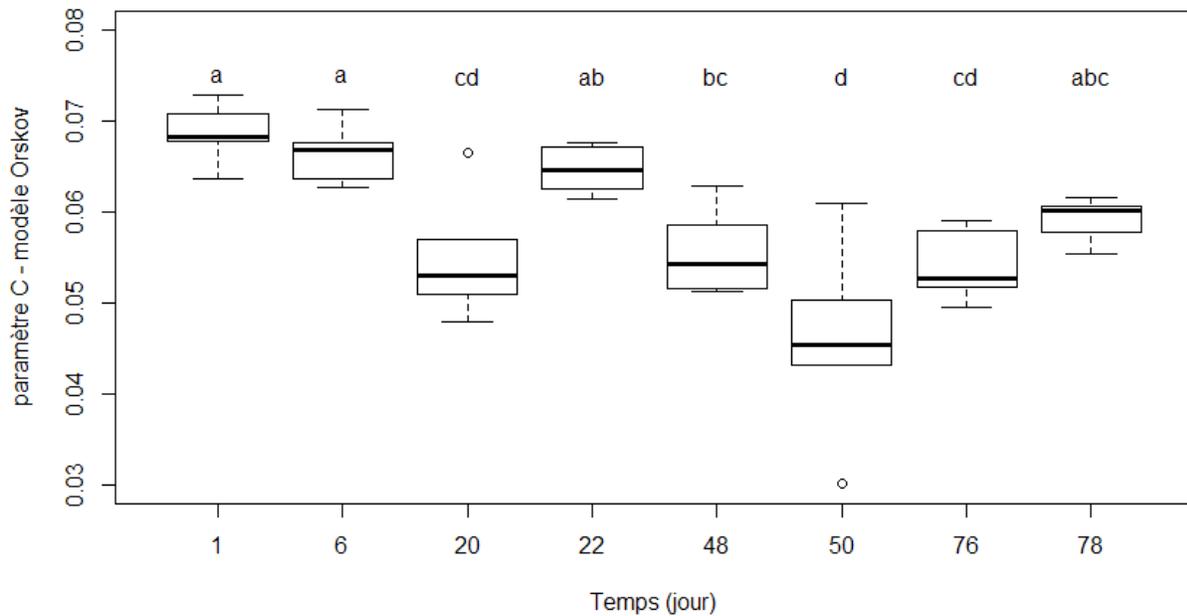


Figure 16 : Graphiques de boîtes à moustaches du taux fractionnaire associé à la phase insoluble (h^{-1}) (paramètre c du modèle d'Orskov) avec la ration FOIN après la synchronisation des contenus ruminiaux durant les incubations en fonction du jour de réalisation de ces dernières. Le modèle expliquant ces taux en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

Pour finir, entre la première incubation post synchronisation et celle réalisée 78 jours après, il n'y a pas de différence significative.

- Relations entre les paramètres fermentaires

Une étude des corrélations entre ces variables a été effectuée sur l'ensemble des données des 4 semaines de mesure (figure 17).

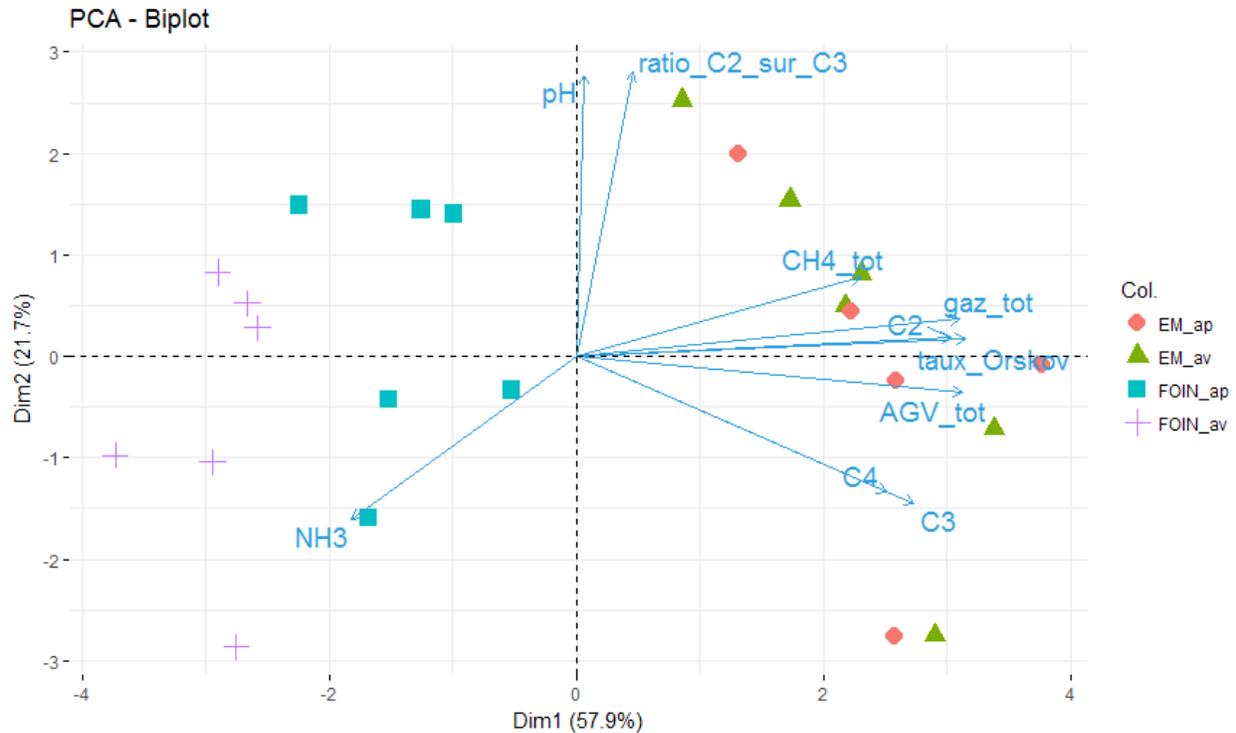


Figure 17 : Représentation graphique des variables et des individus. Les individus sont répartis en 4 catégories selon la ration distribuée et le moment de prélèvement. EM_ap : ration riche en amidon après la synchronisation ; EM_av : ration riche en amidon avant la synchronisation ; FOIN_ap : ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : ration riche en fibre avant la synchronisation ; NH₃ : concentration ruminal en ammoniac ; pH : pH ruminal ; C₂ : concentration ruminale en acide acétique ; C₃ : concentration ruminale en acide propionique ; ratio_C₂_sur_C₃ : ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique ; gaz_tot : production de gaz totale pendant les incubations in vitro ; CH₄_tot : production totale de méthane pendant les incubations in vitro et taux_Orskov : taux fractionnaire de la fraction insoluble concernant la cinétique de production de gaz durant les incubations in vitro (plus cette valeur est grande, plus la production de gaz est rapide).

Les 2 premiers axes de cette ACP expriment la majorité de l'inertie totale du jeu de données (79,6 %). Nous distinguons 3 groupes de variables. Sur l'axe 1, le premier groupe de variables comprend les concentrations en AGV *in vivo* et les paramètres des cinétiques *in vitro*, ces variables sont fortement corrélées positivement entre elles. Sur l'axe 2, nous retrouvons le pH ruminal ainsi que le ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique. Enfin le troisième groupe ne comprenant que la concentration ruminale en ammoniac et il est corrélé négativement aux 2 premiers groupes. A gauche de l'axe 2, nous retrouvons les points issus de la ration FOIN alors qu'à droite nous retrouvons les points issus de la ration EM. Nous nous sommes ensuite intéressés aux relations au sein de chaque ration au travers de deux ACP (figure 18 et 19).

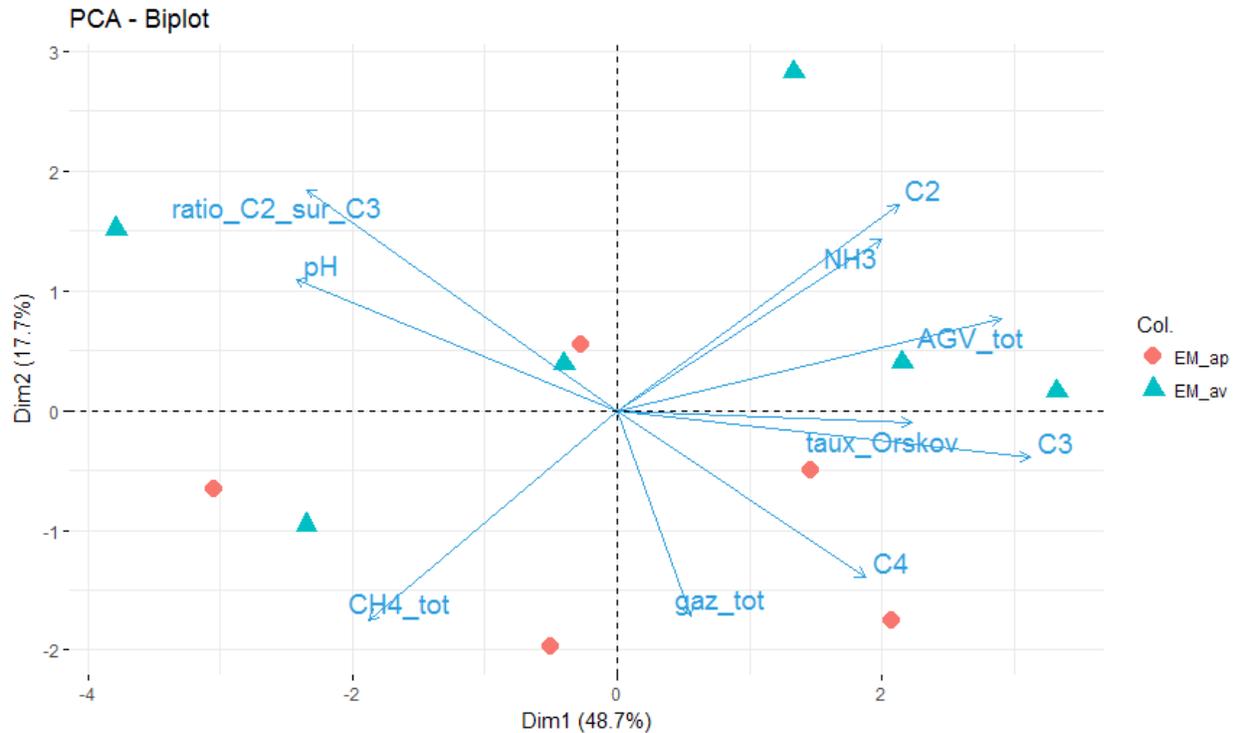


Figure 18 : Représentation graphique des variables et des individus sur la ration EM. Les individus sont répartis en 2 catégories : EM_av : avant la synchronisation et EM_ap : après la synchronisation. NH₃ : concentration ruminal en ammoniac ; pH : pH ruminal ; C₂ : concentration ruminale en acide acétique ; C₃ : concentration ruminale en acide propionique ; AGV_tot : somme des acides acétique, propionique et butyrique ; ratio_C2_sur_C3 : ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique ; gaz_tot : production de gaz totale pendant les incubations in vitro ; CH₄_tot : production totale de méthane pendant les incubations in vitro et taux_Orskov : taux fractionnaire de la fraction insoluble concernant la cinétique de production de gaz durant les incubations in vitro (plus cette valeur est grande, plus la production de gaz est rapide).

Les deux premiers axes de cette ACP expriment la majorité de l'inertie totale du jeu de données (66,4 %). Les paramètres fermentaires des individus avant et après la synchronisation ne sont pas radicalement différents.

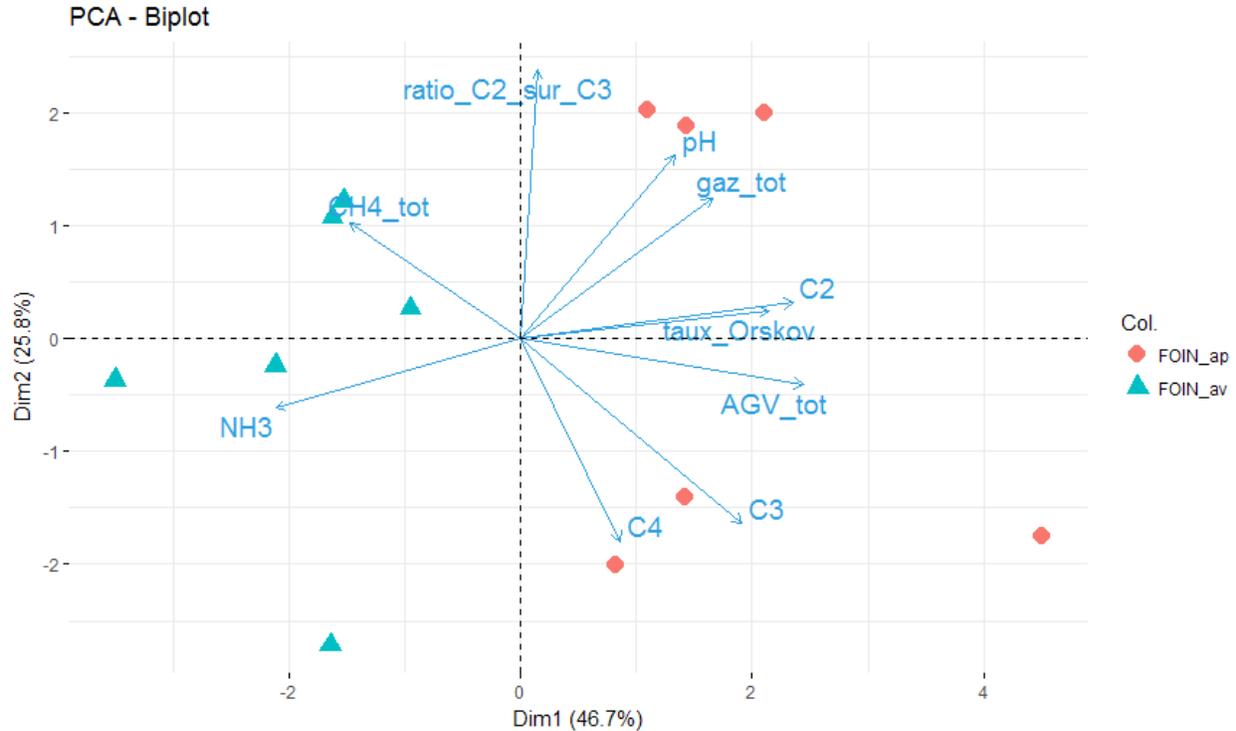


Figure 19 : Représentation graphique des variables et des individus sur la ration FOIN. Les individus sont répartis en 2 catégories : FOIN_av : avant la synchronisation et FOIN_ap : après la synchronisation. NH₃ : concentration ruminal en ammoniac ; pH : pH ruminal ; C₂ : concentration ruminale en acide acétique ; C₃ : concentration ruminale en acide propionique ; AGV_tot : somme des acides acétique, propionique et butyrique ; ratio_C2_sur_C3 : ratio de l'acide acétique sur l'acide propionique ; gaz_tot : production de gaz totale pendant les incubations *in vitro* ; CH₄_tot : production totale de méthane pendant les incubations *in vitro* et taux_Orskov : taux fractionnaire de la fraction insoluble concernant la cinétique de production de gaz durant les incubations *in vitro* (plus cette valeur est grande, plus la production de gaz est rapide).

Les deux premiers axes de cette ACP expriment la majorité de l'inertie totale du jeu de données (72,5 %). Contrairement à la ration EM, avec cette ration FOIN, les groupes de points associés à avant ou après synchronisation sont séparés par l'axe des ordonnées. La concentration ruminale en NH₃ et la production de méthane étaient plus élevées avant qu'après la synchronisation. Le ratio d'acide acétique sur acide propionique est orthogonal à cette différence entre avant et après synchronisation. Les autres variables ont des valeurs plus élevées après, qu'avant la synchronisation.

Il est intéressant de regarder la relation entre la concentration en acide acétique ruminal mesurée *in vivo* et la cinétique de production des gaz fermentaires mesurée *in vitro* (figure 20).

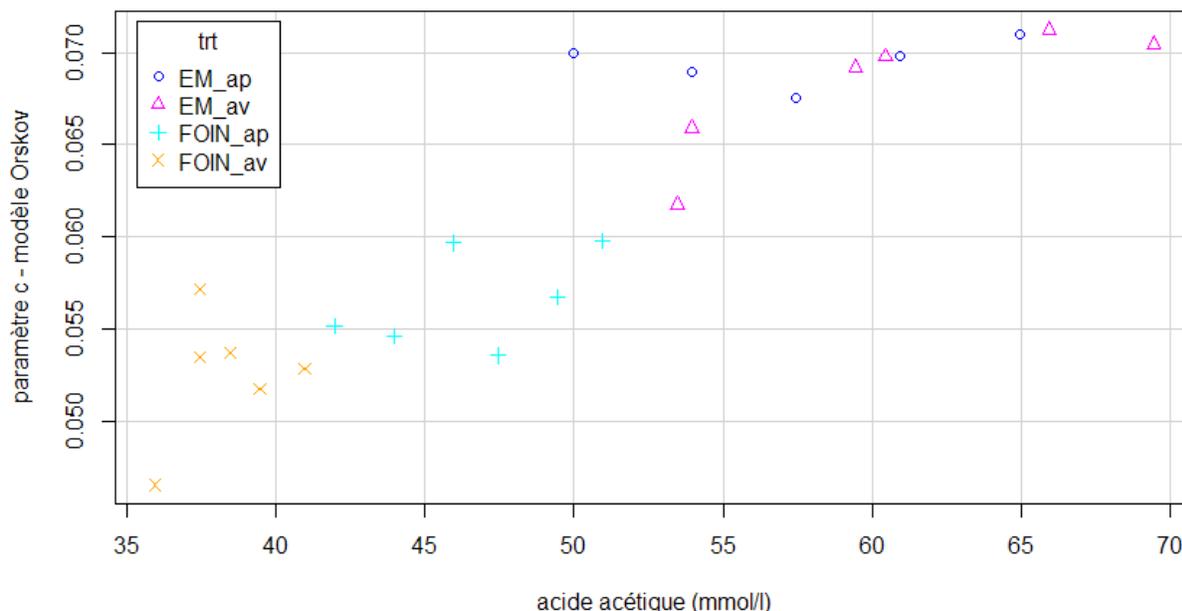


Figure 20 : Représentation de la cinétique des gaz fermentaires en fonction de la concentration ruminale en acide acétique. EM_ap : ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : ration riche en fibres avant la synchronisation.

Cette corrélation est de 0,90 et elle est significative ($P < 0,001$). Ces résultats ne nous permettent pas de conclure à un lien de causalité mais une fermentation entraînant une production gaz rapide pourrait être liée à une production d'acide acétique plus importante.

Composition du microbiote :

Le nombre de séquences obtenues à partir des 84 échantillons de microbiote est très variable d'un échantillon à l'autre (annexe 4). Les analyses des microbiotes présentées se basent sur une table d'OTU normalisée à 4 500 séquences ne prenant pas en compte 9 des échantillons prélevés (d -8 : 3238 ; d -4 : 3286 et 2141 ; d 0 : 3238 ; d 3 : 3286 ; d 22 : 1899 et 2377 ; d 36 : 2141 et d 76 : 2141).

- α -diversité

Au total, 1 732 OTU ont été observés sur l'ensemble de l'essai. Nous remarquons qu'avant la synchronisation, les richesses en OTU et les indices de Shannon ne diffèrent pas entre les deux rations (figure 21 et 22). Après la synchronisation, nous retrouvons des richesses OTU et des indices de Shannon identiques pour la ration EM. En revanche, pour la ration FOIN, ces deux indicateurs de l' α -diversité augmentent d'environ 13% après synchronisation. Plus de détails concernant l'évolution de l' α -diversité au cours du temps sont disponibles en annexe 5.

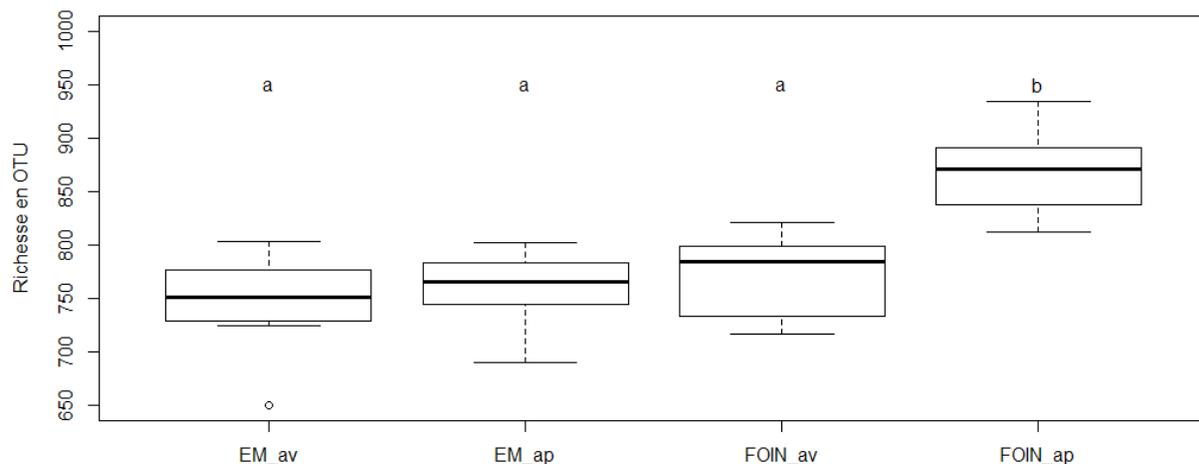


Figure 21 : Diagramme en boîtes à moustaches représentant la richesse en OTU des microbiotes ruminants des 6 vaches durant les 4 semaines de mesures de l'essai. Les temps de prélèvement se situent autour d'une synchronisation des contenus ruminants à d 0. Les animaux ont été nourris avec une ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon pour EM_av (d -43 et d -39) et EM_ap (d 111 et d 115). Ils ont été nourris avec une ration à base de foin riche en fibres pour FOIN_av (d -8 et d -4) et FOIN_ap (d 76 et d 80). Les comparaisons 2 à 2 ont été réalisées par un test sur les moyennes ajustées. Si 2 groupes partagent une lettre, alors ils ne sont pas significativement différents.

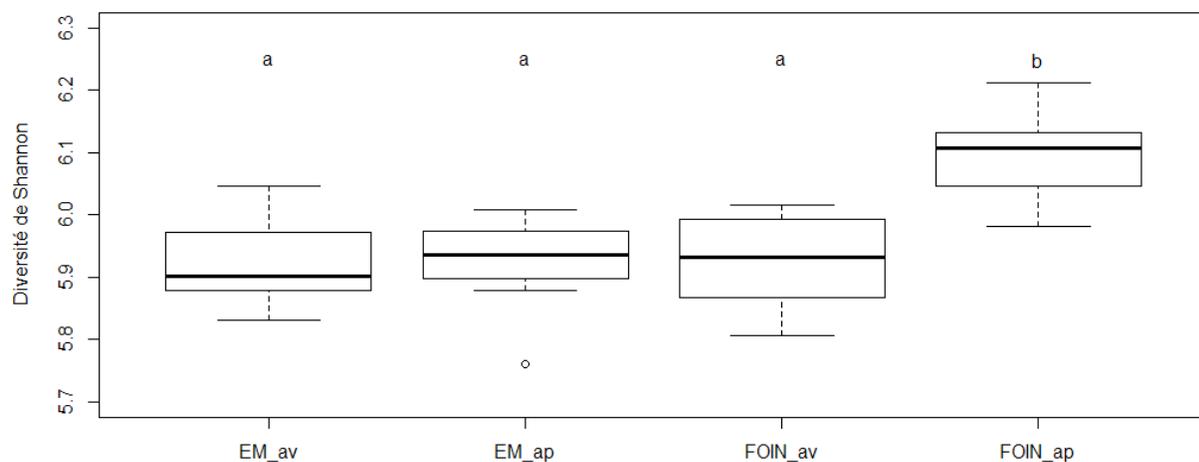


Figure 22 : Diagramme en boîtes à moustaches représentant les indices de diversité de Shannon des microbiotes ruminants des 6 vaches durant les 4 semaines de mesures de l'essai. Les temps de prélèvement se situent autour d'une synchronisation des contenus ruminants à d 0. Les animaux ont été nourris avec une ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon pour EM_av (d -43 et d -39) et EM_ap (d 111 et d 115). Ils ont été nourris avec une ration à base de foin riche en fibres pour FOIN_av (d -8 et d -4) et FOIN_ap (d 76 et d 80). Les comparaisons 2 à 2 ont été

Nous observons que les microbiotes des vaches sont différents avec l'aliment FOIN et l'aliment EM. Les compositions des microbiotes avec la ration EM avant synchronisation (d -43 et d -39) et après synchronisation (d 92, d 111 et d 115) semblent proches, en particulier avec le prélèvement de d 115 (tableau 9). Cette proximité est observée malgré les 5 mois d'écart entre les prélèvements. Le prélèvement réalisé à d 92 intervient seulement 4 jours après la transition alimentaire de la ration FOIN vers la ration EM (tableau 3) et il semblerait que la communauté microbienne soit déjà plus proche de celle de la ration EM que de celle de la ration FOIN. Avec la ration FOIN, la composition du microbiote entre les 3 prélèvements avant et pendant synchronisation (d -8, d -4 et d 0) est très proche. En revanche, la composition se modifie rapidement dans les semaines qui suivent pour évoluer vers un état différent près de 3 mois après la synchronisation.

Pour compléter ces informations, les résultats de l'analyse de similarité (tableau 9) nous indiquent que 4 paires de prélèvements (d -43 et d -39 ; d -8 et d -4 ; d 76 et d 80 ; d 111 et d 115) ne sont pas significativement différents. Il s'agit des prélèvements réalisés le lundi et le vendredi des semaines de mesures (figure 1). Avant la synchronisation, les différences entre les microbiotes des deux rations sont assez franches avec des valeurs de R (un indicateur de la β -diversité qui mesure la séparation entre 2 communautés) comprises entre 0,71 et 0,75. Concernant les 16 familles et les 24 genres principaux de bactéries et d'archées observés, 7 et 10 respectivement sont retrouvés dans des proportions significativement différentes entre ces 2 rations avant synchronisation (tableau 10 et 11). Ces différences sont également observées en fin d'essai pour les deux dernières semaines de mesures (d 76 et d 80 ; d 111 et d 115) avec des valeurs de R comprises entre 0,46 et 0,69. En fin d'essai, 5 familles et 9 genres ont des proportions significativement différentes. Avec la ration EM, entre le début (d -43, d -39) et la fin de l'essai (d 111, d 115), les valeurs de R sont comprises entre 0,16 et 0,33 et seulement 3 familles et 3 genres ont des proportions significativement différentes. Le prélèvement à d 115 n'est pas significativement différent du prélèvement à d -39 et la p-value est proche du seuil de significativité (5 %) pour d -43 indiquant que la composition des microbiotes est proche. Avec la ration FOIN, le microbiote n'est pas significativement différent entre d 76 et d 80 indiquant que le microbiote semble se stabiliser. La composition des microbiotes avant synchronisation (d -8 et d -4) et après synchronisation (d 76 et d 80) avec la ration FOIN sont différents avec des valeurs de R comprises entre 0,61 et 0,83. Ces différences se retrouvent au niveau des principales familles et des principaux genres avec des proportions significativement différentes pour 8 d'entre elles et 9 d'entre eux. La composition du microbiote à d 92 est plus proche de la composition à d 111 avec la ration EM (valeur de R = 0,22) que de celle à d 80 avec la ration FOIN (valeur de R = 0,50).

	d -43	d -39	d -8	d -4	d 0	d 3	d 22	d 36	d 57	d 76	d 80	d 92	d 111	d 115
d -43		-0,13 <i>0,886</i>	0,73 <i>0,008</i>	0,75 <i>0,005</i>	0,66 <i>0,004</i>	0,62 <i>0,004</i>	0,5 <i>0,016</i>	0,74 <i>0,005</i>	0,98 <i>0,008</i>	0,69 <i>0,004</i>	0,67 <i>0,008</i>	0,27 <i>0,022</i>	0,32 <i>0,009</i>	0,17 <i>0,047</i>
d -39			0,71 <i>0,002</i>	0,73 <i>0,004</i>	0,73 <i>0,002</i>	0,73 <i>0,003</i>	0,63 <i>0,004</i>	0,73 <i>0,004</i>	0,95 <i>0,002</i>	0,76 <i>0,003</i>	0,75 <i>0,003</i>	0,34 <i>0,004</i>	0,33 <i>0,004</i>	0,16 <i>0,058</i>
d -8				-0,13 <i>0,747</i>	0,41 <i>0,016</i>	0,32 <i>0,022</i>	0,29 <i>0,061</i>	0,79 <i>0,008</i>	0,99 <i>0,002</i>	0,61 <i>0,007</i>	0,79 <i>0,002</i>	0,82 <i>0,003</i>	0,88 <i>0,002</i>	0,58 <i>0,002</i>
d -4					0,45 <i>0,015</i>	0,36 <i>0,017</i>	0,33 <i>0,057</i>	0,81 <i>0,008</i>	1 <i>0,006</i>	0,69 <i>0,009</i>	0,83 <i>0,005</i>	0,86 <i>0,005</i>	0,89 <i>0,004</i>	0,52 <i>0,004</i>
d 0						0,41 <i>0,018</i>	1 <i>0,008</i>	0,98 <i>0,009</i>	1 <i>0,002</i>	0,94 <i>0,006</i>	0,91 <i>0,002</i>	0,98 <i>0,002</i>	0,81 <i>0,002</i>	0,52 <i>0,006</i>
d 3							0,98 <i>0,008</i>	1 <i>0,007</i>	1 <i>0,002</i>	0,95 <i>0,007</i>	0,9 <i>0,002</i>	0,98 <i>0,002</i>	0,85 <i>0,002</i>	0,55 <i>0,004</i>
d 22								0,68 <i>0,017</i>	1 <i>0,005</i>	0,46 <i>0,029</i>	0,58 <i>0,004</i>	0,82 <i>0,005</i>	0,64 <i>0,005</i>	0,39 <i>0,024</i>
d 36									0,56 <i>0,004</i>	0,66 <i>0,008</i>	0,34 <i>0,027</i>	0,85 <i>0,003</i>	0,66 <i>0,003</i>	0,46 <i>0,005</i>
d 57										0,96 <i>0,002</i>	0,77 <i>0,003</i>	0,99 <i>0,002</i>	0,92 <i>0,002</i>	0,66 <i>0,003</i>
d 76											0,02 <i>0,386</i>	0,69 <i>0,003</i>	0,69 <i>0,002</i>	0,46 <i>0,005</i>
d 80												0,5 <i>0,002</i>	0,61 <i>0,003</i>	0,5 <i>0,002</i>
d 92													0,22 <i>0,036</i>	0,27 <i>0,016</i>
d 111														-0,11 <i>0,885</i>
d 115														

Tableau 9 : Analyse de similarité (one-way ANOSIM) testant les rangs des indices de dissimilarité de Bray-Curtis calculés à partir de la composition au niveau des OTU des microbiotes des 6 vaches entre les différents jours de prélèvement. La statistique R, présentée pour chaque comparaison, mesure la séparation entre 2 communautés. R = 1 indique des structures de communautés totalement différentes alors que R proche de 0 indique que les 2 communautés sont très proches. Ce critère est basé sur des comparaisons des rangs des distances intra et intergroupes. Les p-values, présentées en italiques, sont basées sur un test de permutation de Monte Carlo avec 9999 permutations. Lorsque les p-values sont inférieures à 0,05, la case est grisée. Lorsque les p-values ne sont pas significatives, la case est entourée d'une bordure plus épaisse. Orange = ration EM ; vert = ration FOIN ; gris = comparaison entre les 2 rations.

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	EM_av	EM_ap	FOIN_av	FOIN_ap	P-Value	
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	25.64 ^{ab}	26.52 ^a	23.72 ^a	30.47 ^b	**	
				F082	16.88 ^b	14.83 ^{ab}	10.78 ^a	11.42 ^a	***	
				Rikenellaceae	11.85 ^{ab}	12.3 ^b	12.97 ^b	10.28 ^a	**	
				Muribaculaceae	4.33 ^b	5.49 ^b	2.83 ^a	2.58 ^a	***	
				p-251-o5	1.59 ^a	2.69 ^b	1.80 ^{ab}	2.44 ^{ab}	*	
				Bacteroidales UCG-001	1.61	1.59	1.45	1.60	NS	
				Bacteroidales BS11 gut group	1.24 ^b	0.84 ^{ab}	0.53 ^a	0.97 ^b	***	
				unknown family	0.73 ^{ab}	1.01 ^{bc}	0.53 ^a	1.14 ^c	***	
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	14.48	14.68	16.92	16.66	NS	
				Christensenellaceae	7.52 ^a	6.35 ^a	14.07 ^b	6.97 ^a	***	
				Lachnospiraceae	5.95	5.63	6.20	6.72	NS	
				Family XIII	1.12	1.17	1.30	1.25	NS	
		Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	0.64 ^{ab}	1.08 ^c	0.37 ^a	0.81 ^{bc}	***	
		Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	1.33 ^b	1.48 ^b	0.59 ^a	1.27 ^b	**
		Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	1.22 ^b	1.68 ^c	0.60 ^a	0.91 ^{ab}	***
	Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	1.55 ^{ab}	0.72 ^a	3.11 ^c	1.70 ^b	***
Autres					2.32 ^{ab}	1.95 ^a	2.22 ^a	2.79 ^b	**	

Tableau 10 : Abondances relatives en pourcentage des 16 familles dont les séquences ont été lues plus de 2 000 fois au cours de l'expérimentation. Les pourcentages de ces familles sont présentés pour les 4 semaines de mesures (figure 1) sur les 2 rations (EM et FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux qui a été réalisée à d o. La P-value de l'analyse testant l'évolution d'une famille en fonction de la semaine de mesure et prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite (P-value > 0,1 : 'NS' ; 0,1 > P-value >= 0,05 : '-'; 0,05 > P-value >= 0,01 : '**' ; 0,01 > P-value >= 0,001 : '***' ; 0,001 > P-value : '****'). Les lettres à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupe suite à un test de comparaison des moyennes ajustées quand le test était significatif.

