



HAL
open science

Effet du microbiote ruminal sur l'état d'engraissement des brebis laitières en peri-partum : étude expérimentale dans le bassin du roquefort

Léa Guinard

► **To cite this version:**

Léa Guinard. Effet du microbiote ruminal sur l'état d'engraissement des brebis laitières en peri-partum : étude expérimentale dans le bassin du roquefort. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04497952

HAL Id: dumas-04497952

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04497952v1>

Submitted on 11 Mar 2024

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.

EFFET DU MICROBIOTE RUMINAL SUR L'ETAT D'ENGRAISSEMENT DES BREBIS LAITIERES EN PERI-PARTUM : ETUDE EXPERIMENTALE DANS LE BASSIN DE ROQUEFORT

THESE D'EXERCICE

pour obtenir le titre de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

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

par

GUINARD Léa

Directrice de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER

JURY

PRESIDENT :

M. Gilles FOUCRAS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

ASSESSEURES :

Mme Annabelle MEYNADIER

Professeure à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

M. Fabien CORBIERE

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITEE :

Mme Christel MARIE-ETANCELIN

Ingénieure de recherche à l'INRAE de TOULOUSE - GenPhySE

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

Liste des directeurs/assesseurs de thèse de doctorat vétérinaire

Directeur : Professeur Pierre SANS

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Pharmacologie, thérapeutique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et industrie des aliments d'origine animale*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, statistiques, modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie pathologique*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la reproduction, endocrinologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **SCHELCHER François**, *Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie médicale animale et comparée*

PROFESSEURS 1^{ère} CLASSE

- Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, anatomie pathologique*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie pathologique, animaux d'élevage*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et thérapeutique*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation animale*

PROFESSEURS 2^{ème} CLASSE

- Mme **CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des équidés et des carnivores*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et infectiologie*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la reproduction*
- Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et toxicologie*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et mathématiques*
- Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mme **PRIYENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES CLASSE NORMALE

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BRET Lydie**, *Physique et chimie biologiques et médicales*
- Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
- M. **CARTIAUX Benjamin**, *Anatomie, imagerie médicale*
- M. **COMBARROS Daniel**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Immunologie, bactériologie, pathologie infectieuse*
- Mme **DAVID Laure**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DIDIMO IMAZAKI Pedro**, *Hygiène et industrie des aliments*
- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
- M. **FERCHIOU Ahmed**, *Economie de santé des bovins*
- Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **FUSADE-BOYER Maxime**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **GAIDE Nicolas**, *Anatomie pathologique*
- Mme **GRANAT Fanny**, *Biologie médicale animale*
- Mme **JOURDAN Géraldine**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **JOUSSERAND Nicolas**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des équidés*
- Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
- M. **VERGNE Timothée**, *Santé publique vétérinaire, maladies animales réglementées*
- Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

INGENIEURS DE RECHERCHE

- M. **AUMANN Marcel**, *Urgences, soins intensifs*
- M. **AUVRAY Frédéric**, *Santé digestive, pathogénie et commensalisme des entérobactéries*
- M. **CASSARD Hervé**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CROVILLE Guillaume**, *Virologie et génomique cliniques*
- Mme **DIDIER Caroline**, *Anesthésie, analgésie*
- M. **DELPONT Mattias**, *Clinique Aviaire*
- Mme **DUPOUY GUIRAUTE Véronique**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- Mme **GAILLARD Elodie**, *Urgences, soins intensifs*
- Mme **GEFFRE Anne**, *Biologie médicale animale et comparée*
- Mme **GRISEZ Christelle**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- Mme **JEUNESSE Elisabeth**, *Bonnes pratiques de laboratoire*
- Mme **LAYSSOL-LAMOUR Catherine**, *Imagerie Médicale*
- Mme **POUJADE Agnès**, *Anatomie pathologique Vétérinaire*
- Mme **PRESSANTI Charline**, *Dermatologie vétérinaire*
- M. **RAMON PORTUGAL Felipe**, *Innovations thérapeutiques et résistances*
- M. **REYNOLDS Brice**, *Médecine interne des animaux de compagnie*
- Mme **ROUCH BUCK Pétra**, *Médecine préventive*
- Mme **SAADA Chloé**, *Gestion intégrée de la santé des ruminants*

REMERCIEMENTS AU JURY DE THESE

A Monsieur le professeur Gilles FOUCRAS,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Qui nous fait l'honneur de présider mon jury de thèse

Hommages respectueux

A Madame le professeur Annabelle MEYNADIER,

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Alimentation

Qui m'a proposé ce travail, pour votre patience et votre gentillesse

Sincères remerciements

A Monsieur le professeur Fabien CORBIERE

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie des ruminants

Qui nous a accompagné dès le début de cette expérience

Sincères remerciements

REMERCIEMENTS AUX MEMBRES INVITES

A Madame Christel MARIE-ETANCELIN

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

Laboratoire GenPhySE

Pour toutes les informations que vous m'avez fournies

Sincères remerciements

REMERCIEMENTS PERSONNELS

À mes parents, ma sœur et à mon conjoint, pour leur amour et leur soutien infailibles. Sans
eux, ce parcours n'aurait pas été possible.

Aux amis de France et d'ailleurs

Merci

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	10
Listes des tableaux	12
INTRODUCTION	14
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. La production ovine laitière	15
1. Chiffres clés	15
2. Roquefort : un fromage, une histoire et un territoire.....	16
3. De la production laitière à la transformation fromagère.....	17
a. Conduite d'élevage des brebis Lacaune	17
b. Transformation fromagère.....	19
c. Qualité de la production laitière	21
d. Facteurs de variations	22
II. Physiologie digestive	23
1. Anatomie digestive chez les ovins.....	23
a. Reticulum.....	24
b. Rumen	24
c. Omasum	26
d. Abomasum	26
2. Motricité reticulo-rumen.....	27
a. Récepteurs et régulation de la motricité digestive	28
b. Cycles ruminiaux.....	29
3. Milieu ruminal	31
III. Le microbiote ruminal	33
a. Les bactéries	33
b. Les protozoaires	44
c. Les champignons	46
d. Les archées	47
e. Les phages	47
2. Interactions entre ces organismes	49
3. Facteurs de variations du microbiote.....	49

a.	L'animal	50
b.	Pratique d'élevage.....	51
4.	Lien entre microbiote, métabolisme glucidique et performances.....	52
a.	Transformations métaboliques des glucides.....	52
IV.	Péri-partum	53
1.	Particularités péri-partum	53
a.	Déficit énergétique.....	54
b.	Exportation énergie : lipomobilisation.....	55
c.	Régulation hormonale.....	56
2.	Microbiote et péri-partum	58
a.	Transition physiologique, alimentaire et microbienne	58
b.	Microbiote et AGV.....	60
c.	Microbiote et production.....	61
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....		62
I.	Présentation de l'étude.....	62
1.	Projet SMARTER et IRMA	62
2.	Les objectifs de cette étude	62
II.	Matériel et méthodes.....	63
1.	Animaux.....	63
a.	Conduite élevage.....	63
2.	Mesures et prélèvements.....	64
a.	Plan expérimental.....	64
b.	Pesée des brebis et estimation des NEC	64
c.	Prélèvements.....	65
3.	Analyses.....	65
a.	Dosage des AGNE	65
b.	Evaluation de la concentration en AGV.....	66
c.	Evaluation du profil des acides gras du rumen	66
d.	Métabarcoding pour microbiote (Frogs).....	66
e.	Analyses statistiques	67
III.	Résultats	69
1.	Caractérisation de la lipomobilisation.....	69
2.	Microbiote et lipomobilisation.....	70
3.	Microbiote et acide gras du rumen.....	83

4.	Interactions microbiote et acides gras	85
IV.	Discussion	85
1.	Lien entre la lipomobilisation et le microbiote	85
2.	Acides gras et lipomobilisation.....	87
3.	Microbiote et acides gras	89
CONCLUSION		91
BIBLIOGRAPHIE.....		92
ANNEXES.....		98
Annexe 1 : Grille d'évaluation de la NEC des brebis laitières.....		98
Annexe 2 : Méthode de quantification des AGNE.....		99
Annexe 3 : Méthode de dosage des AGV du rumen		102
Annexe 4 : Méthode de dosage des acides gras du rumen.....		106
Annexe 5 : Mode opératoire d'extraction du microbiote au laboratoire		110
Annexe 6 : Le séquençage haut débit		114
Annexe 7 : Analyse des données issues du séquenceur par FROGS		116
Annexe 8 : Graphiques représentatifs des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen, par date.		118
Annexe 9 : Tableau de corrélation des acides gras du rumen - microbiote ruminal et affiliation par date de prélèvements		121

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1 : Répartition du cheptel ovin laitier en 2020.....	page 18
Figure 2 : Représentation simplifiée du principal système de production en brebis laitières Lacaune	page 22
Figure 3 : Période et répartition de la production laitière en pourcentage	page 22
Figure 4 : Process de fabrication du Roquefort.....	page 23
Figure 5 : Rumen de bovins	page 28
Figure 6 : Phases du cycle primaire	page 32
Figure 7 : Phases du cycle secondaire	page 33
Figure 8 : Etendue des variations du pH du rumen et systèmes tampons	page 35
Figure 9 : Schéma d'une paroi végétale.....	page 39
Figure 10 : Schéma du métabolisme des glucides pariétaux dans le rumen, d'après Van Soest, 1982	page 41
Figure 11 : Schéma de dégradations des glucides dans le reticulo-rumen.....	page 43
Figure 12 : Schéma de dégradations des matières azotées dans le reticulo-rumen.....	page 45
Figure 13 : Principales bactéries biohydrogénantes, leurs enzymes et principales voies de biohydrogénation du C18:1 (acide oléique), C18:2 (acide linoléique) et C18:3 (acide α -linoléique).....	page 46
Figure 14 : Représentation graphique des besoins exprimés en UFL et en PDI chez la brebis laitière suivant le stade physiologique	page 57
Figure 15 : Etapes d'analyse du microbiote ruminal.....	page 69
Figure 16 : Evolution moyenne des brebis laitières : 70 jours avant mise-bas au sevrage des agneaux	page 72
Figure 17 : Distribution des AGNE sanguins au 14.12.2023 (Day 1)	page 73

Figure 18 : Exploration des données de microbiote en fonction de la lipomobilisation par PCA.....	page 74
Figure 19 : Exploration des données de microbiote en fonction de la date de prélèvement par PCA	page 74
Figure 20 : Courbe ROC observée lors de l'évaluation du modèle de classification des OTUs selon la lipomobilisation	page 75
Figure 21 : Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA (2 composantes) des données de microbiote ruminal à l'échelle des OTUs en fonction de la lipomobilisation (Day all).....	page 76
Figure 22 : Représentation graphique de l'analyse PCA des acides gras du rumen en fonction de la date de prélèvements	page 87
Figure 23 : Représentation graphique de l'analyse PCA des acides gras du rumen en fonction de la lipomobilisation.....	page 87
Figure 24 : Courbe ROC observée lors de l'évaluation du modèle de classification par la sPLS-DA des acides gras du rumen selon la lipomobilisation.....	page 87

Listes des tableaux

Tableau 1 : Comparaison de la composition chimique en g/l des laits de brebis et de vache.....	page 25
Tableau 2 : Abondance relative des 3 principaux phyla entre les phases de pré-partum et de post-partum.....	page 61
Tableau 3 : Représentations graphiques des analyses sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 15.12.2023 (Day 1).....	page 77
Tableau 4 : Représentations graphiques des analyses sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 22.12.2023 (Day 2).....	page 78
Tableau 5 : Représentations graphiques des analyses sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 29.12.2023 (Day 3).....	page 79
Tableau 6 : Représentations graphiques des analyses sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 13.01.2023 (Day 4).....	page 80
Tableau 7 : OTUs discriminés par la composante 1 de l'analyse sPLS-DA avec leur significativité et les corrélations associées	page 82
Tableau 8 : Affiliations des OTUs associés à un niveau de lipomobilisation avec lipomobilisation faible : fond bleu, lipomobilisation forte : fond orange et lipomobilisation moyenne : fond gris.....	page 85

INTRODUCTION

Le microbiote, essentiel à la survie des ruminants est primordial pour convertir en énergie, en protéines et en vitamines, les fibres végétales de leur alimentation. Le microbiote est un vaste sujet d'étude. Depuis les années 80, de nombreux articles scientifiques ont été publiés comparant le microbiote de différentes espèces animales, selon certains aspects zootechniques ou encore plus récemment, en étudiant les interactions entre le microbiote ruminal et la santé humaine.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet IRMA. Elle présente une étude *in vivo* des relations entre l'évolution de l'état d'engraissement des brebis laitières, la population bactérienne ruminale et le métabolisme ruminal des acides gras sur la période du péri-partum. C'est une phase peu étudiée chez les ovins et une période de transition particulière pour la brebis et son microbiote ruminal, se caractérisant par un déficit énergétique. Cette période est cruciale car l'animal et le microbiote ruminal sont soumis à de nombreuses contraintes (diminution de la capacité d'ingestion, transition alimentaire...). Les données recueillies s'appuient sur le troupeau de race Lacaune de la station expérimentale de Lafage, dans le bassin de Roquefort.

Dans une première partie bibliographique, la filière ovine laitière en particulier celle de Roquefort sera présentée, puis des éléments de physiologie digestive des ruminants et un chapitre sur le microbiote ruminal. Dans une deuxième partie, l'expérimentation, les résultats et une discussion seront exposés.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La production ovine laitière

1. Chiffres clés

Huitième producteur mondial et deuxième producteur européen après l'Allemagne, la filière laitière française, toutes espèces confondues, représente 25 milliards de litres de lait. Les bovins laitiers représentent 97% de la production et les filières ovines et caprines 3% (CNIEL 2023).

La filière ovine laitière française se structure comme suit :

- En 2020 : 4 710 exploitations pour un cheptel national de reproducteurs de 1,54 millions de têtes.
- 296 millions de litres de lait collectés sur la campagne 2021-2022 dont 23 millions de litres transformés à la ferme.

L'une des caractéristiques de la filière ovine laitière est que 91% de l'effectif national est réparti sur 7 départements (figure 1) :

- Aveyron
- Pyrénées-Atlantiques
- Tarn
- Lozère
- La corse pour ses deux départements
- Hérault

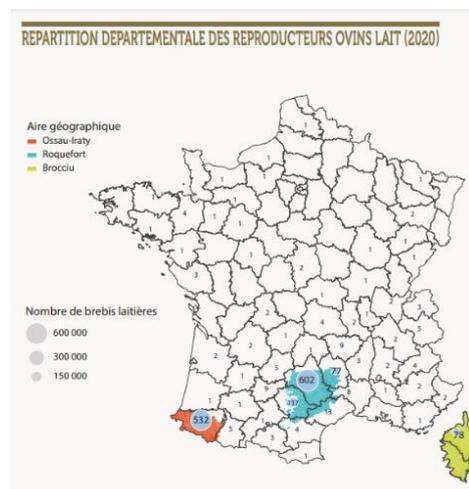


Figure 1 : Répartition du cheptel ovin laitier en 2020 (Allaix et al. 2022)

Cette filière, localisée au Sud de la France, valorise 42% de sa collecte en produits laitiers AOP. En comparaison, elle n'est que de 10% pour le lait de vache et de chèvre (CNIEL 2023).

Cette collecte du lait produit principalement 3 Appellations d'Origine protégées (AOP) et 1 Indication Géographique Protégée (IGP) :

- AOP :
 - Ossau-Iraty pour les Pyrénées-Atlantiques
 - Brocciu pour les deux départements de Corse
 - Roquefort pour les 3 autres départements
- IGP :
 - Pérail (Aveyron, Lozère, Tarn, Gard et Hérault)

Chaque production est associée à une aire géographique et à un système d'élevage spécifique (Allaix et al. 2022). En termes de volume, la production de Roquefort est la plus importante et compte :

- 1 424 exploitations et 3 400 éleveurs
- 640 000 brebis Lacaune
- 173 millions de litres de lait collectés dont 42,5% transformés en Roquefort
 - 16 tonnes de Roquefort commercialisées en 2021 : principalement en Grande et Moyenne Surface (GMS). (« Rapport d'activité 2022 de la confédération générale des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort » 2022)

2. Roquefort : un fromage, une histoire et un territoire

Le Roquefort est un fromage à pâte persillée produit exclusivement avec du lait de brebis entier et cru. Sa pâte est non pressée, non cuite etensemencée avec des spores de *Penicillium roqueforti*. Sa taille est environ de 20 cm de diamètre et 10 cm d'épaisseur pour un poids n'excédant pas les 3 kg. Ces caractéristiques proviennent du territoire sur lequel il est fabriqué (« Cahier des charges de l'appellation d'origine Roquefort » 2017).

C'est Roquefort-sur-Soulzon qui a donné son nom à ce fromage aujourd'hui mondialement connu. Il n'en a pas toujours été ainsi. Les débuts du Roquefort restent assez troubles. Un fromage était produit sur le plateau de Roquefort, à proximité du Larzac, lieu de passage intense qui contribua au rayonnement local de ce fromage. Grâce au développement du réseau routier par les romains, la notoriété du petit fromage s'étend jusqu'à conquérir Nîmes. En 400 après J.C, la chute de Rome amorce une période de troubles et d'incertitudes. Le site de production, au pied du Combalou, se fortifie et sera connu désormais sous le nom de « Rocca forta », traduit du latin par « Forteresse forte ». C'est la ville que nous connaissons sous le nom de Roquefort.

Entre le XII^{ème} et XIV^{ème} siècle, la région attire les grands ordres monastiques et militaires et, parmi eux les Templiers. Ces derniers peuplent le plateau du Larzac et réorganisent l'agriculture. L'élevage ovins sera désormais prédominant avec la production de laine, peau, viande et lait.

Par décision du roi Charles VI, les caves du Cambalou deviendront un lieu de franchise où les fromages ne pourront être saisis pour dettes favorisant ainsi la fabrication de Roquefort. Cette décision a été renforcée par Charles VII en 1457. Celui-ci rédige une charte qui institutionnalise l'affinage du fromage au Combalou. Cette charte sera renouvelée par les rois de France de François I^{er} à Louis XIV.

En plus de cette charte, en 1666 le parlement de Toulouse émet un célèbre arrêté spécifiant que pour être authentique le Roquefort doit provenir des caves du village. Ainsi naquit la première appellation d'origine protégée reconnue à l'échelle nationale. Il faudra attendre 1925 pour obtenir la première Appellation d'Origine Certifiée Roquefort (1^{ère} AOC nationale), puis 1951 où la Convention Internationale de Stresa (Italie) confère à cette appellation une renommée internationale. Enfin, le 12 Juin 1996, le Roquefort obtient l'AOP.

Pour protéger la filière Roquefort, l'aire géographique de production de lait de Roquefort est limitée à un rayon de 100 km autour de Roquefort-sur-Soulzon. Aujourd'hui, cela concerne principalement le département de l'Aveyron et une partie des départements limitrophes tels que l'Aude, la Lozère, le Gard, l'Hérault et le Tarn. Ce territoire se caractérise par des variations d'altitudes très importantes allant de 300 m à 1000 m d'altitude sur les plateaux. Il est soumis à un climat continental particulier, fortement influencé par le climat méditerranéen entraînant des périodes de sécheresse historiquement connues. Enfin, en raison d'un sol peu profond et difficile à travailler (landes et parcours), la zone a été consacrée à l'élevage ovin en particulier les brebis laitières qui valorisent ce type de terres agricoles. (« Brochure institutionnelle confédération de Roquefort » 2017)

3. De la production laitière à la transformation fromagère

a. Conduite d'élevage des brebis Lacaune

La race traditionnelle de Larzac est la brebis de race Lacaune. C'est pourquoi, l'une des exigences du cahier des charges de Roquefort impose que le lait doit provenir uniquement de

brebis de race Lacaune, âgées d'au moins 12 mois et nourries avec les fourrages locaux, produits à 75% sur l'aire géographique de production.

L'intérêt d'exploiter des brebis Lacaune est double. D'une part ce sont de très bonnes laitières avec une production moyenne de 340 litres de lait (soit près de 27 pains de Roquefort ou 73 kg de fromage) pour une lactation moyenne de 180 jours (6 mois) et d'autre part, elles sont particulièrement bien adaptées au territoire car historiquement issues du croisement de races locales, sélectionnées pour leur aptitude laitière (races de Camarès, des Causses, de Rodez, du Ségala, de Lauragaise et du Larzac).

La conduite du troupeau de Lacaune est cyclique et s'organise comme suit :

- Dès que les conditions météorologiques le permettent, les brebis vont en pâture la journée et consomment l'herbe qui est l'aliment principal. Les différentes espèces prairiales consommées participent à la qualité organoleptique du lait. Généralement en salle de traite, la ration est complétée par des céréales et un correcteur azoté.
- Mai-Juin : tonte des brebis
- Juin-Juillet : les brebis profitent des prairies temporaires de bonnes valeurs alimentaires (association graminées-légumineuses) et sont mises à la lutte pour un agnelage en Novembre-Décembre.
- Août : arrêt de la production laitière
- Novembre-Décembre : mise-bas suivie d'une période d'allaitement-traite de 28 jours jusqu'au sevrage des agneaux (13-15 kg poids vif). Les brebis allaitent et sont également traitées en raison de leur potentiel laitier supérieur aux besoins des jeunes (UPRA Lacaune 2023). L'alimentation se compose de fourrages de bonne qualité, secs ou fermentés, produits sur l'exploitation. Ils sont complétés par des céréales et équilibrés avec un correcteur azoté. L'achat d'aliment est possible mais limité à 200 kg MS/brebis/an (« Cahier des charges de l'appellation d'origine Roquefort » 2017) et depuis 2022, à 400 kg MS/brebis/an, en raison des sécheresses récurrentes (Légifrance). Les agneaux sevrés, particulièrement appréciés pour la finesse de leur chair, sont engraisés 3 mois dans des groupements de producteurs.