Règne	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	EM_av	EM_ap	FOIN_av	FOIN_ap	P-value			
Bacteria	Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella 1	17.77 ^{ab}	18.92 ^a	17.68 ^{ab}	22.72 ^b	*			
					Prevotellaceae UCG-001	3.77 ^b	2.87 ^{ab}	2.00 ^a	2.31 ^a	***			
					Prevotellaceae UCG-003	1.52 ^a	1.93 ^a	1.46 ^a	2.67 ^b	***			
					Prevotellaceae NK3B31 group	1.77	2.09	2.02	1.88	NS			
				F082	unknown genus	16.88 ^b	14.83 ^{ab}	10.78 ^a	11.42 ^a	***			
				Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	11.29 ^{ab}	11.91 ^b	11.91 ^{ab}	9.93 ^a	*			
				Muribaculaceae	unknown genus	4.33 ^b	5.49 ^b	2.83 ^a	2.58 ^a	***			
				p-251-o5	unknown genus	1.59 ^a	2.69 ^b	1.80 ^{ab}	2.44 ^{ab}	*			
				Bacteroidales UCG-001	unknown genus	1.61	1.59	1.45	1.6	NS			
				Bacteroidales BS11 gut group	unknown genus	1.24 ^b	0.84 ^{ab}	0.53 ^a	0.97 ^b	***			
				unknown family	unknown genus	0.73 ^{ab}	1.01 ^{bc}	0.53 ^a	1.14 ^c	***			
	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	7.47 ^a	6.28 ^a	13.97 ^b	6.87 ^a	***			
				Ruminococcaceae	Ruminococcaceae NK4A214 group	7.31	7.87	8.75	6.91	*			
					Papillibacter	1.22 ^a	1.43 ^a	1.50 ^a	2.18 ^b	***			
					Saccharofermentans	0.92 ^a	1.04 ^a	1.59 ^b	1.51 ^b	***			
					[Eubacterium] coprostanoligenes group	1.02	1.17	1.04	1.35	NS			
				Ruminococcus 1 and 2	1.16	0.94	0.85	1.05	NS				
				Lachnospiraceae	Butyrivibrio 2	1.25	1.32	0.86	1.09	NS			
					Lachnospiraceae NK3A20 group	1.02 ^{ab}	0.73 ^a	1.55 ^c	1.27 ^{bc}	***			
					Lachnospiraceae XPB1014 group	0.62 ^{ab}	0.67 ^{ab}	0.83 ^b	0.45 ^a	*			
				Negativicutes	Selenomonadales	Acidaminococcaceae	Succiniclasticum	0.64 ^{ab}	1.08 ^c	0.37 ^a	0.81 ^{bc}	***	
				Fibrobacteres	Fibrobacteria	Fibrobacterales	Fibrobacteraceae	Fibrobacter	1.31 ^b	1.47 ^b	0.58 ^a	1.26 ^b	**
				Spirochaetes	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema 2	0.89 ^b	1.35 ^c	0.45 ^a	0.71 ^{ab}	***
				Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae	Methanobrevibacter	1.54 ^{ab}	0.71 ^a	3.00 ^c	1.66 ^b
Autres						11.13 ^a	9.76 ^a	11.66 ^a	13.22 ^b	***			

Tableau 11 : Abondances relatives en pourcentage des 24 genres dont les séquences ont été lues plus de 2 000 fois au cours de l'expérimentation. Les pourcentages de ces genres sont présentés pour les 4 semaines de mesures (figure 1) sur les 2 rations (EM et FOIN) avant (av) et après (ap) la synchronisation des contenus ruminiaux qui a été réalisée à d 0. La P-value de l'analyse testant l'évolution d'un genre en fonction de la semaine de mesure prenant en compte la structure en mesures répétées (voir matériels et méthodes) est indiquée dans la colonne de droite (P-value > 0,1 : 'NS' ; 0,1 > P-value >= 0,05 : '-' ; 0,05 > P-value >= 0,01 : '**' ; 0,01 > P-value >= 0,001 : '***' ; 0,001 > P-value : '****'). Les lettres à côté de chaque moyenne indiquent les différences observées entre groupe suite à un test de comparaison des moyennes ajustées quand le test était significatif. *Parfois pour cette catégorie le modèle général peut être significatif sans que le test de comparaison de moyennes ne le soit, il y a souvent une tendance pour la comparaison des valeurs extrêmes.

- Relation entre le microbiote et les paramètres fermentaires

Les liens entre la composition des microbiotes et les paramètres fermentaires ont été testés avec les prélèvements des 4 semaines de mesures (d -43, d -39, d -8, d -4, d 76, d 80, d 111 et d 115). Neuf des dix paramètres fermentaires ont été sélectionnés par l'analyse d'ordination contrainte avec sélection de variables (figure 24). La part de la variation totale expliquée par ces 9 paramètres est de 46.5 %. Les deux rations (EM et FOIN) sont représentées selon deux nuages distincts. La variabilité entre les rations est expliquée en partie par la concentration en NH_3 qui est plus élevée pour la ration FOIN et par gaz_tot, CH_4 _tot, taux_Orskov ainsi que les concentrations en C3, C4 et AGV_tot qui ont des valeurs supérieures pour la ration EM. La variabilité intra-semaine semble être davantage expliquée par le ratio de la concentration en C2 sur C3 et le pH ruminal. Pour mieux comprendre la variabilité intra-ration avant et après la synchronisation, deux nouvelles RDA avec sélection de variables sont présentées (figure 25 et 26). Concernant la ration EM (figure 25), 8 des 10 paramètres ont été sélectionnés expliquant 67,3 % de la variation totale. L'axe des abscisses sépare les deux nuages de points correspondants à avant et après synchronisation. Les paramètres fermentaires représentés sur ce graphique sont les mêmes que pour la figure 24 mais sans le pH. Pour la ration FOIN (figure 26, seuls 4 des 10 paramètres ont été sélectionnés et ils expliquent 41,8 % de la variation totale. Ces 4 paramètres fermentaires sont gaz_tot, taux_Orskov ainsi que les concentrations en C2 et en AGV_tot. L'axe des ordonnées sépare les points avant et après synchronisation. L'annexe 6 présente les tests des paramètres fermentaires réalisés un à un pour chaque jour de prélèvement. Ces tests permettent de savoir si un paramètre explique de la variabilité concernant la composition des microbiotes au sein d'un même jour. Nous en déduisons que les paramètres fermentaires expliquent mieux les différences entre les animaux avec la ration EM qu'avec la ration FOIN. Le profil en AGV semble expliquer les différences de composition des microbiotes entre vaches via en partie le ratio de la concentration ruminale en acide acétique sur l'acide propionique.

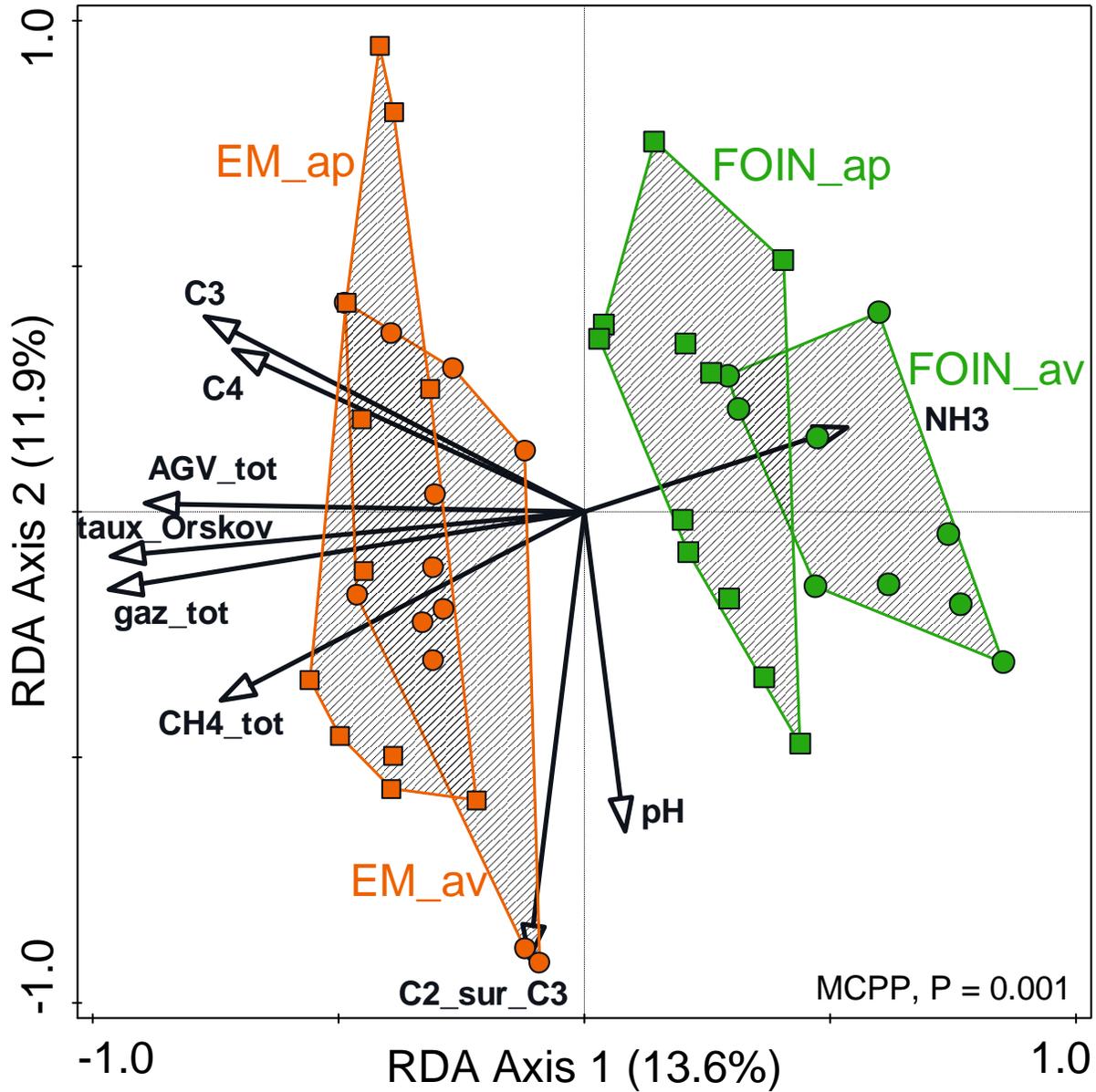


Figure 24 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches durant les 4 semaines de mesures (EM_av, EM_ap, FOIN_av et FOIN_ap). Le diagramme d'ordination est contraint par les paramètres fermentaires sélectionnés par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés ici sont : la concentration ruminale en ammoniacque (NH_3), la concentration ruminale en acide propionique (C_3), la concentration ruminale en acide butyrique (C_4), la concentration ruminale de l'ensemble des trois AGV C_2 , C_3 et C_4 (AGV_{tot}), le ratio C_2/C_3 (C_2/C_3), le pH ruminal (pH), la production totale de gaz in vitro (gaz_{tot}), la production totale de méthane in vitro (CH_4_{tot}) et la cinétique de production de gaz in vitro ($taux_{Orskov}$). Le paramètre non sélectionné est la concentration ruminale en acide acétique (C_2). Le premier axe représente 13,6 % de la variabilité et le second 11,9 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».

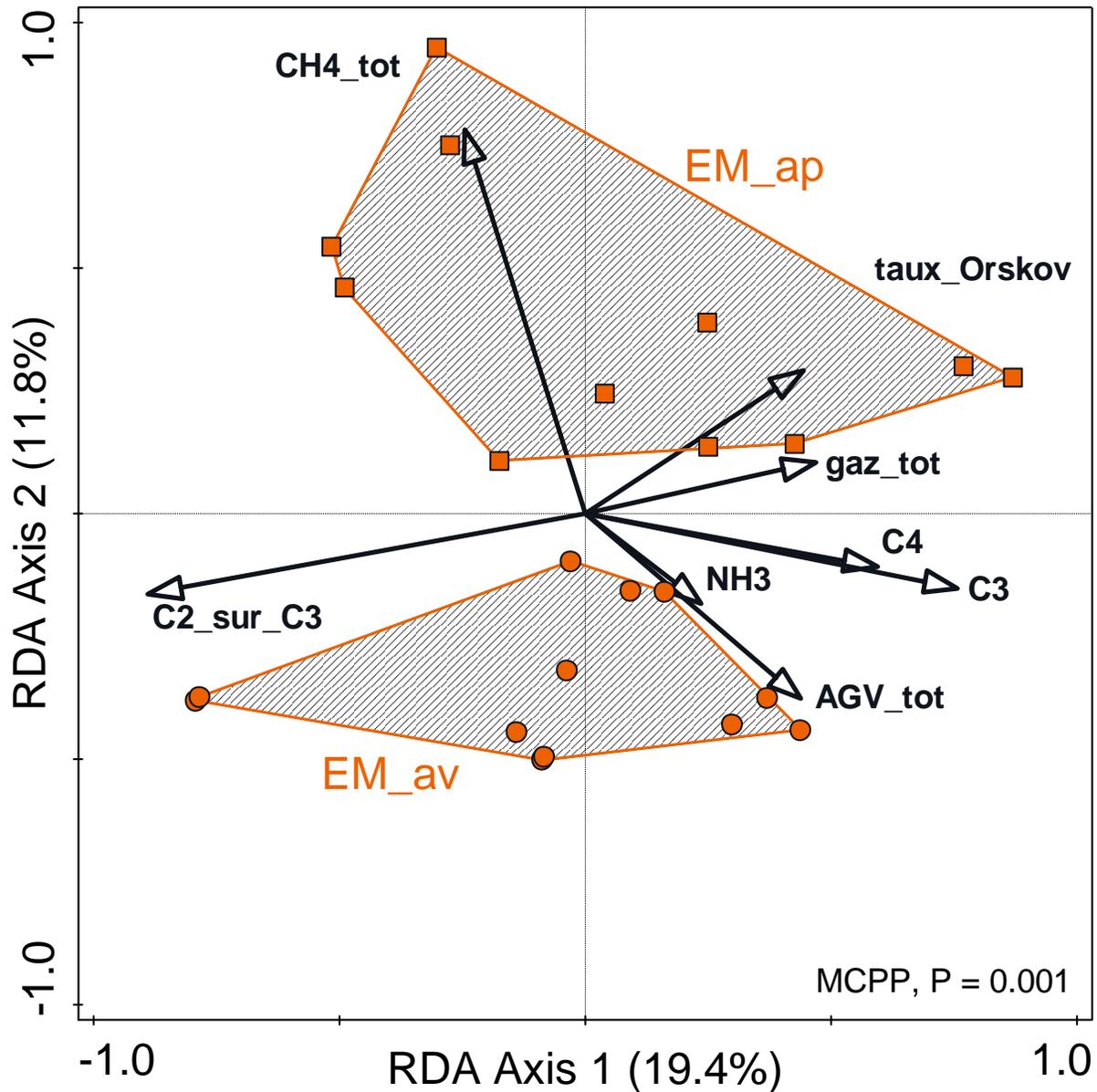


Figure 25 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches durant les 2 semaines de mesures réalisées avec la ration EM (EM_av et EM_ap). Le diagramme d'ordination est contraint par les paramètres fermentaires sélectionnés par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés ici sont : la concentration ruminale en ammoniacque (NH_3), la concentration ruminale en acide propionique (C_3), la concentration ruminale en acide butyrique (C_4), la concentration ruminale de l'ensemble des trois AGV C_2 , C_3 et C_4 (AGV_{tot}), le ratio C_2/C_3 (C_2/C_3), la production totale de gaz in vitro (gaz_{tot}), la cinétique de production de gaz (Taux Orskov) et la production totale de méthane in vitro (CH_4_{tot}). Les deux paramètres non sélectionnés sont le pH ruminal (pH) et la concentration ruminale en acide acétique (C_2). Le premier axe représente 19,4 % de la variabilité et le second 11,8 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».

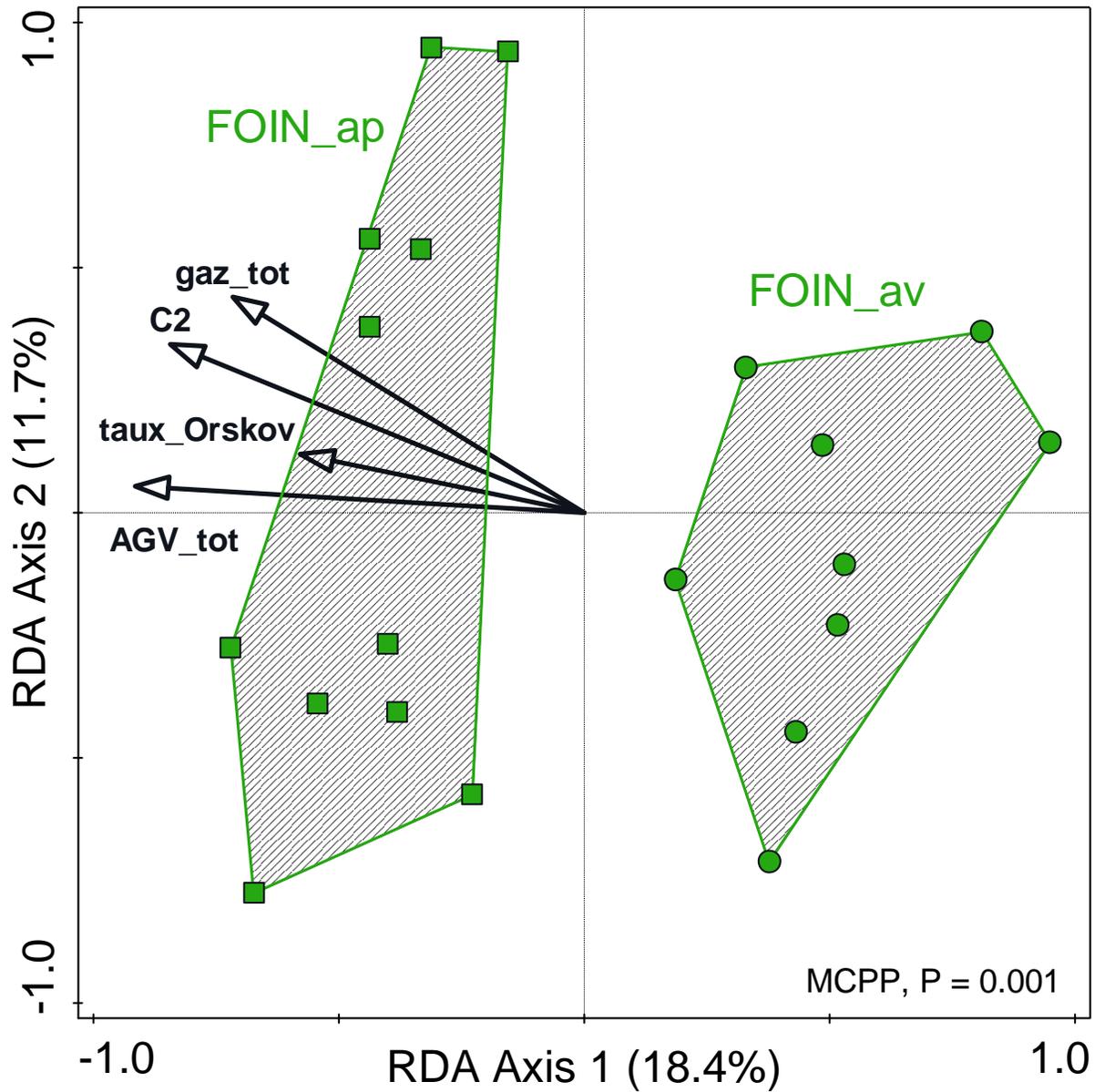


Figure 26 : Graphique de l'analyse de redondances (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches durant les 2 semaines de mesures réalisées avec la ration FOIN (FOIN_av et FOIN_ap). Le diagramme d'ordination est contraint par les paramètres fermentaires sélectionnés par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés ici sont : la concentration ruminale de l'ensemble des trois AGV C_2 , C_3 et C_4 (AGV_{tot}), la concentration ruminale en acide acétique (C_2), la production totale de gaz in vitro (gaz_{tot}) et la cinétique de production de gaz (Taux Orskov). Les paramètres non sélectionnés sont : la concentration ruminale en ammoniac (NH_3), la concentration ruminale en acide propionique (C_3), la concentration ruminale en acide butyrique (C_4), le ratio C_2/C_3 (C_2/C_3), le pH ruminal (pH) et la production totale de méthane in vitro (CH_4_{tot}). Le premier axe représente 18,4 % de la variabilité et le second 11,7 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».

1.5 DISCUSSION

Dans ce chapitre, l'objectif principal était d'étudier la propriété de résilience structurelle des microbiotes suite à une perturbation de l'écosystème ruminal (par synchronisation) sur 6 vaches tarées en fonction de la source énergétique principale contenue dans la ration. Notre hypothèse était la suivante : le retour de la composition du microbiote à l'état initial est conditionné par la ration initiale. Une ration à base foin riche en fibres pouvait conduire à un nouvel état d'équilibre alors qu'une ration moins riche en fibres et plus riche en amidon conduirait à une composition similaire.

Avec la ration FOIN, la composition du microbiote était similaire entre les deux prélèvements réalisés avant la synchronisation (d -8 et d -4). Les microbiotes des 6 vaches ont suivi une même trajectoire entre les différents jours de prélèvement, s'éloignant de la composition initiale jusqu'à 2 mois après synchronisation (d 57). Le microbiote n'était toujours pas stabilisé 76 jours après la perturbation. En revanche, les 2 derniers prélèvements réalisés avec cette ration (d 76 et d 80) ne sont pas significativement différents indiquant une probable stabilisation de la composition. Seulement 4 jours séparent ces 2 prélèvements, ce qui est un temps court pour confirmer une stabilisation. La richesse en OTU a augmenté significativement après la synchronisation (d 76 et d 80) par rapport à la richesse observée avant cet événement (d -8 et d -4). Au niveau des familles et des genres, les différences observées avant et après la synchronisation concerne 8 des 16 familles principales et 9 des 24 principaux genres de bactéries et d'archées. Parmi les familles dont les proportions ont augmenté, nous observons *Prevotellaceae*, *Bacteroidales BS11 gut group*, *Acidaminococcaceae* et *Fibrobacteraceae*. Les familles dont les proportions ont diminuée sont *Rikenellaceae*, *Christensenellaceae* et *Methanobrevibacteriaceae*. Avec cette ration à base de foin riche en fibres, les communautés microbiennes ont évolué vers un état différent de celui avant la perturbation de l'écosystème ruminal. Cette expérience illustre une certaine plasticité du microbiote ruminal dans ce contexte nutritionnel (Sauvant and Martin, 2010).

Avec la ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon (EM), la composition du microbiote était similaire entre les deux prélèvements réalisés avant la synchronisation (d -43 et d -39). Cette stabilité est également observée entre les deux prélèvements réalisés après la synchronisation (d 111 et d 115). La perturbation de l'écosystème ruminal n'a pas été la même avec cette ration EM qu'avec la ration FOIN. En effet, pour la ration EM, il ne s'agit pas d'un événement ponctuel comme la synchronisation mais d'une période de 17 semaines comportant un changement de ration (passage à la ration FOIN) suivie de la synchronisation puis d'un retour à la ration EM la 18^{ème} semaine. Le prélèvement réalisé à d 92 a été effectué seulement 4 jours après la transition alimentaire de la ration FOIN vers la ration EM et pourtant la composition était déjà proche de la composition à d 111 et d 115 (figure 23 et tableau 5). Ces résultats laissent supposer que le microbiote ruminal se stabilise sur une période courte avec ce type de ration. Les différences entre avant (d -43 et d -39) et après la perturbation de l'écosystème ruminal (d 111 et d 115) sont moindres avec seulement 3 des principales familles et 3 des principaux genres ayant des proportions différentes entre ces 2 périodes. Les 3 familles, dont les proportions ont augmenté, sont *p-251-05*, *Acidaminococcaceae* et *Spirochaetaceae*. Avec cette ration riche en amidon, la perturbation de l'écosystème ruminal n'a que très peu affecté les communautés microbiennes ruminales, mettant en évidence une résilience structurelle. Pour revenir à notre objectif principal, nos résultats sont en accord avec notre hypothèse initiale. Le facteur

alimentaire a une influence sur l'évolution de la composition microbienne après perturbation de l'écosystème ruminal. Le microbiote a évolué vers une nouvelle composition pour la ration FOIN alors qu'un retour proche de la composition initiale est observé pour la ration EM.

Les principales différences entre les rations concernaient la teneur en cellulose où la ration FOIN en contenait 24,6 % contre 17 % pour la ration EM et la teneur en amidon avec 27,1 % pour la ration EM contre 6,5 % pour la ration FOIN. Entre ces deux rations, aucune différence significative de richesse en OTU n'a été mise en évidence avant synchronisation contrairement à ce qui a pu être observé entre des rations similaires (Belanche et al., 2012). Ces différences de composition chimique ont induit des différences de composition des microbiotes avant synchronisation entre la ration EM (d -43 et d -39) et la ration FOIN (d -8 et d -4). Parmi les 16 principales familles de bactéries et d'archées, 7 ont des proportions différentes entre les 2 rations. Les familles *Christensenellaceae* et *Methanobacteriaceae* ont des proportions significativement plus importantes dans la ration FOIN que dans la ration EM. Les familles dont les proportions sont significativement plus élevées dans la ration EM sont *Bacteroidales-F082*, *Muribaculaceae*, *Bacteroidales BS11 gut group*, *Fibrobacteraceae* et *Spirochaetaceae*. L'augmentation de la proportion des microorganismes méthanogènes avec des rations plus riches en fibres a déjà été observée avec des vaches (Belanche et al., 2012). Les différences induites entre ces 2 rations concernent également les paramètres fermentaires mesurés *in vivo* et *in vitro*. En effet, la concentration ruminale en AGV, les cinétiques et les quantités de gaz fermentaires produits *in vitro* sont beaucoup plus importantes avec la ration EM qu'avec la ration FOIN. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie (Jouany et al., 1995). Certains paramètres ont été modifiés après la synchronisation avec la ration FOIN comme la concentration ruminale en NH₃ qui a diminué ou comme la concentration ruminale en C₂ qui a augmenté. D'autres ont été modifiés après la synchronisation avec la ration EM comme la production de méthane qui a augmenté après la perturbation de l'écosystème ruminal. Cette augmentation n'est pas liée à une augmentation du genre *Methanobrevibacter* car il est passé d'une proportion de 1,55 % avant synchronisation à 0,72 % après. En ovins, les résultats d'une expérimentation ont montré que les productions de méthane n'étaient pas liées à la proportion des archées méthanogènes (Shi et al., 2014). Enfin, dans notre étude, des paramètres tels que le pH et le ratio de concentration ruminale en C₂/C₃ ne sont pas influencés par la ration mais sont davantage liés à l'animal. Cet effet de l'animal avait également été observé pour 8 vaches nourries avec de l'ensilage de maïs et de la luzerne (Palmonari et al., 2010). Normalement, le pH est plus faible avec des rations moins riches en fibres et plus riches en amidon (Belanche et al., 2012) mais l'absence de différence que nous observons est probablement liée au moment de la prise de pH. En effet, cette mesure est réalisée juste avant la distribution du repas du matin à la fin d'une période de jeun de plus de 16h (Sauvant et al., 1995). L'absence de différence significative entre les profils en acides gras des contenus ruminiaux des deux rations n'était pas attendue car les rations riches en fibres conduisent à des proportions importantes d'acide acétique alors que la présence d'amidon augmente la part de l'acide propionique (Jouany et al., 1995). Les résultats que nous avons mesurés sont des moyennes de concentrations molaires à 4 moments de la journée. Sachant que les différences entre rations ont tendance à diminuer au fil des 24 heures après le repas principal et que les cinétiques de productions d'AGV ne sont pas les mêmes avec des substrats différents des deux rations (Bannink et al., 2006), alors nos mesures moyennes ne sont peut-être pas les mieux adaptées pour prédire le profil en AGV des deux rations (d'autant plus que la précision des analyses d'AGV était de 0,1 g/L).

Des relations entre la composition des microbiotes et les paramètres fermentaires sont retrouvés entre la ration EM (d -43, d -39, d 111 et d 115) et la ration FOIN (d -8, d -4, d 76 et d

80) (figure 24). En effet, 46,5 % de la variation totale est expliquée par les paramètres fermentaires. Nous retrouvons le ratio de la concentration en C_2/C_3 et le pH comme étant presque orthogonaux aux autres paramètres, ne décrivant pas des différences entre ration, mais des différences intra-ration. Regardés séparément pour chaque ration, moins de paramètres fermentaires sont mis en évidence comme liés avec la ration FOIN par rapport à la ration EM. Enfin, la variabilité entre vache par jour n'est que très peu expliqué par les paramètres fermentaires, hormis pour le ratio des concentrations en C_2/C_3 qui est retrouvé tout au long de l'essai (annexe 6). Les paramètres fermentaires mesurés dans cette expérimentation représentent l'activité du microbiote pour ceux mesurés *in vitro* et celle de l'hôte et du microbiote pour les paramètres mesurés *in vivo*. Les changements de composition du microbiote dans cette expérimentation sont en relation avec des paramètres fermentaires.

1.6 CONCLUSION

Ce chapitre avait pour objectif d'étudier la résilience structurelle du microbiote après une perturbation de l'écosystème ruminal en fonction de la source énergétique principale de la ration distribuée. Notre hypothèse était la suivante : la communauté microbienne peut évoluer vers une nouvelle composition avec la ration riche en fibres alors qu'avec une ration plus riche en amidon, la composition reviendrait à une situation proche de celle avant perturbation. L'expérimentation menée ici a validé notre hypothèse. Avec la ration riche en fibres, la composition du microbiote a évolué jusqu'à amorcer une stabilisation près de 80 jours après la synchronisation, illustrant la propriété de plasticité. La composition du microbiote a été modifiée à des niveaux taxonomiques élevés (familles et genres). Avec la ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon la composition du microbiote est revenue à une composition proche de celle avant perturbation. Peu de taxons ont été modifiés par cette perturbation de l'écosystème ruminal. En parallèle de ces modifications de composition du microbiote, les paramètres fermentaires ont évolué suite à cette perturbation sauf pour le pH et le ratio de la concentration ruminale en acide acétique sur acide propionique. En effet, ces deux derniers paramètres sont des caractéristiques liées à l'hôte plutôt qu'à la ration dans nos conditions expérimentales. La source énergétique de la ration a donc une influence sur l'évolution de la composition du microbiote après une perturbation de l'écosystème ruminal. Après avoir étudié la résilience structurelle des microbiotes en fonction de la ration, nous nous sommes intéressés à la spécificité liée à l'hôte en étudiant l'origine de la variabilité entre les individus concernant le microbiote (par exemple, les flux de matières organiques sortant du rumen qui sont des caractéristiques de l'hôte).

CHAPITRE 2. INFLUENCE DE L'ANIMAL HÔTE SUR LA COMPOSITION DE SON MICROBIOTE RUMINAL CHEZ LA VACHE TARIE RECEVANT UNE RATION RICHE EN FIBRES OU EN AMIDON

Dans ce second chapitre, nous avons étudié l'interrelation entre l'animal et son microbiote sous l'angle de l'effet des caractéristiques de l'animal hôte sur la composition de sa communauté microbienne ruminale. Nous avons donc testé le degré de spécificité du microbiote lié à son hôte. La procédure de synchronisation apporte un même microbiote à un même moment à l'ensemble des animaux impliqués dans l'expérimentation. Cela permet, après cette perturbation de l'écosystème ruminal, d'identifier les caractéristiques corrélées aux modifications de composition au sein des microbiotes entre les individus, une fois atteint un état stable. Ces relations ont été suivies avec deux rations distribuées aux vaches : une ration à base de foin riche en fibres et l'autre à base d'ensilage de maïs riche en amidon. Les caractéristiques mesurées de l'animal hôte étaient le gabarit des animaux à travers leur poids (PV), leurs quantités de contenu ruminal juste avant la synchronisation (CR) et les taux de passage des phases solide (TPPS) et liquide (TPPL). Notre hypothèse était la suivante : ces paramètres influencent la composition du microbiote après la perturbation de l'écosystème ruminal indépendamment de la ration distribuée aux vaches.

1.7 RESULTATS

Dans un premier temps, nous présentons les caractéristiques des animaux hôtes, leurs variabilités et les relations entre ces variables. TPPS et TPPL sont deux variables qui ont été mesurées avec les deux rations (EM et FOIN), avant et après synchronisation.

- TPPL (taux de passage de la phase liquide) :

Pour la variable TPPL, la ration et le moment de prélèvement (avant ou après synchronisation) n'ont pas d'effet significatif sur les 4 mesures réalisées par vache sur l'ensemble de l'expérimentation. En revanche, nous retrouvons des différences significatives de TPPL moyen entre les vaches ($P < 0,05$) (figure 27). La vache n°2377 a un TPPL significativement supérieur aux vaches n°1899 et n°2141. La moyenne des TPPL par ration et par vache est présentée dans le tableau 12. La variabilité entre les vaches pour le TPPL est importante. Le plus petit TPPL avec la ration EM est de 5,8 %/h alors que le plus grand est de 10,3 %/h. Avec la ration EM, ces mêmes vaches ont également le taux le plus faible de 6,2 %/h et le taux le plus élevé de 16,4%/h. Le TPPL semble être une caractéristique liée à l'animal.