L'ensemble de ces périodes est représenté schématiquement dans la figure 2.

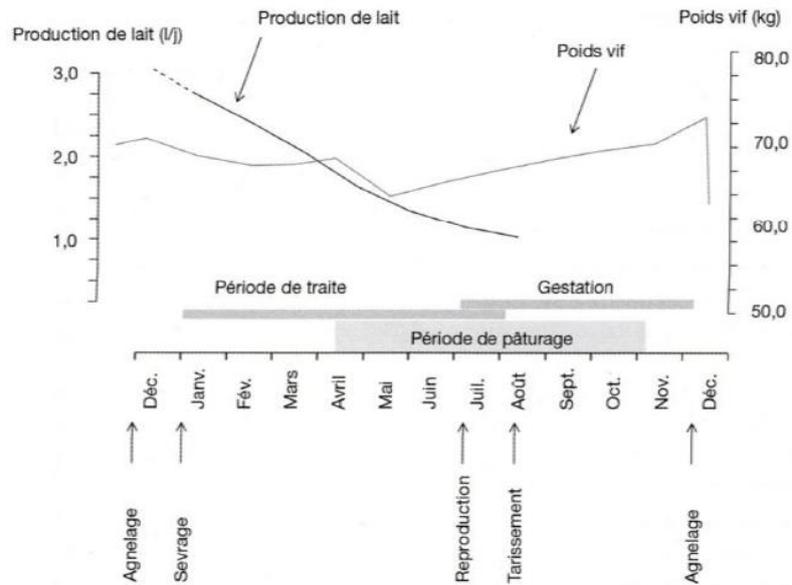


Figure 2 : Représentation simplifiée du principal système de production en brebis laitières Lacaune (INRA 2018)

b. Transformation fromagère

La transformation du lait en Roquefort se fait de Décembre à Juillet (figure 3).

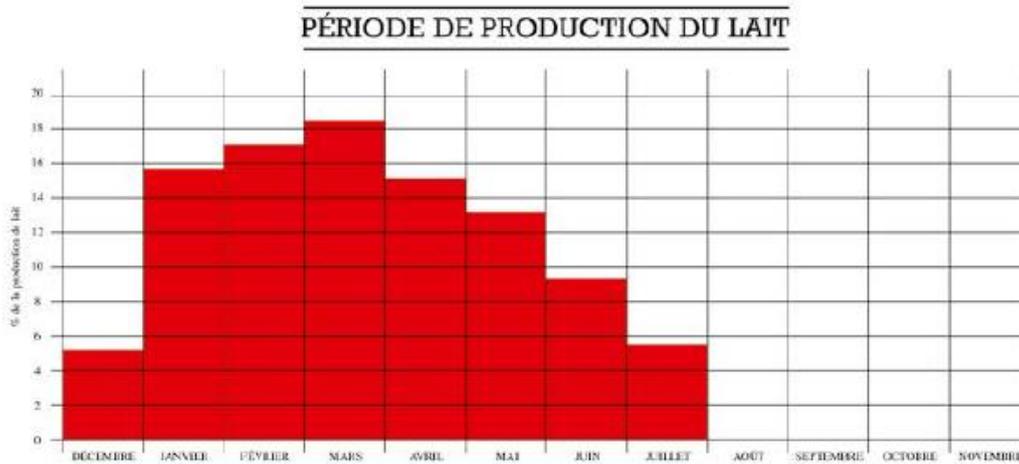


Figure 3 : Période et répartition de la production laitière en pourcentage (« Brochure institutionnelle confédération de Roquefort. 2017 »)

En système Roquefort, la traite s'effectue 2 fois par jour à 12 heures d'intervalle. Le lait est collecté tous les jours par 7 laiteries (Ets Carles, Ets Combes, Ets Gabriel Coulet, Les fromageries Occitanes, Fromagerie Papillon, Société des Caves et Ets Vernières). Il est stocké

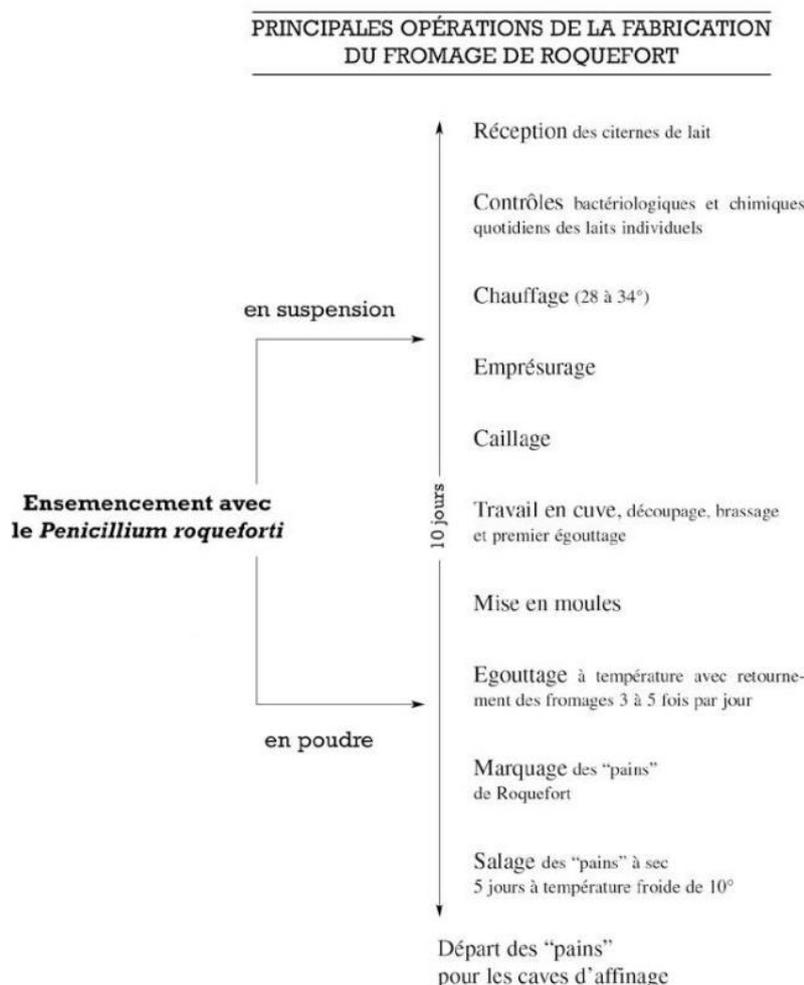
en ferme pendant 24 heures dans un tank réfrigéré à 10°C, sauf cas exceptionnel d'élevages très éloignés où le lait est conservé pendant 38 heures à 4°C.

Chaque jour, lors du ramassage du lait, un échantillon de lait est prélevé du tank puis analysé. Arrivé en laiterie, un échantillon du lait de mélange est aussi analysé.

La filtration est la première étape de transformation, elle vise à éliminer les impuretés. C'est le seul traitement physique autorisé dans le cahier des charges. Le lait est ensuite mis dans des cuves en acier inoxydable, réchauffé entre 28°C et 34°C puisensemencé. La montée en température du lait favorise à la fois :

- Le développement de ferments lactiques qui acidifient le milieu
- L'emprésurage en stimulant l'activité enzymatique de la présure (chymosine et pepsine) pour former le caillé

Selon les laiteries, le *Penicillium roqueforti* est ajouté à cette étape de montée en température



(figure 4). Ce champignon est préparé à partir de souches qui se développent naturellement dans le microclimat des caves de la commune de Roquefort-sur-Soulzon. Lorsque le lait est coagulé, il est tranché avec des « lyres » en petits cubes qui sont brassés puis moulés. D'autres artisans fromagers préfèrent ajouter le *Penicillium roqueforti* à la mise en moule. Les fromages sont ensuite égouttés sans pressage pendant 2 à 3 jours entre 16°C et 20°C, pour garder les ouvertures dans la pâte puis retournés 3 fois par jour, salés et identifiés.

Dans la majorité des cas, les fromages sont piqués avant leur

Figure 4 : Process de fabrication du Roquefort. (« Brochure institutionnelle confédération de Roquefort. 2017 »)

entrée en cave. Cette étape permet de créer d'autres cavités utiles à l'évacuation du gaz carbonique inhérent à la fermentation et au développement uniforme de *Penicillium roqueforti*. Il est à noter que le savoir-faire fromager est essentiel à l'obtention d'un Roquefort de qualité. Le lait cru n'est pas une matière première figée. Il faut s'adapter (temps de brassage, temps de coagulation, temps de découpage...) pour avoir une qualité de fromage constante tout au long de la production.

Une fois en cave, deux étapes se succèdent :

- L'affinage : les fromages restent nus pendant 2 semaines minimum pour le développement des moisissures
- La maturation : au cours de laquelle les fromages sont plombés, c'est-à-dire emballés dans une feuille d'étain pour le stabiliser et empêcher l'évolution de *Penicillium roqueforti*. Ce n'est que 90 jours minimum après leur fabrication que les fromages peuvent être commercialisés.

La maturation et l'affinage suivent des conditions strictes. En effet, les caves sont uniques, spécifiques du territoire et bénéficient d'une ventilation naturelle grâce aux fleurines. Les fleurines, « trous souffleurs » en occitan, fruit d'un phénomène géologique sont des fissures au cœur même de la montagne du Combalou. L'air s'engouffre dans les fleurines, y circule et se charge en humidité ce qui permet de maintenir les paramètres d'ambiance entre 8°C et 12°C à environ 95% d'humidité. Ces conditions sont propices au développement de *Penicillium roqueforti*, qui au cours de la maturation transformera la couleur, la texture et le goût du fromage en un bouquet particulier. Le chef de cave sondera les fromages pour suivre leur évolution (onctuosité, coloration, goût, texture...). Une fois les fromages validés, ils peuvent être commercialisés. (« Cahier des charges de l'appellation d'origine Roquefort » 2017; « Brochure institutionnelle confédération de Roquefort », 2017)

c. Qualité de la production laitière

Le lait de brebis est un lait propice à la transformation. Comparativement au lait de vache, il contient deux fois plus de matière grasse et de matière protéique. Cette dernière influence favorablement le rendement fromager. Le tableau 1 illustre les différences de compositions entre ces deux espèces :

	Lait de brebis	Lait de vache
Eau	810	870
Matière grasse (MG)	75	39
Matière protéique (MP) :	55	33
Dont caséines	44	27
Dont protéines solubles	11	6
Glucides	50	49
Minéraux	10	9

Tableau 1 : Comparaison de la composition chimique en g/l des laits de brebis et de vache (FIDOCL 2023)

La composition du lait ainsi que la qualité sanitaire (cellules somatiques, germes) sont surveillées et déterminent son prix. Pour cela, des analyses individuelles sont réalisées 4 fois par mois (« Brochure institutionnelle confédération de Roquefort. 2017 »). Pour la campagne 2021-2022, le prix de base est fixé à 1 056€/1000 litres, avec des valeurs standards de matière grasse à 66,9 g/l et matière protéique à 48,7 g/l (« Rapport d'activité 2022 de la confédération générale des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort » 2022). Tout lait non conforme est écarté de la fabrication de Roquefort.

d. Facteurs de variations

Il existe plusieurs facteurs de variations de la composition chimique du lait tels que la race, la génétique ou encore l'alimentation. C'est ce que démontre l'étude de Agabriel où les paramètres de matière grasse et de matière protéique sont directement influencés par les pratiques alimentaires (distribution, qualité des foins, part du regain dans la ration, type de concentrés utilisé) (Agabriel et al. 1993).

Outre l'alimentation, la santé ruminale, le métabolisme des acides gras de la glande mammaire et le statut énergétique de l'animal influencent également le profil de matière grasse du lait.

La digestion des acides gras est spécifique chez les ruminants domestiques et suit deux voies métaboliques :

- La voie des AGV (Acides Gras Volatils) : ce sont des acides gras à chaîne courte de type acide acétique (C2) et acide butyrique (C4) issus de la fermentation des glucides

structuraux qui sont absorbés par la paroi du rumen. Ils sont prélevés dans la circulation sanguine et synthétisés en acides gras courts et moyens du lait par la glande mammaire.

- La voie d'absorption des acides gras par l'intestin grêle : les acides gras insaturés sont majoritaires dans l'alimentation des ruminants et ont un effet négatif sur le microbiote ruminal en raison de leur toxicité. Les bactéries ruminales les biohydrogénéisent et les transforment en acides gras insaturés *cis*, *trans* puis en acides gras saturés. Ces derniers sont ensuite absorbés par l'intestin et sont prélevés par la glande mammaire pour donner les acides gras moyens et longs du lait. (Enjalbert et al. 2017)

Enfin le déficit énergétique, par la libération d'Acides Gras Non Estérifiés (AGNE) influence aussi la matière grasse du lait.

II. Physiologie digestive

1. Anatomie digestive chez les ovins

Les ovins font partie du sous-ordre des ruminants qui ont la particularité d'avoir un estomac dit « pluriloculaire » c'est-à-dire, constitué de plusieurs réservoirs. Cet estomac est très volumineux et occupe les 4/5^{ème} de la cavité abdominale. Il se compose du :

- Reticulum
- Rumen
- Omasum
- Abomasum

Les trois premiers sont les « pré-estomacs » non sécrétants et sont recouverts par un épithélium pluristratifié. L'abomasum au contraire, est l'estomac sécrétant, essentiel à la digestion enzymatique et possède lui, un épithélium glandulaire. Le rumen est de loin le plus grand des compartiments puisqu'il occupe $\frac{3}{4}$ du volume digestif total. Il est souvent associé en raison de leur proximité anatomique au reticulum, formant ainsi le reticulo-rumen.

a. Reticulum

Le reticulum est le pré-estomac le plus petit avec un volume de 1 litre chez les ovins. Il est situé dans l'abdomen crânial, en position crânio-ventrale gauche, contre le diaphragme. C'est le pré-estomac le plus crânial. Il communique à la fois avec l'œsophage par le cardia mais aussi avec l'omasum par le sillon réticulaire ou « gouttière œsophagienne ». Ce dernier est formé de deux lèvres musculeuses qui se rapprochent pour faire passer directement des liquides tels que le lait chez le jeune ou de l'eau de boisson dans le cas de soif intense, de l'œsophage à l'entrée de la caillette en passant par l'orifice réticulo-omasal. Ventralement, il est séparé de l'atrium du rumen par le pli rumino-réticulaire et dorsalement prolongé par le rumen.

Sa muqueuse est très reconnaissable car comme son nom l'indique (reticulum = résille), sa paroi a une structure en nid d'abeilles, parsemée de papilles absorbantes. Sa muqueuse est non sécrétante et les aliments les plus fins séjournent au fond des alvéoles puis passent l'orifice réticulo-omasal grâce à ses contractions (1 contraction par minute). Seules les particules de moins de 2 mm peuvent passer, les plus grosses étant repoussées vers le rumen par contraction du sphincter (Jarrige 1995; Pace 2019). Outre l'absorption et la filtration des particules, le reticulum a aussi un rôle de stockage des aliments déglutis, notamment les éléments lourds. Il sert aussi, en association avec le rumen, de lieu de fermentation microbienne.

b. Rumen

Le rumen est le compartiment le plus volumineux avec une capacité moyenne de 15 litres chez les ovins (Meynadier et al. 2019). Il occupe la partie ventrale gauche de l'abdomen.

Le rumen se compose de plusieurs parties :

- L'atrium du rumen : caudal au reticulum et séparé du reticulum par le pli rumino-réticulaire.
- Le sac ventral et le sac dorsal : ces deux parties se distinguent grâce à la présence du sillon longitudinal (figure 5) qui les délimitent et sur lequel le grand omentum s'insère. Ainsi, le rumen est un réservoir bilobé. En face interne, la muqueuse est couverte de papilles allant de 2 mm à 2 cm, plus développées dans le sac ventral. Ces papilles servent à absorber les produits terminaux de fermentation appelés AGV grâce à l'importante vascularisation de l'épithélium ruminal.

- Deux culs-de-sac, ventral et dorsal : ils sont séparés horizontalement par le sillon caudal du rumen et verticalement par les sillons coronaires.

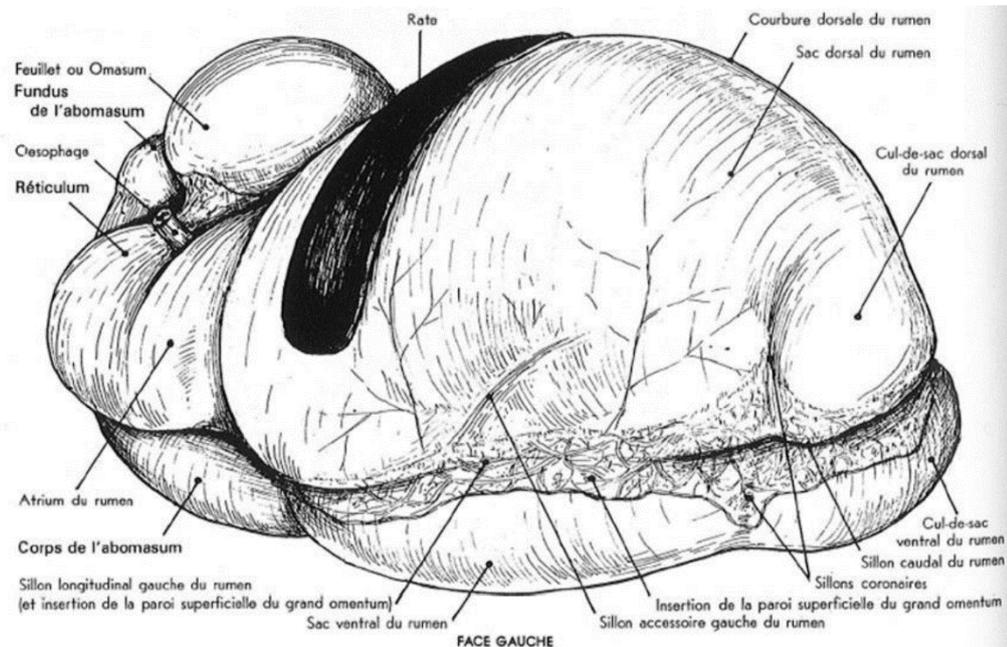


Figure 5 : Rumen de bovins (Barone et al. 1984)

La figure 5, ci-dessus, présente un rumen de bovin avec des sillons très marqués contrairement à celui des petits ruminants.

Le rumen est un compartiment de volume important, qui permet aux herbivores d'ingérer une grande quantité de fourrages avec toutefois une limite inhérente à l'encombrement du rumen et donc une régulation de type « physique ». (J.P. Dulphy et al.1983).

On constate une stratification des aliments ingérées, avec :

- Une strate gazeuse en partie dorsale du rumen, correspondant aux gaz issus des fermentations microbiennes (méthane, dioxyde de carbone...)
- Une strate solide qui correspond à la « langue de fourrages ». Il s'agit des fourrages ingérés qui s'agglomèrent en partie dorsale du rumen
- Une strate liquide en partie ventrale qui contient les fluides issus de la salivation, près de 10 litres par jour chez les ovins et de l'abreuvement soit entre 2 et 4 litres/kg MSI/jour selon le stade physiologique (Idele 2016). On retrouve aussi des petites particules alimentaires en suspension comme les fourrages dégradés saturés en fluide et des molécules en solution tels que les minéraux. L'eau dissout les éléments et facilite ainsi l'activité enzymatique microbienne.

Le rumen a donc un rôle de stockage des aliments et d'absorption des AGV issus de la fermentation microbienne. La forte musculature entourant le rumen permet le brassage des aliments et la mise en contact avec la flore ruminale. Ce brassage est régulé par le système nerveux parasympathique (nerf vague) qui coordonne la motricité ruminale ou par le système nerveux sympathique qui inhibe la motricité et qui induit l'arrêt de la digestion en cas de situation de stress.

c. Omasum

L'omasum est le dernier des pré-estomacs. Situé sous l'hypochondre droit, entre le rumen et la caillette, il possède une forme arrondie et une capacité n'excédant pas 0,5 litre (bovins : 20 litres et chèvres : 1,2 litre) (Jarrige 1995). En face interne, on distingue le canal omasique et les deux orifices :

- réticulo-omasique : permettant la communication entre le reticulum et l'omasum
- omaso-abomasique où l'omasum communique avec l'abomasum

L'omasum est constitué de lames, disposées dans le sens du transit alimentaire : les primaires pour les plus grandes, secondaires et tertiaires pour les plus petites formant ainsi un cycle laminaire. Il y en a une quinzaine chez les ovins et toutes sont recouvertes de papilles (Jarrige 1995). Cela permet d'augmenter la surface d'absorption de l'eau, des minéraux et des nutriments présents dans le contenu du reticulo-rumen.

L'omasum a plusieurs rôles tels que la régulation du transit entre le reticulo-rumen et l'abomasum. Il se dilate pour absorber les aliments du reticulum puis se contracte et les fait passer dans l'abomasum via l'ostium omaso-abomasique. Il a une action sur la régulation de la nature des aliments : les particules fibreuses vont dans les récessus et se plaquent contre les lames, tandis que les liquides sont dirigés vers le centre dans le canal omasique.

d. Abomasum

L'abomasum est le seul estomac sécrétant des ruminants. Sa zone de projection se situe dans l'abdomen ventral droit, plus précisément entre le 8^{ème} et 11^{ème} espace intercostal, caudalement à l'appendice xiphoïde. Comme chez les monogastriques, on y distingue une grande et une

petite courbure. Elles servent respectivement d'attache au grand omentum et au petit omentum. À la différence des monogastriques, on retrouve dans l'abomasum des ovins en 3 parties : le fundus, le corps et l'antrum pylorique avec une incisure angulaire.

La cavité de l'abomasum est recouverte par un épithélium simple glandulaire, de type cylindrique à pôle muqueux, qui sert à protéger la paroi de l'acide chlorhydrique et des enzymes protéolytiques produits par les cellules pariétales et les cellules principales.

Les voiles abomasiques encadrent l'ostium omaso-abomasique, avec une muqueuse proventriculaire non sécrétante du côté omasal et sécrétante du côté abomasal. Ces voiles visent à protéger l'omasum en empêchant le reflux du contenu abomasique lorsque l'ostium se relâche. Enfin, au niveau du fundus et du corps de l'abomasum, on retrouve les plis spiraux, qui sont des plis de muqueuse, obliques. Ces derniers ne s'effacent pas à la distension et sont de taille importante en regard de la grande courbure pour diminuer jusqu'à disparaître au niveau de la petite courbure. Cette organisation permet de ménager une zone de muqueuse lisse : le sillon abomasique qui relie l'orifice omaso-abomasal au pylore. Ce dernier régule le flux vers le duodénum, renforcé par la contraction du Torus pylorique (Jarrige 1995).

La muqueuse sécrétoire de l'abomasum permet de digérer les protéines et les parois bactériennes grâce à l'acide chlorhydrique, au pepsinogène et aux lysozymes.

2. Motricité reticulo-rumen

Les ruminants se sont adaptés à la digestion des fibres grâce à la fermentation microbienne du reticulo-rumen. Sa motricité permet d'optimiser la digestion des fibres à différentes étapes par le brassage, l'éructation, la rumination et le transit vers l'omasum. Le brassage favorise d'une part, l'imprégnation en eau des aliments, nécessaire à leur hydrolyse et d'autre part, le contact entre les particules alimentaires avec le microbiote. L'éructation est nécessaire à l'élimination des gaz de fermentation. La rumination réduit mécaniquement les particules longues, elle favorise également la salivation qui tamponne le milieu s'acidifiant avec les fermentations. Ces différentes phases ne sont possibles que par la motricité digestive (Jarrige 1995; Rousseau 1968).

a. Récepteurs et régulation de la motricité digestive

La régulation de la motricité digestive passe avant tout par les récepteurs, présents dans les organes digestifs. Ils induisent une stimulation ou une diminution de cette motricité et sont de plusieurs types :

- Mécanorécepteurs : présents dans la cavité buccale : lors de prise de nourriture ou de rumination, ils stimulent la motricité ruminale.
- Tensorécepteurs : localisés dans la couche musculaire du reticulo-rumen, de l'omasum, de l'abomasum et du duodénum sont des récepteurs à adaptation lente. Ils stimulent la motricité du reticulo-rumen lors de distension faible à modérée et l'inhibent lorsque cette distension est trop importante. Enfin, en cas de distension dans l'omasum, abomasum ou duodénum, les récepteurs inhibent les contractions du reticulo-rumen.
- Epithéliorécepteurs : localisés dans la muqueuse digestive, d'adaptation rapide, ces récepteurs s'activent lors des stimuli mécaniques tactiles légers et entraînent une augmentation des contractions. Ils sont également sensibles aux stimuli chimiques et entraînent une stase ruminale en cas d'acidité trop importante (ration acidogène particulièrement riche en glucides fermentescibles).

La stimulation de ces récepteurs donnent lieu aux contractions dites intrinsèques ou extrinsèques. Les contractions dites intrinsèques, n'entraînent que des contractions musculaires de faible amplitude sur l'ensemble du reticulo-rumen. Ce sont des contractions lentes qui se répètent en moyenne toutes les 20 secondes. Elles sont régulées par le système nerveux myentérique. Cette activité peut être influencée par le contenu et la pression intra-ruminale. En effet, l'augmentation de la pression au niveau du sac dorsal du rumen entraîne un accroissement de la fréquence des contractions intrinsèques (Jarrige 1995; Rousseau 1968).

Au contraire, les contractions extrinsèques, elles, sont coordonnées par le centre moteur des pré-estomacs, au sein du noyau du nerf vague. Elles font intervenir les efférences vagales, de nature cholinergique. Le nerf vague coordonne la motricité ruminale et permet la contraction du réseau (Jarrige 1995). Ces contractions sont cycliques, coordonnées et interviennent environ toutes les 60 secondes au sein de la paroi du reticulo-rumen (Rousseau 1968).

Ces contractions s'organisent, se répètent et forment les cycles primaires, les cycles secondaires et les cycles de rumination.

b. Cycles ruminiaux

Les pré-estomacs chez les ruminants sont innervés par :

- Le système nerveux parasympathique (nerf vague) qui coordonne la motricité
- Le système nerveux sympathique qui peut seulement inhiber cette motricité
- Le système nerveux intrinsèque qui permet seulement des contractions locales non organisées

L'ensemble se coordonne et permet deux modalités de contraction : les cycles primaires et les cycles secondaires.

- Le cycle primaire commence par une contraction biphasique du réseau (figure 6). Chez les ovins, le relâchement du réseau entre ces deux contractions est partiel (Ruckebusch et Kay 1971). La contraction progresse dans le sac dorsal, vers la partie caudale du rumen puis elle revient au niveau du reticulo-rumen crânial via les piliers et se termine par la contraction du cul de sac ventral. Le cycle primaire a une durée d'environ 20 secondes.

Chez les ovins, ce cycle peut se poursuivre par la contraction du sac dorsal et se poursuit dans le sens caudo-crânial au niveau du sac ventral. Cette légère variation intervient lorsque le cycle secondaire est présent soit 1 fois tous les 2 cycles primaires (Jarrige 1995).

Cycle primaire

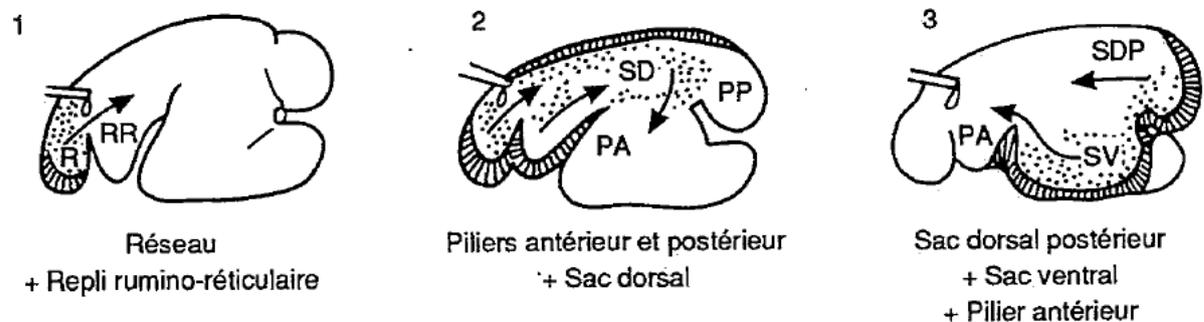


Figure 6 : Phases du cycle primaire (Jarrige 1995)

Lors de la rumination, l'extracontraction vient se greffer au début du cycle primaire, juste avant la contraction biphasique du réseau. Cette phase est nécessaire à la régurgitation du bol alimentaire en élevant le niveau du contenu alimentaire à hauteur du cardia et à l'augmentation de la pression intra-ruminale, afin de faire passer le bol mérycique du réseau vers l'œsophage. Cette phase est coordonnée par le centre de la rumination (faisant partie de la Formation Réticulée Activatrice) au sein du tronc cérébral.

- Les cycles secondaires (figure 7) permettent l'éructation, même si chez les ovins, l'éructation peut se produire au moment d'une contraction réticulaire (Jarrige 1995). Ces cycles permettent l'évacuation des gaz tels que le dioxyde de carbone, méthane, azote et hydrogène. Ces contractions suivent les cycles primaires et leur fréquence augmente en fin de repas.

À l'inverse des cycles primaires, les cycles secondaires démarrent caudalement et se terminent crânialement. Le mécanisme est le suivant :

- La langue de fourrage et le contenu liquidien sont repoussés ventralement et les gaz sont repoussés vers l'avant
- Libéré des fibres, le cardia s'ouvre par réflexe puis les gaz passent dans l'œsophage, le sphincter œsophagien s'ouvre et le nasopharynx se ferme
- Les gaz sont expulsés. Une partie est néanmoins réinhalée, passe dans la trachée, les poumons et sont expirés. On parle d'éructation silencieuse.

Cycle secondaire

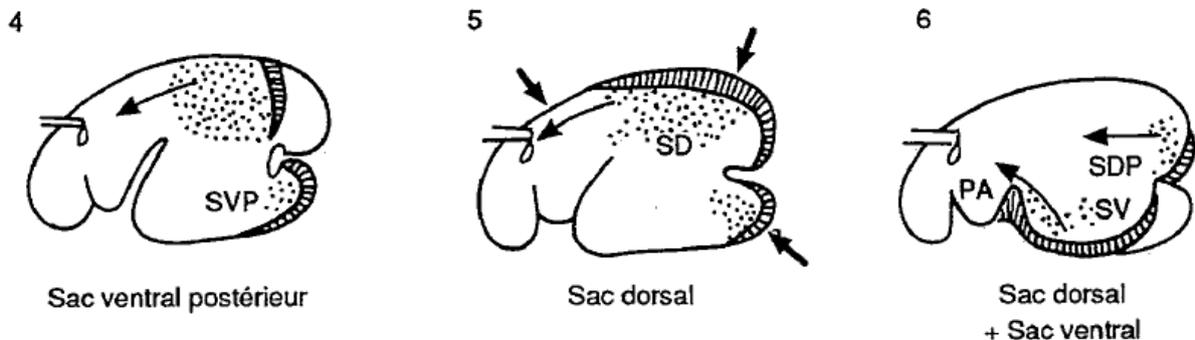


Figure 7 : Phases du cycle secondaire (Jarrige 1995)

3. Milieu ruminal

Outre la motricité, le milieu ruminal représente un lieu particulièrement favorable au développement du microbiote participant à la digestion des aliments. Ce milieu répond à plusieurs caractéristiques :

- Température comprise entre 39°C et 41°C
- Anaérobiose
- Milieu aqueux favorisant l'hydrolyse et les fermentations
- pH adapté compris entre 5,5 et 7

- Température

La température du reticulo-rumen est comprise entre 39°C et 41°C. Elle varie selon l'intensité des fermentations. Ainsi, elle augmente lors de rations riches en composés fermentescibles ou dans les heures qui suivent les repas. Elle diminue suite à l'abreuvement.

- Potentiel d'oxydo-réduction et anaérobiose

Le potentiel d'oxydo-réduction ruminal est toujours négatif (entre -300 à -500 mV à pH 7). L'absence d'oxygène est nécessaire à la survie des bactéries anaérobies strictes du rumen d'où le milieu réducteur. En cas de déséquilibre, comme lors d'acidification du milieu ou lors d'apport d'oxygène (au moment des repas ou lors de la rumination), les bactéries anaérobies facultatives corrigent les écarts de potentiel en utilisant rapidement l'oxygène introduit dans le milieu (Jarrige 1995). Cette consommation d'oxygène vise à maintenir l'activité des bactéries anaérobies.

- Eau

Le contenu ruminal est un milieu composé à 85% d'eau (Meynadier et al. 2019). Elle en est le constituant principal et provient de l'abreuvement (près de 3 litres/kg MSI/jour chez les ovins) (Idele 2016), de l'eau contenue dans les aliments et de la salivation (environ 10 litres par jour). On retrouve des petites particules alimentaires en suspension ou percolées comme les fourrages dégradés saturés en fluide et des éléments en solution tels que les minéraux. L'eau dissout et facilite l'activité enzymatique microbienne.

- pH

Le pH ruminal est un facteur essentiel à la sélection et au développement du microbiote. Comme le montre la figure 8 ci-dessous, il est compris entre 5,5 et 7 avec une valeur optimale à 6,2. Sa valeur fluctue au cours de la journée, principalement en lien avec la fermentation des aliments. D'ordinaire légèrement acide, il résulte de la somme entre les acides faibles et les bases faibles issus de l'ingéré, de la salivation et de l'activité microbienne. Les principaux acides retrouvés sont les AGV issus de la fermentation microbienne. Les bases ont deux origines : l'ammoniac, issu de la protéolyse bactérienne, les bicarbonates et phosphates de sodium d'origine salivaire. Les trois principales causes de variations du pH sont : la taille des particules, la composition de la ration et sa distribution.

En effet, plus un aliment est grossier et riche en cellulose, plus il va stimuler les récepteurs (tensorécepteurs et épithéliorécepteurs) présents dans la paroi des pré-estomacs, déclenchant les phénomènes de rumination et de salivation (INRA 2018). Le rythme de distribution influe puisque dans les heures qui suivent les repas (entre 2 et 4 heures), la valeur du pH diminue à mesure que la concentration en AGV s'accroît. Il remonte par la suite grâce aux substances tampons d'origine salivaires et à l'absorption des AGV par la muqueuse ruminale pour tendre vers la neutralité (Jarrige 1995).

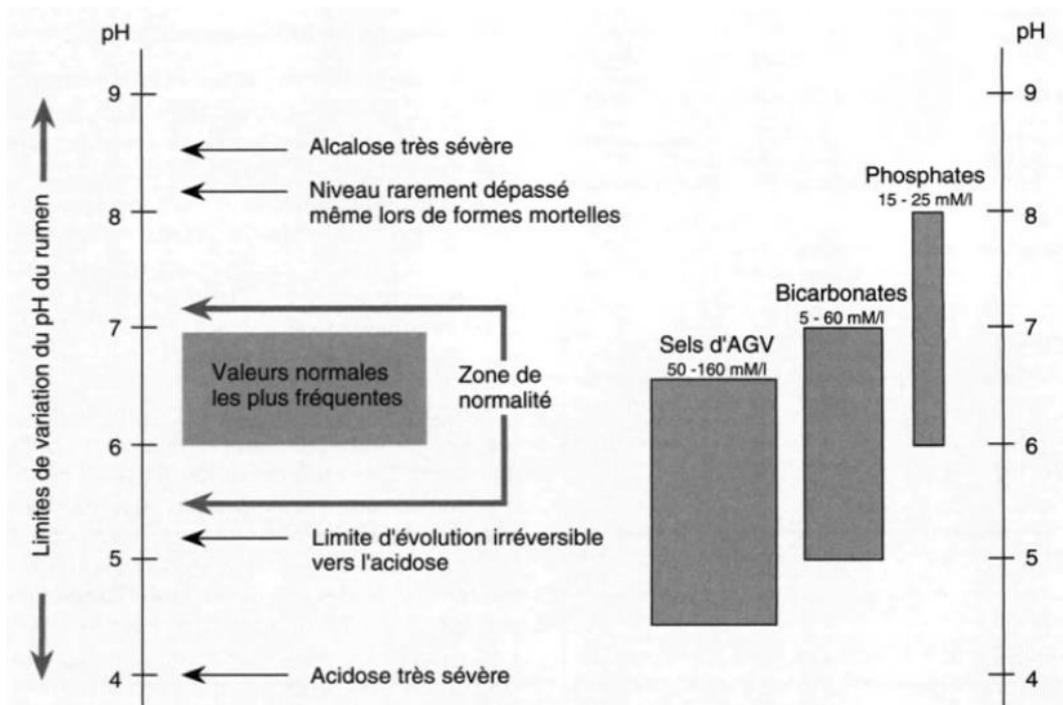


Figure 8 : Etendue des variations du pH du rumen et systèmes tampons (Jarrige 1995)

L'ensemble de ces paramètres conditionnent la santé du microbiote ruminal

III. Le microbiote ruminal

Au sein du milieu ruminal, la micro-population est particulièrement abondante et diversifiée. Les micro-organismes qui la composent sont des bactéries, des archées, des eucaryotes et des virus tels que les phages. Cet ensemble évolue en symbiose pour dégrader et fermenter la plupart des composants alimentaires. Avec près de 10^{10} à 10^{11} cellules par gramme de contenu ruminal, les bactéries, premières représentantes, assurent la majeure partie des dégradations. Viennent ensuite les eucaryotes avec les protozoaires qui comptent 10^6 cellules par gramme de contenu puis les champignons avec 10^5 zoospores par gramme de contenu.

1. Population ruminale

a. Les bactéries

À elle seule, la communauté bactérienne constitue plus de la moitié de la biomasse microbienne ruminale et compte près de 5 000 espèces différentes. La plupart de ces espèces appartiennent aux phyla des Firmicutes et des Bacteroidetes. Elle est aussi la plus active.

Les bactéries sont responsables de la majorité des fonctions métaboliques présentes dans le reticulo-rumen. 75% de ces bactéries se fixent directement sur les particules alimentaires, les 25% restant se répartissent entre l'épithélium ruminal, la surface des protozoaires, ou sont libres en suspension dans la phase liquide (Zened et al. 2021; Thivend et al. 1985). La population bactérienne a une croissance régulière et continue. Elle est régulée par deux phénomènes : la vidange ruminale (évacuation vers le reste du tube digestif) où elle est digérée (source d'acides aminés essentiels), ou par prédation par les protozoaires ruminants (INRA 2018).

Toutes les bactéries ne dégradent pas le même substrat, elles sont classées selon leur capacité de dégradation et d'utilisation des glucides, des protéines et des lipides. Ainsi, on retrouve les bactéries fibrolytiques capables de métaboliser les glucides pariétaux et les bactéries amylolytiques qui dégradent plus particulièrement l'amidon (Meynadier et al. 2019).

- Bactéries dégradant la cellulose

Leur développement et leur métabolisme sont lents. Elles ne représentent jamais plus de 25% de la population microbienne quelle que soit l'alimentation. Elles se développent avec les régimes riches en fourrages et un pH supérieur à 6-6,5. En revanche, un pH acide (<6) (Weimer 2022) leur est particulièrement défavorable, les rendant incapable d'initier leur croissance amenant à leur disparition progressive.

Les quatre espèces cellulolytiques dominantes sont :

- *Fibrobacter succinogenes* (anciennement *Bacteroides succinogenes*) : bactérie appartenant au phylum des Fibrobactériote, c'est un bacille Gram- et l'espèce la plus nombreuse allant jusqu'à 1 milliard de bactéries/ml de jus de rumen. Cette bactérie hydrolyse principalement la cellulose, l'hémicellulose et les xylanes. En effet, les produits hydrolytiques de la cellulose soutiennent son développement et sa prolifération. L'utilisation de l'hémicellulose augmente l'accès à la cellulose (Weimer, 2022). Elle fermente la cellobiose et le glucose pour produire principalement de l'acide succinique (Jarrige 1995), du C2 et de l'acide formique (Weimer 2022; Vézignol 2020).
- *Ruminococcus albus* : Appartenant au phylum des Firmicutes, cette bactérie fait partie des coques Gram+. C'est une population très nombreuse et active, qui dégrade la paroi des cellules végétales, particulièrement la cellulose et diverses hémicelluloses (Weimer, 2022), mais ne peut métaboliser le glucose. Les produits de dégradations majeurs sont le dihydrogène, le dioxyde de carbone, l'éthanol, le C2, les acides formique et lactique.
- *Ruminococcus flavefaciens* : tout comme *Ruminococcus albus*, cette espèce est un coque, de type Gram+ qui possède une importante population. Elle dégrade aussi les glucides pariétaux, particulièrement la cellulose et diverses hémicelluloses (Weimer, 2022). Certaines souches sont capables de métaboliser le glucose. Les produits de leur dégradation sont les acides succinique, formique et le lactate (Vézignol 2020).
- *Butyrivibrio fibrisolvens* : Bacille Gram-, adaptable et qui fermente un grand nombre de substrats. On la retrouve dans les rations allant du foin de luzerne (pH rumen très alcalin) aux rations riches en céréales (pH acide). Elle participe à l'hydrolyse de la paroi végétale, à la dégradation de l'amidon, à l'hydrogénation des lipides et à la protéolyse. Elle produit du C4 en grande quantité, du C2, du formate et du CO₂. In vitro, cette espèce dégrade plus rapidement l'hémicellulose que la cellulose, contrairement aux espèces ci-dessus (Jarrige 1995).

Ces quatre espèces ont des caractéristiques communes : elles sont toutes anaérobies strictes, non mobiles et ne produisent pas d'endospores. Elles sont capables de synthétiser leurs propres protéines à partir de l'ammoniac ruminal et ne requièrent qu'une faible concentration d'acides gras à chaîne ramifiée en C4 et C5 pour leur croissance (Weimer 2022).

Afin d'adhérer le plus étroitement possible à la cellulose, ces bactéries utilisent deux types de mécanismes :

- Des pilines et des protéines visqueuses appelées (« fibro-lime ») comme c'est le cas pour *F. succinogenes*
- Un glycocalix extracellulaire (composé de glucides et de protéines) et des pilines comme pour *R. albus* (Thivend et al. 1985; Weimer 2022)

Ces moyens sont essentiels pour adhérer aux particules fibreuses et sécréter un complexe enzymatique actif sur les glucides pariétaux : β glucidases. Ces enzymes clivent les liaisons β 1-4, au sein des chaînes de cellulose conduisant rapidement à la réduction des chaînes celluloses pour former des cellodextrines, de la cellulobiose (dimère du glucose) et du glucose. Ces produits intermédiaires sont eux-mêmes hydrolysés par les cellodextrinases et les β -glucosidases pour libérer du glucose (Jarrige 1995).

Il existe de nombreuses complémentarités entre les bactéries du reticulo-rumen. Les bactéries fibrolytiques valorisent les polysides des parois végétales assimilables à la fois par l'animal et par le reste du microbiote. Cependant, leur survie dépend aussi des autres types de bactéries telles que les amylolytiques ou les protéolytiques.

- Bactéries métabolisant les hémicelluloses

A la fois associées à la cellulose dans les parois cellulaires végétales, mais aussi présentes dans les graines ou tubercules comme glucides de stockage, les hémicelluloses font partie d'une vaste classe de polysaccharides non celluloses. De par leur localisation, leur structure et leur composition les hémicelluloses sont métabolisées par une grande variété d'organismes scindés en deux groupes : les bactéries cellulolytiques spécialisées (*F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvens*) et les bactéries non cellulolytiques (certaines espèces de *Prevotella*, en particulier *Prevotella ruminicola*) (Weimer, 2022). Chacune d'entre elles possède le matériel génétique pour produire des hémicellulases. *F. succinogenes* par exemple, possède 36 gènes codant pour la synthèse des hémicellulases en particulier des xylanases. *B.*

fibrisolvens, comme décrit précédemment, dégrade plus rapidement les hémicelluloses que la cellulose elle-même. Cette bactérie, plus polyvalente est également capable d'hydrolyser l'amidon et les protéines. Les *Prevotella* telles que *P. bryantii*, *P. brevis*, *P. ruminantium* et *P. albensis* sont capables de fermenter en partie les hémicelluloses.