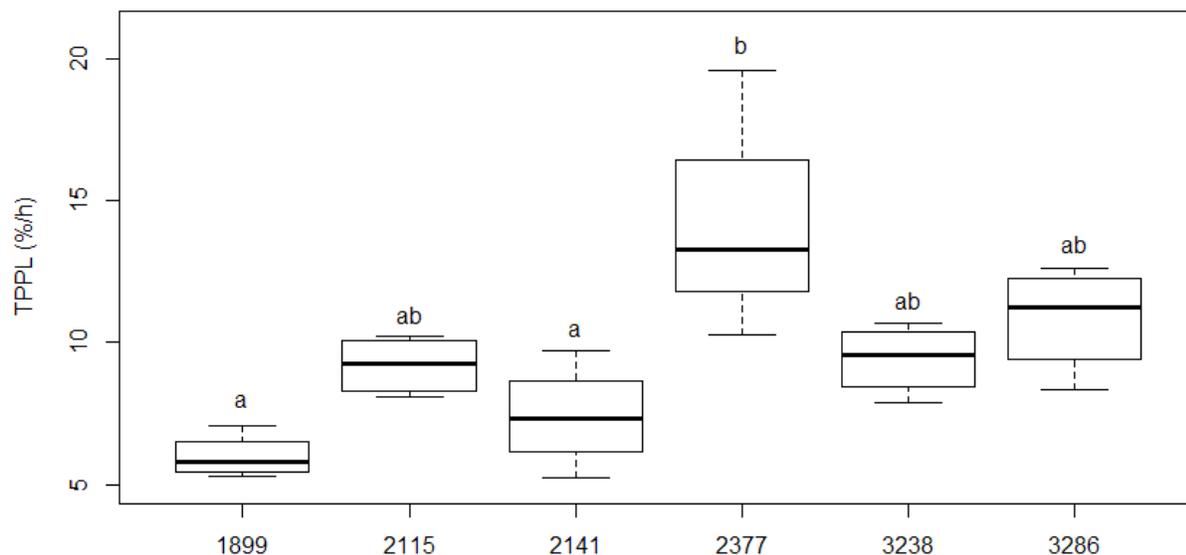


Figure 27 : Graphiques de boîtes à moustaches des taux de passages de la phase liquide (TPPL) des contenus ruminiaux en fonction des vaches sur l'ensemble de l'expérimentation. Le modèle expliquant le TPPL en fonction du facteur vache est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences entre vaches. Deux vaches partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes.

vache	TPPL (%/h)	
	Maïs	Foin
2115	9,1 ± 1,5	9,2 ± 1,0
1899	5,7 ± 0,2	6,1 ± 1,2
2141	6,1 ± 1,2	8,6 ± 1,5
3286	9,4 ± 1,5	12,2 ± 0,4
3238	9,5 ± 0,6	9,2 ± 2,0
2377	10,2 ± 1,5	16,4 ± 4,4

Tableau 12 : Valeurs des taux de passage de la phase liquide (TPPL) par vache en fonction des deux rations distribuées. La ration riche en concentrés est symbolisée dans le tableau par EM et la ration riche en fibres est symbolisée dans le tableau par FOIN.

- TPSS (taux de passage de la phase solide) :

Pour la variable TPSS, il n'y a aucune différence significative entre les vaches, mais il y a des différences significatives entre les jours de prélèvement ($P < 0,05$) (figure 28). Une interaction entre la variable jour de prélèvement et la variable ration est mise en évidence. Seul le TPSS de la ration EM après synchronisation est différent du TPSS de la ration FOIN avant la synchronisation. Pour chacune des rations, les différences entre avant et après la synchronisation ne sont pas significatives. Le tableau 13 présente les valeurs pour le TPSS de la ration EM et de la ration FOIN par vache. Les valeurs du TPSS varient de 1,2 à 2 %/h pour la ration EM et de 1,1 à 1,8 %/h pour la ration FOIN.

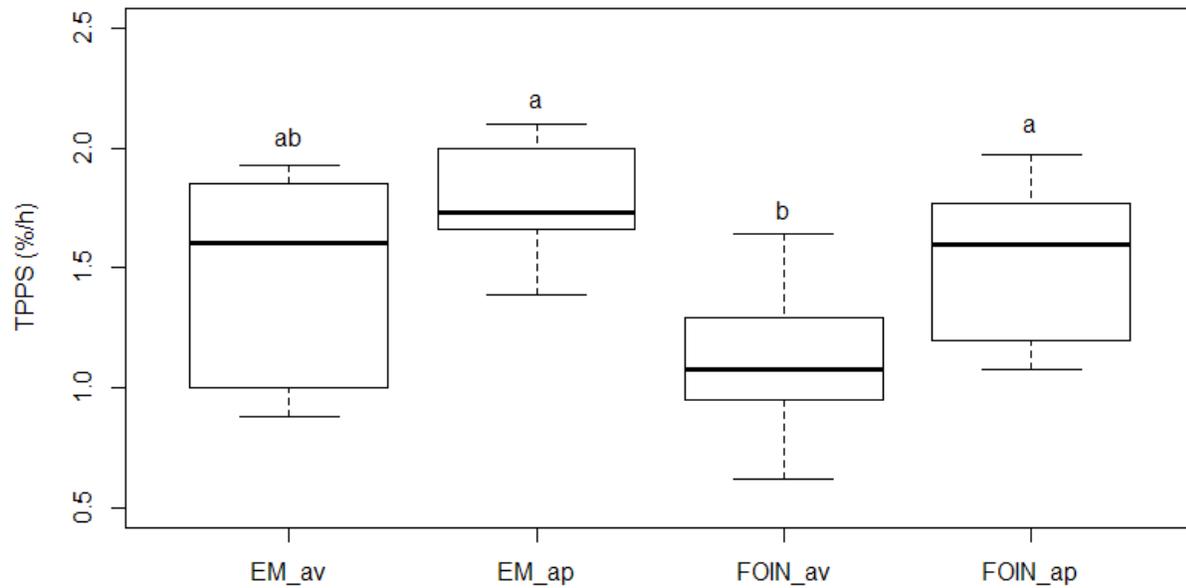


Figure 28 : Graphiques de boîtes à moustaches des taux de passages de la phase solide (TPPS) des contenus ruminiaux en fonction de la ration et du jour de prélèvement (avant ou après la synchronisation). Le modèle expliquant le TPPL en fonction du temps est significatif ($P < 0,05$). Des tests de comparaison des moyennes ajustées avec correction de Bonferroni ont permis d'identifier les différences au cours du temps. Deux temps partageant une même lettre ont des moyennes qui ne sont pas significativement différentes. EM_ap : ration riche en concentrés après la synchronisation ; EM_av : ration riche en concentrés avant la synchronisation ; FOIN_ap : ration riche en fibres après la synchronisation ; FOIN_av : ration riche en fibres avant la synchronisation.

Vache	TPPS (%/h)	
	EM	FOIN
2115	1,8 ± 0,3	1,3 ± 0,4
1899	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,0
2141	1,3 ± 0,5	1,2 ± 0,1
3286	2,0 ± 0,1	1,4 ± 0,5
3238	1,8 ± 0,1	1,1 ± 0,6
2377	1,7 ± 0,0	1,8 ± 0,2

Tableau 13 : Valeurs des taux de passage de la phase solide (TPPS) par vache en fonction des deux rations distribuées. La ration riche en concentrés est symbolisée dans le tableau par EM et la ration riche en fibres est symbolisée dans le tableau par FOIN.

- PV (Poids vif) et CR (contenu ruminal)

Le gabarit des animaux est chiffré par leur poids mesuré au démarrage de l'essai (PV). La quantité de contenu ruminal sorti au moment de la procédure de synchronisation a été pesée (CR). Les valeurs de ces deux variables sont présentées dans le tableau 14. Nous observons une importante variabilité entre les vaches qui pesaient de 580 à 900 kg et avaient des quantités de contenu ruminant allant de 32,5 à 92,9 kg. Nous constatons dans ce tableau que les vaches au plus gros poids vif n'ont pas forcément plus de contenus dans leurs rumens que les vaches de poids vif plus faible.

Vache	PV (kg)	CR (kg)
2115	830	56,4
1899	753	92,9
2141	840	79,8
3286	580	55,6
3238	651	61,6
2377	900	32,5

Tableau 14 : valeurs du poids vif des 6 vaches (PV) en kg et du contenu ruminal présent dans leurs rumens le jour de la synchronisation des contenus ruminants (CR) en kg.

- Relations entre les variables caractérisant l'hôte :

Les relations entre 6 caractéristiques de l'hôte sont représentées par une ACP (figure 29). Les 2 premiers axes de cette ACP expriment la majorité de l'inertie totale du jeu de données (93,8 %). Les 6 variables sont bien représentées. Sur l'axe 1, CR est corrélé négativement aux 4 variables décrivant les taux de passage des phases solide et liquide pour les deux rations, ce qui signifie, dans notre expérimentation, que plus un animal a un contenu important, plus le taux de renouvellement de ce dernier est lent pour une même quantité ingérée. La variabilité verticale de l'axe 2 est principalement expliquée par le gabarit des animaux.

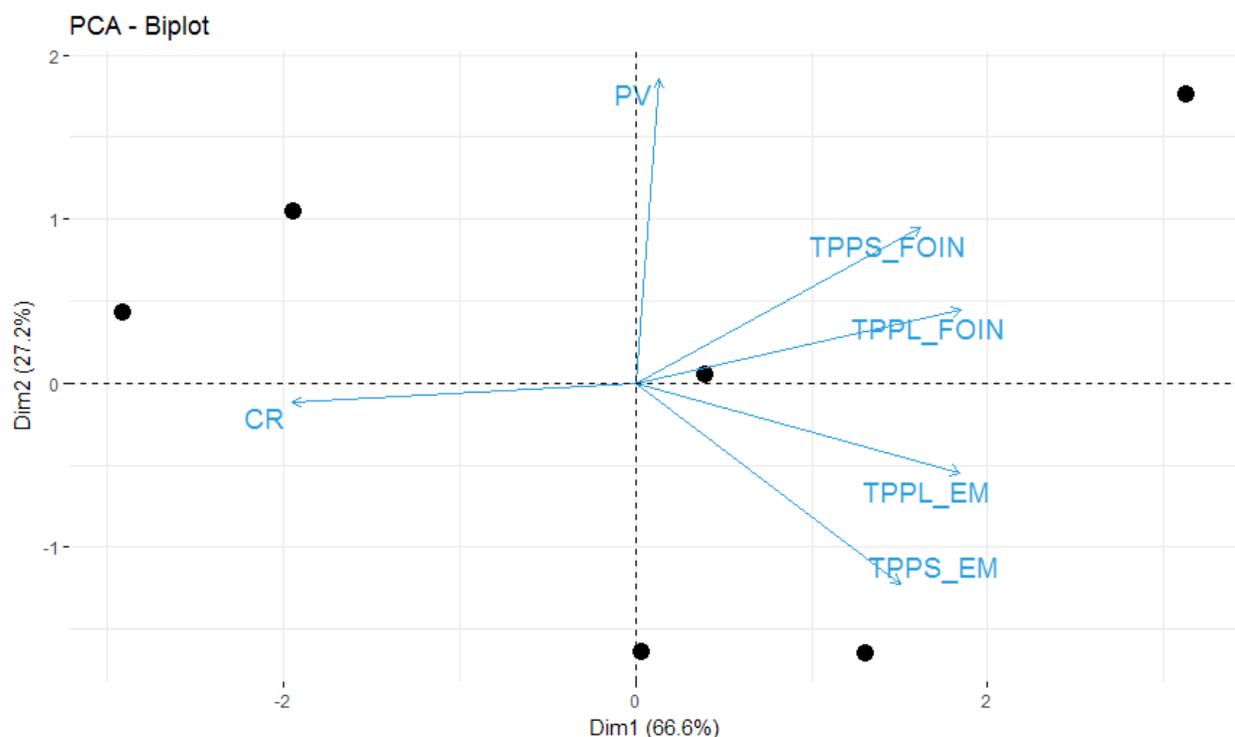


Figure 29 : Représentation graphique des variables de l'ACP des caractéristiques décrivant les 6 vaches de l'expérimentation. Les deux premiers axes de l'ACP expriment 93,8 % de l'inertie totale du jeu de données avec 66,6 % pour l'axe 1 et 27,2 % pour l'axe 2. CR : Contenu ruminal (kg) ; PV : Poids vif (kg) ; TPPL_FOIN : taux de passage de la phase solide pour la ration riche en fibres ; TPPL_FOIN : taux de passage de la phase liquide pour la ration riche en fibres ; TPPL_EM : taux de passage de la phase liquide pour la ration riche en concentrés ; TPPL_EM : taux de passage de la phase solide pour la ration riche en concentrés.

- Liens entre composition du microbiote et caractéristiques des animaux hôtes

Les liens entre la composition des microbiotes et les caractéristiques des vaches ont été testés chaque jour de prélèvement à l'aide d'une analyse d'ordination contrainte (tableau 15). Aucune corrélation n'a été identifiée pour la ration FOIN. Pour la ration EM, nous observons une corrélation entre le TPPL à d -39 et la composition du microbiote. Après la synchronisation, c'est TPPL qui est identifié comme ayant un effet sur la composition du microbiote à d 111.

	d -43	d -39	d -8	d -4	d 76	d 80	d 111	d 115
PV	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TPPL_EM	NS	*					NS	NS
TPPL_FOIN			NS	NS	NS	NS		
TPPL_EM	NS	NS					*	NS
TPPL_FOIN			NS	NS	NS	NS		

Tableau 15 : Tableau reportant la significativité des caractéristiques des vaches testées une à une par jour de prélèvement avec une analyse de redondance (RDA) et une procédure de permutation de Monte Carlo. Les caractéristiques testées sont : le poids des animaux (PV), la quantité de contenu ruminal présent le jour de la synchronisation (CR), le taux de passage de la phase solide avec la ration EM (TPPL_EM) et avec la ration FOIN (TPPL_FOIN) ainsi que le taux de passage de la phase liquide avec la ration EM (TPPL_EM) et avec la ration FOIN (TPPL_FOIN). Le jour de la synchronisation des contenus ruminiaux est noté d 0. Les temps de prélèvement pour la ration EM sont d -43, d -39, d 111 et d 115. Les temps de prélèvement pour la ration FOIN sont d -8, d -4, d 76 et d 80. (P-value > 0,1 : 'NS' ; 0,1 > P-value >= 0,05 : '-'; 0,05 > P-value : '*')

Pour aller plus loin une analyse d'ordination contrainte avec sélection de variable a été effectuée pour chacune des semaines de mesures (EM_av (d -43 et d -39), EM_ap (d 111 et d 115), FOIN_av (d -8 et d -4) et FOIN_ap (d 76 et d 80)). Les graphiques dont au moins une variable a été sélectionnée sont présentés dans les figures 30, 31 et 32. Pour la ration EM avant la synchronisation, deux variables ont été sélectionnées : PV et TPPS_EM. La variation totale expliquée par ces deux variables est de 38,8 %. Après la synchronisation avec cette même ration, le TPPL_EM a été sélectionné et il explique 25 % de la variation totale. Pour la ration FOIN avant synchronisation, la variable CR a été sélectionnée et elle explique 21,6 % de la variation totale. Pour cette même semaine de mesures, si parmi les variables testées (PV, CR, TPPS_FOIN et TPPL_FOIN) la variable CR est remplacée par le ratio CR/PV alors le TPPL_FOIN est sélectionné et il explique 21,2 % de la variation totale (annexe 7). Pour la ration FOIN après la synchronisation, aucune variable n'a été sélectionnée pour ces deux jours de prélèvements.

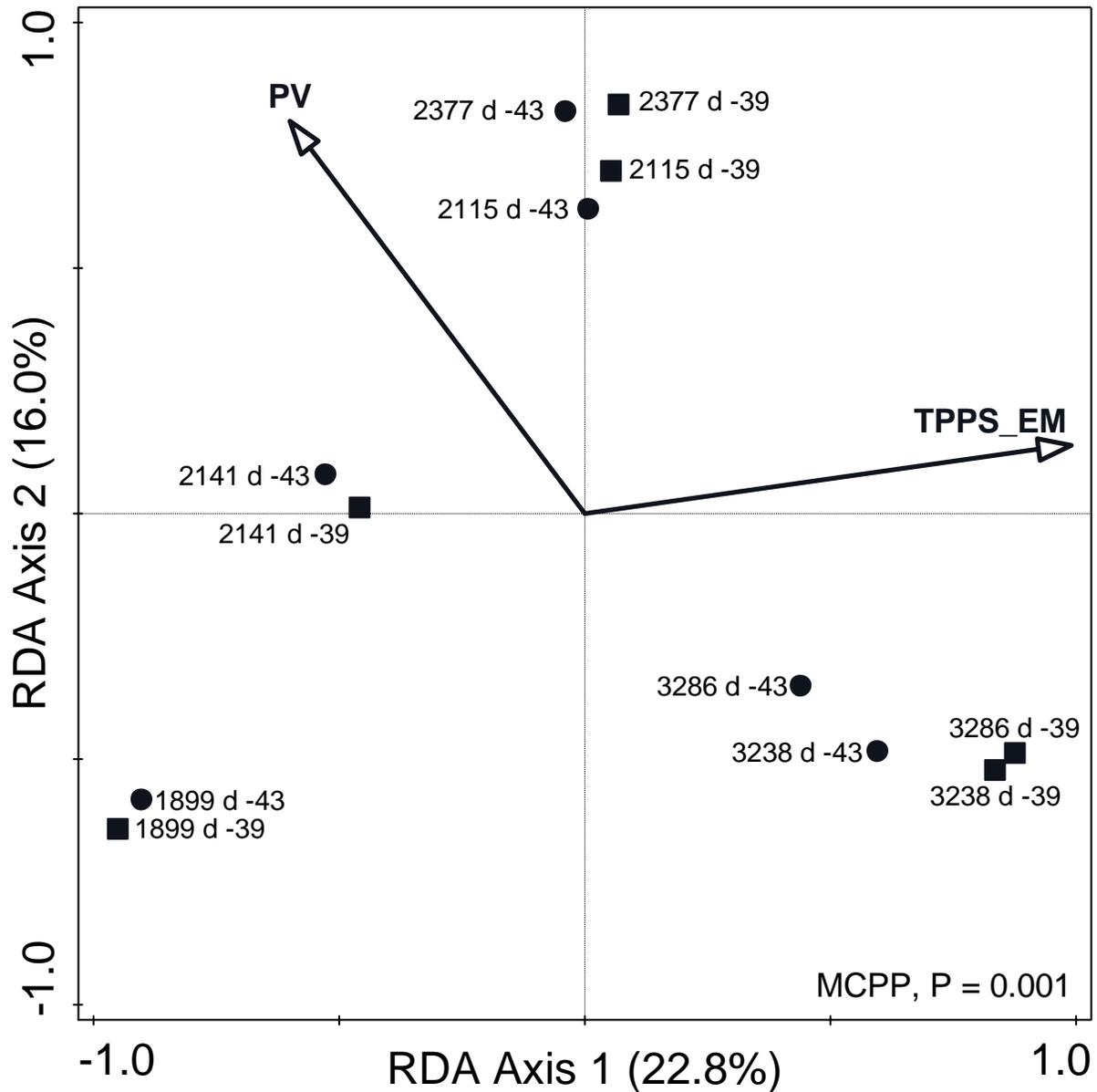


Figure 30 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d -43 et d -39. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Les paramètres sélectionnés sont : le poids vif des vaches (PV) et le taux de passage de phase solide pour la ration EM (TPPS_EM). Les paramètres non sélectionnés sont la quantité de contenu ruminal retiré le jour de la synchronisation (CR) et le taux de passage de la phase liquide pour la ration EM (TPPL_EM). Le premier axe représente 22,8 % de la variabilité et le second 16,0 %. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».

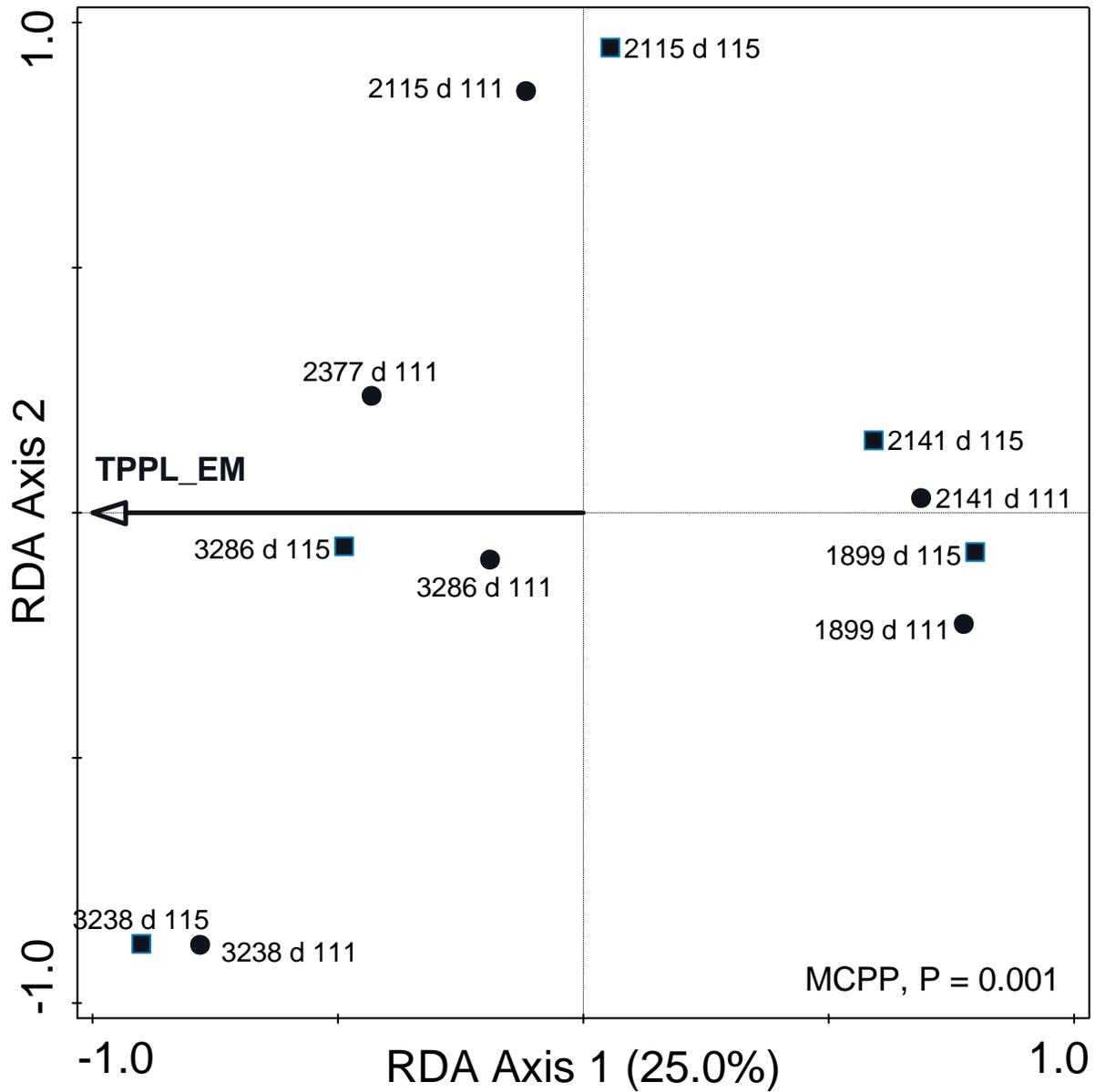


Figure 31 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d 111 et d 115. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Le paramètre sélectionné est le taux de passage de phase liquide pour la ration EM (TPPL_EM). Les paramètres non sélectionnés sont le poids vif (PV), la quantité de contenu ruminal mesuré le jour de la synchronisation (CR) et le taux de passage de la phase liquide mesuré sur la ration EM (TPPS_EM). Le premier axe représente 25,0 % de la variabilité. MCP : « Monte Carlo permutation procedure ».

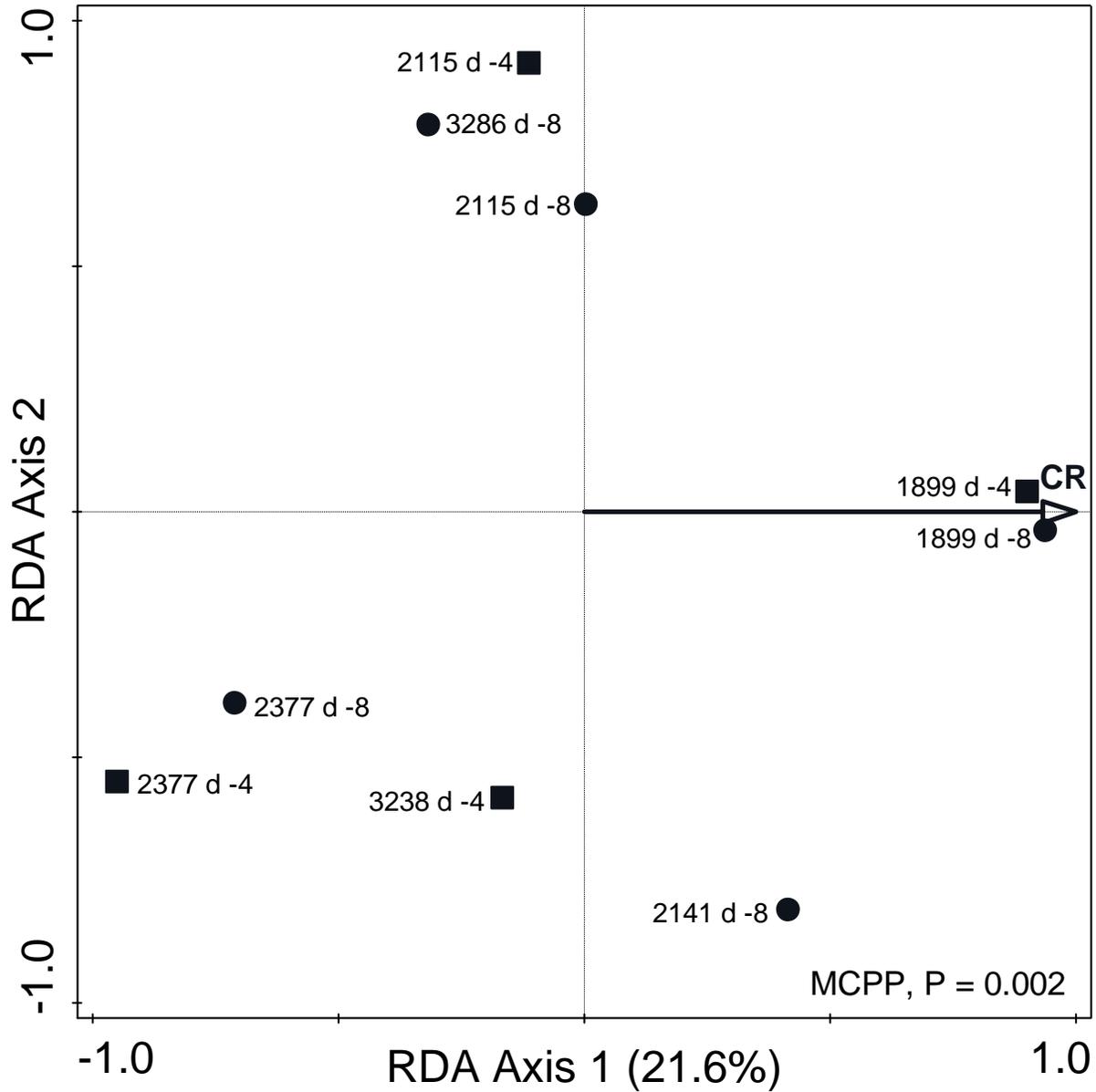


Figure 32 : Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basé sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d -8 et d -4. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0,05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Le paramètre sélectionné est la quantité de contenu ruminal mesuré le jour de la synchronisation (CR). Les paramètres non sélectionnés sont le poids vif (PV), le taux de passage de la phase solide mesuré sur la ration FOIN (TPPS_FOIN) et le taux de passage de la phase liquide mesuré sur la ration FOIN (TPPL_FOIN). Le premier axe représente 21,6 % de la variabilité. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».

1.8 DISCUSSION

L'objectif de ce chapitre était d'étudier le degré de spécificité du microbiote lié à son hôte par l'étude des effets des caractéristiques mesurées de cet hôte sur la composition de sa communauté microbienne ruminale. L'étude de ces relations a été effectuée avec deux rations : une à base de foin riche en fibres et l'autre à base d'ensilage de maïs riche en amidon. L'identification des paramètres ayant une influence sur la composition du microbiote est permise grâce à la procédure de synchronisation qui permet de fournir un microbiote de même composition au même moment aux animaux de l'expérimentation. Les relations observées avant cette procédure sont des corrélations dont la causalité ne peut être mise en évidence. En revanche, les divergences d'évolution des microbiotes sont liées aux caractéristiques de l'animal hôte. Nous reviendrons sur les particularités de la procédure de synchronisation dans la discussion générale.

Après la synchronisation avec la ration FOIN (d 76 et d 80), aucune caractéristique de l'animal hôte n'est identifiée comme ayant une influence significative sur la composition du microbiote. Pour la ration EM, la perturbation de l'écosystème ruminal n'est pas uniquement dû à la synchronisation mais elle inclut également la période de 17 semaines autour de cette synchronisation où les vaches ont reçu la ration FOIN. Pour les prélèvements réalisés à d 111 et d 115, le paramètre TPPL_EM est corrélé à la composition du microbiote. La RDA testant ce paramètre pour les seuls prélèvements de d 111 était significative. Avant la synchronisation avec la ration FOIN, le paramètre CR a été identifié comme étant corrélé à la composition du microbiote. Les taux de passage dans le rumen sont en partie liés aux flux d'entrée et à la quantité de contenu ruminal. Pour ces animaux rationnés, les quantités entrant dans le rumen sont les mêmes. La quantité de contenu ruminal influence donc majoritairement le taux de passage de la phase solide. Plus l'animal a un contenu ruminal de taille importante, plus les taux de renouvellement seront faibles pour une même ingestion. Les digestions mécanique, microbienne et chimique sont également des éléments influençant les taux de passage dans le rumen. Avec la ration EM, avant la synchronisation, les deux variables identifiées sont le PV et le TPPS_EM. La variable PV caractérise le gabarit des animaux et également le niveau d'ingestion. La quantité de matière sèche distribuée par jour étant la même pour chaque animal (7,1 kg de MS en moyenne avec les deux rations) la vache ayant le poids le plus faible (580kg) et la vache ayant le poids le plus élevé (900kg) ont des niveaux d'ingestion respectifs de 1,22 et 0,78 MS en pourcentage du PV. L'effet du taux de renouvellement de la phase solide sur la composition du microbiote est lié au temps de génération des bactéries. Plus le taux est rapide, moins le pourcentage des bactéries ayant un grand temps de génération est élevé dans le microbiote (Van Soest, 2018). En revanche, la relation entre le poids vif de l'animal et la composition de son microbiote est beaucoup moins évidente. Les flux de matières sortant du rumen semblent être corrélés à la composition des communautés microbiennes. Parmi la variabilité de composition des communautés microbiennes observée entre les vaches, la majorité de cette variabilité reste inexpliquée par les paramètres mesurés dans notre expérimentation.

Dans notre expérimentation, les flux de matières traversant le rumen n'ont été caractérisés que pour les flux sortant. En effet, il n'y avait pas assez de variabilité entre les vaches concernant les cinétiques d'ingestion. La distribution rationnée de l'aliment, à faible niveau d'ingestion, ne permet pas d'exprimer la variabilité entre les comportements alimentaires des individus comme ce pourrait être le cas avec une alimentation *ad libitum*. Néanmoins, il existe des équations permettant de prédire les taux de passage dans le rumen à partir du niveau

d'ingestion (Sauvant et al., 2018). À partir des niveaux d'ingestion des vaches de l'essai, les TPPL prédits sont compris entre 6,3 et 7,2 %/h et les TPPS prédits sont compris entre 2,4 et 2,8 %/h. Nos mesures des TPPL (de 5,8 à 16,4 %/h) se situent autour de ces prédictions avec une valeur maximale toutefois élevée. En revanche, pour les TPPS, nos mesures sont toujours sous estimées par rapport aux prédictions (de 1,1 à 2 %/h). La méthode de mesure du taux de passage de la phase solide par insertion via la canule ruminale d'une quantité connue de balle de riz n'a pas été réalisée, à notre connaissance, dans la bibliographie. Les cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique sont généralement utilisées comme marqueur afin d'estimer les digestibilités (Penning and Johnson, 1983). Dans notre expérimentation, l'insertion d'une quantité définie de matière première riche en cendres insolubles permet de suivre la diminution de la concentration par rapport au niveau basal présent dans le rumen et d'estimer, ainsi, le TPPS. Cette méthode sous-estime probablement les taux de passage, mais le biais est le même pour tous les animaux avec les 2 rations. Dans notre expérimentation, nous étions plus intéressés par les différences entre les vaches que par la valeur absolue. Nous avons représenté sur la figure 33 la relation entre les TPPS et le CR pour s'assurer de la cohérence entre ces deux variables. La relation obtenue pour la ration FOIN est cohérente, le TPPS étant plus faible pour les vaches ayant des gros CR. Pour la ration EM, le point entouré par un cercle rouge semble avoir un comportement atypique. Il s'agit de la vache n°2377 (PV = 900 kg et CR = 32,5 kg). Cet animal a le plus gros poids vif et le plus petit contenu ruminal de tous des animaux étudiés. La mesure de la quantité de contenu ruminal le jour de la synchronisation avec la ration FOIN n'est peut-être pas représentative de sa quantité de contenu ruminal avec la ration EM. Le dispositif expérimental utilisé avec le rationnement constant des animaux a limité la variabilité individuelle des flux entrant et sortant des rumens. Nous n'avons pas anticipé que cette réduction de variabilité combinée aux imprécisions de mesure du TPPS rendrait plus difficile la mise en évidence de l'effet de ce caractère de l'hôte sur le microbiote qu'il héberge.