P. ruminicola peut hydrolyser les cellodextrines et métaboliser le glucose et la cellobiose. Cette bactérie produit de l'acide succinique, de l'acide formique, du C2 et de l'acide propionique (C3) (Jarrige 1995).

- Bactéries métabolisant les pectines

Avec la lignine (polymère phénolique), la cellulose, les hémicelluloses et les pectines font parties des glucides pariétaux. Ensemble, par leur enchevêtrement, elles constituent la paroi des cellules végétales (figure 9). Les pectines, elles, constituent l'ensemble des fibres solubles (Meynadier et al. 2019) et sont présentes dans les lamelles moyennes des cellules végétales. Ce sont des polymères de polysaccharides acides (sucres oxydés) et se composent d'une chaîne principale de molécules d'acide galacturonique liées en β 1-4. Entre ces monomères s'intercalent régulièrement des molécules de rhamnosés.

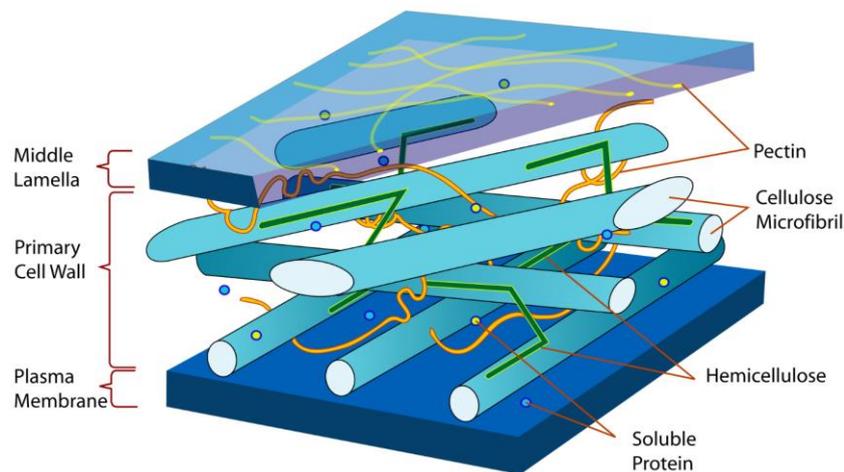


Figure 9 : Schéma d'une paroi végétale (Aquaportail 2023)

Elles sont facilement hydrolysables par les micro-organismes du rumen. Les AGV qui en sont issus sont riches en C2 et pauvres en C4 et lactate. Les bactéries responsables de leur

fermentation sont : *L. multipara*, *B. fibrisolvens*, *S. amylolytica* et *S. dextrinosolvens*, *T. bryantii*, *S. bovis* et les *Prevotella*, en particulier les souches *P.ruminicola* et *P.bryantii*.

- *Lachnospira multipara (multiparus)* : appartient au phylum des Bacillota, c'est un bacille, mobile, de type Gram+ qui dégrade la pectine. Elle est particulièrement présente dans le rumen des bovins nourris avec des légumineuses, riches en substances pectiques. Le C2 stimule sa croissance et elle peut utiliser l'ammoniac, les acides aminés ou les peptides comme source d'azote. Elle a une activité pectinestérase et pectinlyase mais pas d'activité polygalacturonasique. En association avec *Eubacterium limosum*, *L. multipara* voit sa population augmenter avec une meilleure utilisation de la pectine.
- *Streptococcus bovis* : Bactérie anaérobie, de type coque, de forme ovoïde, Gram+, non mobile. Cette bactérie est capable d'une croissance très rapide comparable à la population d'*E.coli*. Le dioxyde de carbone, la biotine et la thiamine stimulent sa croissance, l'ammoniac peut être sa seule source d'azote. Cette bactérie est aussi polyvalente, avec une large gamme de substrat. En effet, elle fermente aussi bien l'amidon contenu dans les céréales (via les amylases avec une enzyme extracellulaire active contre l'amidon brut et une enzyme intracellulaire probablement active contre l'amidon soluble), que les cellodextrines hydrosolubles dérivées de la cellulose cristalline, ou encore les sucres associés à la fraction pectique des parois cellulaires (arabinose, xylose, galactose et rhamnose). Ainsi, *S. bovis* peut survivre dans le rumen des animaux nourris avec des fourrages (Hobson et Stewart 1997).
- *Butyrivibrio fibrisolvens* : comme déjà mentionné plus haut, cette bactérie est considérée comme l'une des espèces de bactéries ruminales les plus polyvalentes sur le plan métabolique. La plupart des souches sont capables de se développer sur des sucres simples, sur les produits de dégradation solubles d'autres organismes, sur des amidons, des polysaccharides pectiques et d'autres polymères non cellulolytiques. Elle a aussi une activité protéolytique. Elle se développe néanmoins difficilement sur les parois cellulaires végétales intactes et la cellulose.
- *Prevotella ruminicola* : bactérie prédominante dans le rumen dans la plupart des régimes alimentaires. Elle a la capacité de dégrader exclusivement les composants non cellulosiques des parois cellulaires végétales (hémicellulolytique et pectinolytique) puisqu'elle joue un rôle dans la fermentation du pentose, du glucose et du cellobiose. Elle est aussi amylolytique et protéolytique (Jarrige 1995). Elles produisent du succinate, du C2, du C3 et du formate.

- *Succinomonas amylolytica* : appartient au phylum Pseudomonadota, bactérie de type Gram-, mobile et mésophile. Elle est particulièrement présente dans les rations riches en céréales associées au foin. Elle est capable de dégrader l'amidon, la pectine et de fermenter les sucres simples. Ses produits de fermentations sont du C2, du C3 et le succinate.
- *Succinivibrio dextrinosolvans* : comme pour *S. amylolytica*, cette bactérie appartient au phylum Pseudomonadota de type anaérobie, Gram-, mobile, se retrouve dans les rations riches en amidon associé au foin. Elle hydrolyse l'amidon, la pectine, les triglycérides, les protéines. Elle fermente le maltose, l'acide uronique, le fructose, le glucose et le galactose. Ses produits terminaux de fermentations sont le formate, le C2, le succinate et le lactate (Jarrige 1995)
- *Treponema bryantii* : bactérie appartenant au phylum Spirochaetes, anaérobie, de type Gram- et mobile. Elle a la capacité de dégrader la pectine, le cellobiose mais aussi les pentoses et hexoses tels que le xylose, mannose, glucose, galactose, lactose...(Hobson et Stewart 1997). Elles sont donc retrouvées dans les rations énergétiques.

La figure 10 résume le métabolisme des glucides pariétaux dans le reticulo-rumen.

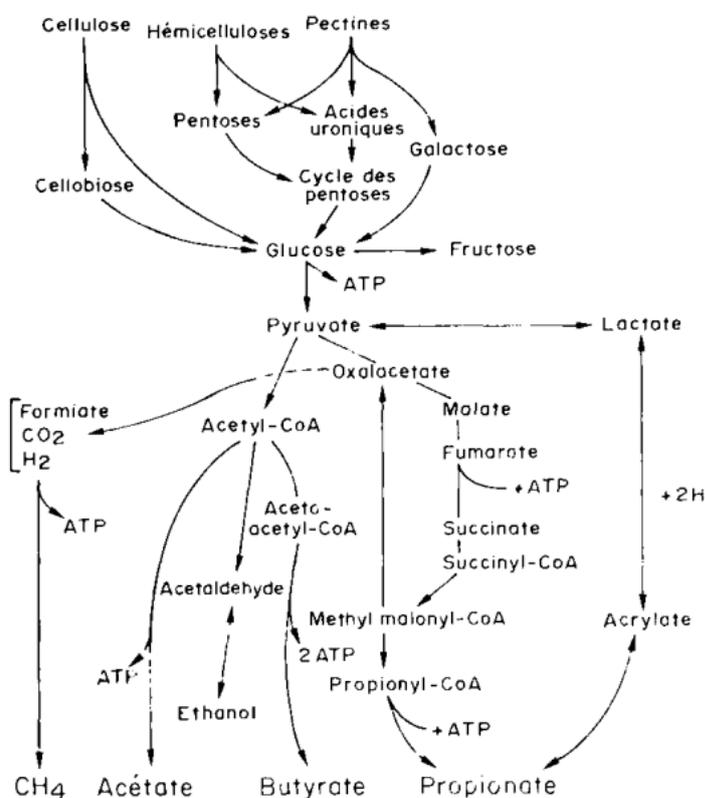


Figure 10 : Schéma du métabolisme des glucides pariétaux dans le rumen, d'après Van Soest, 1982 (Thivend et al. 1985)

- Bactérie métabolisant l'amidon

L'amidon fait partie des glucides non structuraux. Il se compose de deux polymères du glucose : l'amylose et l'amylopectine avec des liaisons de type α 1-4. C'est la forme de réserve énergétique des végétaux. Dans le rumen, l'amidon est rapidement digéré par les bactéries amylolytiques et protozoaires via :

- L'alpha-amylase libérée dans le jus de rumen. Elle découpe les chaînes d'amidon en polyholosides puis en maltose (2 glucoses)
- L'iso-amylases (dextrinases) intrabactériennes rompent les liaisons de ramification 1-6

Les bactéries peuvent agir à un pH optimum compris entre 5,5-6,6. Elle comprend *P. ruminicola* qui a un spectre d'action assez large, puis *S. ruminantium*, *S. bovis*, *R. amylophilus* et *S. dextrinosolvans*. Comme pour les bactéries fibrolytiques, ces bactéries adhèrent aux grains d'amidon via un glycocalyx. *B. fibrisolvens* est capable de dégrader l'amidon mais survit difficilement sur ce substrat et à pH faible (Jarrige 1995). Elles ont des produits de fermentation commun comme le formate, le C2, le C4 et le CO₂ pour *B. fibrisolvens*, le C3 et succinate pour *P. ruminicola*.

Les autres candidates ont un spectre plus étroit, *S. ruminantium*, *S. bovis*, *R. amylophilus* et *S. dextrinosolvans*.

- *Streptococcus bovis* : Phylum Bacillota, de type Gram+, immobile et anaérobie facultatif. C'est la principale espèce amylolytique. Son développement est extrêmement rapide lorsque les conditions lui sont favorables. Elle utilise l'amidon et ses produits d'hydrolyse (cellodextrine et pectines) qui lui permettent de survivre chez les animaux nourris avec des fourrages. Un pH acide stimule sa multiplication. Cette bactérie a un rôle clé dans l'apparition de l'acidose lactique, son développement s'accélère avec la chute du pH lui conférant un net avantage sur les autres espèces, inhibées pour la plupart. Les produits terminaux de fermentation sont le C2 et le lactate.
- *Selenomonas ruminantium* : Phylum des Firmicutes, bactérie Gam-, bacille flagellé, cette bactérie hydrolyse les protéines présentes dans le rumen et fermente les composés azotés tels que les protides et acides aminés. Elle hydrolyse aussi l'amidon et fermente les sucres qui en sont issus. Cette bactérie possède aussi des enzymes lactycolytique et reste active à pH 6-6,5 (Jarrige 1995), mais peut transformer le lactate en C3 (Hobson et Stewart 1997). Les produits terminaux de fermentations sont le C2, le C3 et le lactate.

- *Ruminobacter amylophilus* : Phylum des Pseudomonadota, bactérie anaérobie de type Gram-, elle fait partie des espèces protéolytiques les plus actives avec *B. fibrisolvans* et *P. ruminicola*. Elle dégrade aussi l'amidon et produit du C2, du formate et du succinate (Jarrige 1995).
- *Succinovibrio dextrinosolvans* : présentée précédemment.

➔ Synthèse globale des dégradations des glucides dans le reticulo-rumen (figure 11) :

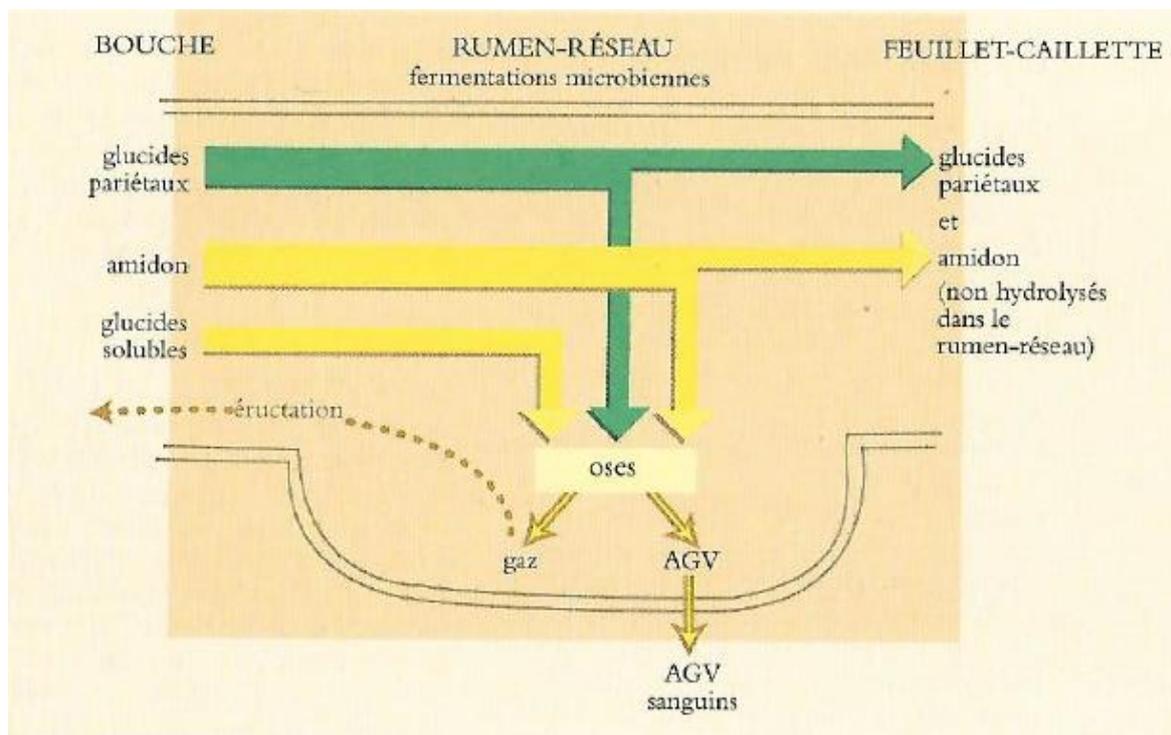


Figure 11 : Schéma de dégradations des glucides dans le reticulo-rumen ("Nutrition et alimentation des animaux d'élevage 2004")

- Bactéries métabolisant les protéines et urée

Les protéines végétales font partie de la matière azotée végétale et représentent 75% à 85% de l'azote contenue dans les plantes. Elles sont retrouvées principalement dans les graines oléagineuses, les protéagineuses ou encore dans les légumineuses (trèfles, luzerne). Dans cette catégorie, il y a deux types de protéines végétales. Il y a les protéines solubles (60%) et les protéines insolubles (40%). Les protéines solubles sont essentiellement localisées dans les chloroplastes. Elles sont facilement accessibles et leur protéolyse par les enzymes bactériennes est rapide (environ 2h). Les protéines insolubles, quant à elles, proviennent des organites

intracellulaires comme les mitochondries et les membranes. Elles sont plus difficiles d'accès et métabolisées progressivement.

Les protozoaires et près de la moitié des espèces bactériennes possèdent les capacités pour métaboliser la matière azotée ruminale grâce à leur activité protéolytique. Ils interviennent sur les protéines insolubles contenues dans des particules de grande taille ou dans les bactéries (prédation). Les bactéries protéolytiques interviennent surtout sur les protéines solubles. Ce sont principalement les bactéries amylolytiques qui réalisent la protéolyse, grâce à l'activité extracellulaire des protéases bactériennes. Les espèces bactériennes les plus actives et les plus souvent rencontrées sont *R. amylophilus*, *B. fibrisolvens* et *P. ruminicola*. Néanmoins, selon les régimes, ces bactéries peuvent être remplacées par des espèces sous-dominantes. Les enzymes protéolytiques (cystéine-protéase, sérine-protéase, métallo-protéase et aspartique-protéase) libèrent des acides aminés et des peptides. Ces derniers, en faible concentration dans le milieu peuvent être utilisés par le microbiote ruminal pour produire ses propres protéines ou sont désaminés principalement par *P. ruminicola*, *S. ruminantium*, *M. elsdenii* et *Butyrivibrio* pour former de l'ammoniac et des AGV (Jarrige 1995).

Le reste de l'azote, soit 15% à 25% est classé comme azote non protéique et correspond aux amides, aux acides aminés, ainsi que d'autres éléments tels que les bases azotées, les amines, l'ammonium (NH_4^+), l'urée et les nitrates (NO_3^-). Cet azote est principalement retrouvé dans les tiges. Les bactéries utilisent l'ammonium pour synthétiser les acides aminés, une partie de ceux-ci sera incorporée aux protéines microbiennes, les autres seront désaminés. Cela illustre bien la nécessité d'avoir un équilibre entre les populations et l'interdépendance nutritionnelle entre les micro-organismes, car la croissance des bactéries non protéolytiques (principalement fibrolytiques) est permise par la production d'ammonium par les bactéries protéolytiques (Meynadier et al. 2019).

La figure 12 synthétise les dégradations des matières azotées dans le reticulo-rumen :

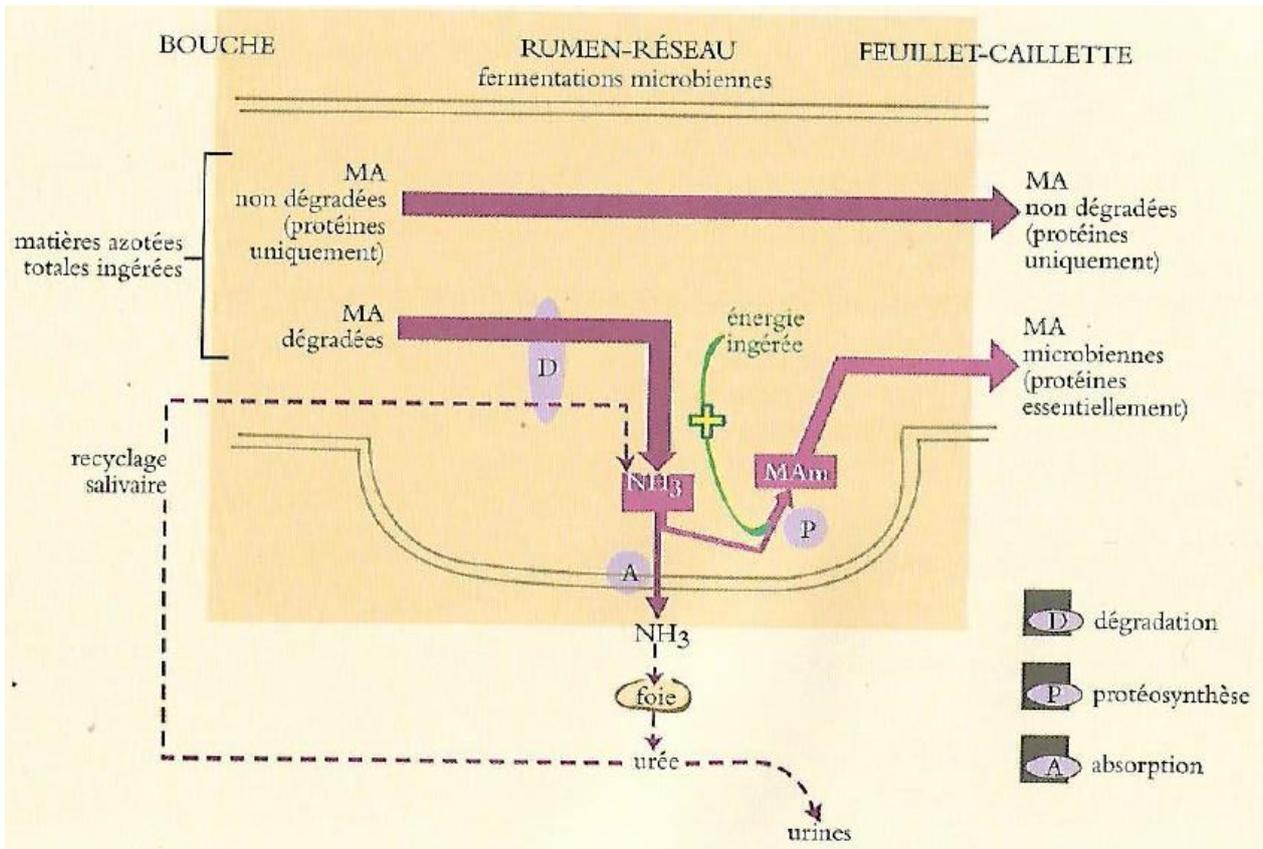


Figure 12 : Schéma de dégradations des matières azotées dans le reticulo-rumen ("Nutrition et alimentation des animaux d'élevage 2004")

- Bactéries métabolisant les lipides

L'alimentation des ruminants est pauvre en lipides. Ils représentent moins de 5% de la matière sèche (MS). Selon leur nature, les aliments peuvent être plus ou moins riches mais tous contiennent des triglycérides et des acides gras longs (>C18) et insaturés. Les plus riches sont les graines d'oléagineux et de protéagineux avec la présence d'acide α -linoléique (C18:3), d'acide linoléique (C18:2) et d'acide oléique (C18:1). Les fourrages, en particulier l'herbe, contiennent principalement trois acides gras de type acide α -linoléique (C18:3), acide linoléique (C18:2) et de l'acide palmitique (C16:0) (Enjalbert et al. 2017; Meynadier et al. 2019).

En pénétrant dans le rumen, les lipides alimentaires sont soumis à une hydrolyse complète et rapide par les lipases microbiennes : c'est la lipolyse. Au cours de cette première étape, les bactéries lipolytiques hydrolysent les triglycérides, les galactolipides et les phospholipides. Elles libèrent des acides gras libres, du glycérol, des oses et du phosphate. Tandis que les oses

et le glycérol suivent une voie différente (fermentation en AGV), les lipides subissent la deuxième phase : la biohydrogénation. Cette étape consiste à détoxifier les acides gras insaturés alimentaires *cis*, en acides gras insaturés *trans* puis en acides gras saturés via les enzymes bactériennes. La figure 13 illustre les principales voies de biohydrogénation de l'acide oléique, linoléique et linoléinique (Enjalbert et al. 2017; Meynadier et al. 2019). Dans la plupart des cas, la première réduction entraîne une disparition supérieure à 70 % de l'acide oléique, de plus de 80 % de l'acide linoléique et près de 90 % de l'acide α -linoléinique. Les réductions suivantes affectent d'abord les doubles liaisons *cis* puis *trans*. Cette dernière réduction est plus lente que les précédentes. Les acides gras *trans* (C18:1) s'accumulent dans le rumen et s'écoulent dans l'intestin grêle en quantité beaucoup plus importante que l'acide linoléique conjugué et l'acide linoléinique conjugué (Enjalbert et al. 2017). L'étude de Hobson et Stewart de 1997, montre également que le milieu ruminal s'enrichit en acide stéarique (18:0) aux dépens des acides gras alimentaires linoléique (18:2) et linoléinique (18:3) (Hobson et Stewart 1997).

En parallèle, les bactéries peuvent synthétiser des acides gras ramifiés principalement à partir des acides aminés ramifiés ou en utilisant le C3 comme précurseur (Schmidely et al. 2001).

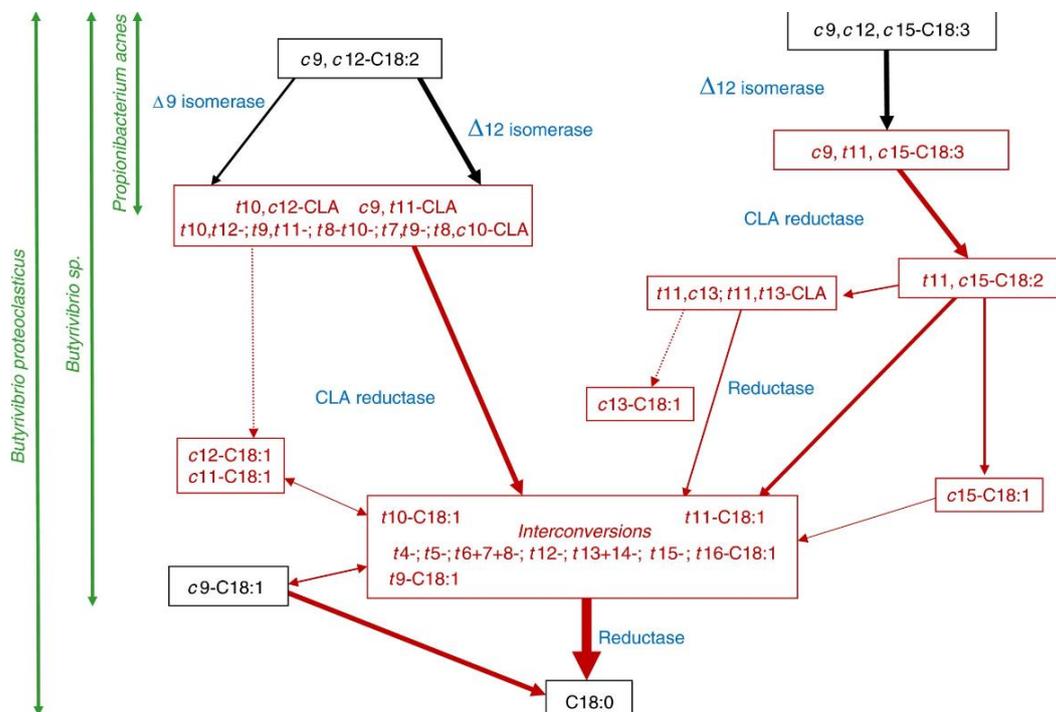


Figure 13 : Principales bactéries biohydrogénantes, leurs enzymes et principales voies de biohydrogénation du C18:1 (acide oléique), C18:2 (acide linoléique) et C18:3 (acide α -linoléinique) (Enjalbert 2017)

Parmi toutes les espèces bactériennes, seules deux ont été isolées :

- *Anaerovibrio lipolytica* : phylum Bacteroidetes, bacille de type gram-, anaérobie. Cette bactérie hydrolyse les diglycérides et les triglycérides. Les phospholipides et les galactolipides ne sont en revanche pas attaqués. Cette bactérie ne joue probablement pas un rôle important dans la digestion des lipides chez les animaux recevant des régimes fourragers riches en ces lipides.
- *Butyrivibrio fibrisolvens* : Déjà évoquée. Elle a la capacité à hydrolyser les triglycérides, les phospholipides et hydrogéner les acides gras. Elle contribue ainsi, avec le reste des bactéries ruminales et dans une moindre mesure les protozoaires, à la biohydrogénation des acides gras (Hobson et Stewart 1997).

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (phylum Proteobacteria) et *Propionibacterium acnés* (phylum Actinomycetota) ayant respectivement un pH optimal de 8 et de 7,2 à 7,5 contribuent au métabolisme des lipides alimentaires. Le *Propionibacterium acnés*, grâce à l'enzyme $\Delta 9$ isomérase, transforme la liaison *cis* en *trans* de l'acide linoléique (C18:2) et permet à la biohydrogénation de se poursuivre (Enjalbert et al. 2017).

b. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes anaérobies et unicellulaires principalement localisés dans la strate solide du rumen. Leur pH optimal de croissance est compris entre 6 et 7,6. Les protozoaires sont mobiles, flagellés ou ciliés. Leur taille est variable, allant de 4 à 15 microns pour les flagellés et de 20 à 150 microns pour les ciliés. Ils sont 20 à 100 fois plus grands que les bactéries. Les protozoaires ciliés sont séparés en deux groupes :

- Les « holotriches » : ils possèdent des cils sur toute leur surface et représentent 25% de cette population. Les rations riches en fourrages verts (herbe jeune), mélasse ou aliments concentrés qui contiennent des glucides solubles sont plutôt favorables à la famille des *Isotrichidae*. Chez les ovins et caprins, leur nombre tend à augmenter juste avant le repas et jusqu'à une heure après. L'arrivée d'aliments et de sucres solubles déclenche leur migration du réseau (lieu de fixation) vers le rumen (Jarrige 1995). Les *Isotricha* dégradent peu les glucides pariétaux mais métabolisent surtout l'amidon qui est source d'énergie et de carbone. Il a une activité complémentaire avec les autres protozoaires

tels que les *Dasytricha* qui fermentent le maltose, le galactose et l'amidon de riz. En résumé, les holotriches produisent les enzymes nécessaires à l'utilisation de la pectine, de l'amidon et sucres solubles. Ils possèdent les enzymes dégradant la cellulose et les hémicelluloses mais en moindre quantité que les entodiniomorphes.

- Les entodiniomorphes appartiennent à l'ordre des Entodiniomorpha. Ils se caractérisent par la présence de cils oraux et représentent 75% de cette population. Dans la famille des *Ophryoscolecidae*, le genre *Entodinium* est majoritaire et ce sont les plus petits et les plus simples des protozoaires (Hobson et Stewart 1997). Les rations mixtes à base de fourrages (fibres longues) et d'amidon leurs sont propices. Elles ne doivent cependant pas excéder 75% d'amidon. L'excès d'amidon entraînant une chute du pH ruminal et le broyage des aliments diminuant le temps de séjour dans le reticulo-rumen sont délétères à la population de ciliés (sauf *Entodinium* qui supporte un pH < 5 pendant plusieurs heures). Les rations riches en fourrages sont donc conservatrices. Au cours de la journée, la population d'entodiniomorphes suit une cinétique. Elle diminue les 4^{èmes} heures post-prandial, augmente jusqu'à 8 heures pour réduire ensuite. Dans un premier temps cela s'explique par un effet de dilution et par la vidange du rumen, ensuite par la stabilisation du milieu favorable à la multiplication des protozoaires. En raison de l'appauvrissement en nutriments du milieu, leur nombre décroît après 8h post-prandial (Jarrige 1995). La famille des *Ophryoscolecidae* métabolise moins bien les glucides solubles, même si les genres *Entodinium*, *Epidinium* et *Polyplastron* sont capables d'utiliser les glucides comme source d'énergie. Ils stockent les grains d'amidon au niveau des plaques squelettiques et les dégradent lentement. Leur activité principale reste néanmoins la cellulolyse. Les fibres sont ingérées par la bouche, mises en contact avec les enzymes du sac digestif puis digérées dans les vacuoles et les vésicules de l'organisme.

Les ciliés participent à la régulation des populations bactériennes en les phagocytant. Ils contribuent à l'équilibre du milieu ruminal. Ils ont une action favorable sur la synthèse d'AGV en particulier de C4, de C2 et de C3. Au niveau de la digestion azotée, les ciliés ont une action protéolytique, dégradent les protéines alimentaires (solubles ou insolubles) et les bactéries qui sont leur source de protides et d'acides aminés. Une partie est incorporée à leurs propres protéines et le reste est fermenté en ammoniac dans le milieu ruminal.

c. Les champignons

Les champignons anaérobies sont des habitants courants du tube digestif des herbivores. Ils peuvent représenter jusqu'à 20 % de la biomasse microbienne ruminale. Ils jouent un rôle clé dans la dégradation du matériel de la paroi cellulaire végétale de type lignocellulosique (Edwards et al. 2017). A ce jour, seuls 18 genres de champignons anaérobies appartenant au phylum Neocallimastigomycota et à l'ordre des Neocallimastigales ont été décrits (Zened et al. 2021). Les champignons ont une reproduction asexuée et prennent 2 formes au cours de leur existence. D'abord la forme de zoospores, mobiles et flagellés nécessaires à la colonisation du milieu, puis la forme végétative adhérente aux particules végétales.

Les champignons anaérobies sont les micro-organismes les plus efficaces pour dégrader les fibres dans le rumen. Leurs activités mécanique et enzymatique combinées à leur capacité à pénétrer les barrières structurelles des plantes s'effectue grâce à leur rhizoïde filamenteux, particulièrement performant chez *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Oipinomyces* (Edwards et al. 2017; Jarrige 1995). Quelque soit leur stade, ils produisent un grand nombre d'enzymes extracellulaires et hydrolytiques telles que : des cellulases (actives sur la cellulose cristalline ou amorphe), des hémicellulases (xylanases, cellodextrinases, glucanases...), des pectinases (Kopečný et Hodrová 1995), des amylases et des glycosidases, le tout leur permettant de libérer les polysaccharides liés à la lignine et d'accroître la quantité d'énergie disponible pour le reste du microbiote ruminal (Jarrige 1995). Bien que capable d'utiliser une grande variété de sucres, les rations très riches en glucides fermentescibles sont délétères et entraînent une chute marquée de la population (Zened et al. 2021). L'interaction syntrophique avec les archées méthanogènes augmenterait leur activité de dégradation des fibres (Edwards et al. 2017).

Même si cette activité semble limitée, les champignons anaérobies participent à la dégradation des protéines alimentaires, via une activité protéolytique (souche *Neocallimastix*) ou peptidasique. Le métabolisme lipidique et la dégradation des glucides cytoplasmiques ne sont actuellement pas bien connus. Pour l'ensemble des espèces, les produits de fermentations terminaux sont le formate, C₂, le lactate, l'éthanol, les acides gras à chaîne courte, le CO₂ et le H₂ (Jarrige 1995; Zened et al. 2021). Leur métabolisme est lent, souvent leur contribution dépend de la vitesse de vidange du rumen.

d. Les archées

Les archées ont longtemps été considérées comme des bactéries extrémophiles appartenant au groupe des eucaryotes jusqu'en 1990 où les travaux de recherche ont permis de distinguer les archées, des bactéries et eucaryotes. La population des archées est difficile à décrire car très diversifiée, en termes de morphologie et de physiologie. Leur forme peut aller de la sphère au bâtonnet, spiralée ou non, regroupée ou isolée, filamenteuse ou non. Elles peuvent être Gram+ ou Gram-, anaérobies ou aérobies, mésophiles ou hyperthermophiles (température pouvant dépasser les 100°C). Leurs besoins nutritionnels s'étendent de chimiolithoautotrophes¹ à organotrophes. Selon leurs caractéristiques, on distingue 3 phyla : Crenarcheota, Euryarcheota et Nanoarcheota.

Celles du rumen sont de type méthanogène et appartiennent au phylum Euryarcheota, dans lequel sont regroupés 5 ordres : Methanobacteria, Methanococci, Methanomicrobia et Methanopyri, Methanosarcina. Chez les ovins, c'est l'ordre des Methanomicrobia qui est le plus important alors que chez les bovins et les caprins, il s'agit de Methanobacteria. Les archées du rumen sont anaérobies strictes et principalement hydrogénotrophes, réduisant la concentration en dihydrogène (H₂) ruminal, lequel s'il est en excès, risque d'inhiber les fermentations du rumen. Chez les ruminants, elles représentent 3% de la biomasse ruminale et se localisent préférentiellement le long de l'épithélium ruminal et à la surface des protozoaires du genre *Entodinium* et *Dasytricha*. Avec les protozoaires, elles seraient responsables de 9% à 24% de la production de méthane (Popova 2012).

e. Les phages

Les phages sont des virus, des particules infectieuses composées de matériel génétique (ADN ou ARN) et d'une enveloppe externe composée de protéines. Certains de ces virus possèdent une membrane externe, ils sont classés parmi les virus enveloppés. Toute cette population virale s'appelle le virome. Ils regroupent :

¹ Chimiolithoautotrophes : « se dit d'un organisme vivant qui produit ses composés organiques sans l'aide de la lumière comme source d'énergie (chimiotrophie) et avec une source de carbone minérale (autotrophie) » (La langue française 2023).

- Les bactériophages : ciblent et infectent spécifiquement les bactéries. Ils constituent la population virale la plus nombreuse dans le rumen (5×10^7 à $1,4 \times 10^{10}$).
- Les archaeaphages : ciblent et infectent spécifiquement les archées
- Les mycophages : ciblent et infectent spécifiquement les champignons
- Les virus protozoaires : ciblent et infectent spécifiquement les protozoaires

Il y a deux catégories de phages : il y a les virus résidants (majoritaires) et les virus transitoires introduit via l'alimentation et l'abreuvement. Les virus résidants utilisent les micro-organismes ruminants pour proliférer. Ils établissent une relation symbiotique ou une relation de prédation avec les autres micro-organismes du rumen. Dans le premier cas, les phages sont intégrés dans le génome de l'hôte sous forme de prophages. Dans le deuxième cas, ils infectent par une courte association la cellule hôte qui meurt rapidement, libérant de nouveaux virions. On parle de phages lytiques. Les prophages sont deux fois plus nombreux que les phages lytiques.

Bien que généralement associés à leurs effets destructeurs sur la cellule hôte, ils peuvent aussi l'amener à évoluer et à se diversifier via le transfert horizontal de gènes.

L'infection virale est très spécifique. Certains phages ciblent et infectent uniquement une espèce ou une même souche hôte, ils sont dits monovalents. D'autres peuvent infecter plusieurs souches et sont dits polyvalents. Les virus (phages et prophages) des familles *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Mimiviridae* et *Podoviridae* seraient les plus abondants dans l'environnement ruminal. Une majorité est proportionnellement associée aux phyla bactériens du rumen (Firmicutes et Proteobacteria). Certains phages de la famille des *Siphoviridae* et *Podoviridae* sont décrits comme prédateurs des bactéries ruminales du genre *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Streptococcus*.

Les phages n'ont pas de rôle direct dans la digestion des ruminants. Ils modulent les populations bactériennes par la lyse des cellules hôtes, affectant la nutrition des ruminants par des changements dans l'écologie microbienne, modifiant la fermentation ruminale, influençant la santé des animaux et leurs performances.

Les micro-organismes impliqués dans le processus de recyclage utilisent des substrats issus de la lyse. Ces substrats sont source de nutriments pour la biomasse microbienne et ensuite valorisés par l'animal. Une étude récente suggère que la lyse des cellules hôtes bactériennes libérerait des enzymes qui peuvent contribuer à la dégradation des aliments et améliorer la fermentation ruminale (ex : fermentation des glucides). Ces résultats confortent l'idée selon

laquelle les phages présents dans le rumen peuvent influencer la lyse microbienne et le recyclage des nutriments. À ce titre, les phages sont une opportunité pour contrôler les populations méthanogènes du rumen. Ils seraient considérés comme des moteurs des cycles des nutriments et de l'énergie (Lobo et Faciola 2021).

2. Interactions entre ces organismes

Dans le milieu ruminal, de nombreuses interactions existent entre les micro-organismes. Ces interactions assurent le fonctionnement efficace des réseaux trophiques. Ce milieu forme un écosystème à part entière. On y retrouve des interactions, entre autres, de type mutualisme, commensalisme, compétition voire amensalisme. Ces interactions visent à réguler la population de manière directe par prédation ou indirecte (mutualisme, compétition, amensalisme). Les bactéries assurent les fonctions essentielles du rumen. Elles sont régulées ou aidées par d'autres organismes comme les champignons pour les fibres grossières ou par d'autres bactéries. Par exemple, la survie des bactéries fibrolytiques dépend principalement de l'activité des bactéries protéolytiques qui leur fournit l'ammoniac, indispensable à la synthèse de leurs propres protéines. Les protozoaires ont une action plus réduite mais ont surtout un rôle de régulation de la population bactérienne. Les archées permettent d'éliminer sous forme de méthane le H₂ qui serait toxique pour les bactéries.

Dans cet écosystème, chaque population métabolise des substrats différents ou communs, avec un chevauchement partiel des niches et une redondance fonctionnelle au sein du rumen. L'objectif est de transformer les végétaux en substances assimilables par l'animal comme les AGV, des acides gras, des protéines microbiennes et des vitamines (Zened et al. 2021). Le microbiote ruminal s'adapte constamment aux variations du milieu et garantit la stabilité des fermentations ruminales.

3. Facteurs de variations du microbiote

Le microbiote peut être influencé par des facteurs propres à l'animal ou inhérents aux pratiques d'élevage.

devenir plus mature et stable. La dynamique d'installation du microbiote ruminal est liée à l'âge et aux changements nutritionnels (Zened et al. 2021).

À l'âge adulte, le microbiote ruminal est un écosystème complexe, constitué d'un ensemble de microorganismes (bactéries, archée, protozoaires...) agissant en interactions et capable de transformer, par activité enzymatique, la matière végétale ingérée en produits de fermentation ou d'hydrolyse valorisable par l'animal (AGV, protéines microbiennes, acides aminés...).

- Stade physiologique :

L'étude de Pitta et al de 2014, a démontré que le stade physiologique des bovins influence le microbiote ruminal. Le passage de l'état de tarissement à lactation modifie le microbiote par un changement de rapport Bacteroidetes/Firmicutes de 6/1 à 12/1 (Pitta et al. 2014).

- Génétique :

Est un facteur de variation méconnu mais établi chez les petits ruminants. Les travaux de Christel Marie-Étancelin et al. en 2018, ont permis d'établir des variations d'abondance sur les genres bactériens en fonction de la lignée des ovins. Il a été constaté que ces genres bactériens étaient héréditaires, allant jusqu'à $h^2 > 0,25$ pour *Ruminococcaceae* UCG002, *Lachnospira*, *Atopobium* et *Oscillospira* (Marie-Etancelin et al. 2020). Il y aurait donc un contrôle génétique de la communauté microbienne, en particulier pour le genre *Ruminococcus*. Ces bactéries auraient coévolué avec leur hôte, expliquant la forte association entre la génétique de l'hôte et ce genre bactérien. Dans le cadre de la recherche sur la réduction des émissions de méthane chez les bovins, Zhang et al., en 2020, révèlent que la génétique de l'hôte a un effet sur le microbiote et qu'il peut en modifier la composition (Zhang et al. 2020).

b. Pratique d'élevage

- Alimentation :

Le principal facteur de variation du microbiote ruminal est l'alimentation. Selon sa composition et le rapport fourrages/concentrés, la population microbienne s'adapte. Ainsi les rations riches en glucides fermentescibles sont propices à la multiplication et au développement de la

communauté bactérienne amylolytique (ex : *S. bovis*, *R. amylophilus*), tandis qu'une alimentation riche en fourrages est favorable aux bactéries de type fibrolytique (ex : *F. succinogenes*, *B. fibrisolvans*). Une ration riche en glucides fermentescibles est plus à risque pour plusieurs raisons : l'acidification du milieu entraîne une diminution de la diversité des bactéries, de protozoaires et des champignons, au profit de bactéries acidophiles comme les *S. bovis*. Si le pH est inférieur à 5,6 pendant plus de 5 heures par jour, elle cause un état pathologique : c'est l'acidose ruminale. Cet état altère la structure de l'épithélium ruminal (parakératose et hyperkératose), sa physiologie, ainsi que les fonctionnalités de la micro-population et des fermentations.

La structure des acides gras présents dans la ration est un autre facteur de variation. Les végétaux contiennent des lipides, en partie constitués d'acides gras insaturés, toxiques pour les protozoaires et les bactéries fibrolytiques. En faible quantité, ces acides gras sont biohydrogénés par les lipases microbiennes pour donner des acides gras saturés, non toxiques. Dans le cas d'une ration enrichie en acides gras insaturés, les lipases sont submergées, aboutissant à une modification du microbiote digestif (Enjalbert et al. 2017).