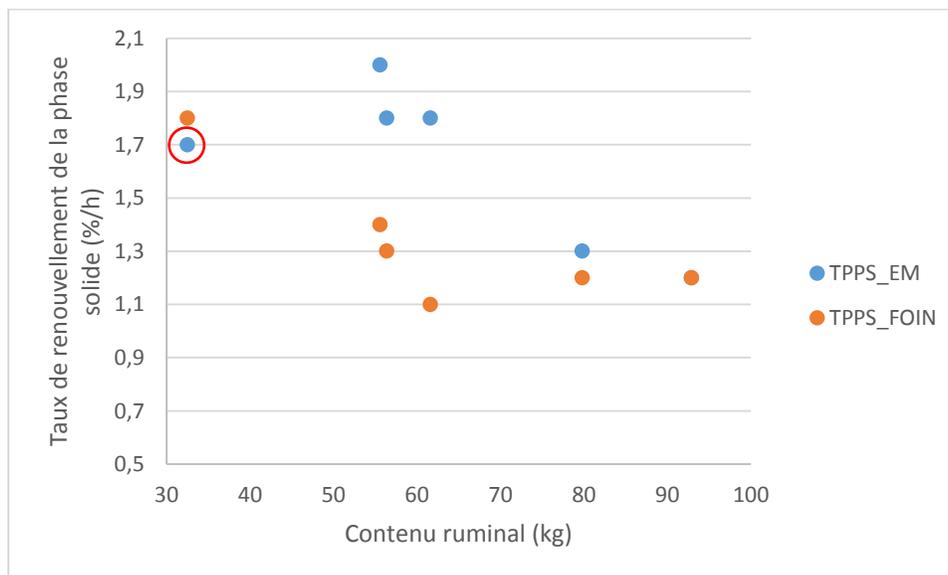


Figure 33 : Représentation des taux de passage de la phase solide mesurés avec la ration riche en fibres (TPPS_FOIN) et avec la ration riche en amidon (TPPS_EM) en fonction de la quantité de contenu ruminal présente le jour de la procédure de synchronisation.

1.9 CONCLUSION

L'objectif de ce chapitre était d'étudier la spécificité des microbiotes ruminiaux liée à l'animal hôte. L'effet des caractéristiques de l'animal hôte sur la communauté microbienne ruminale a été étudiée avec deux rations : une à base de foin riche en fibres et une à base d'ensilage de maïs riche en amidon. Les caractéristiques mesurées chez les vaches étaient le gabarit de l'hôte avec la mesure du poids vif (PV), la quantité de contenu présent dans le rumen avec le poids de contenu extrait le jour de la synchronisation (CR), et les taux de passage des phases solide et liquide caractérisés pour les deux rations distribuées au cours de l'essai (TPPS_EM, TPPS_FOIN, TPPL_EM et TPPL_FOIN). Notre hypothèse supposait que ces paramètres influenceraient la composition du microbiote après la perturbation de l'écosystème ruminal indépendamment de la ration distribuée aux vaches. Pour la ration FOIN, aucun paramètre n'a été mis en évidence après la synchronisation. Pour la ration EM, après la synchronisation nous avons identifié le TPPL_EM comme étant lié aux communautés microbiennes. Avant la synchronisation PV et TPPS_EM sont observés pour la ration EM et le CR est observé pour la ration FOIN. Le contenu ruminal est corrélé négativement aux taux de passage des phases solides et liquides. Dans l'ensemble, nous avons mis en évidence des relations entre les flux de matières sortant du rumen et la composition des microbiotes mais une part importante de la variabilité des communautés microbiennes entre les individus reste non expliquée par les paramètres que nous avons mesurés. D'autres caractéristiques de l'hôte doivent être étudiées. Notamment, il serait intéressant de reproduire cette expérimentation avec des animaux en production pour tester si un niveau d'ingestion et des flux de matières à travers le rumen plus élevés influenceraient davantage les communautés microbiennes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bannink, A., J. Kogut, J. Dijkstra, J. France, E. Kebreab, A. M. Van Vuuren, and S. Tamminga. 2006. Estimation of the stoichiometry of volatile fatty acid production in the rumen of lactating cows. *J. Theor. Biol.* 238:36–51. doi:10.1016/j.jtbi.2005.05.026.
- Belanche, A., M. Doreau, J. E. Edwards, J. M. Moorby, E. Pinloche, and C. J. Newbold. 2012. Shifts in the Rumen Microbiota Due to the Type of Carbohydrate and Level of Protein Ingested by Dairy Cattle Are Associated with Changes in Rumen Fermentation. *J. Nutr.* doi:10.3945/jn.112.159574.
- Bokulich, N. A., S. Subramaniam, J. J. Faith, D. Gevers, J. I. Gordon, R. Knight, D. A. Mills, and J. G. Caporaso. 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods.* 10:57.
- Ter Braak, C. J., and P. Šmilauer. 2012. Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0. Microcomputer power.
- Broudiscou, L. P., and Y. Papon. 1994. Quantification of ammonia in rumen and fermenter fluid samples by a gas-sensing electrode. *Reprod. Nutr. Développement.* 193–200.
- Cherwell Scientific Ltd. 2000. Modelmaker user manual. Oxford, England.
- Edgar, R. C., B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, and R. Knight. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27:2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- Egan, J. K., and P. T. Doyle. 1984. A comparison of particulate markers for estimation of digesta flow from abomasum of sheep offered chopped oaten hay. *Aust. J. Agric. Res.* 35:279–291.
- Escudié, F., L. Auer, M. Bernard, M. Mariadassou, L. Cauquil, K. Vidal, S. Maman, G. Hernandez-Raquet, S. Combes, and G. Pascal. 2018. Sequence analysis FROGS : Find , Rapidly , OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics.* 34:1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
- Guyader, J., M. Eugène, B. Meunier, M. Doreau, D. P. Morgavi, M. Silberberg, Y. Rochette, C. Gerard, C. Loncke, and C. Martin. 2015. Additive methane-mitigating effect between linseed oil and nitrate fed to cattle. *J. Anim. Sci.* 93:3564–3577. doi:https://doi.org/10.2527/jas.2014-8196.
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper, and P. D. Ryan. 2001. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4:1–9.
- Hünerberg, M., S. M. McGinn, K. A. Beauchemin, E. K. Okine, O. M. Harstad, and T. A. McAllister. 2013. Effect of dried distillers grains plus solubles on enteric methane emissions and nitrogen excretion from growing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 91:2846–2857. doi:https://doi.org/10.2527/jas.2012-5564.
- Hyden, S. 1956. A turbidimetric method for determination of higher polyethylene glycols in biological materials. *K. Lantbrukshögskolans Ann.* 22:139–145.
- Jouany, J. P., L. Broudiscou, R. A. Prins, and S. Komisarczuk-Bony. 1995. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In: *Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion.* INRA editi. p. 349–381.
- Kindt, R. 2016. BiodiversityR: package for community ecology and suitability analysis. R version.

2.

Lê, S., J. Josse, and F. Husson. 2008. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25:1–18.

Lenth, R., H. Singmann, J. Love, P. Buerkner, and M. Herve. 2019. Package “emmeans”: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/emmeans.pdf>

Mahé, F., T. Rognes, C. Quince, C. De Vargas, and M. Dunthorn. 2014. Swarm : robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ.* 2:e593. doi:10.7717/peerj.593.

Mould, F. L., R. Morgan, K. E. Kliem, and E. Krystallidou. 2005. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124 Pa:155–172. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.05.002.

Orskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499–503. doi:10.1017/S0021859600063048.

Palmonari, A., D. M. Stevenson, D. R. Mertens, C. W. Cruywagen, and P. J. Weimer. 2010. PH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:279–287. doi:10.3168/jds.2009-2207. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2207>

Penning, P. D., and R. H. Johnson. 1983. The use of internal markers to estimate herbage digestibility and intake 1. potentially indigestible cellulose and acid insoluble ash. *J. Agric. Sci.* 100:127–131. doi:10.1017/S0021859600032512.

Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, and R. C. Team. 2015. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Packag. version 3.1. 1–122.

R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. Available from: <https://www.r-project.org>

Sauvant, D., E. Grenet, and M. Doreau. 1995. Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen : cinétique et importance. In: *Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion*. INRA editi. p. 383–406.

Sauvant, D., S. Lemosquet, P. Chapoutot, and P. Nozière. 2018. Protein and amino acids supply. In: *INRA Feeding System for Ruminants*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. p. 61–63.

Sauvant, D., and O. Martin. 2010. Robustesse, rusticité, flexibilité, plasticité... les nouveaux critères de qualité des animaux et des systèmes d'élevage : définitions systémique et biologique des différents concepts. *INRA Prod. Anim.* 23:5–10. Available from: <http://prodinra.inra.fr/ft?id=9D34BA09-0518-4B4C-962F-F491C3DC37B7>

Shi, W., C. D. Moon, S. C. Leahy, D. Kang, J. Froula, S. Kittelmann, C. Fan, S. Deutsch, D. Gagic, H. Seedorf, W. J. Kelly, R. Atua, C. Sang, P. Soni, D. Li, C. S. Pinares-Pati, J. C. McEwan, P. H. Janssen, F. Chen, A. Visel, Z. Wang, G. T. Attwood, and E. M. Rubin. 2014. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Res.* doi:10.1101/gr.168245.113.

Šmilauer, P., and J. Lepš. 2014. *Multivariate Analysis of Ecological Data using Canoco 5*. Second edi. Cambridge university press.

Van Soest, P. J. 2018. Nutritional ecology of the ruminant. (C. university Press, editor.).

Weimer, P. J., D. M. Stevenson, H. C. Mantovani, and S. L. C. Man. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents. *J. Dairy Sci.* 93:5902–5912. doi:10.3168/jds.2010-3500. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210006417>

Yu, Z., and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques.* 36:808–812.

Discussion générale

Ce travail de thèse avait pour objectif de mieux comprendre les interrelations entre l'animal et son microbiote ruminal. Toutes les facettes de ces interrelations ne pouvant être abordées, deux axes principaux ont été étudiés. Le premier était le suivi de l'évolution de la composition du microbiote suite à une perturbation de l'écosystème ruminal. Les questions étaient les suivantes : est-ce que la composition du microbiote revenait à un état stable et si oui, est-ce que cet état était proche ou éloigné de l'initial ? Si le microbiote se stabilisait sur un nouvel état, dans quel contexte nutritionnel et physiologique ces résultats étaient-ils obtenus ? Le deuxième axe de recherche concernait l'effet de l'animal hôte sur son microbiote ruminal. L'objectif était d'identifier certaines caractéristiques de l'animal hôte qui moduleraient la composition de son microbiote.

1 LA SYNCHRONISATION : UNE METHODE EXPERIMENTALE INEDITE

Pour améliorer nos connaissances sur ces deux axes de recherche, une méthode expérimentale inédite a été mise au point. Il s'agit de la synchronisation ruminale. Des animaux ont été sélectionnés au hasard au sein du troupeau. Leur contenu ruminal a été retiré, mélangé puis la chimère obtenue a été réintroduite dans chacun des rumens. La quantité de chimère réintroduite correspondait à 90 % de la quantité de contenu retiré de l'animal pour éviter de réintroduire seulement le fond des contenants pour le dernier animal. Le fait de sortir l'intégralité du contenu ruminal d'un animal n'est pas traumatisant pour l'animal, sa réaction de peur face à l'opérateur n'est pas augmentée après cette manipulation (Silberberg et al., 2015). A notre connaissance, cette méthode n'a pas été utilisée en dehors des expérimentations présentées dans ce mémoire. La figure 1 reprend schématiquement l'effet de la synchronisation sur des contenus ruminiaux avant et après l'application de cette procédure.

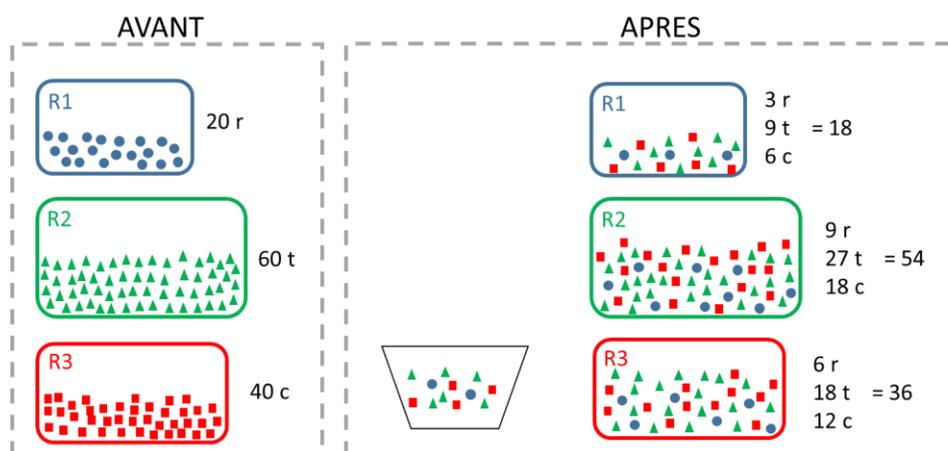


Figure 1 : Schéma synthétique représentant l'évolution des contenus de trois rumens (R1, R2 et R3) avant et après la procédure de synchronisation **avec contribution proportionnelle** (la chimère réintroduite est composée des proportions des contenus ruminiaux en fonction de la quantité retirée des rumens). Les communautés microbiennes initiales sont représentées par un certain nombre de formes associées à une couleur : un rond 'r' bleu, triangle 't' vert et carré 'c' rouge respectivement. Le trapèze contient les éléments de contenu non utilisés pour la réintroduction du mélange. La quantité de chimère réintroduite correspond à 90 % du contenu initialement retiré.

La synchronisation n'est pas la seule technique pour étudier les relations entre l'animal hôte et son microbiote ruminal. Le partage de contenu est une technique consistant à vider le contenu de 4 animaux et de n'en conserver qu'un seul à diviser en 4 pour réensemencer les rumens. Cette technique a été utilisée par l'équipe de de Mulder (2018). Elle a l'avantage de fournir un microbiote de même composition au 4 animaux et d'avoir un témoin négatif (l'animal donneur reçoit un quart de son propre microbiote. Il existe également un autre dispositif, il s'agit de l'échange de contenus ruminiaux entre deux animaux (Weimer et al., 2010; Weimer et al., 2017). Pour cette technique, la première étape consiste à réaliser des paires d'animaux. Un groupe d'animaux est caractérisé pour un ou plusieurs critères d'intérêts. Les paires sont généralement constituées de deux animaux ayant des valeurs très différentes pour le critère de sélection. Une fois les animaux appariés, leur rumen est vidé et chaque animal reçoit le contenu de l'autre. La composition des microbiotes est étudiée avant l'échange et elle est suivie après. L'évolution du critère de sélection initial est également suivie. L'équipe de P. J. Weimer s'est intéressée au critère d'efficacité de la production laitière sur des vaches Holstein (Weimer et al., 2017). Dans le cas de la synchronisation, aucune sélection *a priori* n'est nécessaire par rapport à la méthode d'échange des contenus ruminiaux. Avec la synchronisation, une des différences principales est que les animaux disposent d'un même microbiote à un instant donné et que le microbiote commun contient, pour chaque animal, une proportion de son microbiote initial. Les animaux recevant la chimère exercent alors une pression de sélection sur cette communauté. Ces trois méthodes entraînent une perturbation de l'écosystème ruminal permettant de suivre l'évolution de la composition du microbiote afin d'étudier sa résilience structurelle. La perturbation est toutefois différente pour chaque animal dans les 3 méthodes, mais pour des raisons différentes. Dans la méthode d'échanges, la perturbation dépend de la paire d'animaux choisie. Plus les animaux auront des contenus initiaux différents, en quantité et en qualité, plus la perturbation sera importante. Dans le cas de la méthode de partage la perturbation sera liée à la différence de quantité entre leur contenu initial et la proportion de microbiote réintroduite. Pour les animaux receveurs la perturbation dépendra de la différence de composition entre leur microbiote initial et celui du donneur. Dans le cas de la synchronisation et pour un animal donné, la perturbation dépend de la proportion de sa contribution à la chimère. Un animal ayant participé davantage à la constitution de la chimère retrouvera une proportion de son microbiote plus importante dans cette dernière. La perturbation dépend également de la différence de composition entre le microbiote avant la procédure de synchronisation et la composition de la chimère. Plus les différences seront importantes, plus la perturbation de l'écosystème sera grande. Le tableau 1 synthétise les principaux avantages et inconvénients de chacune des méthodes. Pour éviter l'effet de proportion pour la constitution de la chimère, une méthode de synchronisation avec contribution équivalente est possible. Cette dernière est schématisée sur la figure 2.

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
Echange de contenu	échanger les contenus de 2 animaux ayant des valeurs extrêmes et opposées sur le critère d'intérêt étudié	Etudier la relation entre un paramètre d'intérêt et la composition du microbiote	Nécessite une sélection des animaux a priori ; Procédure applicable seulement sur une paire d'individu
Partage de contenu	Partage d'un contenu ruminal en 4 portions égales pour l'animal donneur et 3 animaux receveurs	Même microbiote fournit aux animaux ; avoir un témoin négatif (l'animal donneur reçoit son propre microbiote)	Quantité de contenu ruminal réduite ; Procédure applicable sur un nombre limité d'animaux
Synchronisation	Vidange, mélange des contenus ruminiaux et réintroduction de cette chimère	Même microbiote fournit aux animaux ; quantité de contenu présent dans le rumen maintenue ; Perturbation des écosystèmes ruminiaux individuels ; pas de sélection a priori des animaux ; fournir l'ensemble des taxons présents dans les rumens à tous les animaux ; Procédure applicable sur un nombre important d'animaux (environ 10)	Chaque animal ne contribue pas de manière équitable à la chimère ; La perturbation de l'écosystème dépend de la différence entre la composition initiale du contenu ruminal et la composition de la chimère

Tableau 1 : Rappel rapide des principes des échanges de contenu, du partage de contenu et de la synchronisation ainsi que des principaux avantages et inconvénients de chacune de ces méthodes.

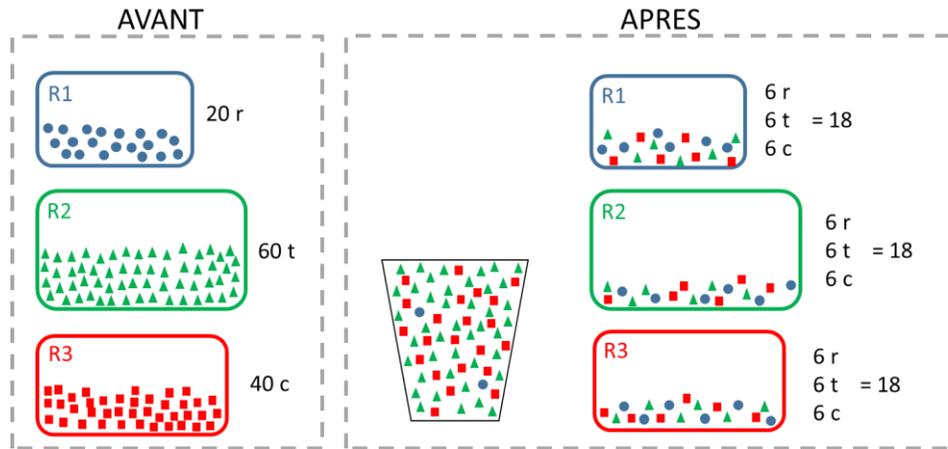


Figure 2 : Schéma synthétique représentant l'évolution des contenus de trois rumens (R1, R2 et R3) avant et après la procédure de synchronisation **avec contribution équivalente** (la chimère réintroduite est composée des mêmes quantités de chacun des contenus). Les communautés microbiennes initiales sont représentées par un certain nombre de formes associées à une couleur rond 'r' bleu, triangle 't' vert et carré 'c' rouge respectivement. Le trapèze contient les éléments de contenu non utilisés pendant la réintroduction du mélange.

Certes, dans cette situation, chaque microbiote contribue quantitativement de manière équivalente à la formation de la chimère, mais un autre biais est alors introduit. Si les animaux ont, comme dans la figure 2, des quantités de contenus ruminiaux très différentes avec un ratio de 1 à 3 par exemple, la quantité à réintroduire dans les rumens sera basée sur le plus petit contenu. Cette importante différence entre les contenus ruminiaux a été observée sur les 6 vaches de l'expérimentation de la partie II. Le plus petit contenu retiré pesait 32,5 kg alors que le plus lourd pesait 92,9 kg. Dans cette situation, on constate que le contenu réintroduit n'est plus égal à 90 % du poids du contenu retiré. Ce pourcentage n'est valable que pour l'animal ayant le plus petit contenu. Dans l'exemple ci-dessus (figure 2), le rumen R2 ayant le plus gros contenu ne reçoit que 30 pourcent de son poids initial. Sachant que nous nous intéressons aux flux de matières dans le rumen, cette différence entre les animaux n'était pas souhaitable. Le choix de la méthode dépend des objectifs de recherche et des animaux étudiés. En effet, si leurs contenus sont similaires en volume, une synchronisation avec contribution équivalente est envisageable.

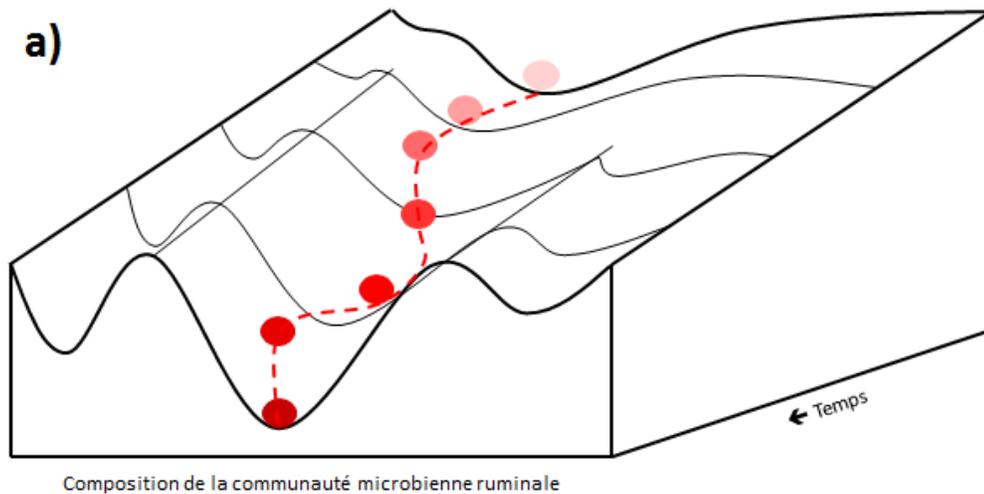
Pour les 3 expérimentations réalisées dans cette thèse, seules les deux premières, avec des chèvres, ont été réalisées strictement selon la même méthodologie. Entre les vaches et les chèvres, nous avons dû faire face à des contraintes logistiques. En effet, pour les chèvres l'ensemble des contenus ont été réunis dans un même récipient maintenu à 39°C dans des conditions anaérobies. Chez les vaches, en raison des quantités de contenus, un récipient a été utilisé par animal. Au moment de la réalisation de la chimère pour les chèvres, l'ensemble du récipient est brassé avant de peser les quantités exactes à réintroduire par chèvre. Pour les vaches, chaque récipient est mélangé un à un et les quantités de chaque contenu sont pesées individuellement avant d'être mélangées et réintroduites dans l'animal. La méthodologie utilisée pour les vaches assure une proportion quantitative précise, mais la réussite de la procédure est également liée à l'homogénéité. Pour chaque vache, ce problème est rencontré 6 fois (au moment du prélèvement de chaque contenu) alors que pour chaque chèvre il est rencontré une seule fois (au moment du prélèvement de la quantité à réintroduire). Pour l'expérimentation réalisée avec les vaches taries, ce sont ces problèmes d'homogénéité qui conduisent à ne pas observer qu'un seul et même point sur la PCoA pour d o. Une composition parfaitement identique n'a pas été obtenue.

2 SUIVI DU MICROBIOTE APRES UNE PERTURBATION

La propriété de résilience du microbiote ruminal, décrite par P. J. Weimer, traduit le fait que la composition du microbiote après une importante perturbation telle que les échanges de contenus ruminiaux n'entraîne qu'un changement de composition temporaire. Selon cet auteur, la restauration de la structure n'est pas parfaite mais est proche de la composition initiale (Weimer, 2015a). Les résultats présentés dans le chapitre 2 de la partie I avec les chèvres en lactation nourries à base d'une ration riche en concentrés conforte cette hypothèse de résilience de la communauté microbienne. En revanche, dans un autre contexte nutritionnel (ration à base de foin riche en fibres) avec des chèvres tarées (chapitre 1 partie I), la résilience de la communauté microbienne n'est pas observée. Les communautés microbiennes des 12 chèvres se stabilisent à une composition différente de la composition avant synchronisation. Cette expérience illustre plutôt la propriété de plasticité du microbiote (Sauvant and Martin, 2010). Un point de vigilance est toutefois à préciser concernant ces deux résultats. Pour ces deux expérimentations, des changements de rations sont survenus en cours d'essai. Pour l'essai avec des chèvres en lactation, le retour à la composition initiale nous laisse supposer que ce changement n'a pas eu une influence importante sur les résultats et qu'ils sont cohérents avec les expérimentations menées par l'équipe de P. J. Weimer. En revanche, pour l'essai avec des chèvres tarées le résultat est un contre-exemple de l'hypothèse de retour à la composition initiale. Le changement alimentaire s'est produit quelques jours avant la synchronisation. L'effet de ce changement et de la synchronisation sont des facteurs de confusions. L'ajout d'une matière première, la luzerne déshydratée brins long qui représente environ 11 % du poids en matière sèche de la ration, n'a pas entraîné de changement majeur dans la composition chimique de l'aliment. La luzerne est une légumineuse contrairement au foin qui est principalement composée de graminées. Les légumineuses sont des fabacées, ce sont des plantes dicotylédones qui peuvent faire une symbiose avec *rysobium* dans les nodosités pour utiliser l'azote de l'air. Les graminées sont des poacées, ce sont des plantes monocotylédones. Elles captent l'azote uniquement dans le sol. Pour utiliser ce nouveau substrat, les microorganismes produisant les enzymes nécessaires pour dégrader sa structure et ceux pouvant en tirer parti sont favorisées, induisant potentiellement des modifications de la composition du microbiote. La caractérisation des fonctions de chaque microorganisme, étudié séparément ou au sein d'une communauté, n'est pas encore établie pour la plupart d'entre eux (Terry et al., 2019). Ce manque de caractérisation ne permet pas de quantifier les changements induits par l'ajout de cette matière première. Nous savons que l'alimentation est un des principaux facteurs de variation des communautés microbiennes ruminales (Loor et al., 2016). L'effet de trois sources de fourrages (tiges de maïs, seigle chinois et foin de luzerne) a été testé sur 15 vaches Holstein (Zhang et al., 2014). Les 3 rations avaient la même teneur en protéines, étaient iso-caloriques et avaient le même ratio fourrage sur concentré (45/55). Des différences de composition des microbiotes ruminiaux ont été observées au niveau des genres. La représentation de ces différences à travers une PCoA montre que les trois nuages de points se superposent largement indiquant qu'il n'y a pas de grandes différences de composition entre ces trois rations. Dans notre situation, les différences de composition sont minimisées par rapport à cette expérimentation car seulement une faible partie de fourrage est modifiée. Nous avons considéré ces changements alimentaires

comme mineurs. Ce point est cependant à garder en mémoire quant à la robustesse de nos résultats.

Du fait de la différence de ration distribuée et du statut tari ou en lactation des chèvres pour les 2 expérimentations, nous ne pouvons pas conclure quant à un effet du stade physiologique ou de la ration. Nous ne pouvons pas identifier la cause de cette divergence d'évolution. Si les différences d'évolution observées après la perturbation étaient liées au statut physiologique, cela signifierait que les animaux ayant des besoins faibles (animaux à l'entretien) pourraient avoir plusieurs points d'équilibre pour leur communauté microbienne afin de satisfaire cette demande modérée. En revanche, pour des animaux ayant un fort niveau de production (animaux en lactation), le nombre de structures de communautés microbiennes serait beaucoup plus restreint. Cette diminution des combinaisons possibles avec l'augmentation des besoins chez les animaux a été mise en évidence du point de vue nutritionnel. Pour satisfaire les besoins d'un animal, chaque nutriment doit être apporté dans une plage de valeur optimale. Cette plage est beaucoup plus restreinte pour des animaux aux besoins de production importants que pour des animaux ne devant satisfaire que leurs besoins d'entretien (Kronfeld, 1976). Les différences d'évolution observées peuvent également être liées aux rations distribuées dans chaque expérimentation. Au cours de l'évolution, les aliments à forte teneur en glucides rapidement fermentescibles et/ou en amidon sont apparus tardivement dans les rations des ruminants. Cela n'aurait pas permis au microbiote d'établir différentes combinaisons de structure de la communauté microbienne pour valoriser ces composés. En revanche, sur des rations riches en fibres, la longue coévolution entre les ruminants et les végétaux permettrait d'avoir différentes structures stables de microbiotes pour valoriser les fibres. Ces concepts sont illustrés à travers la figure 3.



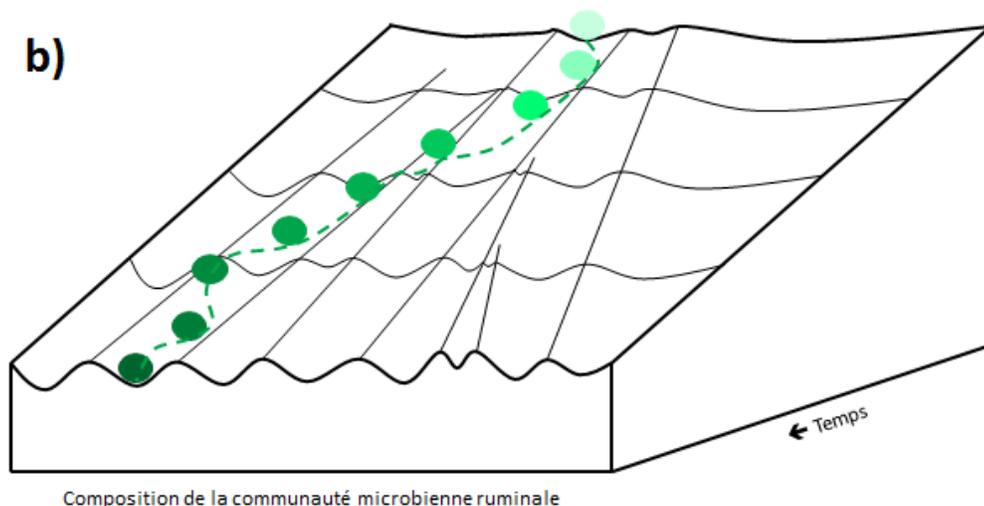


Figure 3 : Schéma conceptuel des résultats obtenus pour l'expérimentation avec des chèvres en lactation nourries avec une ration de production (riche en glucides rapidement fermentescibles) (a) et de ceux obtenus avec des chèvres taries nourries avec une ration d'entretien (à base de foin riche en fibres) (b). Ces schémas de plan incliné représentent les possibilités d'évolution de la composition du microbiote en fonction du temps. Le relief composé de vallées est différent d'une ration à l'autre. Les fonds de vallée indiquent les compositions stables. Sans aucune perturbation la composition resterait stable (trajectoire dans une même vallée). Des perturbations peuvent modifier la composition temporairement si elle est faible et qu'elle n'a pas conduit à un changement de vallée ou durable dans le cas contraire. Plus une vallée est creuse plus la perturbation nécessaire pour changer de vallée doit être importante. Les trajectoires d'évolution d'une communauté microbienne (lignes pointillées) sont schématisées par des billes rouges pour des rations riches en concentrés et/ou des animaux à fort niveau de production et des billes vertes pour des rations riches en fibres et/ou des animaux à faible niveau de production ou à l'entretien. Dans ces deux schémas, la synchronisation se produit au premier quart de la ligne de temps.

La troisième expérimentation de cette thèse a été mise en place pour tester l'hypothèse suivante : les différences de trajectoire observées entre les 2 expérimentations chèvres seraient dues aux différences de ration et non au stade physiologique. Les animaux utilisés n'étaient que des vaches taries et le dispositif expérimental avait pour objectif de tester l'effet du type de ration, soit à base de foin riche en fibres, soit à base d'ensilage de maïs riche en amidon. La synchronisation a été réalisée avec la ration riche en fibres pour maximiser les chances d'obtenir une stabilisation de la composition du microbiote avec une composition différente de celle initialement observée. Les résultats obtenus sont en accord avec notre hypothèse. Avec la ration riche en fibres après perturbation de l'écosystème ruminal, le microbiote évolue vers une composition différente de celle observée avant, alors qu'avec la ration riche en amidon, nous observons une composition proche malgré les 5 mois entre les prélèvements réalisés. La stabilisation de la composition du microbiote a été rapide pour la ration riche en amidon alors que pour la ration riche en fibres, c'est seulement pour les deux derniers prélèvements réalisés 76 et 80 jours après synchronisation que les communautés ne sont plus significativement différentes. La stabilisation n'est peut-être pas complètement effective car l'intervalle entre ces 2 derniers prélèvements n'est que de 4 jours.

Que ce soit en 2013, en 2014 ou en 2019, la trajectoire d'évolution de la composition des microbiotes intra-essai a été commune pour l'ensemble des animaux. Mais malgré tout, des différences entre individus ont été observées. L'étude des raisons de cette variabilité entre les individus relevait de notre second axe de recherche.

3 EFFET DE L'ANIMAL SUR SON MICROBIOTE RUMINAL

De nombreux facteurs ont une influence sur la composition du microbiote comme l'âge, la race ou l'alimentation (Shi et al., 2008; Jami et al., 2013; Douglas et al., 2016; Loor et al., 2016). Pour des animaux du même âge, nourris avec la même ration et dans un même environnement, de nombreux auteurs retrouvent des différences de microbiote entre les animaux (Weimer et al., 1999; Jami and Mizrahi, 2012a; Jami and Mizrahi, 2012b; Guo et al., 2015). Ils parlent dans ce cas de spécificité du microbiote lié à l'animal hôte. Des relations entre la génétique de l'animal et la composition du microbiote ruminal ont déjà été mises en évidence (Gonzalez-Recio et al., 2017). A ce jour, nous ne savons pas quelles caractéristiques de l'animal sont impliquées dans cette spécificité. Une étude descriptive de grande ampleur aurait permis d'étudier les corrélations entre les compositions des communautés microbiennes et différentes caractéristiques mesurées chez les animaux. Toutefois, il aurait été impossible de savoir s'il s'agit de l'effet du microbiote sur l'animal hôte ou alors de l'effet de l'animal hôte sur le microbiote. Il est très compliqué d'obtenir des animaux qui n'ont pas été influencés par leur microbiote ruminal, dits des animaux axéniques, et de suivre les modifications induites par l'introduction d'un microbiote connu. En revanche, introduire un microbiote identique dans les rumens des animaux de l'expérimentation est possible grâce à la procédure de synchronisation des contenus ruminiaux que nous avons utilisé. Grâce à cette procédure, il devient possible d'étudier l'effet de l'animal hôte sur son microbiote.