D'autres paramètres, tels que les tanins, les levures ainsi que des éléments liés à la conduite d'élevage (taille des particules végétales, mode de distribution, type de céréales et forme de présentation) sont aussi des facteurs de variations du microbiote ruminal.

4. Lien entre microbiote, métabolisme glucidique et performances

a. Transformations métaboliques des glucides

Comme déjà évoqué, il existe une variabilité dans la production d'AGV liée à la ration : les bactéries fibrolytiques sont plutôt orientées vers le C2, les bactéries amylolytiques vers le C3 et les sucro-saccharolytiques vers le C4. Grossièrement, à partir de la fermentation d'un glucose, on obtient 70% de C2, 20% de C3 et 10% de C4 (en pourcentage molaire). Les AGV sont absorbés par l'épithélium ruminal.

Pour le C2, il est absorbé et une petite partie est transformée en C4 dans la paroi du rumen. Le reste rejoint directement la circulation générale. Au contraire, la majorité du C4 est transformée en β hydroxybutyrate (β OH). Ces corps cétoniques rejoignent le foie et la circulation sanguine. Enfin, une partie du C3 rejoint la circulation générale, le reste subit une transformation dans la

paroi ruminale pour donner du lactate et du pyruvate. Le C3 est primordial chez les ruminants car c'est le précurseur du glucose. Grâce à la néoglucogénèse, il fournit les 2/3 du glucose aux ruminants.

Arrivés au foie, les AGV fournissent les éléments indispensables au fonctionnement de la néoglucogénèse :

- C2, C3 et C4 représentent 70% de l'énergie de l'animal. Une molécule de C3 vaut 17 ATP, une molécule de C2 vaut 10 ATP et une molécule de C4 vaut 25 ATP
- C2 et C4 fournissent le β OH et l'acétoacétate, qui sont des corps cétoniques, nécessaires à la formation d'acétyl CoA. Ils sont cétoènes et pourraient contribuer à la cétose en cas d'excès ou de déficit énergétique. Ils sont les précurseurs des acides gras courts et moyens du lait
- C3 et les lactates fournissent respectivement le succinate et le pyruvate. Le C3 est glucoformateur et anti-cétoène. Il est indispensable au métabolisme lipidique et énergétique du C2 et C4, ainsi que dans diverses synthèses (lactose et glycérol). Le NADPH (voie des pentoses) est indispensable à la synthèse des acides gras du lait et du tissu adipeux.

Ces éléments entrent dans le cycle de Krebs pour fournir de l'énergie aux cellules de l'animal.

Le glucose formé depuis le C3 par la néoglucogénèse donne :

- Des acides gras (sauf dans la mamelle) du tissu adipeux
- Du lactose
- Du glycérol pour la synthèse des triglycérides

IV. Péri-partum

1. Particularités péri-partum

Chez les brebis laitières, le péri-partum (fin de gestation, parturition et début de lactation) se caractérise par des changements importants dans la physiologie et le métabolisme des nutriments. (Zhu et al. 2017).

a. Déficit énergétique

La fin de gestation est caractérisée chez les ruminants par l'augmentation des besoins et la diminution de l'ingestion. Ce phénomène s'explique par :

- L'augmentation du volume utérin inhérent au développement du/des fœtus. Chez les ovins, dans les 6 dernières semaines de gestation, le poids des fœtus augmente rapidement (INRA 2018). La hausse du volume utérin au sein de la cavité abdominale induit la réduction du volume ruminal et la capacité d'ingestion.
- L'approche de la parturition modifie le profil hormonal, en partie responsable de cette diminution d'ingestion (Caja et al. 2002).

Les besoins des brebis sont corrélés positivement au poids total de la portée. Ils s'accroissent de 50% pour une brebis avec un agneau. Pour les gestations gémellaires, les besoins doublent. La capacité d'ingestion de la brebis en fin de gestation est de 1,45 UEM (Unité d'Encombrement Mouton), soit inférieure de près de 20 % à sa valeur en début de gestation, induisant un bilan énergétique négatif. Environ 4 semaines après la mise-bas, l'ingestion reprend progressivement mais insuffisamment pour couvrir les besoins. Pour limiter ce déficit, la ration peut être enrichie en concentrés (orge, tourteaux soja...) (Laur 2003). Néanmoins

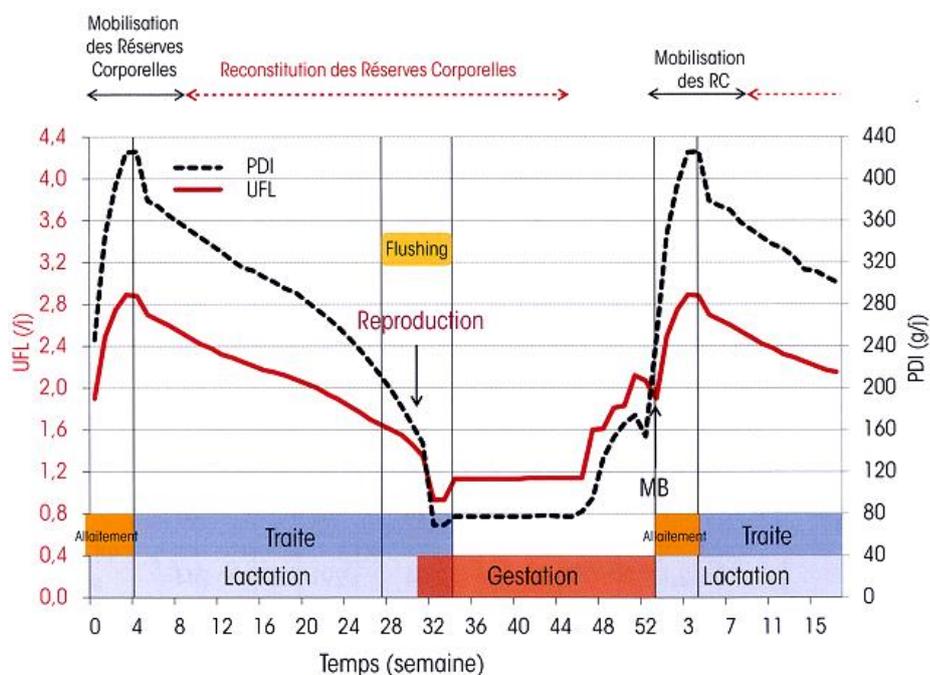


Figure 14 : Représentation graphique des besoins exprimés en UFL et en PDI chez la brebis laitière suivant le stade physiologique (CNBL 2019)

l'organisme s'adapte pour répondre aux besoins de gestation puis de lactation (figure 14) et va puiser dans ses réserves corporelles : on parle de lipomobilisation. Elle se traduit par l'augmentation de la quantité d'AGNE dans le sang dès la fin de gestation.

La mobilisation excessive des réserves graisseuses amène un état pathologique chez les ovins : c'est la toxémie de gestation.

b. Exportation énergie : lipomobilisation

En raison d'une capacité d'ingestion limitée, de l'augmentation de leurs besoins (lié au nombre de fœtus et à la préparation de la mamelle) et de la modification de leur profil hormonal, les brebis gravides maigrissent en fin de gestation. Jusqu'au 100^{ème} jour, l'organisme stocke de l'énergie, via la formation de triglycérides (estérification de glycérol et d'acides gras) au sein des adipocytes. Cette estérification diminue progressivement dès le 4^{ème} mois et chute 15 jours avant la mise-bas. Les 15 derniers jours, la lipolyse progresse de 65% en raison de la chute des réestérifications. Cela augmente le flux des AGNE, en particulier dans les jours qui précèdent et suivent la mise-bas. La lipomobilisation est accrue pendant cette période pour répondre au développement fœtal et mammaire qui s'accélèrent. Le taux d'AGNE qui reste élevé jusqu'au début de lactation est associé à une augmentation du renouvellement de l'albumine plasmatique servant de transporteur. Les AGNE sont mis à disposition des organes périphériques (muscles, myocarde) par le foie qui les incorpore dans des lipoprotéines. Les AGNE en excès sont :

- Utilisés comme substrat énergétique. Ils subissent la β -oxydation dans la mitochondrie pour fournir de l'acétyl-CoA. En association avec le pyruvate issu du glucose, il fournit de l'ATP aux cellules hépatiques via le cycle de Krebs.
- Stockés, c'est-à-dire, réestérifiés en triglycérides dans le cytoplasme des hépatocytes grâce à la triglycéride synthase.

La densité énergétique de la ration est un point clé. Dans les années 70, des chercheurs ont démontré que la maîtrise du régime alimentaire est essentielle dans le contrôle de la lipomobilisation. Ils ont comparé 3 groupes de brebis : un premier sous-alimenté, un second normo-alimenté et un troisième suralimenté. Les brebis gestantes sous-alimentées mobilisent plus de 50% de leurs réserves corporelles dès le début de la gestation. Les brebis normo-alimentées ne lipomobilisent que dans le dernier tiers de gestation. Les brebis gestantes suralimentées augmentent leurs réserves jusqu'au 3^{ème} mois de gestation, pour diminuer et devenir nulles à l'approche du partum.

La fonte lipidique commence par le tissu adipeux sous-cutané, le plus labile et le plus rapidement mobilisable. Elle se poursuit avec le tissu adipeux intermusculaire et périrénal. À l'approche de la mise-bas, elle s'intensifie et peut solliciter les tissus épiploïque et mésentérique. La lipomobilisation peut atteindre 75% des lipides initiaux. Elle est fonction du nombre d'agneaux allaités, du niveau de production laitière, de la capacité d'ingestion, de l'état d'engraissement initial. Elle peut atteindre 300g/jour (Chilliard 1987).

c. Régulation hormonale

En début de gestation, l'organisme de la brebis s'oriente vers le stockage des réserves corporelles, par une lipogenèse élevée et une lipolyse faible. Au contraire, en fin de gestation l'organisme se prépare à la parturition. Il requiert de l'énergie rapidement disponible, dans la circulation sanguine et puise dans ses réserves. La lipogenèse diminue au profit de la lipolyse. La lipomobilisation s'effectue grâce à une enzyme : la lipase. Cette enzyme est présente dans les adipocytes et a pour rôle d'hydrolyser les triglycérides contenus dans le tissu adipeux en réponse aux hormones lipolytiques. Elle est dite Lipase HormonoSensible (LHS) car sa synthèse est soumise au contrôle hormonal. Les hormones lipolytiques agissent généralement de la même façon. En se fixant aux récepteurs membranaires couplés aux protéines G, elles activent l'adénylate cyclase, enzyme membranaire qui catalyse l'AMP (Adénosine MonoPhosphate) en AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) à partir de l'ATP (Adénosine TriPhosphate). Ces réactions en cascade aboutissent à la phosphorylation de la lipase, nécessaire à son activation.

Les hormones lipolytiques intervenant dans l'activation de la lipase sont le glucagon, les catécholamines, les glucocorticoïdes, l'hormone de croissance et les œstrogènes. L'insuline limite l'activité lipasique.

- Glucagon : hormone pancréatique, hyperglycémiant. Elle est responsable de la néoglucogénèse hépatique (synthèse de glucose à partir des acides aminés) et de l'oxydation des AGNE. C'est une hormone cétogène à action lipolytique. Elle hydrolyse les triglycérides en glycérol et acides gras qui sont libérés dans la circulation sanguine. Cette hormone est inhibée par l'insuline (Rous 1977).

- Catécholamines : dopamine, noradrénaline et adrénaline. Ce sont des hormones et des neuromédiateurs. Elles sont sécrétées par la médulla des glandes surrénales (adrénaline) et par les neurones adrénérgiques. Elles se fixent sur les récepteurs β adrénérgiques de la membrane des adipocytes (Rous 1977). A l'approche du terme, le tissu adipeux est plus sensible aux catécholamines et lors d'un état de stress comme l'agnelage, la concentration sanguine augmente en faveur de la lipomobilisation (Laur 2003).
- Glucocorticoïde : le cortisol est produit par la région fasciculée des glandes surrénales. Sa concentration augmente à l'approche de la mise-bas. C'est une hormone hyperglycémiante par stimulation de la néoglucogénèse hépatique. Elle favorise la lipolyse en induisant la biosynthèse de la triglycéride lipase. De par son action lipolytique, elle est hypercholestérolémiante et hypertriglycéridémiante.
- Hormone de croissance (GH) : sécrétée par l'antéhypophyse, elle a une action sur tous les métabolismes (glucidique, protéique et lipidique). Elle favorise la synthèse de protéines (anabolisme) dans le but d'augmenter le tissu musculaire et la croissance. Elle est hyperglycémiante, favorise la libération des acides gras qui bénéficient à l'utérus et la mamelle pour finaliser la croissance fœtale et amorcer la lactation. Sa concentration plasmatique augmente à l'approche de la mise-bas et rend les adipocytes plus sensibles à la lipolyse (Laur 2003).
- Insuline : hormone pancréatique produite par les cellules β des îlots de Langerhans. Elle permet l'absorption du glucose par les cellules hépatiques pour former le glycogène ou par le tissu adipeux pour synthétiser les triglycérides. Elle est antilipolytique et serait plus efficace à faible concentration (Rous 1977). Jusqu'à 3 mois de gestation, l'organisme de la brebis orienté vers le stockage d'énergie, voit le nombre de récepteurs à insuline augmenter. La lipogénèse est alors prioritaire malgré quelques stimulations pouvant induire la lipolyse, jusqu'au dernier tiers de gestation où la situation s'inverse (Laur 2003).

Les hormones sexuelles jouent aussi un rôle. Les œstrogènes ont une action lipolytique. Dans les 24h à 48h avant la mise-bas, le pic de concentration en œstrogènes entraîne un afflux d'AGNE plasmatique, disponible pour les cellules.

L'adaptation du profil hormonal (homéorhèse) favorise l'augmentation de la concentration sanguine en glucose et en acides gras pour finaliser la croissance fœtale, amorcer la lactation et maintenir de l'énergie disponible en vue de l'agnelage (Laur 2003).

2. Microbiote et péri-partum

a. Transition physiologique, alimentaire et microbienne

Le péri-partum est une période critique pour la santé des femelles, leurs fœtus et leur production à venir. La croissance et le développement fœtaux sont des processus énergétiquement très coûteux. Par exemple, chez les bovins, la quantité d'énergie métabolisable requise à terme, est d'environ 175 % de celle d'une vache non gestante de même poids corporel (Zhu et al. 2018). Cette période dite de « transition », s'appuie sur le changement de stade physiologique qui couvre la période de pré-partum (3 semaines avant la mise-bas) au post-partum associé au début de lactation (3 voire 4 semaines après mise-bas), avec une modification du régime alimentaire :

- Pré-partum : alimentation à volonté, riche en fourrages (ensilage de maïs, ensilage herbe, farine de colza et paille) et pauvres en céréales
- Post-partum : ration enrichie en céréales (ensilage de maïs, ensilage herbe, tourteaux de colza, concentrés de betterave, orge et blé)

Le microbiote ruminal doit s'adapter rapidement à l'augmentation de la densité énergétique de la ration. Cette étude révèle que la communauté bactérienne active est dominée par 3 phyla (tableau 2), avec une variation de l'abondance relative entre les phases de pré-partum ou de post partum (changement de régime alimentaire, accroissement de la capacité d'ingestion) :

	Pré-partum	Post-partum
Firmicutes	57 %	35 %
Bacteroidetes	22 %	18 %
Proteobacteria	7 %	32 %

Tableau 2 : Abondances relatives des 3 principaux phyla entre les phases de pré-partum et de post-partum (Zhu et al. 2017)

Le nombre de Proteobactéria augmente fortement entre la phase de pre-partum et post-partum, suggérant qu'elles sont plus actives dans le rumen des animaux nourris avec des régimes riches en concentrés. A l'inverse, on constate une diminution des populations de l'ordre des Bacteroidales, des familles *Ruminococcacea* et *Christensenellaceae*, plus favorables aux régimes alimentaires riches en fourrages (Zhu et al. 2017; 2018).

Au cours du péri-partum, c'est le phylum Firmicutes qui est le plus abondant de la communauté bactérienne active dans le rumen, dont les genres les plus souvent détectés sont

Ruminococcus, *Ruminobacter*, *Fibrobacter* et *Butyrivibrio*. Ces 4 genres seraient selon les études plus ou moins affectés par les changements alimentaires au cours de la période de transition. Alors que la population de *Ruminobacter* reste stable dans l'étude de 2017, celle de 2018 nous montre qu'avec le passage à un régime post-partum riche en céréales, l'abondance relative des dégradeurs potentiels de l'amidon tels que *Ruminobacter* en particulier de *R. amylophilus* diminue, alors même que la proportion de concentrés dans le régime alimentaire post-partum augmente. Cette population serait compensée par les abondances relatives de *Prevotella* et de *Succinivibrionaceae*, plus importants chez les animaux nourris avec des régimes riches en concentrés. Ces genres bactériens peuvent inclure des producteurs de C3 (ou de son précurseur le succinate) dégradant l'amidon. Leur augmentation pourrait contribuer à la diminution observée du rapport C2/C3. Ceci suggère qu'en tant que groupe dominant et fonctionnellement diversifié, les espèces apparentées à *Prevotella* s'adapteraient plus facilement aux changements dans la composition du régime alimentaire, et assumer le rôle de *Ruminobacter* dans la dégradation de l'amidon (Zhu et al. 2018).

Suivent ensuite les phyla Bacteroidetes dont le genre le plus important est *Prevotella* et Proteobacteria avec une abondance relative de 20% (Zhu et al. 2017).

L'étude de Lima et al., corrobore ces informations. Les deux principaux phyla présents dans les échantillons de rumen sont les Bacteroidetes et les Firmicutes avec une abondance relative de 32% et 43%. Cependant, le microbiote ruminal est dominé par *Prevotella* (Lima et al. 2015).

Au niveau des eucaryotes, la classe dominante est celle des protozoaires Litostomatea (protiste ciliés) qui représentent plus de 90 % des eucaryotes présents dans les échantillons de rumen. Leur abondance relative s'accroît au cours de la période post-partum avec un régime pauvre en fibres et riche en énergie. Dans cette classe, on retrouve les *Entodinium spp.* capables d'engloutir l'amidon et de s'attacher aux bactéries amylolytiques (Lima et al. 2015).

Il en ressort que le passage du pré-partum au post-partum se caractérise par une réduction de la richesse bactérienne. Cela concorde avec les observations selon lesquelles le passage d'un régime riche en fourrages à un régime riche en amidon réduit la diversité et la structure de la communauté microbienne du rumen (Zhu et al. 2018).

b. Microbiote et AGV

Les acides gras chaînes courtes (C2, C3 et C4) sont absorbés par l'épithélium du rumen et aussi utilisés dans les processus métaboliques de l'hôte. Le C2 est un élément clé dans la synthèse des matières grasses du lait. Le C3 est le précurseur le plus important pour la néoglucogénèse. Le C4 est converti en corps cétoniques pour l'approvisionnement énergétique. L'étude menée en 2018 par Zhigang et al., a démontré que les taux de production et d'absorption ruminiaux d'acides gras à chaîne courte (AGCC) changent avec l'augmentation de la quantité de concentrés distribuée au cours de la période de transition. Alors que les proportions d'AGCC varient de manière significative, entre le pré-partum et le post-partum, avec une diminution de la proportion de C2 par rapport à celle du C3 et du C4, la concentration en AGCC reste stable n'évoluant que de 80 à 100 mmol/kg. En conséquence, le rapport C2/C3 diminue également de manière significative au cours de la période de transition.

Aussi, les changements dans l'abondance relative des principaux taxons bactériens peuvent être directement liés aux variations dans le modèle de fermentation microbienne du rumen, comme en témoignent les corrélations entre les taxons bactériens et les AGCC.

Corrélations :

- Le genre *Ruminococcus* est le seul taxon présentant une corrélation positive avec la concentration en C2.
- Les phyla Bacteroidetes et Firmicutes ont montré des corrélations positives avec la proportion de C2 et le rapport C2/C3, également comme la famille *Ruminococcaceae*, dont le genre *Ruminococcus*.
- La famille des *Prevotellaceae* et le genre *Prevotella* du phylum des Bacteroidetes sont positivement corrélés à la concentration et à la proportion de C3
- À l'exception de *Ruminobacter* et d'*Alphaproteobacteria*, les taxons du phylum Proteobacteria ont montré des corrélations positives avec la concentration de C3 et montré une corrélation négative du rapport C2/C3.
- Certains taxons parmi les *Paraprevotellaceae* (genre *Prevotella* YRC22 et CF231) et les *Succinivibrionaceae* ont montré des corrélations positives avec la concentration et la proportion de C4 (Zhu et al. 2018).

c. Microbiote et production

Une forte corrélation entre le rapport Firmicutes/Bacteroidetes et le rendement en matière grasse du lait a été révélée grâce aux études du microbiote pendant le péri-partum. Le rôle des bactéries du rumen dans la dégradation des polysaccharides végétaux et les AGV produits par cette dégradation constituent une source d'énergie majeure avec un effet direct sur la production de lait. D'après Lima et al., le genre *Butyrivibrio* et la famille des *Prevotellaceae* présentent une corrélation positive avec la production laitière (Lima et al. 2015).

- *Butyrivibrio* par son large spectre d'action, entreprend une biohydrogénation des acides gras et génère de l'acide linoléique.
- *P. bryantii*, par sa capacité à diminuer la production de lactate ruminal et augmenter les pourcentages de matières grasses du lait via le C2 (Lima et al. 2015). L'étude de Jami et al. a montré une corrélation significativement négative avec le rendement en matière grasse du lait avec les autres *Prevotella*, genre le plus abondant chez les ruminants. Cela explique la plupart des corrélations négatives de Bacteroidetes avec ce paramètre (Jami et al. 2014).

Le rapport Bacteroidetes/Firmicutes, entre le péri-partum et la lactation, augmente de 6/1 à 12/1 (Pitta et al. 2014).

L'analyse des genres du phylum Firmicutes, dans les échantillons présentant de faibles niveaux de *Prevotella*, montre qu'ils sont corrélés au rendement en matière grasse laitière. Ils appartiennent à la famille des *Lachnospiraceae* (genre *Eubacterium*).

Du phylum Actinobacteria, les *Bifidobacterium*, les *Lactobacillus* et le genre *Bulleidia* appartenant aux Firmicutes ont également montré une corrélation positive avec le rendement en matière grasse du lait. Des corrélations positives significatives avec la production laitière et le lactose ont également été observées entre quatre genres : *Atopobium*, *Adlercreutzia*, *Mitsuokella* et *Desulfovibrio* (Jami et al. 2014).

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Présentation de l'étude

1. Projet SMARTER et IRMA

Le programme SMARTER (SMAll RuminanTs breeding for Efficiency and Resilience) a pour objectif de développer des stratégies novatrices en élevages de petits ruminants visant à améliorer la production et la résilience des animaux. C'est un projet européen porté par l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement) et l'UMR GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevages) de Toulouse, respectivement représentés par Mme Christel Marie-Etancelin et par le Pr. Annabelle Meynadier. Le projet IRMA, sur lequel s'appuie notre étude, vient compléter ce programme en étudiant notamment le métabolisme énergétique de début de lactation chez les brebis.

Les données recueillies proviennent du troupeau de brebis laitières, de race Lacaune de l'Unité Expérimentale de Lafage, sur le plateau du Larzac, à proximité de Roquefort-sur-Soulzon.

2. Les objectifs de cette étude

Le péri-partum chez les brebis laitières est une période peu étudiée. Après la mise-bas, l'organisme doit s'adapter rapidement le premier mois pour l'allaitement-traite. Lors de cette période, elles doivent répondre aux besoins alimentaires des agneaux et assurer une nouvelle lactation de 7 mois. Le péri-partum chez les ovins se caractérise par un déficit énergétique plus ou moins marqué selon les individus. Nous avons essayé de comprendre les raisons de ces différences inter-individuelles en étudiant le microbiote ruminal.

Notre objectif est de :

- Voir si la lipomobilisation pendant la phase d'allaitement-traite des brebis laitières influence le microbiote ruminal
- Voir l'évolution du microbiote au cours de la phase d'allaitement
- Etablir une relation entre le microbiote et les acides gras du rumen

II. Matériel et méthodes

1. Animaux

a. Conduite élevage

Cette étude a été menée sur un lot de 70 brebis Lacaune dont 40 suivis aux portillons individuels d'alimentation. Nous avons sélectionné des brebis fortes productrices avec plusieurs agneaux et d'autres de faible production avec un seul agneau pour exacerber les phénomènes. Ces brebis sont toutes conduites de la même manière, avec une ration à base de :

- Ensilage de RGI 37% MS
- Foin de luzerne 2^{ème} coupe (Parc C13) 13% MS
- Foin de Dactyle Luzerne 2^{ème} coupe (Parc C15) 13% MS
- Foin de luzerne 3^{ème} coupe (Parc C13) 14% MS
- Orge 6% MS
- Fédapro Super Amine (UNICOR) 17% MS

C'est une ration riche en fibres, complétée par un concentré énergétique (orge) et un concentré azoté (Fédapro super Amine). Elle est distribuée à volonté, 2 fois par jour, 1/3 le matin et 2/3 l'après-midi avec un objectif de 15% de refus.

Les mesures des quantités ingérées individuelles de matière sèche (QIMS) se feront sur 4 jours du lundi matin (premier repas) au vendredi matin (dernier refus).

Au niveau de la reproduction, les brebis sont toutes inséminées le 11 Juin 2021. La semence provient de béliers identifiés, contrôlés et sélectionnés selon certains critères/mutations tels que l'efficacité alimentaire ou encore la concentration du lait en cellules somatiques. Les brebis ont été échographiées le 04 Août 2021 pour dénombrer les fœtus.

Dans cette étude, les brebis ont mis-bas autour du 1^{er} Décembre 2021 et ont entamé la période d'allaitement-traite de 28 jours.

2. Mesures et prélèvements

a. Plan expérimental

Quatre sessions de collecte d'échantillons pendant la phase d'allaitement-traite :

- Le 15 Décembre 2021 (Day1)
- Le 22 Décembre 2021 (Day 2)
- Le 29 Décembre 2021 (Day 3)
- Le 13 Janvier 2022 (Day 4) avec un premier contrôle laitier officiel.

b. Pesée des brebis et estimation des NEC

Le poids et les Notes d'Etat Corporelles (NEC) des brebis ont fait l'objet d'un suivi régulier, lors de la mise à la reproduction, de l'échographie des femelles, 70 jours avant la mise-bas, et toutes les semaines du 8 Décembre 2021 au 11 Janvier 2022.

La NEC est déterminée par 4 gestes successifs, effectués par des techniciens expérimentés qui s'appuient sur la grille de notation de référence présente dans l'annexe 1 :

- Apprécier la proéminence des apophyses épineuses des vertèbres, en caressant la ligne médiane du dos. Les apophyses apparaissent plus ou moins saillantes ou arrondies.
- Apprécier la proéminence des apophyses transverses des vertèbres. En passant la main, on la détermine avec son degré de couverture.
- Apprécier le développement des muscles sous-lombaires. L'animal doit être détendu avec une paroi abdominale relâchée. On estime la facilité avec laquelle on peut engager les doigts sous les apophyses transverses.
- Apprécier le développement de la noix (tissus entre les apophyses épineuses et transverses). On évalue l'existence et la forme de ce muscle : concave, plat, convexe.

Les notes attribuées vont de 1 à 5, avec une précision de l'ordre du dixième.

c. Prélèvements

A chacun des 4 contrôles expérimentaux, différents échantillons ont été prélevés dont les 2 derniers pour cette étude.

- Echantillons de lait : TB, TP, Cellules Somatiques (CS), Urée, Spectre MIR (pour prédiction acides gras et protéines), analyse des acides gras en chromatographie gazeuse
- Echantillons de sang :
 - o Tube EDTA : nécessaire au génotypage des individus (54 k SNP)
 - o Tube héparine : β OH en direct (bandelette) sur sang total, puis sur plasma : AGNE, métabolome
- Echantillons de jus de rumen (40 ml) : AGV, microbiote, métabolome et acides gras longs

Pour chaque brebis, les prélèvements et l'heure ont été enregistrés sur les tubes, fiches papier et sous format informatique. Le contenu ruminal a été prélevé grâce à une pompe à vide à piston WOB-L® de modèle 2522C-02 (230V /50Hz) et les échantillons de lait et de sang (après aliquotage dans des tubes Eppendorf de 2 ml) sont congelés immédiatement dans de l'azote liquide puis transportés à l'INRAE de Toulouse pour être conservés à -80°C jusqu'à analyse.

3. Analyses

a. Dosage des AGNE

La méthode de dosage des AGNE plasmatiques est réalisée grâce à un kit de dosage enzymatique. Les plasmas de chaque individu sont répartis sur une plaque de 96 puits et mis en contact avec les enzymes. Les réactions enzymatiques successives aboutissent à la formation finale d'un dérivé coloré rouge dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 545 nm. L'intensité du colorant formé est directement proportionnelle à la concentration initiale en AGNE (annexe 2). Ces données nous ont servi de référence pour des groupes de brebis et procéder à l'étude statistique.

b. Evaluation de la concentration en AGV

Chaque échantillon est débarrassé des particules grossières par centrifugation puis déprotéinisé et dilué. La chromatographie en phase gazeuse avec son détecteur à ionisation de flamme nous permet d'évaluer la concentration en AGV (annexe 3).

c. Evaluation du profil des acides gras du rumen

Comme pour les AGV, l'évaluation de la quantité et le profil des acides gras du rumen fait appel à la chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur d'ionisation sur flamme (annexe 4). Elle s'appuie sur la méthode de Jenkins de 2010.

d. Métabarcoding pour microbiote (Frogs)

Cette partie s'est déroulée en trois étapes. Après extraction et séquençage de l'ADN, une analyse bio-informatique par FROGS a été nécessaire pour connaître les populations microbiennes.

Le métabarcoding est une technique de catalogage et d'identification moléculaire permettant la caractérisation génétique d'un individu ou d'un échantillon d'individus à partir d'une courte séquence d'ADN choisie en fonction du groupe étudié.

Nous l'avons utilisé pour analyser les populations microbiennes et leur équilibre dans le milieu ruminal. La méthode requise pour l'analyse de l'ADN extrait des contenus de rumen, repose sur les étapes présentées dans la figure 15 ci-dessous.

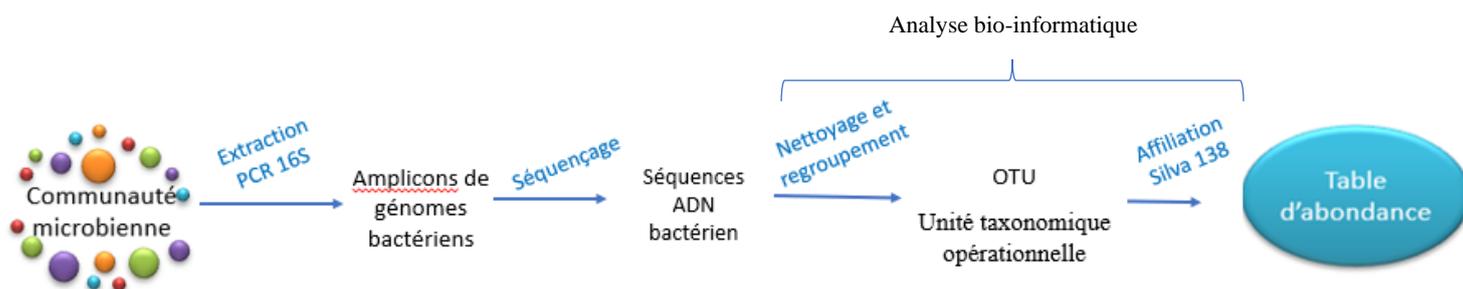


Figure 15 : Etapes d'analyse du microbiote ruminal (Escudie et al., 2018)

Dans un premier temps on extrait et on casse des brins d'ADN à l'aide du kit Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 (annexe 5). Puis on amplifie par PCR les brins extraits à l'aide d'une amorce codant la région v3-v4 du gène de la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (spécifique des bactéries, permettant d'aller jusqu'au genre). Enfin les brins d'ADN amplifiés sont séquencés par la technologie Illumina MiSeq à la Genotoul (annexe 6).

- Analyse bio-informatique des séquences obtenues

L'analyse des données issues du séquenceur a été réalisée à l'aide du pipeline FROGS (Escudie et al. 2018). Ces étapes sont présentées dans l'annexe 7. FROGS est requis car il est adapté à la métagénomique et permet une exploitation facile des données par les chercheurs. FROGS a permis le nettoyage des séquences et de rassembler celles similaires en tenant compte des erreurs de PCR et séquençage. Nous avons appliqué le filtre de Bokulich pour éliminer les artefacts méthodologiques. Ce filtre est recommandé car c'est le plus « *stringent* » et il permet de se débarrasser au maximum des faux positifs. La dernière étape correspond à l'affiliation des séquences identifiées à un taxon bactérien, référencé dans la base de données Silva 138 (Escudie et al. 2018).

e. Analyses statistiques

Pour les quatre dates de prélèvements, l'effet de la lipomobilisation sur le microbiote digestif et la production d'acide gras ruminiaux a été étudié grâce à une analyse de covariance (ANOVA) à trois facteurs dans le programme R Studio® (version 4.3.0), avec un seuil de significativité inférieur ou égal à 5%.

L'analyse des espèces bactériennes a nécessité un traitement particulier. Ce qui caractérise les données issues de la métagénomique est la différence du nombre de lectures obtenues par échantillon. Cette différence provient du séquençage ; les séquenceurs haut débit traitent beaucoup d'échantillons en même temps, sans garantir le même nombre de lectures. On peut avoir 1000 lectures pour l'échantillon 1 et seulement 500 pour l'échantillon 2. De plus, les résultats obtenus ne sont pas forcément proportionnels aux abondances réelles contenues dans les échantillons. Ainsi, malgré la même profondeur de séquençage et le même outil de comptage, deux échantillons n'auront pas les mêmes résultats du fait de leurs biomasses et de la quantité de bactéries. Toute comparaison directe de comptage entre échantillons est

impossible. Il a fallu les transformer en respectant leur nature de données compositionnelles à l'aide de packages disponibles sous R (Hardy 2018).

Les données compositionnelles sont par définition des données positives ou nulles, ne contenant que de l'information relative (ex : pourcentage, proportion...) et correspondent à nos tables de comptage d'OTUs (Unité Taxonomique Opérationnelle : définit des groupes de bactéries ayant des caractéristiques proches). Pour une analyse statistique, ces données nécessitent d'être transformées. La transformation la plus appropriée actuellement est la CLR (Rapport Logarithmique Centré). L'autre particularité de nos tables de comptage d'OTUs est de contenir beaucoup de zéros. Ils sont essentiellement observés sur les OTUs minoritaires et liés à notre profondeur de séquençage (ils sont en dessous du seuil de détection de notre méthode). Pour remplacer ces zéros, nous avons utilisé la méthode GBM (méthode Géométrique Bayésienne Multiplicative). Elle utilise l'hypothèse selon laquelle la probabilité d'apparition des OTUs dans la loi multinomiale n'est pas nulle. Elle présente l'avantage de corriger toutes les valeurs de la table. Elle permet de conserver les rapports entre toutes les valeurs d'abondances, génère une distorsion mineure dans les rapports d'abondances de nos OTUs. Puis, les données subissent une transformation CLR (Rapport Logarithmique Centré), elles sont centrées-réduites par transformation logarithmique et utilisation de la moyenne géométrique. Cette transformation permet d'améliorer la distribution de nos données qui présentera une allure plus proche d'une loi Normale. Cette transformation est indispensable pour l'analyse multivariée que nous avons réalisée avec nos données (Boggio et al. 2021).

Ces données ont été explorées à l'aide d'une PCA (Analyse des Composants Principaux), qui est une analyse multivariée, permettant d'identifier des tendances, des biais concernant les données de microbiote et d'acides gras du rumen. Ensuite, nous avons effectué des sPLS-DA (sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis), modèle de classification linéaire capable de prédire la classification de nouveaux échantillons et de les caractériser pour les affecter à une catégorie. Ce modèle est utilisé quand le nombre d'observations est très inférieur aux variables. La PCA et la sPLS-DA ont été réalisées à l'aide du package mixOmics.

Nos tables de comptages contiennent des milliers d'OTUs qui rendent cette analyse statistique difficilement interprétable. La méthode Selbal permet de réduire le nombre d'OTUs avant la sPLS-DA. C'est une méthode très « *stringente* » qui permet de bien séparer les groupes et de sélectionner les clusters les plus discriminants pour le facteur lipomobilisation.

Pour cette sPLS-DA nous avons dû choisir un nombre de composantes. La fonction AUROC (Area Under the ROC Curve), montre la performance du modèle de classification. Le tracé de courbes représente les taux de vrais et faux positifs. Cette fonction, très sensible et spécifique, mesure la qualité des discriminations réalisées par le modèle : par exemple, la probabilité pour qu'un événement positif soit bien classé comme positif. Ainsi, plus l'AUC (Area Under the Curve) se rapproche de 1, meilleure est la discrimination. Nous avons choisi le nombre de composantes nécessaires pour obtenir un AUC maximal. Cette analyse sPLS-DA met en évidence les OTUs les plus discriminants de chaque groupe pour une analyse ANOVA.

Enfin, nous avons utilisé une analyse des réseaux appelée « Network », pour visualiser et comprendre les relations entre la population microbienne et la production d'acides gras du rumen, en réalisation d'une sPLS.

III. Résultats

1. Caractérisation de la lipomobilisation

Dans un premier temps, nous avons fait un état des lieux des Notes d'Etat Corporelles (NEC)

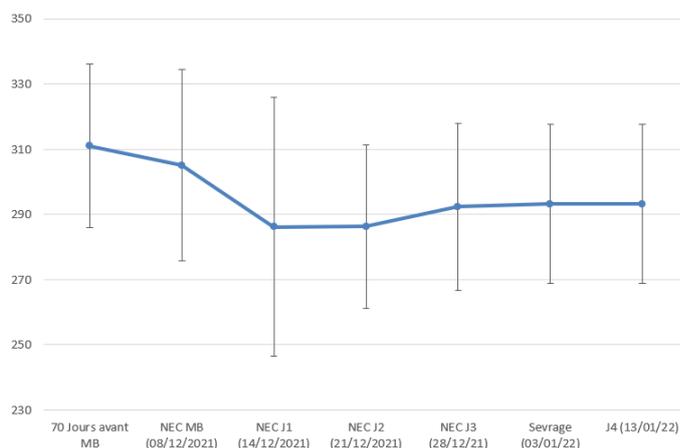


Figure 16 : Evolution moyenne des brebis laitières : 70 jours avant mise-bas au sevrage des agneaux

des brebis laitières relevées avant la mise-bas jusqu'au sevrage des agneaux (figure 16). Nos résultats sont corroborés par la littérature scientifique avec un amaigrissement des brebis avant la mise-bas, d'abord lent, puis s'accélère autour du partum pour ralentir ensuite. Nous avons aussi regardé l'évolution de la lipomobilisation par le dosage des

β OH et des AGNE. Dans notre étude, les β OH ne sont pas corrélés aux AGNE, ni à la perte de poids ou la perte de NEC. C'est pourquoi nous nous sommes appuyés sur les AGNE sanguins pour regarder l'évolution de la lipomobilisation sur le mois de transition correspondant au mois

d'allaitement-traite (figure 16). La NEC du 14 Décembre 2021 étant la plus basse, nous avons regardé le dosage des AGNE sanguins, témoin de cette lipomobilisation.

Ce dosage nous a servi de référence pour déterminer 3 groupes de brebis selon l'intensité de la lipomobilisation (figure 17) :

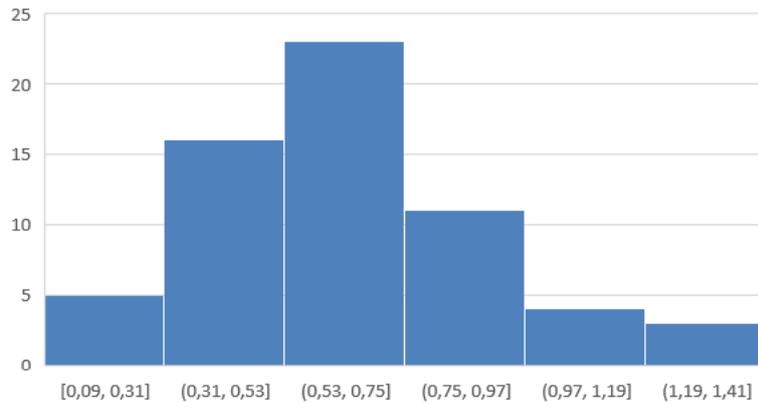


Figure 17 : Distribution des AGNE sanguins au 14.12.2021 (Day 1)

- Groupe lipomobilisation faible : de 0,09 à 0,52 mmol/l (19 brebis)
- Groupe lipomobilisation moyenne : de 0,53 à 0,75 mmol/l (25 brebis)
- Groupe lipomobilisation forte : de 0,76 à 1,28 mmol/l (18 brebis)

Dans notre étude, les brebis lipomobilisent mais ne sont pas, pour la plupart, en état de cétose (cétose subclinique : AGNE > 1 mmol/l (Gebreyesus et al. 2020)), leur période critique ayant plutôt lieu en fin de gestation.

2. Microbiote et lipomobilisation

Nous avons fait un état des lieux de la composition du microbiote à l'échelle des OTUs selon le degré de lipomobilisation (faible, moyenne et forte) et pour l'ensemble des dates de prélèvements. Ceci nous a permis d'affiner notre recherche.

Les figures 18 et 19 sont des représentations graphiques des analyses par PCA. Elles montrent que la variabilité expliquée par les OTUs ne représente que 15%, valeur faible. Le reste de la variabilité n'est pas expliqué par notre étude. Pour ces deux figures, on observe que les nuages de points sont uniformes. La PCA ne permet pas de dissocier les microbiotes selon la lipomobilisation ou selon le jour de prélèvements. L'utilisation de la sPLS-DA va forcer la discrimination entre les groupes (ncomp=3 et keepX=57).