Le microbiote ruminal est une biocénose constituée d'un ensemble d'espèces interagissant entre elles dans un équilibre dynamique en lien avec le milieu, les flux de matières et l'absorption ruminale. Au moment de la synchronisation, le mélange des contenus ruminiaux conduit à la formation d'une chimère. La communauté microbienne de cette dernière n'est pas dans une situation d'équilibre. Les relations biologiques entre les micro-organismes telles que la prédation, la compétition, le parasitisme, l'amensalisme, ... ne sont pas stabilisées. En écologie, il existe le principe d'exclusion par compétition dans un milieu stable et homogène (Hardin, 1960). C'est-à-dire que deux espèces ayant exactement la même niche écologique ne peuvent pas coexister. Dans ce cas, l'espèce la plus efficace concernant l'utilisation de la ou des ressources s'impose. Ce principe a été discuté à propos des méthanogènes (Muñoz-Tamayo et al., 2019). La chimère créée par synchronisation devrait alors évoluer selon des principes déterministes, c'est-à-dire que l'évolution n'aboutit pas en un résultat aléatoire mais à un même résultat. Dans le cas du contenu ruminal, le milieu n'est pas homogène, il est conditionné par l'aliment et par l'animal. Dans le contexte précis où les animaux reçoivent le même aliment de manière rationnée et le consomment selon une même cinétique et sans tri, alors les entrées dans le rumen seraient les mêmes en terme de quantité et de qualité. Dans cette situation, le seul facteur de variation qui entrerait en compte dans la spécificité du microbiote est l'animal hôte.

La mesure des caractéristiques de l'animal est une étape essentielle pour mettre ces dernières en relation avec l'évolution de la composition suite à la synchronisation. Pour les trois essais présentés dans ce mémoire, deux catégories de variables ont été prises en compte en tant que « caractéristiques de l'animal ». Des caractéristiques générales comme le poids, chez la vache, ou encore la production laitière, chez la chèvre en lactation. La deuxième catégorie

concerne la caractérisation des flux de matières dans le rumen. Pour une ration donnée, cette catégorie comprend la caractérisation du comportement alimentaire pour les entrées, la mesure des taux de passage des phases solides et liquides pour les sorties et la quantité de contenu ruminal, chez la vache. S'il n'existe pas de variabilité pour certains paramètres mesurés chez les animaux de l'expérimentation, ils ne peuvent expliquer la variabilité de la composition du microbiote ruminal. La puissance statistique est limitée pour un échantillon de petite taille et les résultats obtenus sont difficilement généralisables à l'ensemble de la population. En plus de certaines caractéristiques générales comme la race et la persistance laitière, dans les 3 expérimentations, les flux de matière dans le rumen semblent moduler la communauté microbienne. Ces résultats sont cohérents avec le fait qu'une bactérie ayant un temps de génération long ne pourra plus être retrouvée lorsque les taux de renouvellement des phases liquides et solides augmentent (Van Soest, 2018) car elle n'a pas le temps de se multiplier. La mise en évidence de la corrélation entre la famille *Bacteroidales PeH15* et le taux de renouvellement de la phase solide dans l'expérimentation présentée dans le chapitre 1 de la partie I (chèvres taries nourries avec une ration à base de foin riche en fibres) suggère le fait que certains taxons pourraient être influencés par le TPPS (figure 4).

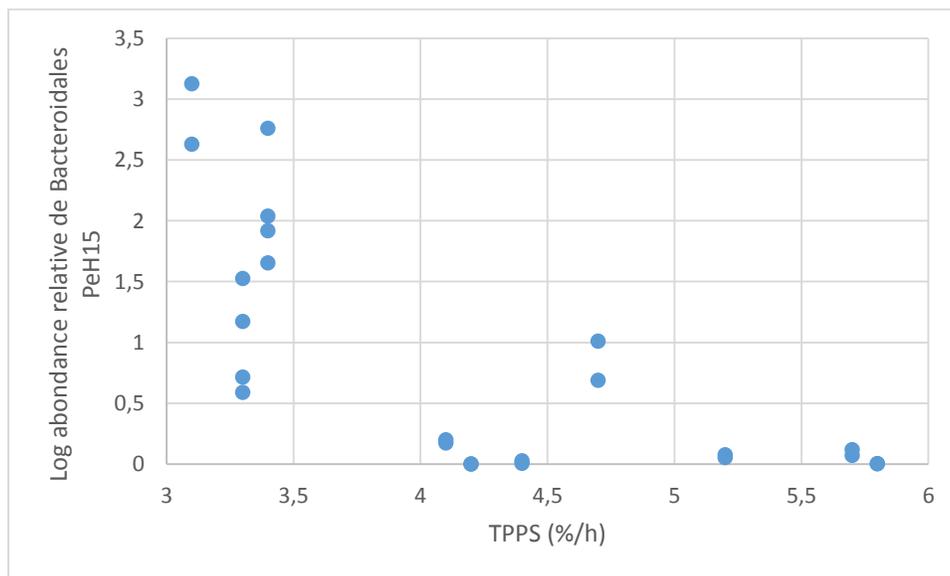
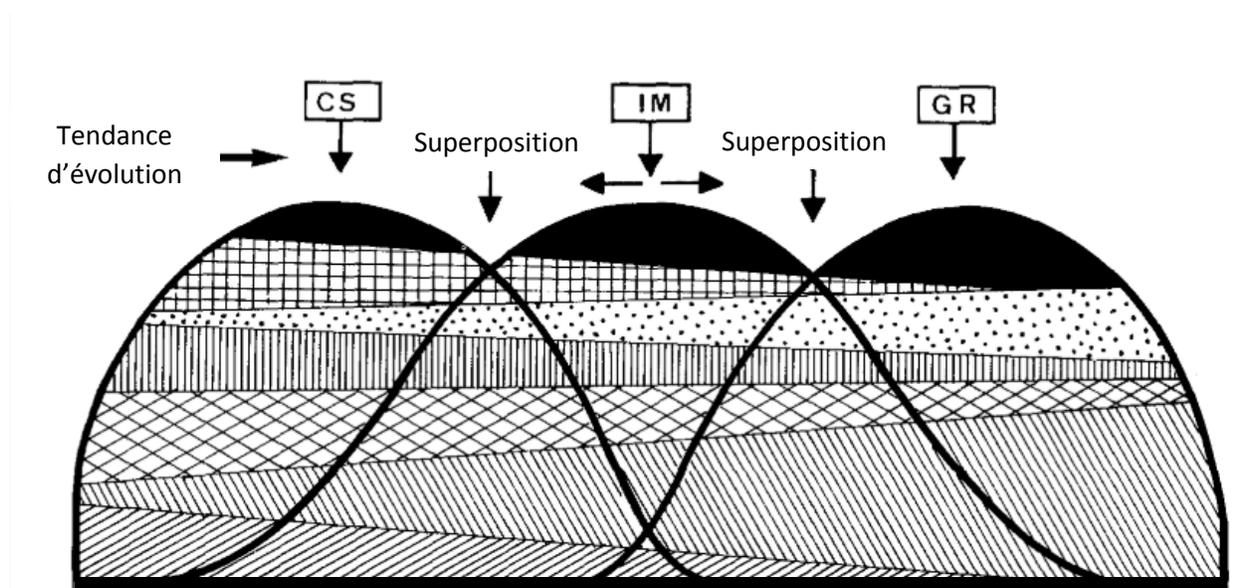


Figure 4 : Représentation du logarithme de l'abondance relative en fonction du taux de renouvellement de la phase solide (TPPS) sur deux journées de prélèvement d 114 et d 141 pour l'essai présenté dans le chapitre 1 de la première partie de cette thèse.

Dans cette figure, nous constatons que plus TPPS augmente, moins la proportion maximale de *Bacteroidales PeH15* est élevée. En revanche, un TPPS faible n'exclut pas une présence faible de ce taxon. Des taux de passage faibles auraient beaucoup moins d'influence sur ces taxons au temps de génération long. C'est peut-être pour cette raison que l'effet du TPPS sur la composition du microbiote n'a pas été mis en évidence après synchronisation dans l'expérimentation avec les vaches.

Nous avons étudié le lien entre l'animal hôte et son microbiote ruminal avec deux modèles animaux différents : la chèvre et la vache. Ces deux ruminants possèdent des différences qu'il faut rappeler afin de comparer les résultats obtenus avec les deux espèces. Il est possible de classer les ruminants dans trois catégories : ceux qui ont une importante sélectivité pour les plantes riche en contenu cellulaire et ayant une faible teneur en parois (CS) ; ceux qui

consomment des fourrages grossiers et de l'herbe (GR) et enfin les ruminants intermédiaires à ces 2 groupes (IM). R. Hofmann (1989) a réalisé un schéma récapitulatif de ces différences. La figure 5 présentée ci-dessous est une adaptation de ce schéma.



CS : Ruminants ayant une sélectivité importante pour des plantes riches en contenu cellulaire (ex : girafe, chevreuil, élan, ...)

GR : Ruminants consommant des fourrages grossiers et de l'herbe (ex : vache, mouton, bison, ...)

IM : Ruminants intermédiaires aux CS et GR et opportunistes (ex : chèvre, chamois, cerf sika, ...)

Sélectivité pour le contenu cellulaire des plantes

Digestion des fibres dans le rumen

Production d'HCl dans l'abomasum ; Production de salive en fonction du poids vif ; Digestion des fibres après le rumen

Amylolyse ruminal ; Possibilité pour les sucres solubles de traverser le rumen

Efficacité des structures et mécanismes pour ralentir la progression d'aliment

Elargissement de la surface papillaire sur la paroi ruminale dorsale

Volume et poids du rumen relatif au poids de l'animal

Figure 5 : Types d'alimentation morpho-physiologique des ruminants : représentation schématique de la spécialisation des ruminants, avec leurs adaptations aux plantes qu'ils consomment, au cours de l'évolution. Bien que la conception structurelle et fonctionnelle de base soit conservée, la capacité croissante de digérer les glucides pariétaux provoque certaines régressions mais aussi le développement d'autres composants du système digestif et des modifications de stratégie d'alimentation. Des critères morpho-physiologiques se chevauchent et conservent une large plage d'adaptation permettant à ces animaux de s'adapter dans des environnements différents. Les limites de séparation se trouvent aux extrémités. Les intermédiaires peuvent changer de stratégie en fonction des saisons (Hofmann, 1989).

Les vaches font partie de la catégorie GR alors que les chèvres font partie de la catégorie IM. Entre deux individus représentatifs de la moyenne de chacune de ces catégories, un animal GR par rapport à un animal IM a une moins grande sélectivité pour le contenu cellulaire des plantes, une plus grande capacité à digérer les fibres dans le rumen, un volume de rumen plus important et un transit alimentaire plus lent. La méthodologie de mesure des taux de passage de la phase solide n'a pas été la même entre les expérimentations avec les chèvres et celle réalisée avec les vaches. Le marqueur utilisé pour suivre le TPPS a été un foin mordancé au chrome dans les expériences avec les chèvres tandis que le marqueur a été la concentration en cendres insolubles dans l'acide chlorhydrique après insertion d'une quantité définie de balle de riz riche en cette fraction dans les expériences avec les vaches. Le taux de passage de phase solide moyen mesuré pour les chèvres nourries avec la ration riche en fibres, celles nourries avec la ration riche en glucides rapidement fermentescibles, les vaches nourries avec la ration riche en fibres et les vaches nourries avec la ration riche en amidon sont $4,2 \pm 1,0$, $7,8 \pm 1,6$, $1,3 \pm 0,3$ et $1,6 \pm 0,3$ %/h respectivement. Nous observons des différences pour les taux de passage de la phase solide entre ces deux espèces de ruminant même s'il est essentiel de noter que la méthode de mesure est différente entre espèces. De plus, la granulométrie des particules suivies influence ces résultats (Campling and Freer, 1962). En effet, les particules de grande taille restent plus longtemps dans le rumen que les particules de petite taille. Pour les chèvres, les particules mesuraient entre 0,212 et 1mm alors que pour les vaches, 86 % du poids de la balle de riz à une granulométrie supérieure à 1mm. La différence observée entre les chèvres et les vaches est donc accentuée par la différence de méthodologie de mesure. Toutefois, il faut noter (figure 5) que les deux catégories IM et GR se superposent et qu'il serait possible de trouver des vaches et des chèvres qui auraient des caractéristiques similaires. En raison des potentielles différences de taux de passage, le microbiote observé entre les deux espèces ne comportera pas les mêmes taxons, mais les principes écologiques testés dans cette thèse sont valables pour les deux espèces.

Le deuxième axe d'étude de ce travail ayant pour objectif d'identifier certaines caractéristiques de l'animal hôte modulant la composition du microbiote, il permet de mettre en évidence que les flux de matière dans le rumen semblent expliquer une partie des différences entre individus. Une grande partie de la variabilité entre individus reste toutefois inexpliquée par les paramètres que nous avons mesurés. Les trajectoires d'évolution des microbiotes après la perturbation des écosystèmes ruminiaux sont communes pour les animaux au sein de chacune des expérimentations. Ces résultats indiquent que les microbiotes ont leur propre évolution indépendamment de leur hôte.

4 LE LIEN STRUCTURE FONCTION

Ce travail de thèse n'a pas exploré le lien entre la structure du microbiote et ses fonctions. Ce n'est pas parce qu'une bactérie à une fonction qu'elle l'exprime dans l'échantillon analysé (Bickhart and Weimer, 2017). Dans le chapitre 1 de la partie II, nous avons étudié les relations entre les paramètres fermentaires mesurés *in vivo* et *in vitro* ainsi que la composition des microbiotes. Ces paramètres sont la résultante des fermentations ruminales et de l'animal hôte pour les paramètres mesurés *in vivo* mais les différences observées *in vitro* sont uniquement liées aux microbiotes. Seul le ratio de la concentration ruminale en acide acétique sur la

concentration en acide propionique est identifié de manière récurrente comme un facteur expliquant une part de la variabilité individuelle, et ce avec les deux rations. En revanche, les paramètres fermentaires sont modifiés d'une ration à l'autre parallèlement au microbiote. L'importance des différences entre les communautés avant et après la perturbation de l'écosystème ruminal pour chaque ration est observée au niveau des paramètres fermentaires. En effet, il y a davantage de différences avec la ration riche en fibres qu'avec la ration riche en amidon. Les communautés microbiennes et les paramètres fermentaires ont covarié. Un parallèle peut être fait entre la structure et des indicateurs de la fonction.

A partir de la figure 3 et des résultats obtenus pour l'expérimentation réalisée avec les vaches, nous avons illustré le fait que le nombre de combinaison de structures stables et différentes est moins important avec des rations riches en amidons ou en glucides rapidement fermentescibles qu'avec une ration riche en fibres. Par ailleurs, nous savons qu'il existe des redondances fonctionnelles au sein du microbiote (Kim et al., 2011; Weimer, 2015b) conduisant à des situations où il serait possible de mesurer les mêmes valeurs de paramètres fermentaires pour des microbiotes aux structures différentes.

5 POUR ALLER PLUS LOIN

L'objectif général de cette thèse était d'améliorer nos connaissances à propos de l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote ruminal en étudiant en particulier la résilience structurelle des microbiotes et la spécificité du microbiote lié à l'animal hôte à travers les flux de matière dans le rumen. Cette interrelation hôte microbiote est en étroite relation avec l'alimentation distribuée aux animaux (figure 6). En effet, la résilience du microbiote semble être dépendante de ce facteur au travers de ce travail de thèse. Le microbiote ruminal reviendrait à une composition proche de sa composition initiale sur des rations de type « production » (riche en concentrés (amidon, glucides rapidement fermentescibles)) alors qu'il pourrait évoluer vers une composition différente pour des rations d'entretien (riches en fibres). L'effet de l'alimentation pourrait être étudié de manière plus détaillée d'un point de vue qualitatif avec différentes compositions chimiques des aliments ainsi qu'en faisant varier les niveaux d'ingestion. Ces variations quantitatives et qualitatives permettraient d'explorer de nouveaux profils (figure 3) et de confirmer les résultats que nous avons obtenus. Des niveaux de perturbation différents pourraient être testés afin de mieux comprendre comment stabiliser le microbiote à un nouvel état d'équilibre. Si une nouvelle expérience incluant une procédure de synchronisation avec une ration riche en fibres devait être menée, alors il faudrait augmenter le temps de suivi du microbiote après synchronisation pour s'assurer d'observer une stabilisation de la composition du microbiote. En effet, dans l'expérimentation menée avec les vaches, nous n'avons pas la certitude que le microbiote était stabilisé 80 jours après la synchronisation.

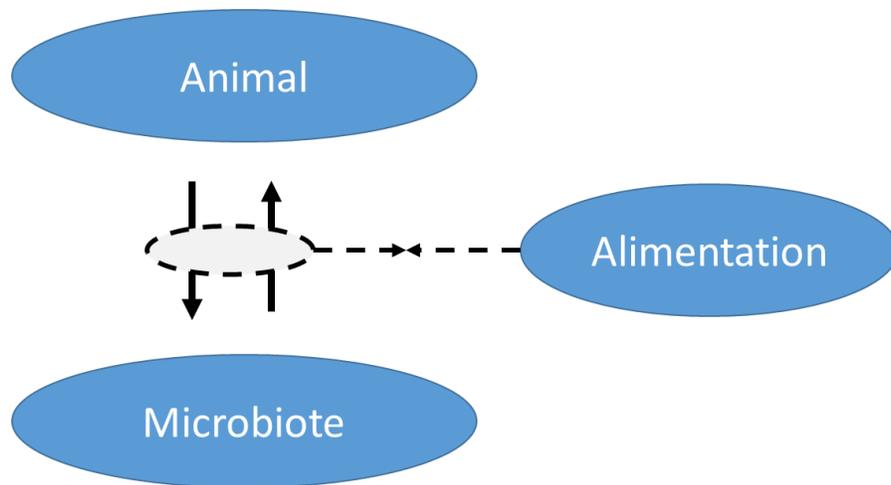


Figure 6 : Schéma des interrelations entre l'animal hôte et son microbiote modulées par l'alimentation distribuée aux animaux.

En ce qui concerne l'étude de la spécificité liée à l'hôte, nous avons étudié l'effet de l'animal hôte sur la composition de son microbiote après la synchronisation des contenus ruminiaux. Les caractéristiques des animaux hôtes mesurées décrivaient l'animal et ses performances ainsi que les flux de matière dans le rumen. Ces derniers expliquent une partie de cette spécificité mais la majorité de la variabilité entre les individus reste inexpliquée. D'autres caractéristiques auraient pu être testées comme l'ingestion de liquide avec la consommation d'eau en termes de quantité ingérée et de cinétiques. La variabilité entre les animaux pour ces critères est très importante (Cardot et al., 2008). Des paramètres comme la rumination (temps par jour et fréquence par minute) par son action mécanique d'ouverture de nouveaux fronts de colonisation pour le microbiote ainsi que les sécrétions salivaires par leur action tampon seraient deux variables à prendre également en compte pour une expérience future (Beauchemin, 2018). Pour caractériser le brassage du contenu au sein du rumen, des paramètres de motilité tels que la fréquence des contractions ruminales pourraient être mesurés (McSweeney et al., 1989).

En nous éloignant des caractéristiques autour du rumen, nous pourrions caractériser les animaux par rapport à leurs réactions face à des perturbations. En effet avec le changement climatique les animaux sont amenés à rencontrer de manière plus fréquente des canicules par exemple. La manière dont les animaux réagissent à ces perturbations n'est peut-être pas uniquement liée à l'hôte mais est peut-être aussi liée à son microbiote ruminal. L'étude des perturbations sur les performances des animaux en parallèle de l'évolution de la composition du microbiote permettrait de mieux comprendre les évolutions observées et d'en déterminer les origines potentielles (animal, microbiote ruminal ou un mélange des deux facteurs). En suivant l'évolution d'un paramètre mesuré fréquemment (comme la production laitière), il est possible de caractériser des perturbations subies par un animal et la réaction qu'il a mise en œuvre face à cette perturbation (quantité de lait perdue, temps nécessaire pour retrouver le niveau de production, etc.). J'ai contribué à la création d'un outil de détection et de caractérisation des perturbations à partir des données quotidiennes de production laitière (annexe 8 : Abdlekrim et al., 2019) et j'ai présenté cet outil au congrès international de l'EAAP en 2018 (Gomes et al., 2018). La figure 7 représente une sortie graphique du modèle avec la courbe laitière théorique sans perturbation et la courbe laitière perturbée. Il est alors possible d'étudier les relations entre les paramètres décrivant une perturbation induite à un même moment au cours d'une expérimentation avec l'évolution des microbiotes ruminiaux des animaux.

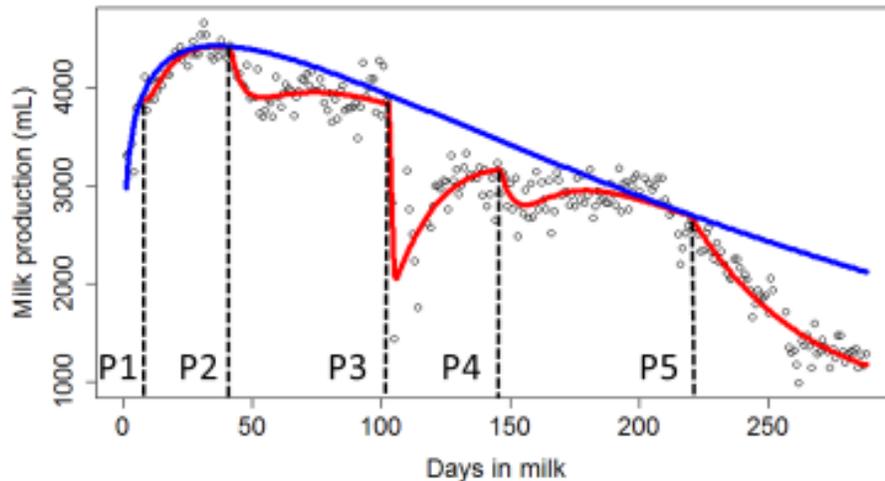


Figure 7 : Graphique illustrant le résultat obtenu après utilisation du modèle de lactation perturbée (PLM) sur les données de lactation de la chèvre G096 durant l'expérimentation de 2014. La courbe bleue représente la courbe de lactation théorique sans perturbation. La courbe rouge reprend la courbe de lactation perturbée. Le début de chacune des perturbations est représenté par une droite verticale en pointillée appelée P suivie du numéro de la perturbation (Gomes et al., 2018).

Ajouter des nouveaux critères caractérisant les animaux n'est pas le seul axe de recherche à poursuivre pour approfondir la compréhension de l'interrelation entre le microbiote ruminal et l'animal hôte. Il faudrait également étudier l'effet du microbiote ruminal sur l'animal hôte. L'utilisation d'animaux axéniques est clairement identifiée comme étant un outil permettant de connaître l'influence du microbiote sur l'animal hôte (Mooser et al., 2018). Cependant la production de ruminants axéniques reste techniquement compliquée, coûteuse et le nombre d'animaux dans les études reste limité (Riou et al., 1977). D'autres modèles animaux seront peut-être à privilégier pour étudier cet axe de la relation entre le microbiote et l'animal hôte tel que le modèle souris et le modèle rat.

Pour améliorer nos connaissances des liens entre la structure du microbiote et ses fonction, en plus des paramètres fermentaires, des fermentescibilités ruminales mesurées *in sacco* ont été mesurées à partir de 5 matières premières (maïs ensilage, tourteau de soja, maïs grain, foin et luzerne) durant l'essai avec les vaches tarées pour les deux rations avant et après la synchronisation. Ces données apporteront un complément d'information concernant l'efficacité digestive des différents microbiotes en fonction de la ration distribuée. Nous pourrions également étudier l'effet de la synchronisation sur ces mesures. Pour aller plus loin dans l'étude des fonctions du microbiote, les techniques d'analyse transcriptomique et protéomique seraient complémentaires aux mesures déjà réalisées, pour une future expérimentation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdlekrim, A. B., L. Puillet, P. Gomes, and O. Martin. 2019. Lactation curve model with explicit representation of perturbations as a phenotyping tool for dairy livestock precision farming. *bioRxiv*. doi:<https://doi.org/10.1101/661249>.
- Beauchemin, K. A. 2018. Invited review : Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows 1. *J. Dairy Sci.* 101:4762–4784. doi:10.3168/jds.2017-13706. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13706>
- Bickhart, D. M., and P. J. Weimer. 2017. Host–rumen microbe interactions may be leveraged to improve the productivity of dairy cows 1. *J. Dairy Sci.* 101:1–10. doi:10.3168/jds.2017-13328. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021730958X>
- Campling, R. C., and M. Freer. 1962. The effect of specific gravity and size on the mean time of retention of inert particles in the alimentary tract of the cow. *Br. J. Nutr.* 16:507–518. doi:10.1079/bjn19620049.
- Cardot, V., Y. Le Roux, and S. Jurjanz. 2008. Drinking behavior of lactating dairy cows and prediction of their water intake. *J. Dairy Sci.* 91:2257–2264. doi:10.3168/jds.2007-0204. Available from: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2007-0204>
- Douglas, J. L., H. J. Worgan, G. L. Easton, L. Poret, B. T. Wolf, A. Edwards, E. Davies, D. Ross, and N. R. Mcewan. 2016. Microbial diversity in the digestive tract of two different breeds of sheep. *J. Appl. Microbiol.* 120:1382–1389. doi:10.1111/jam.13060.
- Gomes, P., A. Ben Abdelkrim, L. Puillet, V. Berthelot, and O. Martin. 2018. Modelling lactation curve with explicit representation of perturbations. In: *Book of Abstracts of the 69th Annual Meeting of the European Federation of animal Science*. Vol. 24. p. 529.
- Gonzalez-Recio, O., I. Zubiria, A. García-Rodríguez, A. Hurtado, and R. Atxaerandio. 2017. Short communication: Signs of host genetic regulation in the microbiome composition in 2 dairy breeds: Holstein and Brown Swiss. *J. Dairy Sci.* 101:2285–2292. doi:10.3168/jds.2017-13179. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217311694>
- Guo, W., Y. Li, L. Wang, J. Wang, Q. Xu, T. Yan, and B. Xue. 2015. Evaluation of composition and individual variability of rumen microbiota in yaks by 16S rRNA high-throughput sequencing technology. *Anaerobe.* 34:74–79. doi:10.1016/j.anaerobe.2015.04.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.010>
- Hardin, G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science (80-)*. 131:1292–1297.
- Hofmann, R. R. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants. *Oecologia.* 78:443–457.
- Jami, E., A. Israel, A. Kotser, and I. Mizrahi. 2013. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2013.2.
- Jami, E., and I. Mizrahi. 2012a. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0033306.
- Jami, E., and I. Mizrahi. 2012b. Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows. *Anaerobe.* 18:338–343. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.04.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.003>

- Kim, M., M. Morrison, and Z. Yu. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:49–63. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01029.x.
- Kronfeld, D. S. 1976. The potential importance of the proportions of glucogenic, lipogenic and aminogenic nutrients in regard to the health and productivity of dairy cows.
- Loor, J. J., A. A. Elolimy, and J. C. McCann. 2016. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. *Anim. Front.* doi:10.2527/af.2016-0030.
- McSweeney, C. S., P. M. Kennedy, and A. John. 1989. Reticulo-ruminal motility in cattle (*bos indicus*) and water buffaloes (*bubalus bubalis*) fed a low quality roughage diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 94A:635–638.
- Mooser, C., M. Gomez de Agüero, and S. C. Ganal-Vonarburg. 2018. Standardization in host–microbiota interaction studies: challenges, gnotobiology as a tool, and perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 44:50–60. doi:10.1016/j.mib.2018.07.007.
- De Mulder, T., L. Vandaele, N. Peiren, A. Haegeman, T. Ruttink, S. De Campeneere, T. Van De Wiele, and K. Goossens. 2018. Cow responses and evolution of the rumen bacterial and methanogen community following a complete rumen content transfer. *J. Agric. Sci.* 156:1047–1058. doi: 10.1017/S0021859618001053.
- Muñoz-Tamayo, R., M. Popova, M. Tillier, D. P. Morgavi, J. P. Morel, G. Fonty, and N. Morel-Desrosiers. 2019. Hydrogenotrophic methanogens of the mammalian gut: Functionally similar, thermodynamically different-A modelling approach. *PLoS One.* 14:1–20. doi:10.1371/journal.pone.0226243.
- Riou, Y., P. Gouet, H. C. Dubourguier, M. Contrepois, C. Dardillat, and J. Lefaiivre. 1977. Techniques for obtaining, fistulization and rearing of axenic or gnotoxenic lambs, kids and calves. *Ann. Rech. Vet.* 8:13–24.
- Sauvant, D., and O. Martin. 2010. Robustesse, rusticité, flexibilité, plasticité... les nouveaux critères de qualité des animaux et des systèmes d'élevage : définitions systémique et biologique des différents concepts. *INRA Prod. Anim.* 23:5–10. Available from: <http://prodinra.inra.fr/ft?id=9D34BA09-0518-4B4C-962F-F491C3DC37B7>
- Shi, P. J., K. Meng, Z. G. Zhou, Y. R. Wang, Q. Y. Diao, and B. Yao. 2008. The host species affects the microbial community in the goat rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 46:132–135. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02274.x.
- Silberberg, M., A. Boissy, M. Rira, E. Delval, H. Chandèze, and M. Doreau. 2015. Impact of rumen emptying on rumen fermentation and animal welfare in cannulated sheep. *Anim. Prod. Sci.* 213–218.
- Van Soest, P. J. 2018. *Nutritional ecology of the ruminant.* (C. university Press, editor.).
- Terry, S. A., A. Badhan, Y. Wang, A. V. Chaves, and T. A. McAllister. 2019. Fibre digestion by rumen microbiota — a review of recent metagenomic and metatranscriptomic studies. *Can. J. Anim. Sci.* 99:678–692. doi:10.1139/cjas-2019-0024.
- Weimer, P. J. 2015a. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* 6:1–16. doi:10.3389/fmicb.2015.00296.
- Weimer, P. J. 2015b. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* doi:10.3389/fmicb.2015.00296.

Weimer, P. J., M. S. Cox, T. Vieira de Paula, M. Lin, M. B. Hall, and G. Suen. 2017. Transient changes in milk production efficiency and bacterial community composition resulting from near-total exchange of ruminal contents between high- and low-efficiency Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 100:7165–7182. doi:10.3168/jds.2017-12746. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217306392>

Weimer, P. J., D. M. Stevenson, H. C. Mantovani, and S. L. C. Man. 2010. Host specificity of the ruminal bacterial community in the dairy cow following near-total exchange of ruminal contents¹. *J. Dairy Sci.* 93:5902–5912. doi:10.3168/jds.2010-3500. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210006417>

Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, and D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122–134. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75216-1. Available from: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75216-1](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75216-1)

Zhang, R., W. Zhu, W. Zhu, J. Liu, and S. Mao. 2014. Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. *J. Sci. Food Agric.* 94:1886–1895. doi:10.1002/jsfa.6508.

Conclusion générale

L'objectif général de ce travail était de mieux comprendre l'interrelation entre l'animal et son microbiote ruminal. Deux axes de recherche ont été développés autour de la potentielle résilience structurelle suite à une perturbation de l'écosystème ruminal et de la spécificité du microbiote liée à son hôte. Pour le premier axe de recherche, nous voulions savoir vers quelle composition la communauté microbienne se stabilise après une perturbation de l'écosystème ruminal et si des facteurs alimentaires peuvent influencer le résultat obtenu. Pour le second axe, l'objectif était d'identifier des éventuelles caractéristiques de l'animal hôte ayant une influence sur la composition du microbiote ruminal. Une procédure expérimentale innovante de synchronisation a été mise en place pour créer une perturbation de l'écosystème ruminal et ainsi fournir un microbiote de même composition à l'ensemble des animaux d'une même expérimentation. Trois expérimentations utilisant cette technique ont été réalisées pour répondre à nos deux questions. La première, en 2013, a été réalisée avec des chèvres taries nourries avec une ration à base de foin riche en fibres. La seconde, en 2014, a été réalisée avec des chèvres en lactation nourries avec une alimentation riche en glucides rapidement fermentescibles. Enfin, la dernière, en 2019, a été réalisée avec des vaches taries nourries successivement avec une ration à base de foin riche en fibres et une ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon.

1 – Après une perturbation de l'écosystème ruminal, vers quelle composition la communauté microbienne se stabilise-t-elle ? Existe-t-il des facteurs alimentaires influençant l'état final obtenu ?

Les résultats de cette étude semblent montrer que l'évolution des communautés microbiennes, après une perturbation de l'écosystème ruminal, est dépendante de la ration distribuée aux animaux. En effet, avec une ration riche en fibres, que ce soit avec les chèvres taries ou avec vaches taries, nous avons observé une évolution des microbiotes vers une composition différente de celle observée avant la synchronisation. Ces résultats indiquent, dans ces conditions, que le microbiote ne retourne pas à sa composition initiale, illustrant une propriété plastique. En revanche, avec des rations riches en glucides rapidement fermentescibles ou riches en amidon, testées avec des chèvres en lactation et avec des vaches taries respectivement, la composition des microbiotes avant et après perturbation de l'écosystème ruminal est très proche. Ces résultats illustrent une capacité de résilience des microbiotes dans ce contexte nutritionnel. La longue coévolution des ruminants avec les végétaux a probablement permis d'établir différents microbiotes aux structures stables capables de valoriser les fibres alors qu'avec les rations liées à la domestication et l'élevage (récemment rencontrées au cours de l'évolution), riches en contenu cellulaires, le nombre de structures stables pourrait être beaucoup plus limité.

2 – Quelles sont les éventuelles caractéristiques de l'animal hôte ayant une influence sur la composition du microbiote ruminal ?

Avant synchronisation, nous ne pouvons pas parler d'influence des caractéristiques de l'hôte mais seulement de corrélation. La procédure de synchronisation fournit un microbiote de composition semblable aux animaux d'une même expérimentation et crée une rupture du lien entre le microbiote et son hôte, permettant d'identifier les éventuelles caractéristiques de l'animal hôte qui expliquent, en partie, les divergences d'évolution des microbiotes. Avec les deux espèces (chèvre et vache) et les différentes rations, les flux des phases solide et liquide traversant le rumen ont été mis en évidence comme facteur influençant la composition du microbiote (tableau 1).

Caractéristiques de l'animal hôte corrélées à la composition du microbiote		
Expérimentation	Avant synchronisation	Après synchronisation
Chèvres taries nourries avec une ration à base de foin riche en fibres	<i>Taux de passage de phase liquide ; taux de passage de la phase solide ; matière sèche ingérée ; vitesse d'ingestion ; variabilité de la vitesse d'ingestion</i>	<i>Taux de passage de phase liquide ; taux de passage de la phase solide ; matière sèche ingérée ; vitesse d'ingestion ; variabilité de la vitesse d'ingestion</i>
Chèvres en lactation nourries avec une ration à base d'ensilage de maïs riche en glucides rapidement fermentescibles	Taux de passage de la phase solide ; taux de passage de la phase liquide ; vitesse d'ingestion ; variabilité de la vitesse d'ingestion ; temps moyen des pauses de consommation jusqu'à 80 % de l'ingestion journalière ; race ; matière sèche ingérée ; poids vif ; la persistance de production laitière ; La matière sèche ingérée (% du poids vif)	Taux de passage de la phase solide ; taux de passage de la phase liquide ; vitesse d'ingestion ; variabilité de la vitesse d'ingestion ; temps moyen des pauses de consommation jusqu'à 80 % de l'ingestion journalière ; race ; matière sèche ingérée ; poids vif ; persistance de production laitière ; La matière sèche ingérée (% du poids vif)
Vaches taries nourries avec une ration à base de foin riche en fibres	<i>Poids vif ; quantité de contenu ruminal ; taux de passage de la phase solide ; taux de passage de la phase liquide</i>	<i>Poids vif ; quantité de contenu ruminal ; taux de passage de la phase solide ; taux de passage de la phase liquide</i>
Vaches taries nourries avec une ration à base d'ensilage de maïs riche en amidon	Poids vif ; quantité de contenu ruminal ; taux de passage de la phase solide ; taux de passage de la phase liquide	<i>Poids vif ; quantité de contenu ruminal ; taux de passage de la phase solide ; taux de passage de la phase liquide</i>

Tableau 1 : Récapitulatif des caractéristiques de l'animal hôte n'étant pas corrélées avec la composition du microbiote (italique) et étant corrélées avec la composition du microbiote (gras). Les paramètres écrits en bleu et en gras sont ceux liés aux flux des phases solide et liquide traversant le rumen.

Les relations entre les taux de passage et la composition du microbiote viendraient du fait qu'avec des taux de renouvellement élevés, les taxons ayant des temps de génération longs ne pourraient plus se multiplier assez vite pour maintenir leurs populations. Malgré l'identification de paramètres expliquant une partie de la spécificité liée à l'hôte, une part importante de la variabilité n'est pas expliquée par les paramètres que nous avons mesurés. D'autres paramètres, non mesurés dans ces études, tels que les quantités et cinétiques d'ingestion de l'eau, la rumination, la salivation et les contractions ruminales seraient intéressants à intégrer dans le cadre d'une nouvelle expérimentation utilisant la procédure de synchronisation.

Ainsi, avec le dispositif expérimental unique (procédure de synchronisation) utilisé dans cette thèse, nous avons mis en évidence une interaction entre deux facteurs qui influencent l'écosystème microbien ruminal : l'animal hôte et le substrat alimentaire. Nous avons aussi identifié des caractères de l'animal hôte qui expliqueraient une part de la variabilité individuelle concernant la composition du microbiote ruminal.

Annexes

ANNEXE 1 : FORMULES DES DEUX CONCENTRES

Ingrédients (% brut)	FOIN	MAIS
Son de blé	19,4	25,0
Drêches de maïs	19,9	4,1
Graine de soja extrudée	3,2	-
Tourteau de soja 48	11,6	18,1
Tourteau de colza	-	39,1
Tourteau de tournesol	-	10,0
Luzerne	20	-
Paille de céréales	15	-
Marc de pommes	2,7	-
Mélasses (canne)	5,9	-
Carbonate	-	0,96
Sel	0,3	1
Urée	1,8	1,5
Prémix VL 6179	0,2	0,2
Composition estimée (% MS)		
Cendres	8,0	8,5
MAT	26,7	37,6
Cellulose	18,2	12,2
Amidon	6,7	7,8
MG	5,5	3,0
UFL	0,91	0,91
PDIN	179,6	243,0
PDIE	125,0	147,0
PDIA	176	260

ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE LA PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON

Temps de préparation	Solution	Réactifs chimiques	Composition de la solution finale (g/L)
Plusieurs jours avant l'essai	Tampon A	Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	1,985
		KH ₂ PO ₄	1,302
		MgCl ₂ 6 H ₂ O	0,105
	Tampon B	NH ₄ HCO ₃	1,407
		NaHCO ₃	5,418
La veille de l'essai	Solution réductrice	Cysteine HCl	0,390
		NaOH	0,100
	Indicateur coloré	Résazurine	0,00001 ou 1g/L de solution diluée

Plusieurs jours avant l'essai : Préparation du tampon 1

- Peser les réactifs du tampon 1 dans des coupelles en plastiques
- Remplir une bouteille d'eau déminéralisée (selon volume requis)
- Verser un réactif chimique dans la bouteille à l'aide d'un entonnoir. Rincer la coupelle et l'entonnoir avec de l'eau déminéralisée.
- Répéter l'étape précédente pour chaque réactif et mélanger (agitateur magnétique) après chaque ajout de réactifs
- Stocker la bouteille à 4°C.

La veille de l'essai : Préparation finale

- Ajouter les réactifs chimiques du tampon 2, la cystéine et la résazurine au tampon 1. Mélanger avec un agitateur magnétique.
- Saturer la solution en CO₂. Arrêter quand le pH est égal à 6.9

ANNEXE 4 : SEQUENCES OBTENUES PAR PRELEVEMENTS

Tableau présentant le nombre de séquences obtenues pour les 14 jours de prélèvements pour les 6 vaches. Les cases barrées d'une croix blanche indiquent les échantillons dont le nombre de séquences est inférieur à 4 500 séquences. Ces derniers n'ont pas été utilisés pour l'ensemble des analyses de microbiotes dans cette expérimentation.

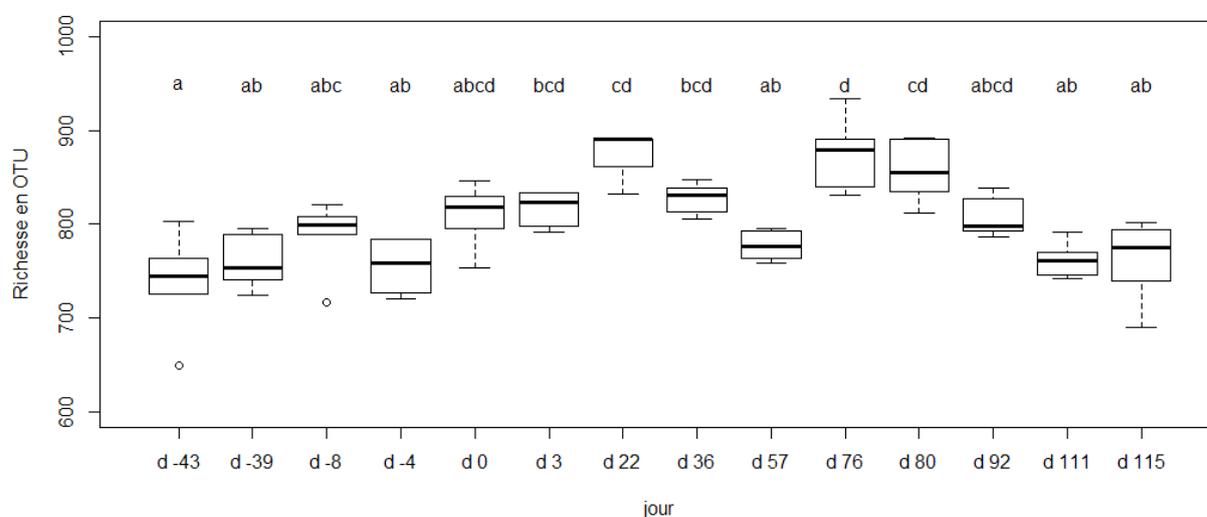
	vache					
	3238	3286	1899	2115	2141	2377
d -43	59860	73113	59846	71521	67216	74016
d -39	40191	74986	46300	67852	66114	77865
d -8	4039	8392	7806	35344	19673	26252
d -4	23729	865	18760	7807	3090	11243
d 0	354	61855	67059	62013	72941	4830
d 3	67005	1997	70795	66424	91576	69506
d 22	7353	10014	3832	16387	50645	3160
d 36	55300	54080	54564	6659	2522	15979
d 57	8014	5817	16752	9613	28932	21972
d 76	12716	67511	47559	57640	857	67531
d 80	23632	67153	19410	61206	58504	62075
d 92	59283	60251	55110	70108	39400	63604
d 111	50368	46318	70636	61519	60459	62379
d 115	41976	66058	50812	51006	61297	-

< 1000	
1000 - 5000	
5000 - 10000	
10000 - 20000	
20000 - 30000	
30000 - 40000	
40000 - 50000	
> 50000	

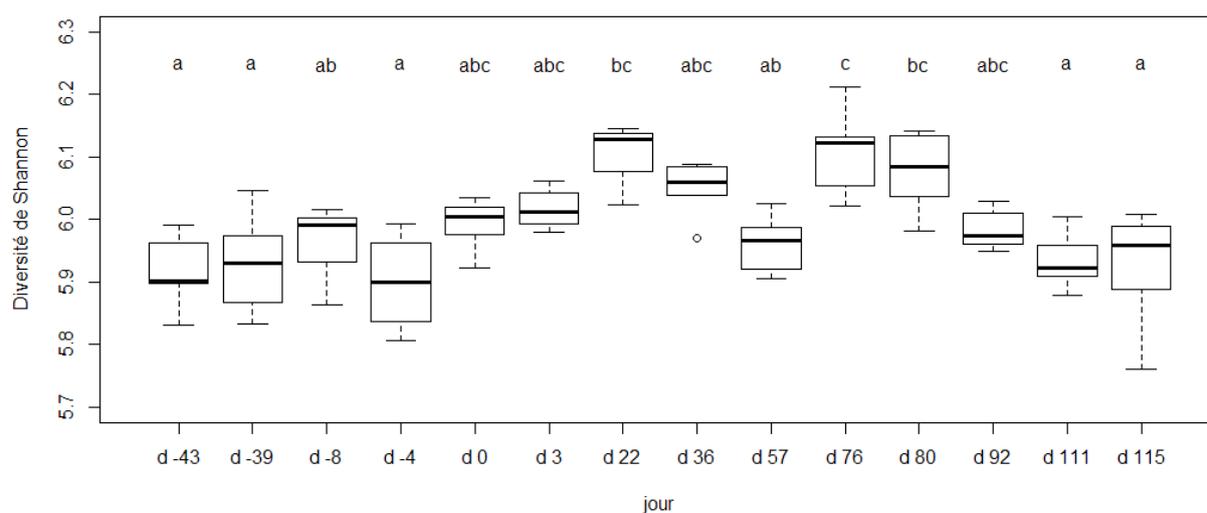
ANNEXE 5 : ALPHA-DIVERSITE

Graphique en boîtes à moustaches représentant la richesse en OTU (a) et les indices de diversité de Shannon (b) selon le jour de prélèvement des contenus ruminiaux des 6 vaches taries. Ces jours se situent autour de la synchronisation du microbiote qui a eu lieu à d 0. Les vaches ont été nourries avec une ration à base de maïs riche en amidon pour les prélèvements d -43, d -39, d 92, d 111 et d 115. Elles ont été nourries avec une ration à base de foin riche en fibres pour les prélèvements d -8, d -4, d 0, d 3, d 22, d 36, d 57, d 76 et d 80. Les comparaisons 2 à 2 ont été réalisées par un test sur les moyennes ajustées. Si 2 groupes partagent une lettre, alors ils ne sont pas significativement différents.

a.



b.



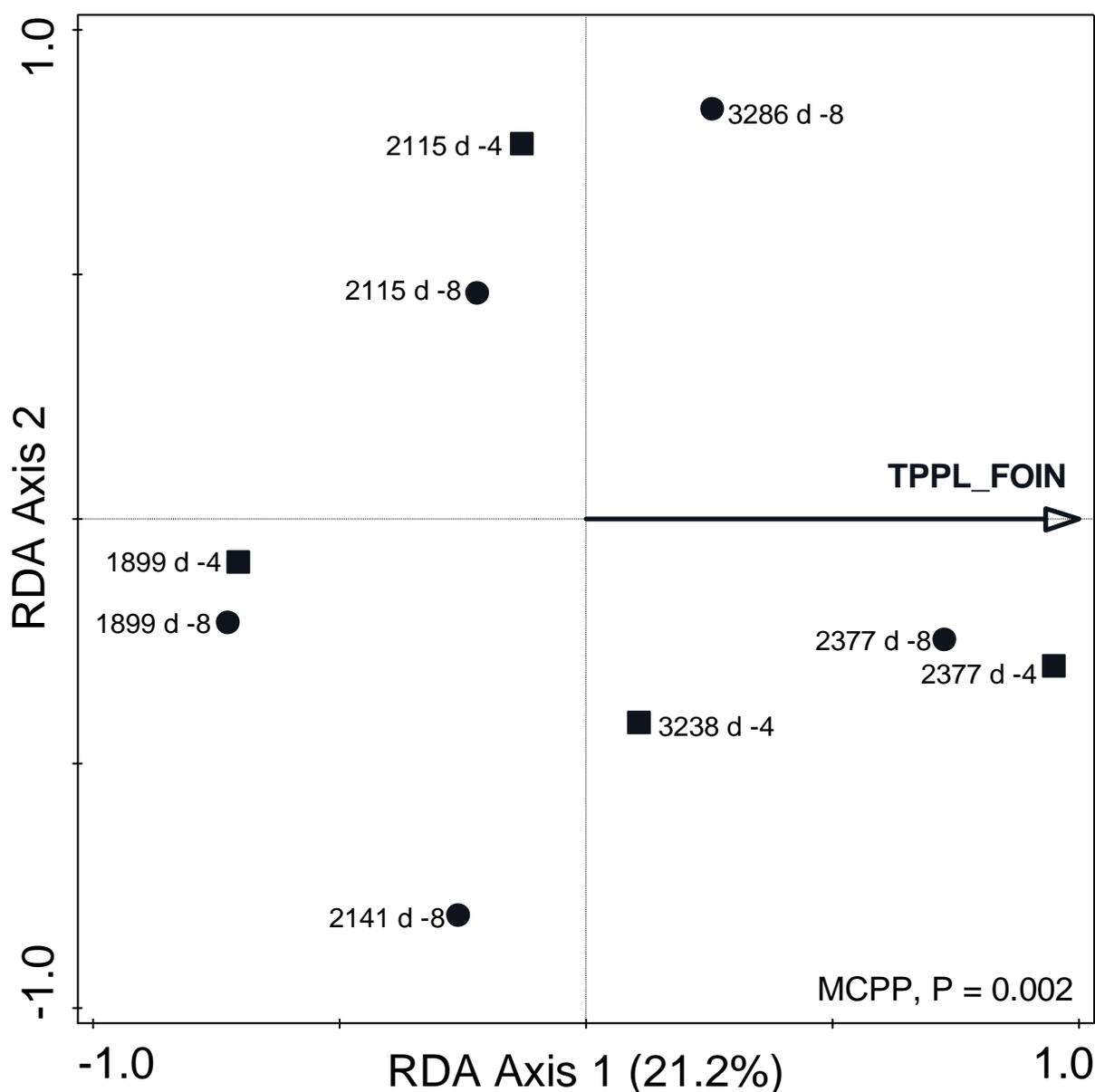
ANNEXE 6 : PARAMETRES FERMENTAIRES TESTES UN A UN PAR JOUR DE PRELEVEMENT

Tableau reportant la significativité des paramètres fermentaires testés un à un par jour de prélèvement avec une analyse de redondance (RDA) et une procédure de permutation de Monte Carlo. Les paramètres testés sont : la concentration ruminale en ammoniacque (NH₃), la concentration ruminale en acide acétique (C₂), la concentration ruminale en acide propionique (C₃), la concentration ruminale en acide butyrique (C₄), la concentration ruminale de l'ensemble de ces 3 AGV (AGV_{tot}), le ratio C₂/C₃ (C₂/C₃), le pH ruminal (pH), la production totale de gaz in vitro (gaz_{tot}), la production totale de méthane in vitro (CH₄_{tot}) et la cinétique de production de gaz (taux Orskov). Le jour de la synchronisation des contenus ruminiaux est noté d 0. Les jours de prélèvement avec la ration EM sont d -43, d -39, d 92, d 111 et d 115. Les jours de prélèvement avec la ration FOIN sont d -8, d -4, d 0, d 3, d 22, d 36, d 57, d 76 et d 80. Les cases grisées n'ont pas pu être testées car la mesure du paramètre fermentaire n'a pas été réalisée à ce temps.

	d -43	d -39	d -8	d -4	d 22	d 36	d 57	d 76	d 80	d 92	d 111	d 115
NH₃ (mmol/L)	NS	NS	NS	NS				NS	NS		NS	NS
AGV_{tot} (mmol/L)	*	*	NS	NS				NS	NS		NS	NS
C₂/C₃	*	*	-	NS				-	-		*	*
C₂ (mmol/L)	NS	NS	NS	NS				NS	NS		NS	NS
C₃ (mmol/L)	*	*	*	NS				NS	NS		NS	NS
C₄ (mmol/L)	NS	-	NS	NS				-	NS		-	NS
pH	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
gaz_{tot} (mmol)	NS	NS	NS	NS	NS			NS	NS		NS	NS
CH₄_{tot} (mmol)	NS	NS	NS	NS	NS			NS	NS		NS	NS
Taux Orskov (h ⁻¹)	*	*	NS	NS	NS			NS	NS		NS	NS

ANNEXE 7 : ANALYSE DE REDONDANCES DES CARATERISTIQUES DE L'HOTE SUR LA RATION FOIN AVANT SYNCHRONISATION

Graphique de l'analyse de redondance (RDA) basée sur les abondances relatives des OTU log-transformées du microbiote ruminal des 6 vaches pour les 2 prélèvements réalisés à d -8 et d -4. Le diagramme d'ordination est contraint par les caractéristiques des vaches sélectionnées par sélection interactive avec des p-values corrigées par FDR (False Discovery Rate) ($P < 0.05$). La flèche pointe dans la direction où ce paramètre augmente. La p-value obtenue par la procédure de permutation de Monte Carlo est indiquée en bas à droite. Le paramètre sélectionné est le taux de passage de la phase liquide mesuré avec la ration FOIN (TPPL_FOIN). Les paramètres non sélectionnés sont TPPS_FOIN, PV et CR/PV. MCPP : « Monte Carlo permutation procedure ».



ANNEXE 8 : LACTATION CURVE MODEL WITH EXPLICIT REPRESENTATION OF PERTURBATIONS AS A PHENOTYPING TOOL FOR DAIRY LIVESTOCK PRECISION FARMING

Ben Abdelkrim Ahmed^{1,2}, Puillet Laurence¹, Gomes Pierre^{1,3}, Martin Olivier¹

¹ UMR MoSAR, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 75005, Paris, France

² GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350, Jouy-en-Josas, France

³ NEOVIA, 56250, Saint-Nolff, France

About the Authors

Ahmed Ben Abdelkrim: Conceptualization, Methodology, Visualization, Software implementation, Writing – Original draft preparation

Laurence Puillet: Conceptualization, Data curation, Writing – review & editing

Pierre Gomes: Conceptualization, Methodology, Preliminary tests

Olivier Martin: Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing

Data Availability:

All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. The data used in this paper and the R code for the Perturbed Lactation Model are accessible on the ZENODO data warehouse (<https://zenodo.org/record/3241372#.XWOYxell9WY>).

Funding:

This work was funded by the “Deffilait project” (ANR; project: ANR-15-CE20-0014).

Competing Interests:

The authors have declared that no competing interests exist.

Keywords:

Dairy Goats, Milk Yield, Individual Variability, Resilience, Perturbations

Abstract

Background

Understanding the effects of environment on livestock provides valuable information on how farm animals express their production potential, and on their welfare. Ruminants often face perturbations that affect their performance. Evaluating the effect of these perturbations on animal performance could provide metrics to quantify how animals cope with their environment and therefore, better manage them. In dairy systems, milk production records can be used to evaluate perturbations because (1) they are easily accessible, (2) the overall dynamics throughout the lactation process have been widely described, and (3) perturbations often occur and cause milk loss. In this study, a lactation curve model with explicit representation of perturbations was developed.

Methods

The perturbed lactation model is made of two components. The first one describes a theoretical unperturbed lactation curve (unperturbed lactation model), and the second describes deviations from the unperturbed lactation model. The model was fitted on 319 complete lactation data from 181 individual dairy goats allowing for the characterization of individual perturbations in terms of their starting date, intensity, and shape.

Results

The fitting procedure detected a total of 2,354 perturbations with an average of 7.40 perturbations per lactation. Loss of production due to perturbations varied between 2% and 19%. Results show that the number of perturbations is not the major factor explaining the loss in milk yield over the lactation, suggesting that there are different types of animal response to challenging factors.

Conclusions

By incorporating explicit representation of perturbations, the model allowed the characterization of potential milk production, deviations induced by perturbations (loss of milk), and thereby comparison between animals. These indicators are likely to be useful to move from raw data to decision support tools in dairy production.

INTRODUCTION

In the context of precision livestock farming, simple interpretive tools are required to convert raw time series datasets, now routinely recorded in animals, into useful information for on-farm decision-making. Such tools are not only expected to provide farmers with good information on performance level of individual animals, but also to detect pathological, nutritional or environmental problems affecting production traits at individual or herd scales. In dairy systems, it is well known that milk yield can be affected by events such as udder health problems [1], lameness [2], meteorological changes [3], or feed quality [4]. Such problems induce perturbations in the course of the lactation process and result in a serrated shape pattern of the lactation curve. These perturbations can be seen as deviations of the lactation curve from its typical profile. This typical profile reflects that lactation is a physiological process common to mammalian females, and as a result, its expression through time follows a general pattern [5]. It can be described in 3 phases. The first phase starts after parturition with the initial milk yield increasing to a maximum or peak yield. The second phase is a plateau-like period in which maximum milk yield is maintained for a more or less long time. The third phase is the decrease from the peak yield. This last phase can be divided into two parts according to the speed of decrease, the first one corresponding to an approximately constant declining rate of milk production after the peak yield, and the second corresponding to an acceleration of the milk yield decline as pregnancy progresses before the start of the dry period when lactation stops [6–8]. Modelling the lactation curve is a long standing issue [9] and numerous authors have proposed mathematical models allowing the characterization of milk yield dynamics, *i.e.*, the transformation of a series of temporal data into a vector of estimated parameters via a fitting procedure. The most famous and used model is the one published by Wood in 1967 [10]. The overall objective of lactation models is to reduce the variability in data by creating a profile, thereby being able to characterize an average animal milk production, or to compare the production of different animals. This strategy of using lactation models as phenotyping tool has been very useful in the past years (for instance, test-day models for genetic selection) and in a context of scarce raw data. An important limitation of these modelling approaches is that short-term perturbations are removed during the fitting procedure in order to extract an unperturbed phenotype, corresponding to a typical lactation curve. However, characterizing perturbations can be highly relevant for better understanding the resilience of dairy females regarding their milk production and therefore for making management decisions [11]. Furthermore, evaluating the effect of perturbations on animal performance could provide metrics to quantify how animals cope with their environment, and develop management strategies to find a good balance between animal welfare and performance.

The need for incorporating perturbations into lactation curve models is also driven by the development of precision livestock farming. Now, we have more frequent and reliable data and we can transition data analysis from reducing variability around average profiles to extracting variability to provide information. High throughput data has led to the development and use of statistical methods, such as smoothing methods, to capture and understand perturbations [12]. Codrea et al. [12] studied the effect of nutritional challenges on the lactation curve in dairy cows using differential smoothing procedures for quantifying biological perturbations in an animal performance. Results of this study highlighted the decline in milk yield during the challenge period for each cow, and showed the presence of other deviations with unknown causes or unrelated to the feed restriction during experiment. On the other hand, Friggens et al. [4] used a clustering procedure linked to a piecewise mixed model to characterize different responses between lactation stages and types of response for the nutritional challenges. Another study have highlighted the large differences in milk production in goats that are subject to the same diet and environmental conditions [13]. There are few other approaches to describe the shape of the lactation curves from animals faced with health problems. Lescourret and Coulon [14] had shown the huge variability of milk production in response to mastitis in both form of the lactation curve and intensity of milk production. Adriaens et al. [1] developed a novel methodology to predict quarter milk yield during clinical mastitis.

The main shortcoming of approaches cited above is the lack of an explicit representation of perturbations which are only captured through statistical objects. To overcome this limit, models on different animal species have been developed with a more explicit representation of perturbations. In the work of Revilla et al. [15] on growing piglets, a classical Gompertz equation, used to capture the unperturbed growth curve, is combined to an equation of the perturbation, used to capture the perturbation in body weight change induced by the weaning stress. Another model based on differential equations was developed to characterize the feed intake response of growing pigs to perturbations [16]. Sadoul et al. [17] used a model based on a spring and a damper to capture perturbations in physiological responses to challenges on rainbow trout. This formalism allows the characterization of perturbations with stiffness and resistance to the change of the system.

These recent modelling developments exhibit two major limits for application to lactation curve: first, they do not allow to capture multiple perturbations that may be imbricated and second they imply that the time of perturbation is *a priori* known.

In this study, we developed a Perturbed Lactation Model (PLM) that incorporates an explicit representation of perturbations and that converts individual raw time-series data into biological meaningful parameters. The fitting procedure of PLM allows the detection and the characterization of perturbations in milk time-series. The objective of the present paper is (1) to introduce the PLM model and the explicit representation of perturbations, (2) to describe the use of PLM to detect and characterize perturbations in milk yield time series with an example in dairy goats, and (3) to illustrate the role of PLM as a phenotyping tool by analyzing the variability in perturbed lactation curves on the basis of the fitting results obtained on the dairy goat dataset.

MATERIALS AND METHODS

The PLM is composed of a lactation model, denoted Y^* , describing the theoretical unperturbed dynamics of milk yield along the lactation, and a perturbation model, denoted π , describing deviations from the lactation model. The list of model parameters is provided in Table 1.

Table 1: Model parameters

Symbol	Definition
<i>Wood Model</i>	
a	Parameter scaling the general level of the lactation curve
b	Parameter controlling the type and magnitude of the curvature of the lactation curve
c	Parameter regulating the rate of decrease in milk yield after the lactation peak
<i>Perturbed Lactation Model with N perturbations (PLM_N)</i>	
N	Number of perturbations
i	Perturbation number ($i \in [0; N]$)
$t_{P,i}$	Time of start of the i^{th} perturbation
$k_{0,i}$	Parameter of intensity of the i^{th} perturbation
$k_{1,i}$	Parameter of collapse speed of the i^{th} perturbation
$k_{2,i}$	Parameter of recovery speed of the i^{th} perturbation

The dynamics of daily milk yield ($Y(t)$, in kg) during the lactation is thus given by:

$$Y(t) = Y^*(t) \cdot \pi(t)$$

where t is the time after parturition in days.

Unperturbed lactation model

Among the numerous mathematical models developed to study lactation curves, the incomplete Gamma function proposed by Wood [10] has been widely used in different mammals (*e.g.*, rabbit [18], sheep [19], cattle [20]). This model gives a general expression for the dynamics of milk yield along the lactation. In this article, we have selected this model as an example to define the unperturbed lactation curve. Because the structure of PLM is generic, any other lactation model can be used.

The Wood model is given by:

$$Y^*(t) = a \cdot t^b \cdot e^{-c \cdot t}$$

where $Y^*(t)$ is the unperturbed daily milk yield in kg, t is the time in days after parturition and a , b , c are positive parameters that determine the shape of the lactation curve (a scales the general level of the curve, b controls the type and magnitude of the curvature of the function, and c regulates the rate of decrease in milk yield after the lactation peak). Values of these parameters can be used to calculate some essential features of the lactation curve such as the time of peak yield (b/c , in days), the lactation persistency, *i.e.*, the extent to which peak yield is maintained ($-(b + 1) \cdot \ln(c)$ in $\text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$), or the peak yield ($a \cdot (b/c)^b \cdot e^{-b}$ in kg) [21].

Perturbation model

The perturbation model is based on the idea that each single perturbation i affecting lactation dynamics can be described as a transient proportional decrease in milk yield, through a sequence of collapse and recovery. Each perturbation can thus be modelled by way of a 3-compartment model (Figure 1) representing the dynamics of the proportion of milk withdrawn from the theoretical unperturbed yield.

The three compartments of the model are: A_i , the maximal proportion potentially affected by the i^{th} perturbation, U_i , the proportion unaffected by the i^{th} perturbation, and P_i , the proportion effectively affected by the i^{th} perturbation. Given the structure of the compartmental model, forming a path from A_i to U_i through P_i , and given that the model is defined such as $A_i + P_i + U_i = 1$, the dynamics of P_i represents the proportional deviation in milk yield.

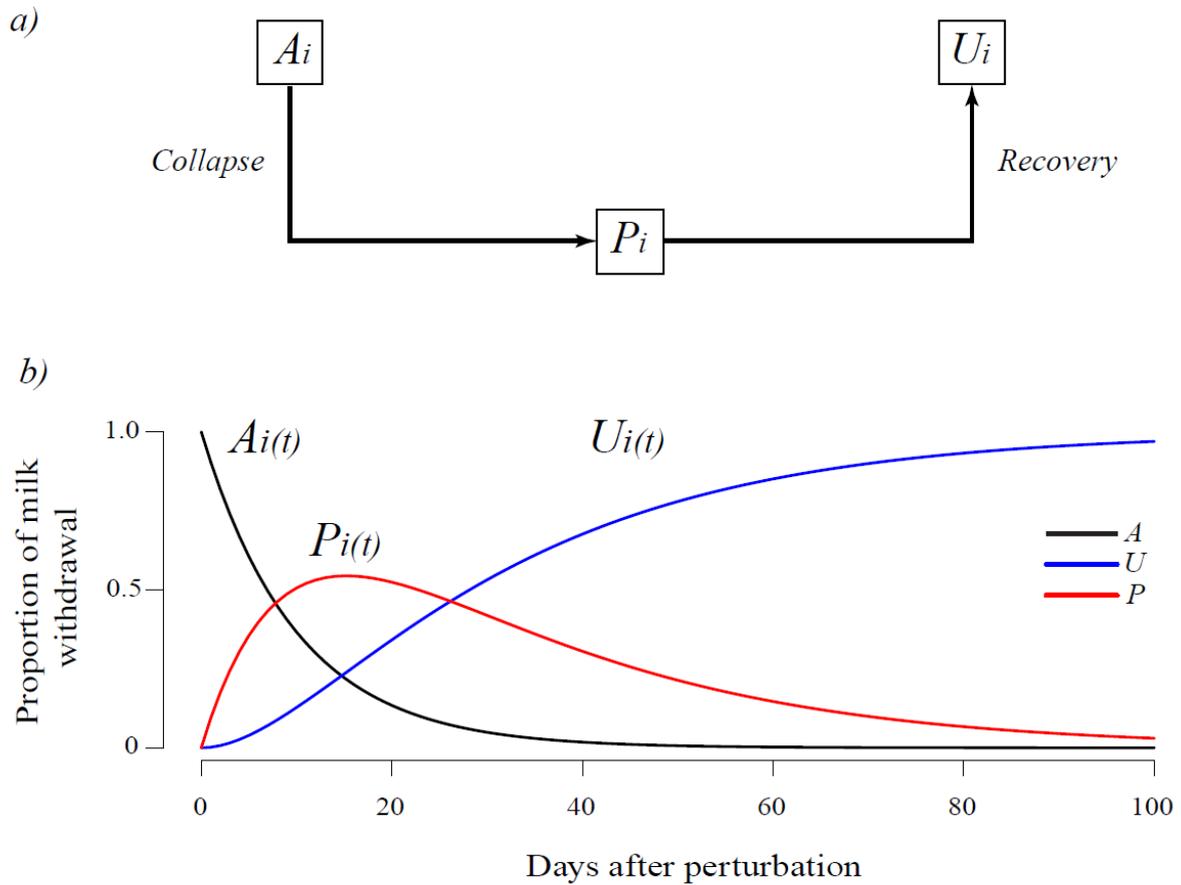


Figure 1. Conceptual model of a single perturbation. A : proportion affected by the perturbation, P : proportion effectively affected by the perturbation, U : proportion unaffected by the perturbation. a) Model diagram and b) Solution dynamics.

The perturbation model for a single perturbation i is defined by the following simple differential system:

$$\text{if } t \geq t_p: \begin{cases} \frac{dA_i}{dt} = -k_{1,i} \cdot A_i \\ \frac{dP_i}{dt} = +k_{1,i} \cdot A_i - k_{2,i} \cdot P_i \\ \frac{dU_i}{dt} = +k_{2,i} \cdot P_i \end{cases} \text{ otherwise: } \begin{cases} \frac{dA_i}{dt} = 0 \\ \frac{dP_i}{dt} = 0 \\ \frac{dU_i}{dt} = 0 \end{cases}$$

with the following initial conditions at parturition time ($t = 0$):

$$\begin{cases} A_i(0) = k_{0,i} \\ P_i(0) = 0 \\ U_i(0) = 1 - k_{0,i} \end{cases}$$

and where t_{P_i} , is the time of start of the i^{th} perturbation, $k_{0,i}$ is the parameter of intensity of the i^{th} perturbation ($k_{0,i} \in]0; 1[$), $k_{1,i}$ is the parameter of collapse speed of the i^{th} perturbation and $k_{2,i}$ is the parameter of recovery speed of the i^{th} perturbation.

Assuming that $k_{1,i} \neq k_{2,i}$, the algebraic solution of this differential system is given by:

$$\begin{cases} A_i(t) = k_{0,i} \cdot e^{-k_{1,i} \cdot \Delta_i(t)} \\ P_i(t) = \frac{k_{0,i} \cdot k_{1,i}}{k_{1,i} - k_{2,i}} \cdot (e^{-k_{2,i} \cdot \Delta_i(t)} - e^{-k_{1,i} \cdot \Delta_i(t)}) \\ U_i(t) = 1 - \frac{k_{0,i}}{k_{1,i} - k_{2,i}} \cdot (k_{1,i} \cdot e^{-k_{2,i} \cdot \Delta_i(t)} - k_{2,i} \cdot e^{-k_{1,i} \cdot \Delta_i(t)}) \end{cases}$$

where $\Delta_i(t)$ is the elapsed time since the beginning of the i^{th} perturbation and is given by:

$$\Delta_i(t) = \begin{cases} 0 & \text{if } t < t_{P_i} \\ t - t_{P_i} & \text{if } t \geq t_{P_i} \end{cases}$$

Finally, the perturbation model, including n individual perturbations affecting the lactation curve is given by:

$$\pi(t) = \prod_{i=1}^n (1 - P_i(t))$$

Model formalism

The detailed algebraic formula of PLM with n individual perturbations is given by:

$$Y(t) = a \cdot t^b \cdot e^{-c \cdot t} \cdot \prod_{i=1}^n \left(1 - \frac{k_{0,i} \cdot k_{1,i}}{k_{1,i} - k_{2,i}} \cdot (e^{-k_{2,i} \cdot \Delta_i(t)} - e^{-k_{1,i} \cdot \Delta_i(t)}) \right)$$

The model includes the three parameters of the Wood model (a , b , and c) to define the unperturbed lactation curve, one parameter to define the number of perturbations affecting the lactation curve (n), and four parameters per individual perturbation i (t_{P_i} , $k_{0,i}$, $k_{1,i}$, and $k_{2,i}$) so that the total number of parameters to define PLM is equal to $4 + 4 \cdot n$.

A simulation of PLM with five perturbations over 300 days of lactation is shown in Figure 2 as an illustration of the model behavior.

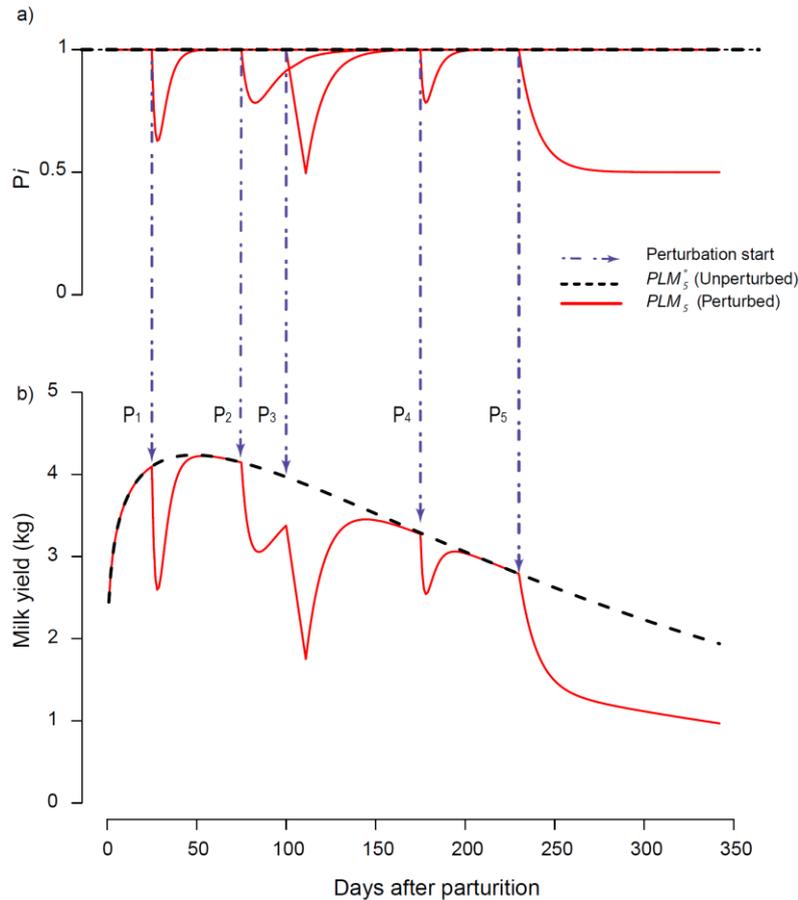


Figure 2. Example of a simulation of the Perturbed Lactation Model (PLM) including five perturbations with a) individual perturbations dynamics expressed as the proportion of unperturbed lactation curve (P_i) and b) unperturbed and perturbed milk yield dynamics.

Perturbations were considered individually so that a perturbation can occur within another one (see P_3 in Figure 2 at $t_{P_3} = 100$). Given that individual perturbations are proportional deviations multiplied between them, when a perturbation is added during another perturbation, the new perturbation is a proportion of the already perturbed curve. Moreover, perturbations can be used to simulate the effect of pregnancy (see P_5 in Figure 2 at $t_{P_5} = 225$) with the recovery parameter $k_{2,i}$ set to zero.

Fitting procedure

PLM is aimed at detecting perturbations in milk yield time-series data and thus, provide estimates of (1) a theoretical unperturbed lactation curve and (2) the number, timing and shape of the perturbations leading to the observed perturbed lactation curve. A dedicated algorithm was developed in R (R Core Development Team, 2018) with the aim of fitting PLM on lactation data and deriving parameter estimates a, b , and c to characterize the unperturbed lactation curve, n to define the number of perturbations and parameter estimates ($t_{P_i}, k_{0,i}, k_{1,i}$, and $k_{2,i}$) for each i^{th} detected perturbation. Preliminary tests have shown that repeated fittings using different starting values can lead to the detection of perturbations differing in total number and detection order. This raised the question of the theoretical identifiability of the model parameters (for further details on identifiability see [22]) and of the use of a stop criterion to estimate n . The structure of the model does not allow a classical identifiability analysis to be performed if n is unknown. However, by using the software DAISY (Differential Algebra for Identifiability of Systems [23]), we could assess that for one perturbation the PLM parameters are locally identifiable. To facilitate the identification of the model parameters, we

adopted a fitting strategy in two steps: first, performing numerous repeated fittings to estimate the most frequent number of perturbations. In the second step, we fixed as known the number of perturbations detected in step 1 and proceeded to estimate the remaining parameters of the model. This strategy ultimately makes it possible to estimate an optimal number of perturbations and facilitates the estimation of the model parameters.

In the following section, PLM_n stands for PLM with n perturbations, k_{W_n} stands for the triplet of parameters (a, b, c) of Wood's model estimated with n perturbations (n ranging from 0 to n_{max}) and $k_{P_{i,n}}$ stands for the quadruplet $(t_{P_i}, k_{0,i}, k_{1,i}, k_{2,i})$ of the i^{th} perturbation (n ranging from 1 to n_{max}). Since PLM_n combines an estimated unperturbed lactation curve and n perturbations, PLM_n^* stands for the unperturbed lactation model (*i.e.*, the lactation curve when the n perturbations are removed). PLM_0 (*i.e.*, PLM with zero perturbation) corresponds to the original Wood's model without any perturbation.

The `nls.multstart` package (version 1.0.0; [24]) performing non-linear least squares regression with the Levenberg-Marquardt algorithm and with multiple starting values was used for each single fit. Two different sampling schemes of starting parameters were used: random sampling of starting parameters from a uniform distribution within the starting parameter bounds or selection of combinations of starting parameters at equally spaced intervals across each of the starting parameter bounds. These two fitting methods are hereafter referred to as 'shotgun search' and 'gridstart search' respectively. Starting parameter bounds are defined as follows: a : [0; 100]; b : [0; 1]; c : [0; 1]; t_{P_i} : [t_0 ; t_3] (where t_0 and t_3 are the times of first and last records of the dataset); $k_{0,i}$: [0; 1]; $k_{1,i}$: [0; 10]; $k_{2,i}$: [0; 10]. For the 'shotgun search', the number of random combinations of starting parameters was set to 100,000. For the 'gridstart search', the number of combinations of starting parameters (*i.e.*, the size of the grid), was set to five for parameters a , b , c , $k_{0,i}$, $k_{1,i}$, $k_{2,i}$ and to 10 for the parameter t_{P_i} . Consequently, for the fit of one perturbation (*i.e.*, estimating $3 + 4 = 7$ parameters) the number of tested combinations of starting parameters was $7^6 \times 10 = 1,176,490$. For both search methods, the best model was selected on the basis of the lowest Akaike Information Criterion (AIC) score [25].

The whole fitting procedure includes repetitions of a fitting sequence that proceeds by successive addition of perturbations. This fitting sequence is defined in such a way that the estimate of the parameters of each new perturbation is obtained while the parameters of the previously added perturbations are kept fixed. Therefore, the fitting of PLM_i provides parameters estimates for the new added i^{th} perturbation and for a new version of Wood model's parameters k_{W_i} (*i.e.*, each time a new perturbation is added, a new version of the unperturbed lactation is refined). For a given lactation dataset composed of daily milk yield records, the preliminary fitting of PLM_0 (*i.e.*, the original Wood's model without any perturbation) was first performed to estimate k_{W_0} . Then, the fitting sequence starts by the fitting of PLM_1 (*i.e.*, PLM with 1 perturbation) thus providing estimates k_{W_1} and $k_{P_{1,1}}$. Then, the fitting of PLM_2 consists in estimating k_{W_2} and $k_{P_{2,2}}$ with $k_{P_{1,2}}$ fixed equal to $k_{P_{1,1}}$. Then, the fitting of PLM_3 consists in estimating k_{W_3} and $k_{P_{3,3}}$ with $k_{P_{1,3}}$ and $k_{P_{2,3}}$ fixed equal to $k_{P_{1,2}}$ and $k_{P_{2,2}}$, respectively. The procedure is applied stepwise until the maximum number of perturbation n_{max} is reached. This maximum number is an *a priori* user defined value to fix a stop criterion. Preliminary tests have shown that setting $n_{max} = 15$ was sufficient. The end of the fitting sequence consists in reordering the n_{max} detected perturbations in decreasing order according to the time of perturbation t_{P_i} (the original obtained order of perturbations is based on the opportunities found by the fitting procedure to improve the goodness-of-fit for each added perturbation).

Finally, the whole fitting procedure is carried out following the 3 following steps:

Step1: Repeat 100 times the fitting sequence with the 'shotgun search' and $n_{max} = 15$.

Step2: Compare the fitting results of the 100 repetitions obtained in Step1 and identify perturbations systematically detected at $t_{P_i} \pm 3$ days. This was performed by counting, for the 15 perturbations over

the 100 fitting results, the number of occurrences of the rounded value $t_{P_i}^* = \text{round}(t_{P_i}/7) \cdot 7$. Step1 provides the optimal number of perturbations denoted N (*i.e.*, the value of n giving the best fit) with an estimate of t_{P_i} for each perturbation (calculated as the median of the t_{P_i} with the same rounded value $t_{P_i}^*$).

Step3: Perform the fitting sequence with the ‘gridstart search’, with $n_{max} = N$ and with starting parameters bounds for each t_{P_i} reset to $[t_{P_i} - 10 ; t_{P_i} + 10]$. This last fit provides the final estimates k_{WN} and $(k_{P_{1,N}}, \dots, \text{and } k_{P_{N,N}})$ characterizing respectively the best fit for the unperturbed model and the N detected perturbations. The Root Mean Square Error (RMSE) was calculated to indicate the goodness-of-fit of PLM_N . Additionally, the percentage of loss ‘ L ’ was calculated using the formula $L = 1 - S_N^*/S_N$ where S_N^* and S_N are respectively the total milk yield over $[t_0; t_3]$ calculated with PLM_N^* (the unperturbed curve corrected from N perturbations) and PLM_N (the perturbed curve with N perturbations).

To provide complementary information on lactation time-series and refine PLM outputs analysis, the model of Grossman et al. [26] was also fit to lactation data as described in Martin and Sauvant [27]. This fitting cuts the lactation period into three stages corresponding to early, middle and late stages (respectively intervals $[t_0; t_1]$: increasing phase, $[t_1; t_2]$: plateau-like phase, and $[t_2; t_3]$: decreasing phase). This triphasic model, based on a smoothing logistic transition between intersecting straight lines, specifies the cut points of the three stages (instead of *a priori* number of days in milk). This fit was performed using the ‘gridstart search’ with $[t_0; t_3]$ as starting parameters bounds for the interval terminals t_1 and t_2 .

Dairy goat dataset

In this study we used data from 181 goats (94 Alpine and 87 Saanen) born between 2009 and 2017. Data concerned 319 lactations (126 primiparous and 193 multiparous; parity ranging from 1 to 7) including 80,773 milk records from the dairy goat herd of the INRA-AgroParisTech Systemic Modelling Applied to Ruminants research unit (Paris, France) between 2015 and 2018. Records are shown in supplementary Figure 1 by breed and parity. All lactations considered had at least one record in the first 5 days of lactation and a last record between 150 and 358 days of lactation (no extended lactation included).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R (R Core Development Team, 2018).

Fixed effects of breed (Saanen *vs.* Alpine) and parity (1 *vs.* 2 and more) were tested on parameters of Wood, with and without the changes made from PLM model. It was also tested on estimated peak milk yield, peak time, total milk yield over $[t_0; t_3]$, the number of perturbation and the rate milk loss using a mixed analysis of variance model with goat as a random factor. Fixed effect of lactation stage (early *vs.* middle *vs.* late) was tested on RMSE and on PLM parameters t_P, k_0, k_1, k_2 with a mixed analysis of variance model with parity as a random factor. Pearson linear correlations were calculated for PLM parameters: intra-class of breed and parity for a, b, c, N , and L and intra-class of stage of lactation for t_P, k_0, k_1 , and k_2 .

RESULTS

Lactation duration ranged from $t_0 = 1.2 \pm 0.6$ to $t_3 = 270.3 \pm 40.8$ days in milk. Early, middle, and late lactation stages determined with Grossman's model were 1.2 to 34.4, 34.4 to 171.0, and 171.0 to 270.3 days, respectively.

Fitting

The fitting procedure converged for the 319 lactations and detected a total of 2,354 perturbations with an average of 7.4 perturbations per animal per lactation. Figure 3 shows the fitting of PLM on one lactation dataset. The fitting results on individual lactations exhibiting the minimum and maximum values for the RMSE (0.1 kg and 0.4 kg) are provided in supplementary Figure 2. The number of perturbations varied between 4 and 11, the percentage of milk loss between 2% and 19%, the total unperturbed milk yield was between 393 kg and 1,557 kg and the record interval length was between 1 and 5 days for t_0 and between 165 and 358 days for t_3 . During the first fitting steps, the Wood's parameters were stabilized on average after the detection of the first 4 perturbations (supplementary Figure 3). This indicates the robustness of the unperturbed curve.

Descriptive statistics of the results obtained from the fitting procedure of PLM_N are given in Table 2 by breed and parity and are compared to the results obtained with PLM_0 , corresponding to an adjustment of the Wood model without any perturbations. The value for the parameter a greatly increased between the Wood model and PLM_N . The values for parameters b and c decreased between the Wood model and PLM_N . As a consequence, values for peak milk and time of peak increased between the Wood model and PLM_N . Both models did not give a similar level of variance of error according to breed or parity level. Regarding the quality of fitting, the RMSE values showed a fairly significant decline between the Wood model (0.4 ± 0.1 kg) and PLM_N (0.2 ± 0.1 kg). Considering explicit perturbations in the fitting of the Wood model with PLM compare to fitting directly the Wood function to data led to a decrease in RMSE, reflecting an improvement in the goodness of fit.

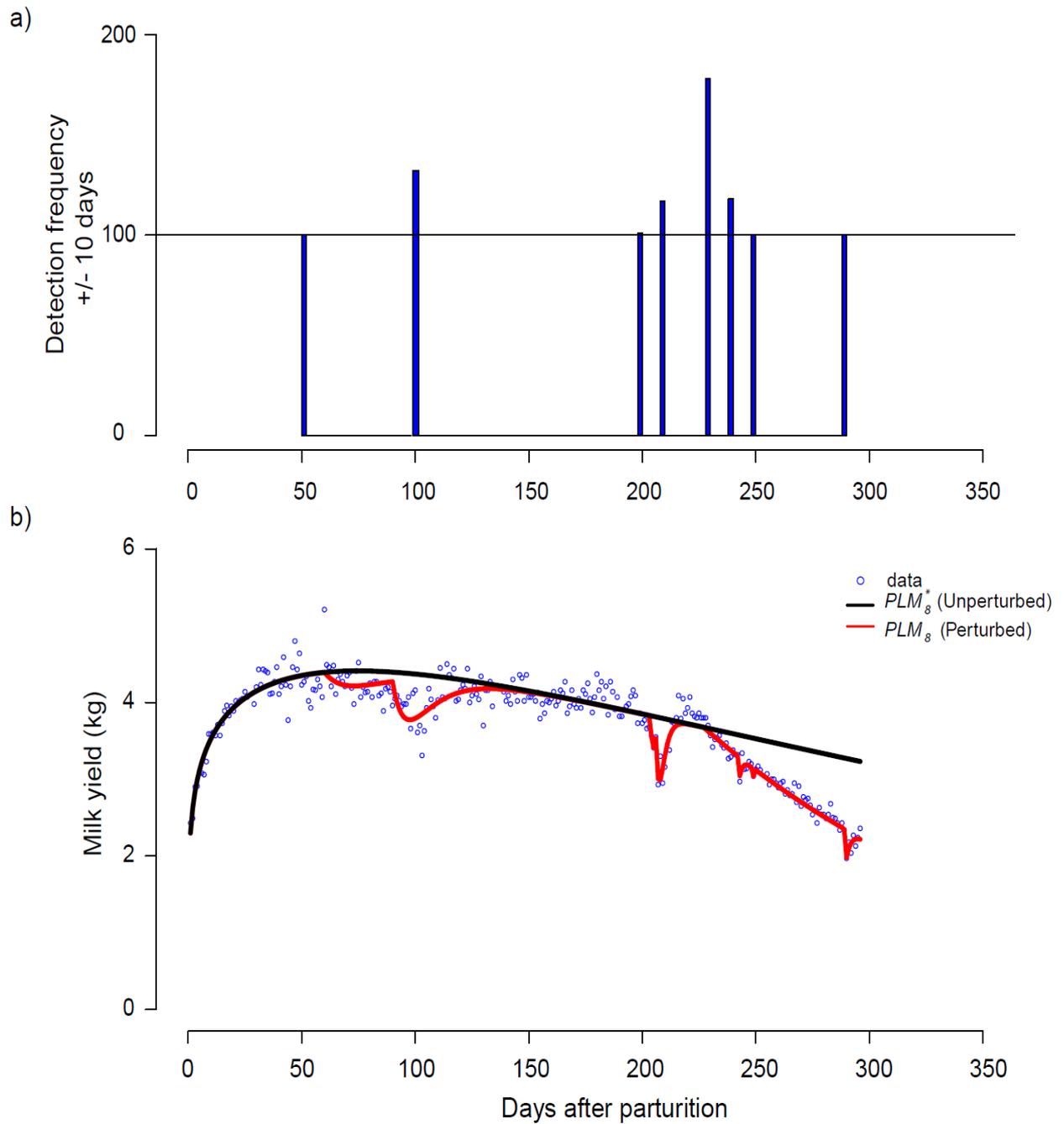


Figure3. Example of the perturbed lactation model fitting procedure result on a one goat lactation dataset. a) frequency of detection of a single perturbation within ± 10 days; b) unperturbed and perturbed lactation models plotted against data.

Table 2. Results of the fitting procedure: comparison between breeds and lactation numbers across the models and variables.

model	All						SAA (143)						ALP (176)						P-value	
	1 (126 [†])		2 + (193 [†])		total (319 [†])		1 (59 [†])		2 + (84 [†])		total (143 [†])		1 (67 [†])		2 + (109 [†])		total (176 [†])		Breed	Parity
Wood ¹	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd		
<i>a</i>	1.88	0.63	2.39	0.79	2.14	0.71	1.84	0.55	2.44	0.84	2.20	0.83	1.92	0.69	2.34	0.76	2.17	0.72	NS	***
<i>b</i>	0.22	0.11	0.24	0.11	0.23	0.11	0.22	0.11	0.23	0.11	0.23	0.11	0.22	0.11	0.25	0.12	0.24	0.12	NS	NS
<i>c</i>	0.004	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.003	0.002	0.004	0.002	0.004	0.002	0.003	0.001	0.005	0.002	0.004	0.02	***	***
RMSE ³ (kg/d)	0.31	0.08	0.44	0.14	0.38	0.11	0.32	0.87	0.46	0.15	0.40	0.15	0.30	0.08	0.43	0.12	0.38	0.13	*	***
Peak milk ⁴ (kg)	3.54	0.55	4.72	0.72	4.13	0.64	3.56	0.59	4.69	0.70	4.25	0.88	3.53	0.52	4.75	0.73	4.26	0.87	NS	***
Peak time ⁵ (d)	63.85	32.18	56.81	22.01	60.33	27.10	74.28	39.88	60.23	24.76	67.26	32.32	54.66	19.50	54.17	19.33	54.42	19.42	*	*
Total milk (kg)	719.60	149.14	972.84	204.34	846.22	176.74	731.91	150.04	986.85	223.17	859.38	186.60	708.77	148.61	962.04	188.91	865.51	168.76	NS	***
PLM²																				
<i>a</i>	2.16	0.60	2.77	0.69	2.53	0.72	2.14	0.49	2.89	0.71	2.58	0.73	2.18	0.68	2.68	0.66	2.49	0.71	NS	***
<i>b</i>	0.17	0.08	0.19	0.08	0.18	0.08	0.16	0.07	0.16	0.07	0.16	0.07	0.17	0.09	0.20	0.08	0.19	0.08	***	NS
<i>c</i>	0.003	0.001	0.003	0.002	0.003	0.001	0.002	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.003	0.001	0.004	0.001	0.003	0.001	***	***
RMSE ³ (kg/d)	0.18	0.04	0.25	0.05	0.22	0.05	0.19	0.05	0.25	0.04	0.22	0.05	0.18	0.03	0.24	0.06	0.21	0.06	NS	***
Peak milk ⁴ (kg)	3.57	0.47	4.81	0.71	4.19	0.59	3.56	0.44	4.75	0.68	4.28	0.83	3.59	0.50	4.86	0.73	4.37	0.90	*	***
Peak time ⁵ (d)	63.51	25.65	69.46	37.33	66.49	31.49	77.73	45.07	67.81	32.26	68.89	29.72	57.80	24.11	60.56	33.26	59.50	30.04	***	NS
S _N ⁶ (kg)	712.25	147.60	962.42	201.67	837.34	174.64	723.99	148.53	976.65	220.74	850.32	184.64	701.92	147.12	951.36	185.47	826.64	166.30	NS	***
S _N ⁷ (kg)	766.28	164.17	1,053.92	232.29	910.10	198.23	780.75	165.60	1,069.68	255.55	925.21	210.58	753.54	163.07	1,041.65	212.87	897.60	187.97	NS	***
N	7.59	1.30	7.38	1.47	7.49	1.39	7.53	1.28	7.44	1.51	7.48	1.41	7.64	1.33	7.33	1.45	7.45	1.41	NS	NS
L (%)	6.02	2.38	7.43	3.50	6.73	2.94	6.19	2.75	7.51	3.66	6.97	3.37	5.87	2.01	7.36	3.39	6.79	3.02	NS	***

Signification codes: ≤0.001: '***', 0.01: '**', 0.05: '*', NS : not significant.

◆ Number of lactation curves

¹ Wood model (1967): a , b , and c : estimated Wood parameters, ² Perturbated Lactation Model based on Wood, ³ RMSE: root mean square error of model fit, ⁴ peak milk = $a \cdot \left(\frac{b}{c}\right)^b \cdot e^{-b}$, ⁵ peak time = $\frac{a}{b}$, ⁶ total milk based on the PLM perturbed lactation curve: $S_N = \sum_{t_0}^{t_1} y(t)$, ⁷ total milk based on the PLM unperturbed lactation curve: $S_N^* = \sum_{t_0}^{t_1} y^*(t)$, N: number of perturbation detected, L: milk yield loss

Unperturbed lactation curve

Descriptive statistics of the parameters a , b and c for the unperturbed lactation curves (for both models: PLM_N^* and Wood model) are presented in Table 2 for the overall dataset, breed and parity. The parameter a , which drives the general scaling of the curve, was not significantly different for the two breeds (Alpine: 2.49 ± 0.71 ; Saanen: 2.58 ± 0.73). Consequently, no significant breed effect was found for the peak milk or for the total unperturbed milk production. The same statistical effects were found with the Wood adjustment without perturbation. The parameter a was significantly affected by the parity of the lactation, with first lactations having a lower value for parameter a than the two and more parities (Table 2). Consequently, there was a significant parity effect on the peak milk and on the total milk production. The parameter b , which drives the curvature of the lactation curve, was significantly affected by breed. Alpine goats exhibited higher values of b compared to Saanen goats (Alpine: 0.19 ± 0.08 ; Saanen: 0.16 ± 0.07). Parity also had a significant effect on the parameter b , with first lactations having a lower value for parameter b than two and more lactations. Regarding the parameter c , which drives the rate of decrease of milk production after the peak, both parity and breed effects were highly significant. Alpine goats exhibited a same value for the parameter c than the Saanen goats (Alpine: 0.003 ± 0.001 ; Saanen: 0.003 ± 0.001). For this parameter, first lactations had a lower value than two and more lactations (Primiparous: 0.002 ± 0.001 ; Multiparous: 0.003 ± 0.001). The peak time of the unperturbed curve, resulting from both b and c parameters, was significantly affected by breed, with Saanen goats exhibiting a peak 14 days later in lactation than the Alpine goats. The statistical effects found for PLM_N^* parameters were consistent with the effects found for the Wood model (PLM_0), except for the peak time. Regarding peak time, the Wood model peak time was slightly affected by both breed and parity, while for the PLM_N^* peak time, breed had a very significant effect and parity was not significant.

Individual unperturbed lactation curves obtained with PLM_N^* for increasing parities are shown in Figure 4. Some of these individual adjusted curves were considered as atypical, in the sense they departed from the general shape of the Wood model. An individual lactation was considered “atypical” if the persistence estimated by PLM, *i.e.* the value of parameter c , was an outlier, defined as a value either 3 times above the inter-quartile range (IQR) (above the third quartile of the distribution for the c parameter) or 3 times below the IQR (below the first quartile of the distribution for the c parameter). However, it is important to note that atypical curves observed in the dataset were biologically true. A total of 18 out of the 319 analyzed curves were classified as atypical. Generally, these atypical curves come from the same goat in different parities or for primiparous that have not started the second parity. Peaks of milk of the unperturbed lactation curve were on average increased by 27.47% between the first parity and the second parity, by 9.46% between the second parity and the third parity, and by -0.29% between the third parity and the fourth parity (Figure 4). The total milk production for the unperturbed curve was increased by 32.55% between the first parity and the second parity, 5.20% between the second parity and the third parity, and by 1.01% between the third parity and the fourth parity. These results are consistent with Arnal et al. [28].

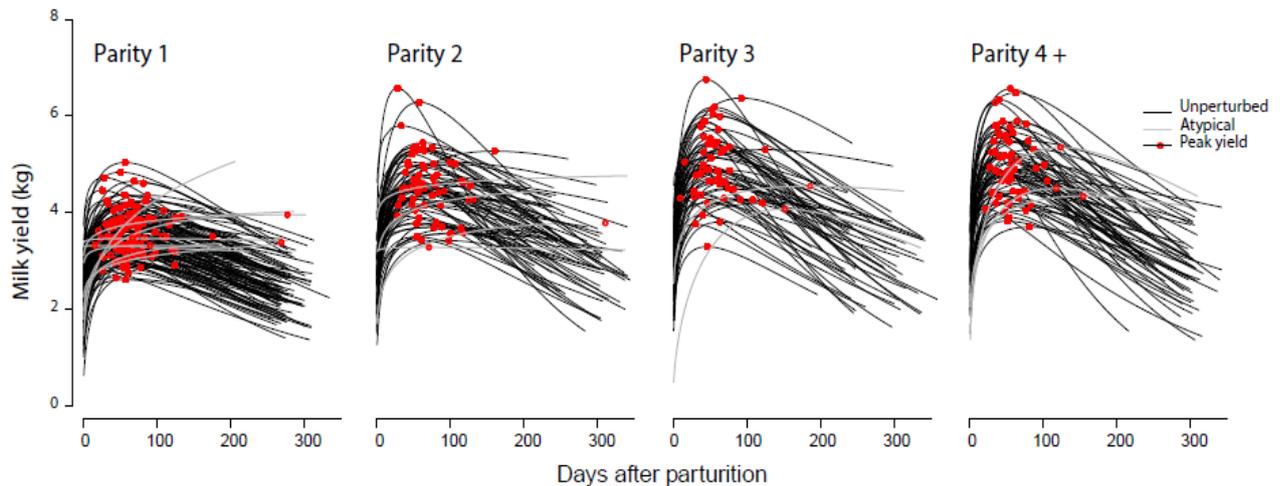


Figure 4. Individual unperturbed curves extracted from data after removal of the estimated perturbations using PLM for increasing parity number (fit on 319 lactation data; atypical curves correspond to outlying estimates of the parameter c governing milk persistency).

The Pearson linear correlation matrix by breed and parity between parameters of PLM_N^* is shown in Figure 5 (panels a and b). A strong negative correlation was found between a and b (-0.65), indicating that high values of a (scaling of the lactation curve), were associated with low values of b (shaping the curve). A positive correlation was found between the parameters c and b (0.64) indicating a positive association between the shape of the curve and the rate of decrease of lactation. Finally, a low negative correlation between c and a (-0.11) was found. These results are consistent with the well-known features of lactation curves: higher milk at peak yield being associated with higher speed of decline after peak. Several factors (*e.g.* breed, parity, seasonality, and season of kidding) can affect characteristics of the lactation curve. The differences found in this study between primiparous and multiparous goats are consistent with previous studies [28, 29] with primiparous goats being less productive, with a lower peak yield and a greater persistency. Despite the lack of a significant effect of parity, our results are consistent with previous studies [29] where primiparous goats had a peak later than multiparous (see Table 2). The strong breed effect we observed on peak time is consistent with previous studies [29] with Saanen goats having a peak yield later than Alpine goats.

Number of perturbations and milk loss

The effects of parity and breed on the total number of perturbations were not significant. Total number of perturbations was 7.59 for the primiparous, 7.38 for the multiparous, 7.45 for the Alpine and 7.47 for the Saanen. By contrast, the rate of milk yield loss after perturbation was significantly affected by the parity. A Pearson linear correlation matrix by breed and parity between PLM_N^* estimates for the number of perturbations (N), percentage loss of milk yield (L), and goodness of fit RMSE was also carried out (Figure 5, panels c and d). A positive correlation was noted between RMSE and milk loss (0.38). However, weak negative correlations between the number of detected perturbations and RMSE (-0.16), and the number of perturbations and the milk loss (-0.20) were also noted. Distributions of N , L and RMSE showed an even larger difference according to the parity than to the breeds. These results show that it is not the number of perturbations that contribute the most to the loss in milk yield over the lactation.

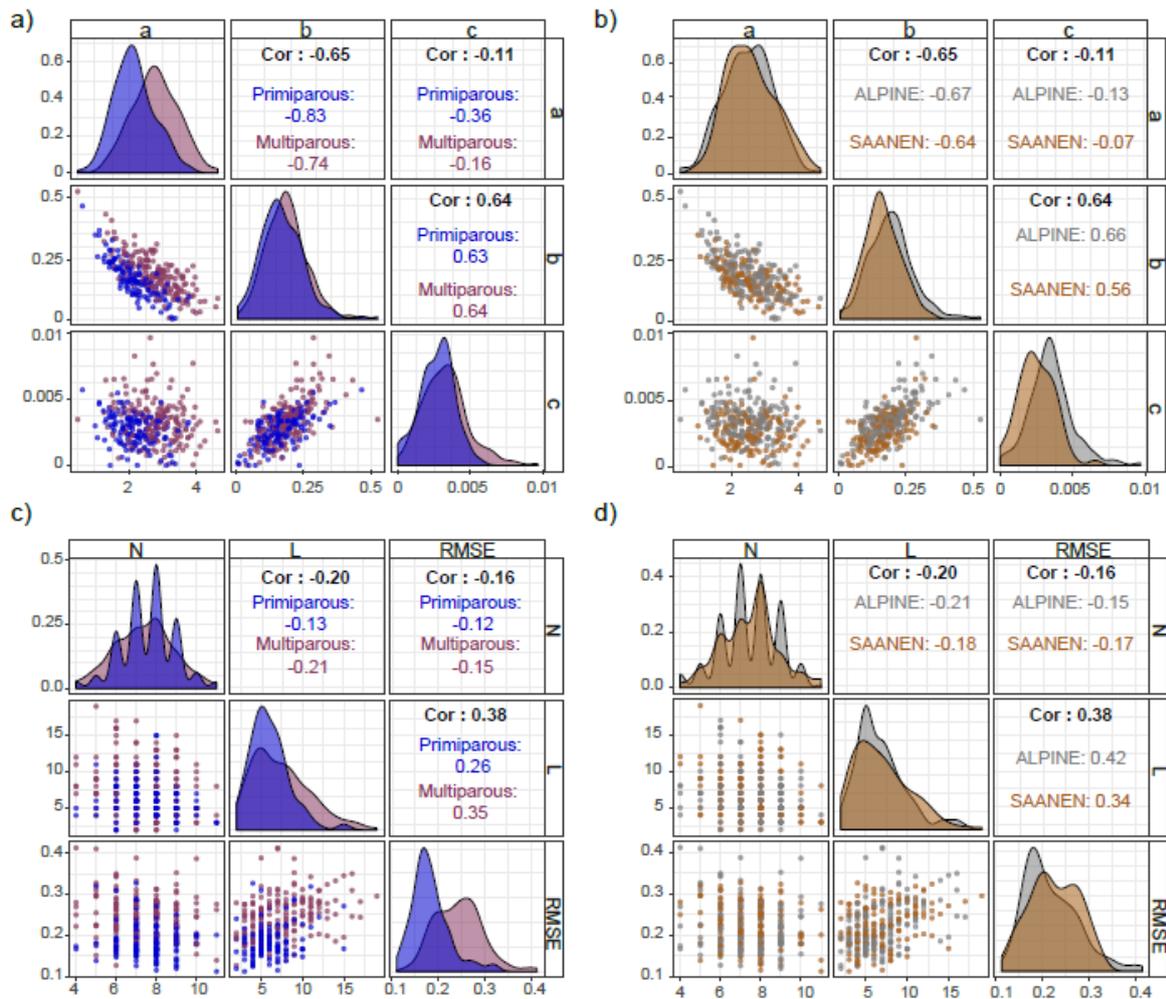


Figure 5. Pearson linear correlation matrix of PLM parameters estimates: panels (a) and (b): the *a*, *b*, *c* parameters defining the unperturbed curve (a: by parity and b: by breed). Panels (c) and (d): the number of perturbations *N*, milk loss and RMSE (c: by parity and d: by breed).

Perturbation timing and shape

Table 3 gives descriptive statistics on the parameters of PLM characterizing the 2,354 perturbations detected during the fitting procedure: time t_p , intensity k_0 , collapse speed k_1 and recovery speed k_2 according to the lactation stage determined with Grossman's model. Most of the perturbations were detected during the late stage of lactation ($n = 1,063$). The number of perturbations tended to decrease in middle stage ($n = 1,054$) and for early stage ($n = 237$). The parameter k_0 increased from early, middle and late lactation stage (Table 3). These results suggest that throughout the lactation process, perturbations become more intense. The parameter k_1 decreased from early to late stages of lactation. This suggests that perturbations tended to be sharper at the beginning of lactation, with a high speed of collapse and recovery, while they tended to be smoother than the lactation progressed

Table 3. Descriptive statistics of perturbation parameters for the 2,354 perturbations detected by the perturbed lactation model in the dairy goat lactation dataset.

Stage of lactation (2,354)						
	Early (237)		Middle(1,054)		Late (1,063)	
Perturbations	Mean	Sd	Mean	sd	Mean	sd
tp : time	33.8	34.0	107	63.0	202	60.0
k_0 : intensity	0.450	0.331	0.506	0.349	0.672	0.359
k_1 : collapse	4.01	4.17	3.41	3.87	2.76	3.69
k_2 : recovery	1.13	1.96	1.18	1.79	0.95	1.71

The PLM parameter k_0 , which drives the intensity of the perturbation, varied considerably between 0.001 and 1 (set as a boundary). The parameter k_1 (which drives the collapse speed of the perturbation), and the parameter k_2 (which drives the speed of recovery) varied between 0 and 10. A gradient according to the stage lactation was noted for these parameters. A gradual increase in k_0 and a gradual decrease in k_1 and k_2 according to early, middle and late lactation stages was noted (Table 3). In the late stage, 30.20% of the perturbations were detected with a parameter k_2 equal to 0, which implied a perturbation without any recovery period. Among these perturbations, 85.39% had a k_0 value equal to 1. On the other hand, in the early and middle stages, the perturbations detected with an k_2 equal to 0 were 1.70% and 7.07%, respectively.

DISCUSSION

Combining two types of models

In this study, we described the PLM model proposed as a tool for extracting simultaneously perturbed and unperturbed lactation curves from daily milk time-series. The key original feature of PLM is to combine an explicit representation of perturbations with a mathematical representation of the lactation curve.

Regarding the mathematical representation of the lactation curve, the structure of PLM is generic and any equation can be used to describe the general pattern of milk production throughout lactation (see appendix including Figure 4 showing illustration of results with other lactation models). The Wood model [10] was chosen in this study as it is one of the most well-known and commonly used mathematical model of lactation curve. Behind the choice of considering a general pattern of lactation that is distorted by perturbations, the biological assumption is that the dairy female has a theoretical production potential (the unperturbed curve) corresponding to the expression of its genetics in a given environment. This genetic potential may not be fully expressed in the farm environment because of perturbations (the perturbed curve).

Regarding the representation of perturbations, we chose an explicit formalism with a compartmental structure for every single perturbation. With this conceptual choice, PLM overcomes limitations of recent models developed for capturing perturbations [15–17]. It allows the capture of multiple perturbations with contrasted features: from a sharp and short drop (for instance due to a diarrhea episode) to a long and slow decrease (for instance due the gestation status). PLM also allows to determine the time at which the perturbations occur during the lactation. This last point is of great interest to add value to on-farm data where challenges imposed to animals do not result from controlled trials and arise from the farm environment.

By combining a general model of lactation curve with an explicit model of perturbations, PLM provides two key outputs: first, the unperturbed curve of the lactating female reflects its production potential in a non-perturbed environment, and second the perturbed curve which reflects the production permitted by the farm environment. The PLM parameters ($k_{0,i}$, $k_{1,i}$ and $k_{2,i}$) provides the most useful information on characteristics of the perturbed lactation curve including scale and shape for each perturbation. Indeed, by providing a perturbed curve, we give an estimate of the number of perturbations and for each perturbation an estimate of its time of start $t_{p,i}$, intensity $k_{0,i}$, collapse speed $k_{1,i}$ and recovery speed $k_{2,i}$. This not only allows PLM to be flexible in capturing different types of perturbations (*e.g.*, gestation, drying, disease), but also to produce metrics to compare the effect of these perturbations on milk yield. In such cases, and by introducing the information concerning these perturbations as an explicit component in the Wood model, we force the model to take into account these perturbations to build the unperturbed curve.

With the development of on-farm technology measurements, an interesting perspective for PLM is to be used to assess other biological time-series data, such as body weight changes, dry matter intake, and hormones dynamics during lactation.

Fitting algorithm

Beyond the original concepts behind PLM, a key methodological development has been the fitting algorithm. The number of parameters to be determined is substantially important, including the Wood parameters of the unperturbed curve (3 parameters), and PLM parameters (4 parameters for each perturbation). To overcome the difficulty of estimating a high number of parameters, a 2-step algorithm was implemented. The first step of the procedure was to determine Wood parameters and the time when the perturbation starts. The second step of the procedure was to determine PLM parameters. Another

difficulty concerned the choice of a maximum number of perturbations. After several attempts, this 2-step algorithm was selected for three main reasons. The first one was related to the visual quality of the fitting results itself. Indeed, the obtained fitted curve is always very close to what would have been drawn after simply looking at the raw data and wondering what the lactation curve would be without perturbations. This proximity to what could have been inferred was considered decisive, yet subjective. The second reason was related to the issue of finding the number of perturbations. The PLM procedure allows an automated determination of an optimal number of perturbations, without *a priori* estimates or use of an arbitrarily chosen stopping criterion. Preliminary results have showed that allowing a maximal number of 15 perturbations to be detected in the first step of the algorithm was enough for the considered dataset. The third reason pertained to the model parameters identifiability issue [22]. Since the fitting is based on a huge number of repeated fittings from which the systematically detected times of perturbations are retained, the 2-step fitting algorithm facilitates the practical identifiability of the model parameters. Indeed, the overall fitting algorithm was applied several times to the same dataset. Given that obtained parameter estimates were the same between the different runs, not only it strengthens the convergence properties of the algorithm but also it guarantees model parameters identifiability.

Fitting results (see Figure 6) have shown that, in some cases, parameter estimates characterizing an individual perturbation reached their initial upper boundaries (1 for parameter $k_{0,i}$ and 10 for parameters $k_{1,i}$ and $k_{2,i}$). This situation concerns perturbations with a narrow and deep peak-shape. By construction, the value of the parameter k_0 (intensity of the perturbation) is a proportion and thus not supposed to exceed 1. For the parameters k_1 and k_2 , a value of 10 already represents a very abrupt collapse or recovery, respectively. These results are therefore considered relevant. However, a next step may be to test the model on a larger dataset to assess the need to broaden these boundaries. Furthermore, another working step will consist in developing an application where the settings of the PLM algorithm can be user-defined. For instance, the maximal number of detectable perturbations, the size of the search grid in step one, or boundaries of parameters.

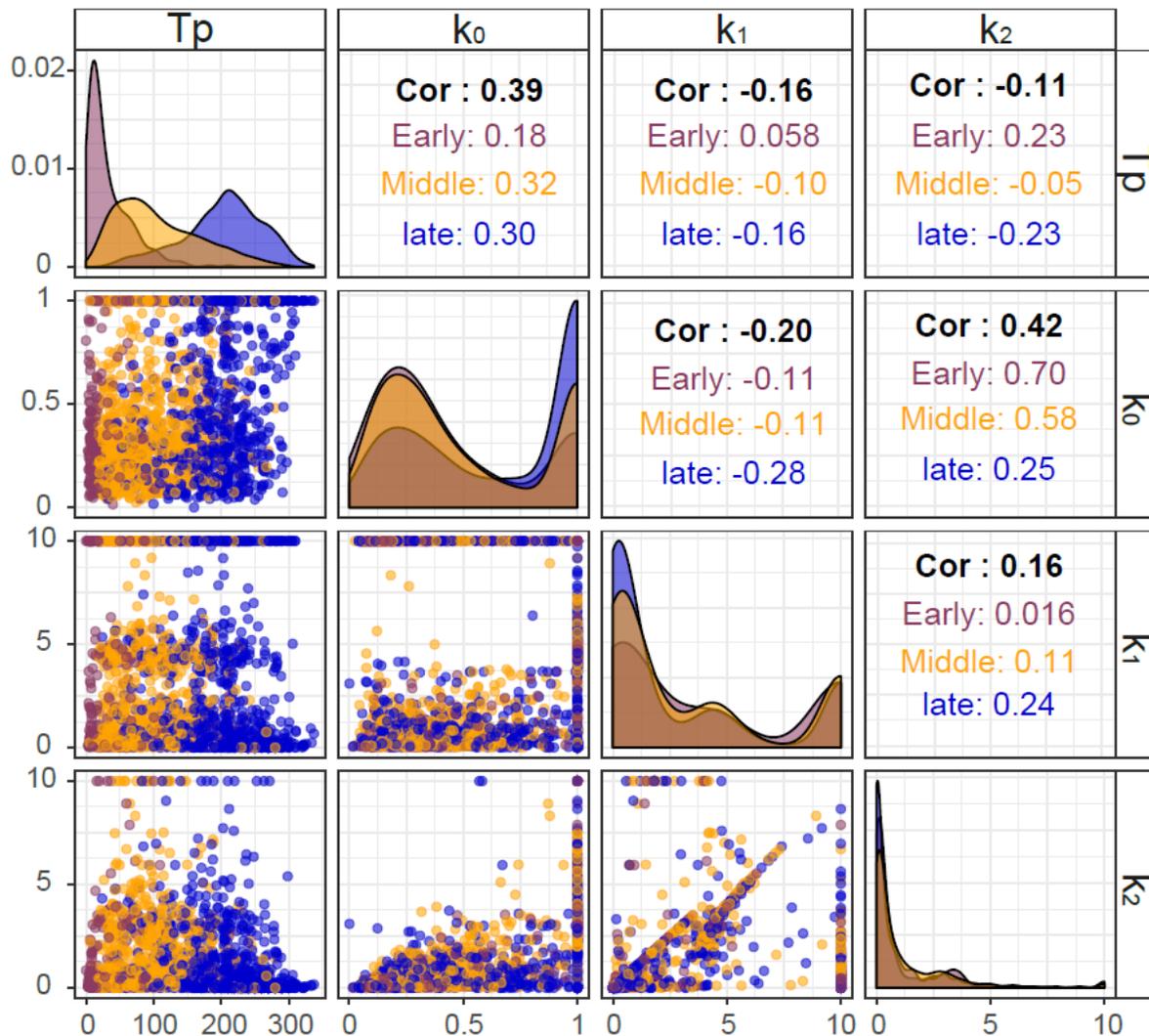


Figure 6. Pearson linear correlation matrix on the PLM parameters by stage of lactation: t_p : perturbations times detected; k_0 : intensity, k_1 : collapse and k_2 : recovery of perturbation.

Phenotyping tool

PLM was developed to improve the ability to phenotype animals by extracting biological meaningful information from raw data. The unperturbed curve fitted by PLM makes it possible to compare animals based on their potential of milk production. With this information, animals can be ranked based on the production level they would have achieved in a non-perturbed environment, instead of being ranked based on the measured production level assuming no perturbations were encountered. This ranking may be of interest for the farmer's breeding strategy, avoiding the culling of animals that have faced a challenge decreasing their production milk while still having high genetic merit.

The perturbed curve and the characteristics of each perturbation (time, intensity, collapse and recovery) open the perspective of working on perturbations as such and using this information for breeding and management. As a phenotyping tool, PLM can be useful for genetic selection. Studying characteristics of

perturbations throughout many lactations of a large number of individuals and linking them to genetic or genomic information opens perspectives to evaluate their heritability and their potential genetic impact. PLM can also be a valuable tool for on-farm management. Linking perturbations with other information on the animals, such as lactation stage, parity, gestation stage, can help to detect sensitive periods where perturbations are more likely to occur. By cross-checking information on perturbations from all animals with information on the farm environment (for instance temperature, feed availability), it would be possible to detect synchronous occurrences of perturbations and link them to farm environment or management practices during times of stress. With this better understanding of environmental effects on animal production, preventive measures on the farm could be made.

Understanding the effects of the environment on farm animals and understanding how they cope with perturbations during crucial times could help to gain insights on resilience and robustness. These complex dynamic properties are highly desirable to face the changes occurring in the livestock sector [30]. While the conceptual framework to work on resilience and robustness is now well defined in animal sciences, we still need operational metrics [31]. Such metrics have been proposed for a single perturbation by Revilla et al., [15] and Sadoul et al. [17]. Taking into account this type of information can provide a proxy to estimate the frequency and severity of disorders such as clinical mastitis [32]. Studying perturbations in lactation curves also makes it possible to compare animals facing the same stress and detect the ones with the greatest adaptive capacities. Finally, the on-farm early detection of perturbations in milk yield can provide farmers with an alert system on udder health. Recently, Huybrechtset al. [33] tested and developed the synergistic control concept for early detection of milk abnormalities in dairy cows based on detection of shifts in milk yield per hour. Of the 49 mastitis cases, 31 cases were detected using this methodology at the same time or earlier than they were detected by the farmer.

To our knowledge, existing metrics for dropped milk yields per day in the lactation curve, as proposed by Elgersma et al. [11], are based on a variance approach applied to the whole curve. Fluctuations in milk yield are summarized with a single statistical measure. Complementary to this type of approach, PLM can decompose the whole curve and characterize each perturbation, with metrics that are consistent with the concept of resilience of each and subsequent perturbation. The PLM model offers a way of quantifying the consequences of external factors and exploring hypotheses about the biological types of responses due to specific perturbations. By giving a biological meaning to these parameters, we can reconcile a phenotyping tool with the opportunity of an explanatory selection approach.

A major limitation of PLM results in its dependency to the quality of data. Indeed, if data are recorded with a low accuracy (due to technical problems of measurements), the outputs of PLM do not have consistency as detected perturbations have nothing to do with perturbations of the lactation curve, but are related to accuracy problem. In addition, PLM has been developed with daily records. It will be necessary to evaluate if PLM can operate correctly with less frequent data. Finally, PLM is based on the concept of a theoretical unperturbed curve of milk production, considered as a potential, and used to determine deviations that reflect perturbations. This rationale for an underlying potential is debatable from a biological point of view. Nevertheless, from a strict mathematical point of view, we considered this approach as valuable to provide a tool for interpreting data. The application of PLM on other datasets from other species could provide information to further evaluate this point.

Conclusion

By combining a general description of the lactation curve with an explicit representation of perturbations, the PLM model allows the characterization of the potential effects on milk production, allowing to assess animal genetics, and the deviations induced by the environment, reflecting how animals cope with real farm conditions. The translation of raw time series data into quantitative indicators makes it possible to

compare animals' phenotypic potential and bring insights on their resilience to external factors. In that sense, PLM could be used as a valuable phenotyping tool and it contributes to provide decision solutions for dairy production that are grounded in a biologically meaningful framework. Further modelling studies should strive for integrating high throughput data analysis with such biological framework.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the team at the INRA UMR 791 Modélisation Systémique Appliquée aux Ruminants (Paris, France) experimental installation for the care of the animals and their work to provide robust performance data. Special thanks to Dr. R. Muñoz-Tamayo for his conscientious reading and meticulous corrections of the manuscript. This work was carried out with the financial support of the ANR- Agence Nationale de la Recherche – The French National Research Agency under the “Deffilait project” (ANR; project: ANR-15-CE20-0014). This preprint has been reviewed and recommended by Peer Community In Animal Science (<https://doi.org/10.24072/pci.animsci.100001>).

Conflict of interest disclosure

The authors of this preprint declare that they have no financial conflict of interest with the content of this article.

REFERENCES

1. Adriaens I, Huybrechts T, Aernouts B, Geerinckx K, Piepers S, De Ketelaere B, et al. Method for short-term prediction of milk yield at the quarter level to improve udder health monitoring. *J Dairy Sci.* 2018; 101: 10327–10336. doi:10.3168/jds.2018-14696
2. Huxley JN. Impact of lameness and claw lesions in cows on health and production. *Livestock Sci.* 2013; 156: 64–70. doi:10.1016/j.livsci.2013.06.012
3. West JW. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 2131–2144. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X
4. Friggens NC, Duvaux-Ponter C, Etienne MP, Mary-Huard T, Schmidely P. Characterizing individual differences in animal responses to a nutritional challenge: Toward improved robustness measures. *J Dairy Sci.* 2016; 99: 2704–2718. doi:10.3168/jds.2015-10162
5. Pond CM. The significance of lactation in the evolution of mammals. *Evolution.* 1977; 31: 177–199. doi:10.1111/j.1558-5646.1977.tb00995.x
6. Coulon JB, Pérochon L, Lescourret F. Modelling the effect of the stage of pregnancy on dairy cows' milk yield. *Animal Sci.* 1995; 60: 401–408. doi:10.1017/S1357729800013278
7. Dijkstra J, France J, Dhanoa MS, Maas JA, Hanigan MD, Rook AJ, et al. A Model to Describe Growth Patterns of the Mammary Gland During Pregnancy and Lactation. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 2340–2354. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76185-X

8. Grossman M, Koops WJ. Modeling Extended Lactation Curves of Dairy Cattle: A Biological Basis for the Multiphasic Approach. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 988–998. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73682-0
9. Delage J, Leroy AM, Poly J. Une étude sur les courbes de lactation. *Annales de zootechnie.* 1953. pp. 225–267.
10. Wood P. Algebraic model of the lactation curve in cattle. *Nature.* 1967;216: 164.
11. Elgersma GG, de Jong G, van der Linde R, Mulder HA. Fluctuations in milk yield are heritable and can be used as a resilience indicator to breed healthy cows. *J Dairy Sci.* 2018; 101: 1240–1250. doi:10.3168/jds.2017-13270
12. Codrea MC, Højsgaard S, Friggens NC. Differential smoothing of time-series measurements to identify disturbances in performance and quantify animal response characteristics: An example using milk yield profiles in dairy cows¹. *J Animal Sci.* 2011; 89: 3089–3098. doi:10.2527/jas.2010-3753
13. Gaddour A, Najari S, Ouni M. Dairy performances of the goat genetic groups in the southern Tunisian. *Agricultural J.* 2007; 2: 248–253. doi:aj.2007.248.253
14. Lescourret F, Coulon JB. Modeling the Impact of Mastitis on Milk Production by Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1994; 77: 2289–2301. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77172-1
15. Revilla M, Friggens NC, Broudiscou LP, Lemonnier G, Blanc F, Ravon L, et al. Towards the quantitative characterisation of piglets' robustness to weaning: a modelling approach. *Animal.* 2019; 1–11. doi:10.1017/S1751731119000843
16. Nguyen Ba H, Van Milgen J, Taghipoor M. A procedure to quantify the feed intake response of growing pigs to perturbations. *Animal.* 2019; 1–8. doi:10.1017/S1751731119001976.
17. Sadoul B, Martin O, Prunet P, Friggens NC. On the Use of a Simple Physical System Analogy to Study Robustness Features in Animal Sciences. Pant AB, editor. *PLoS ONE.* 2015; 10: e0137333. doi:10.1371/journal.pone.0137333
18. Casado C, Piquer O, Cervera C, Pascual JJ. Modelling the lactation curve of rabbit does: Towards a model including fit suitability and biological interpretation. *Livestock Sci.* 2006; 99: 39–49. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.05.019
19. Ruiz R, Oregui LM, Herrero M. Comparison of Models for Describing the Lactation Curve of Latxa Sheep and an Analysis of Factors Affecting Milk Yield. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 2709–2719. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75165-4
20. Beever DE, Rook AJ, France J, Dhanoa MS, Gill M. A review of empirical and mechanistic models of lactational performance by the dairy cow. *Livestock Prod Sci.* 1991; 29: 115–130.
21. France J, Thornley JH. *Mathematical models in agriculture.* Butterworths. 1984.

22. Muñoz-Tamayo R, Puillet L, Daniel JB, Sauvant D, Martin O, Taghipoor M, et al. Review: To be or not to be an identifiable model. Is this a relevant question in animal science modelling? *Animal*. 2018;12: 701–712. doi:10.1017/S1751731117002774
23. Bellu G, Saccomani MP, Audoly S, D'Angiò L. DAISY: A new software tool to test global identifiability of biological and physiological systems. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2007; 88: 52–61. doi:10.1016/j.cmpb.2007.07.002
24. Padfield D, Matheson G. nls. multstart: robust non-linear regression using AIC scores. R package version. 2018;1.
25. Akaike H. A new look at the statistical model identification, *IEEE T. Automat. Contr.*, 19, 716–723. 1974;
26. Grossman M, Hartz SM, Koops WJ. Persistency of Lactation Yield: A Novel Approach. *J Dairy Sci*. 1999; 82: 2192–2197. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75464-0
27. Martin O, Sauvant D. Metaanalysis of Input/Output Kinetics in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci*. 2002; 85: 3363–3381. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74424-X
28. Arnal M, Robert-Granié C, Larroque H. Diversity of dairy goat lactation curves in France. *J Dairy Sci*. 2018; 101: 11040–11051. doi:10.3168/jds.2018-14980
29. Gipson T, Grossman M. Lactation curves in dairy goats: a review. *Small Ruminant Research*. 1990; 3: 383–396. doi:10.1016/0921-4488(90)90019-3
30. Dumont B, González-García E, Thomas M, Fortun-Lamothe L, Ducrot C, Dourmad JY, et al. Forty research issues for the redesign of animal production systems in the 21st century. *Animal*. 2014; 8: 1382–1393. doi:10.1017/S1751731114001281
31. Friggens NC, Blanc F, Berry DP, Puillet L. Review: Deciphering animal robustness. A synthesis to facilitate its use in livestock breeding and management. *Animal*. 2017; 11: 2237–2251. doi:10.1017/S175173111700088X
32. Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, Guard CL, Hillman RB, Powers PA, et al. Path Model of Reproductive Disorders and Performance, Milk Fever, Mastitis, Milk Yield, and Culling in Holstein Cows. *J Dairy Sci*. 1985; 68: 3337–3349. doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)81244-3
33. Huybrechts T, Mertens K, De Baerdemaeker J, De Ketelaere B, Saeys W. Early warnings from automatic milk yield monitoring with online synergistic control. *J Dairy Sci*. 2014; 97: 3371–3381. doi:10.3168/jds.2013-6913

Résumé en français

La communauté microbienne ruminale permet aux ruminants de valoriser des aliments à forte teneur en fibres et de les transformer en produits de très bonne qualité nutritionnelle pour l'Homme. Cependant, cette communauté produit des gaz fermentaires comme le méthane, impliqué dans le réchauffement climatique. Une meilleure compréhension de l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote ruminal est une première étape pour optimiser l'équilibre entre la valorisation des fibres et la production de gaz à effet de serre. Ce travail de thèse est dirigé sur deux axes de recherche pour mieux comprendre l'effet de l'animal hôte sur son microbiote ruminal. Le premier axe étudie la résilience structurelle du microbiote après une perturbation de l'écosystème ruminal en fonction de la source énergétique alimentaire principale de la ration. Le second axe étudie l'effet des caractéristiques de l'animal hôte sur son microbiote, permettant de mieux comprendre la spécificité liée à l'animal hôte. Ces caractéristiques concernent principalement les flux d'entrée et de sortie de matière dans le rumen avec la description des cinétiques d'ingestion et les taux de passage de la phase solide et liquide dans le rumen. D'autres caractéristiques phénotypiques comme le poids et les critères de production ont été pris en compte. Pour répondre à ces questions, une procédure expérimentale innovante, appelée synchronisation, a été mise en place. Elle consiste, après avoir sélectionné au hasard des animaux dans un troupeau, à vider le contenu de leur rumen, à les mélanger et à réintroduire ce mélange dans le rumen de chaque animal. Cette procédure a une double fonction. La première est de créer une perturbation de l'écosystème ruminal permettant de suivre la trajectoire d'évolution des communautés microbiennes pour étudier la résilience du microbiote. La seconde est de fournir un même microbiote à l'ensemble des animaux de l'expérimentation, permettant d'étudier l'effet des caractéristiques de l'hôte sur la divergence d'évolution de ces communautés. Cette procédure a été utilisée dans trois expérimentations. La première a été réalisée avec 12 chèvres tarées nourries avec une ration à base de foin riche en fibres. La seconde a été réalisée avec 10 chèvres en lactation nourries avec une ration de production riches en glucides rapidement fermentescibles. Enfin, la dernière a été réalisée avec 6 vaches tarées nourries successivement avec deux rations, une à base de foin riche en fibres et l'autre à base d'ensilage de maïs riche en amidon. Les communautés de bactéries et d'archées ont été suivies par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. La composition des communautés microbiennes a évolué vers une structure différente de celle avant synchronisation pour les chèvres et les vaches tarées nourries avec une ration riche en fibres. Nous avons donc mis en évidence deux exemples de plasticité des microbiotes dans ces conditions. En revanche, pour les chèvres en lactation et les vaches nourries avec des rations riches en glucides rapidement fermentescibles et en amidon respectivement, les communautés microbiennes sont revenues à des compositions proches de la situation avant synchronisation, démontrant un contrôle fort de l'animal hôte sur ses communautés et illustrant la propriété de résilience. La source énergétique principale de la ration a donc une influence sur l'interrelation entre l'hôte et son microbiote ruminal. Les trajectoires d'évolution des communautés microbiennes après une perturbation de l'écosystème ruminal ont été communes au sein de chaque essai pour l'ensemble des animaux. Ces observations laissent supposer que ces trajectoires d'évolution ont un « noyau » commun davantage lié au microbiote qu'à l'hôte, indiquant qu'il existe des forces affectant les changements après la synchronisation des communautés microbiennes. Malgré cette trajectoire commune, la composition du microbiote est variable entre les animaux. Dans l'étude de l'effet des caractéristiques de l'animal hôte sur la composition du microbiote ruminal, le taux de

passage de la phase solide des contenus ruminiaux a été identifié dans les 2 essais sur chèvres alors qu'il ne l'a pas été pour l'essai sur vaches. Pour les chèvres en lactation, les cinétiques d'entrée dans le rumen ont également été mises en évidence, indiquant que les flux de matières organiques dans le rumen seraient des paramètres participant à la spécificité du microbiote lié à l'hôte. Pour autant, une importante partie de la variabilité de composition du microbiote entre individus reste inexpliquée.

Abstract in English

The rumen microbiota allows ruminants to transform feed with high fiber contents into high nutritional value products for humans. However, during feed fermentation this microbiota produces gases such as methane, which contributes to global warming. A better understanding of the relationship between the host animal and its ruminal microbiota is a first step to optimize the balance between the valorization of fibers and greenhouse gases production. This PhD project presents two research axes to better understand the effect of the host animal on its ruminal microbiota. The first axis is about the structural microbiota resilience after a ruminal ecosystem disturbance depending on the main dietary energy source of the feed. The second axis, to better understand the host specificity, is about the effect characteristics of the host on its microbiota. The characteristics measured mainly concern the input and output flow of materials in the rumen. Inputs were described with the feeding behavior, and outputs with liquid and solid passage rates. Other phenotypic characteristics were measured such as body weight and production traits. To work on these two axes, an innovative experimental procedure, called synchronization, was implemented. It consists, after having randomly selected animals in a herd for these studies, to empty the contents of the rumens, to mix them and to reintroduce this mixed rumen substrate in each animal. This procedure has a dual function. Firstly, to study ruminal ecosystem resilience by creating a disturbance allowing evaluation of the temporal trajectory of change in the microbial communities post-disturbance. Secondly, to provide the same microbiota composition to all the experimental animals, making it possible to study the effect of the characteristics of the host on the divergence in these microbial communities over time. This procedure was used in three experiments. The first was carried out on 12 dry goats fed a diet rich in fiber. The second was carried out on 10 lactating goats fed a diet rich in fast fermentable carbohydrates. The last one was carried out on 6 dry cows fed successively with two diets. The first one was rich in fiber and the second was rich in starch. Bacteria and archaea communities were studied using 16S rRNA gene sequencing. The composition of microbial communities evolved to a different structure from that before synchronization for goats and dry cows fed with high fiber content diets. These results illustrate examples of microbiota plasticity under these experiment conditions. In contrast, for lactating goats and cows fed with diets rich in fast fermentable carbohydrates and starch respectively, the microbial communities revert back to compositions close to the situation before synchronization. These results illustrate strong control of the microbial communities by the host animal, with these diets. Thus, the main energy source of the diet has an influence on the host-microbiota interaction. Within each trial, the main trajectories of evolution of microbial communities after a ruminal ecosystem disturbance were similar for all the animals. These observations suggest that these temporal trajectories of change have a common “core” more linked to the microbiota than to the host, indicating of some constraining forces affecting the changes after synchronization of the microbial communities. Despite this common trajectory, there is still variability between animals in the composition of the microbiota. The study of host characteristics on this variability highlighted that the passage rate of rumen solids was a key factor in both trials on goats after the synchronization. In lactating goats, feeding behavior has also been highlighted, indicating that the flow of organic matter in the rumen is a parameter contributing to the host specificity. However, a large part of the variability in the microbiota composition between individuals remains unexplained.

Titre : Résilience du microbiote ruminal : influence de la source d'énergie alimentaire et du phénotype chez la chèvre et la vache

Mots clés : rumen ; microbiote ; ruminant ; source énergie alimentaire ; résilience ; spécificité de l'hôte

Résumé : Une meilleure compréhension de l'interrelation entre l'animal hôte et son microbiote ruminal pourrait être une première étape afin d'optimiser l'équilibre entre la valorisation des fibres par les ruminants et leur production de méthane. Deux axes ont été étudiés au cours de cette thèse : (1) la résilience structurelle du microbiote après une perturbation de l'écosystème ruminal en fonction de la source énergétique alimentaire et (2) la spécificité du microbiote liée à l'animal hôte via l'étude des effets des flux d'entrée et de sortie de matière dans le rumen (spécifiques de l'hôte) sur la composition du microbiote. Une procédure innovante de synchronisation consistant à vider, mélanger et réintroduire le contenu des rumens dans chaque animal permet de créer une perturbation de l'écosystème ruminal et de fournir un même microbiote à tous les animaux.

Cette procédure a été utilisée dans trois expérimentations sur 12 chèvres taries, sur 10 chèvres en lactation et sur 6 vaches taries. Les bactéries et les archées ont été suivies par séquençage de l'ADN codant pour l'ARNr 16S. Les microbiotes ont évolué vers une composition différente de celle avant synchronisation pour les 2 espèces nourries avec une ration riche en fibres. En revanche, avec des rations riches en glucides fermentescibles et en amidon, les microbiotes des deux espèces sont revenus à des compositions proches de la situation avant synchronisation. La source énergétique de la ration influence la résilience structurelle du microbiote. La spécificité du microbiote liée à l'hôte vient en partie du contrôle par l'animal des flux de matière organique entrant et sortant du rumen.

Title: Rumen microbiota resilience: influence of dietary energy source and phenotype in goats and cows

Keywords: rumen; microbiota; ruminant; feed energy sources; resilience; host specificity

Abstract: A better understanding of the relationship between the host animal and its ruminal microbiota would be the first step to optimize the balance between the use of fiber in ruminant feed and methane production. Two elements of this relationship were studied in this thesis: (1) the structural resilience of the microbiota after a ruminal ecosystem disturbance depending on the dietary energy source, and (2) the microbiota host specificity linked to rumen input and output flows. An innovative procedure of synchronization was developed consisting of emptying, pooling across animals and refilling rumens with the mixed rumen contents. This creates a ruminal ecosystem disturbance and provides the same microbiota to all animals.

This procedure was used in 3 experiments on 12 dry goats, 10 lactating goats and 6 dry cows. Bacteria and archaea communities were assessed by 16S rRNA gene sequencing. The rumen microbiota evolved towards a different composition from the one before synchronization in the 2 species fed with a high fiber content diet. On the other hand, with diets rich in fast fermentable carbohydrates or starch, the microbiota of the 2 species go back to compositions close to the initial one before synchronization. Thus, the dietary energy source influences the structural microbiota resilience. A part of the microbiota host specificity is explain by the input and output flow of organic matter in the rumen.