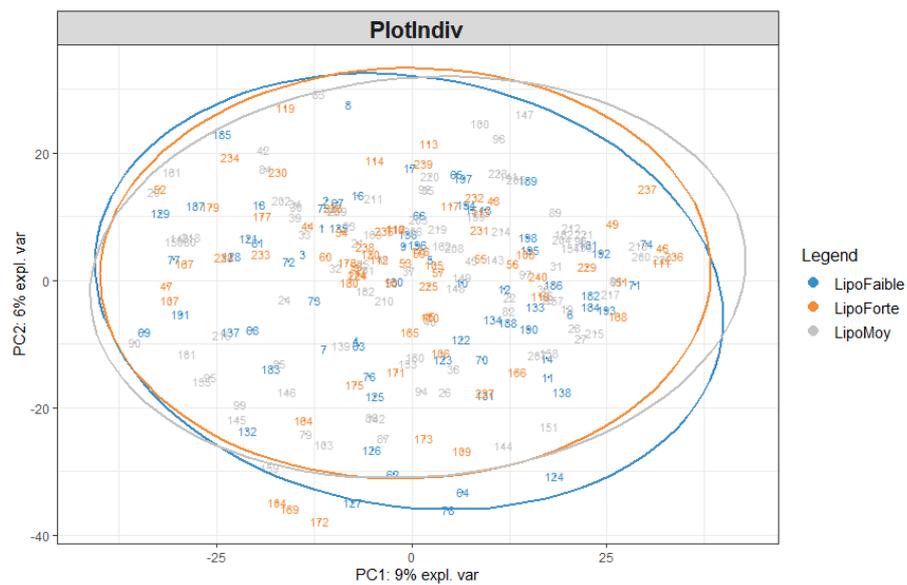


Figure 18 : Exploration des données de microbiote en fonction de la lipomobilisation par PCA

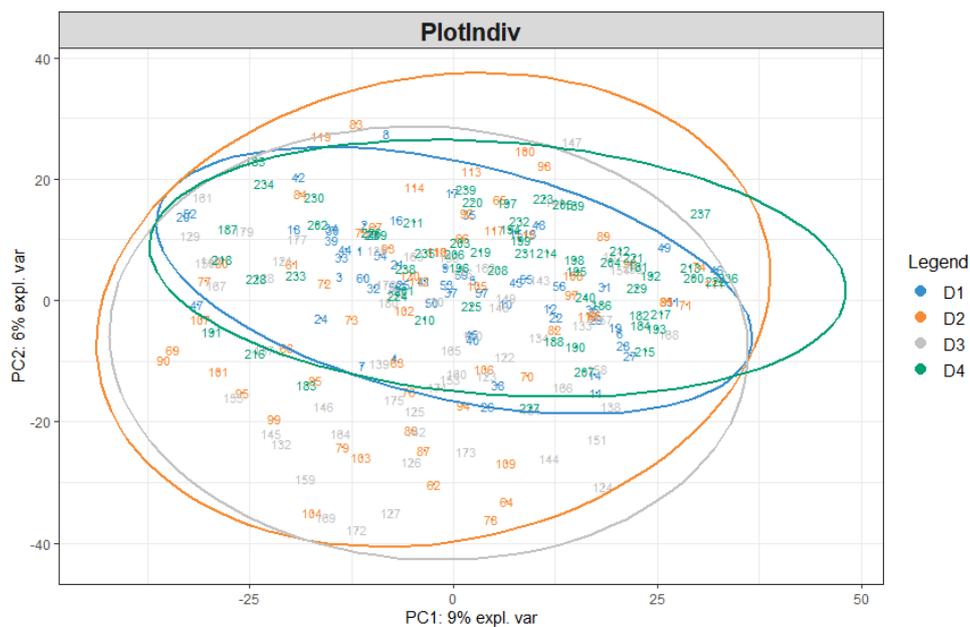


Figure 19 : Exploration des données de microbiote en fonction de la date de prélèvement par PCA

Pour procéder à une sPLS-DA, il faut d'abord vérifier la précision du modèle avec la fonction AUROC. La figure 20 ci-dessous montre la performance du modèle de classification, par le tracé des trois courbes selon le niveau de lipomobilisation faible, moyenne ou forte.

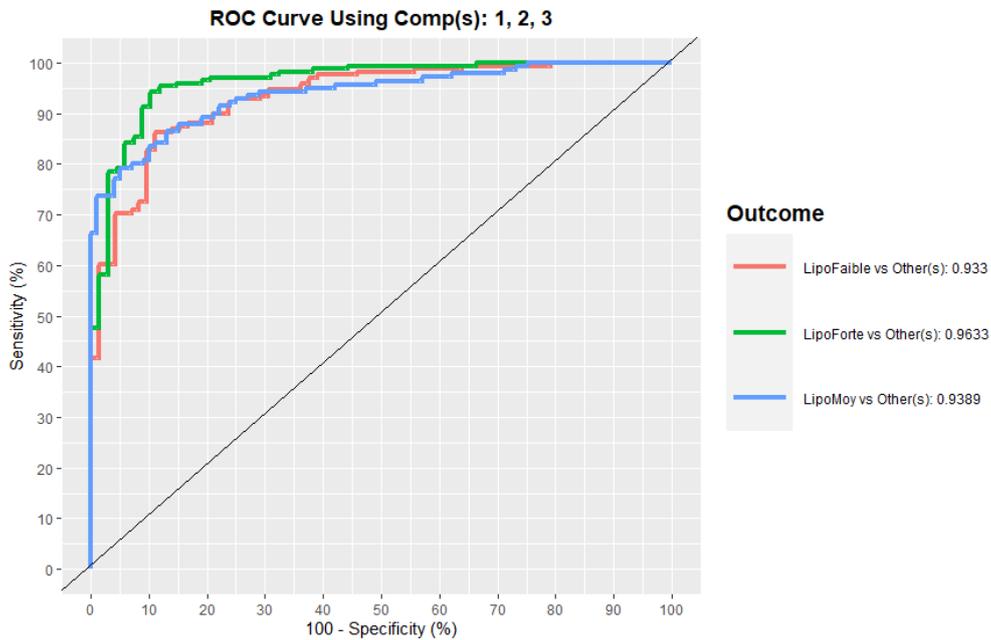


Figure 20 : Courbe ROC observée lors de l'évaluation du modèle de classification des OTUs selon la lipomobilisation

L'AUROC est très sensible et très spécifique. Plus l'AUC se rapproche de 1, meilleur est le modèle de classification. Ici, les valeurs d'AUC sont supérieures à 0,9, le modèle est suffisamment précis pour établir une discrimination. On peut avoir confiance en la classification par la sPLS-DA des OTUs selon la lipomobilisation.

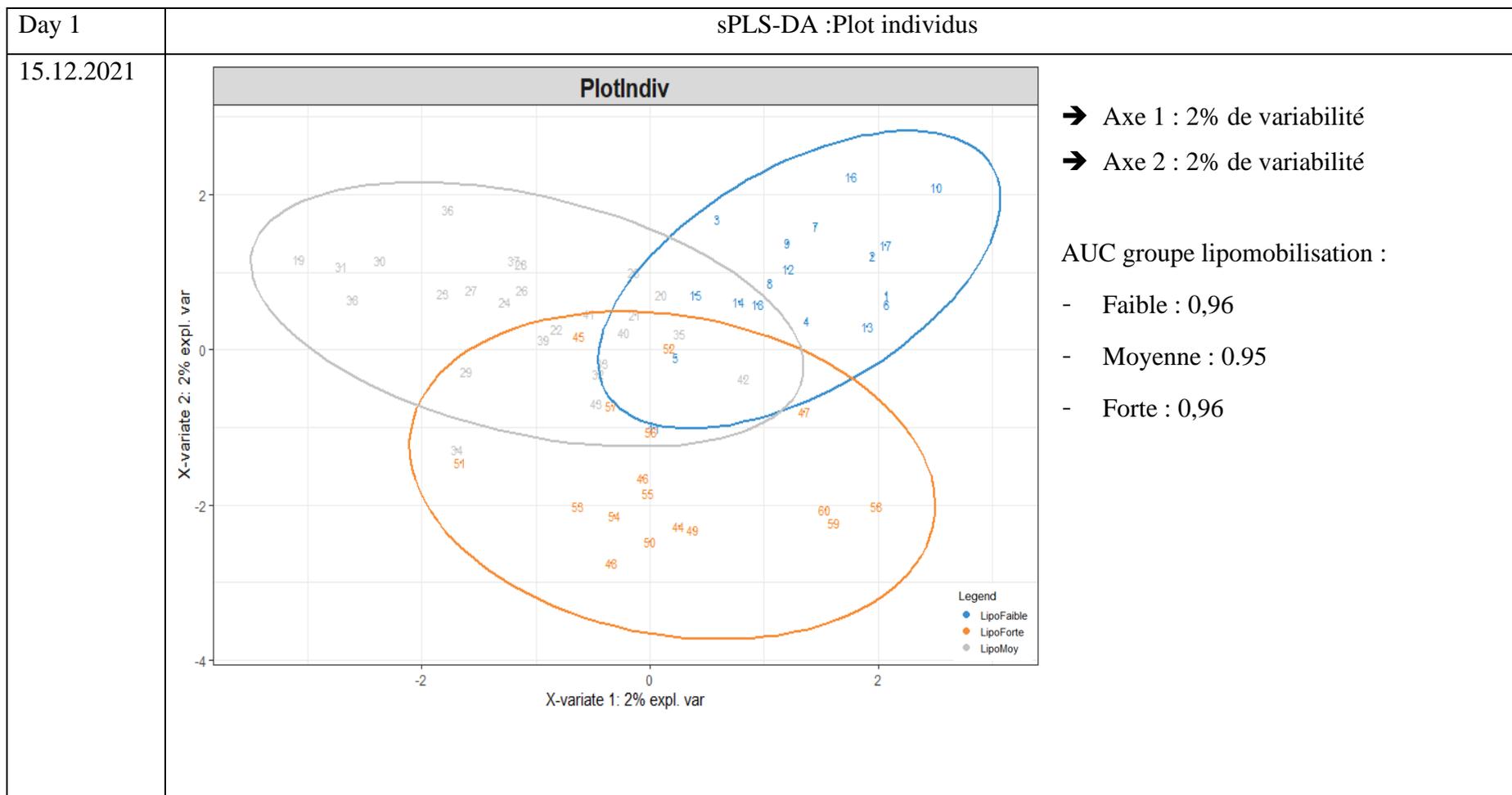


Tableau 3 : Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 15.12.2023 (Day 1)

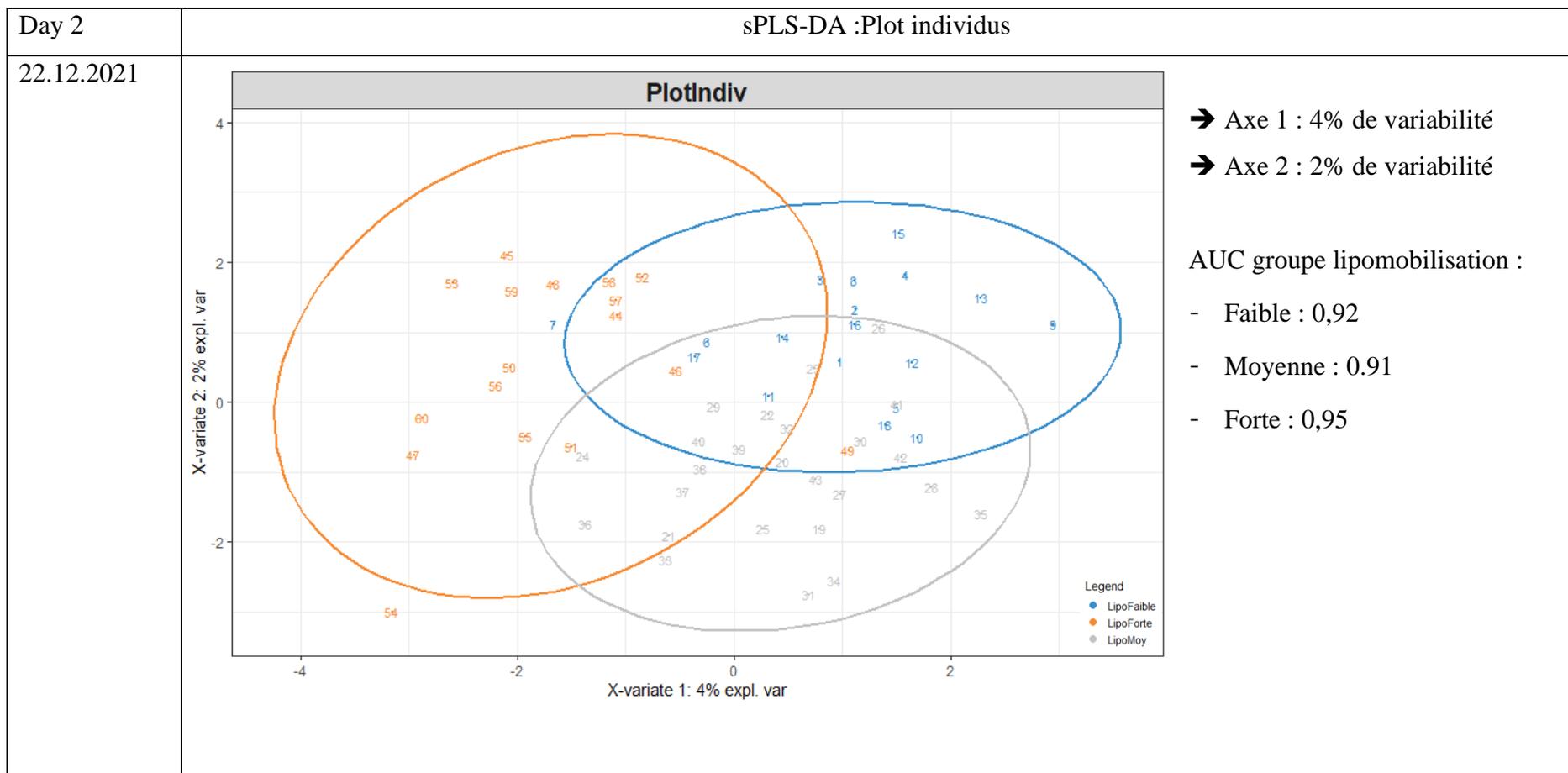


Tableau 4 : Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 22.12.2023 (Day 2)

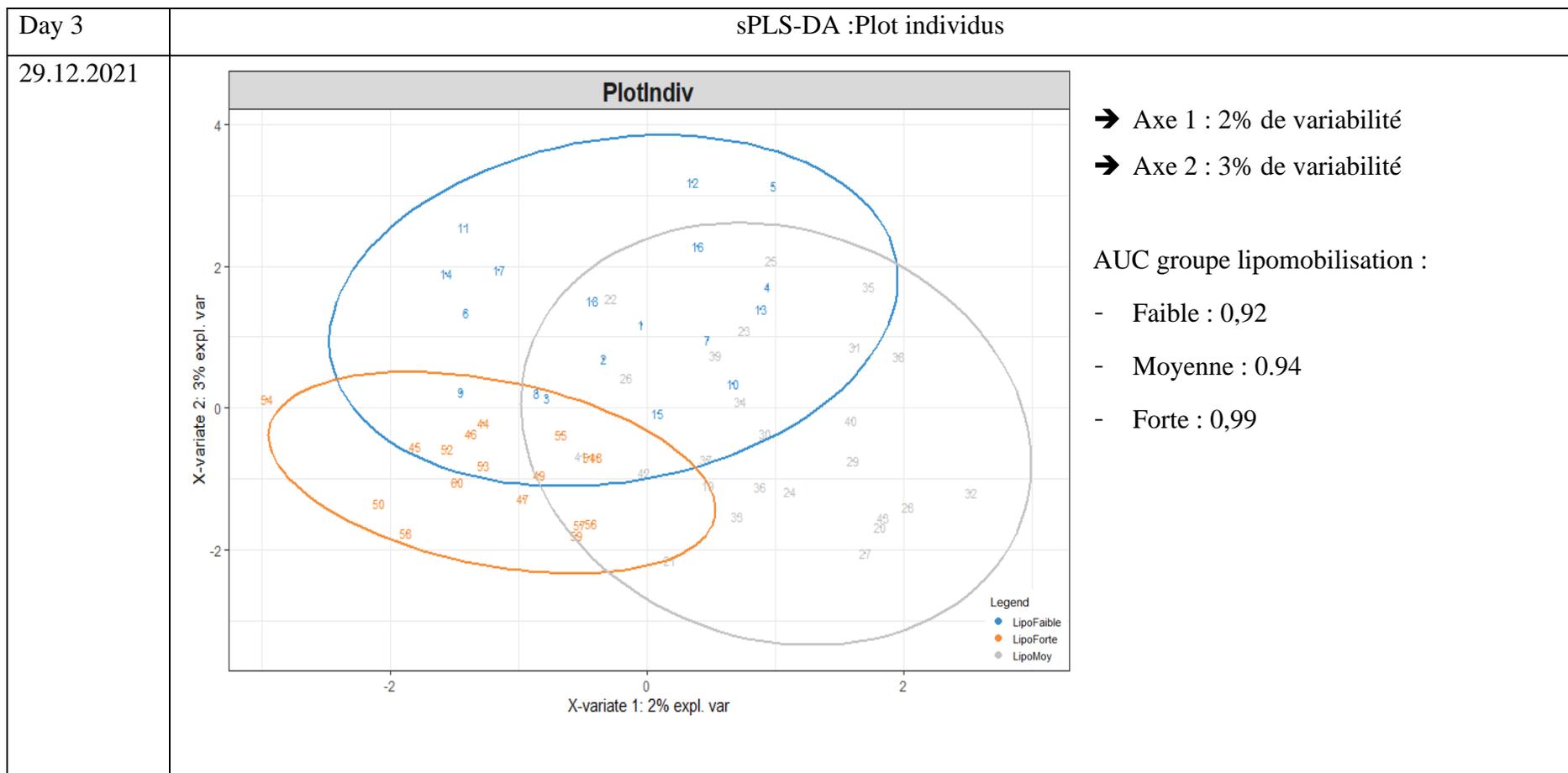


Tableau 5 : Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 29.12.2023 (Day 3)

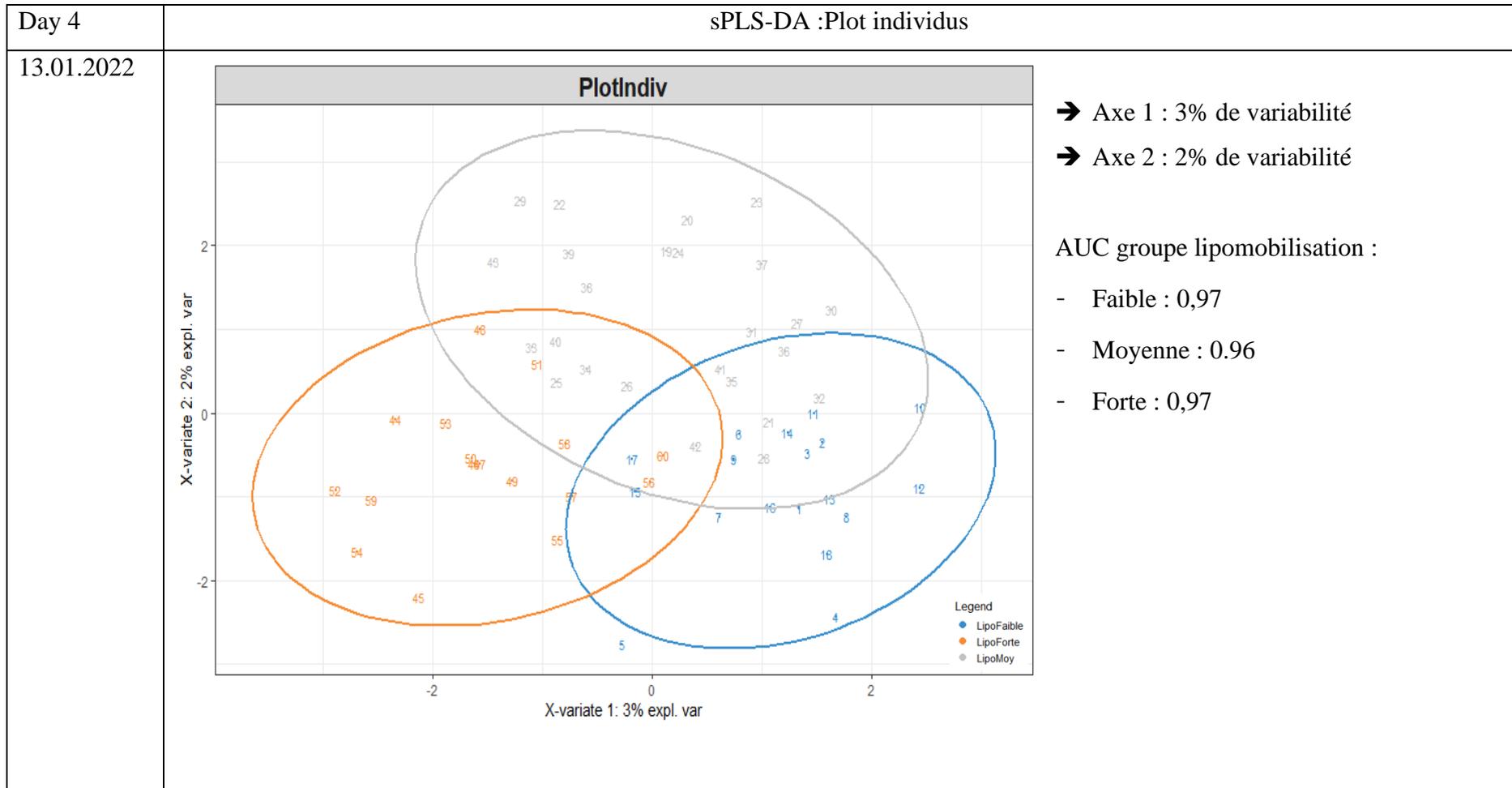


Tableau 6 : Représentation graphique de l'analyse sPLS-DA des données de microbiote selon la lipomobilisation du 13.01.2023 (Day 4)

- Synthèse des 4 dates :

Pour ces 4 dates, nous avons vérifié que les courbes ROC présentent une valeur d'AUC proche de 1 (valeur > 0,9). À toutes les étapes, le modèle est suffisamment précis pour établir une discrimination des OTUs en fonction du degré de lipomobilisation. La sPLS-DA nous permet d'observer une séparation des nuages de points qui reste peu marquée. Les OTUs les plus discriminants n'expliquent qu'une variabilité minimale sur les axes 1 et 2, comprise respectivement de 2 à 4% et de 2 à 3%.

La composante 1 maximise la discrimination de la sPLS-DA, et permet de discriminer certains OTUs en accentuant leurs différences. Nous avons sélectionné les OTUs avec des « value.var » supérieure à $|0,2|$ correspondant à ceux qui ont le plus d'impact sur la variabilité (tableau 7). La value.var est un indice qui permet de qualifier la relation entre une variable et le facteur discriminant sur la composante (comparable à un coefficient de corrélation).

L'ANOVA a été utilisée pour tester l'effet de la lipomobilisation sur ces OTUs. Le seuil de significativité retenu est de 5%.

	Clusters	Value.var	p.value (ANOVA)
Day all	Cluster_612	0,294296021	0,048 < 0,05
	Cluster_3427	-0,285691364	0,26
	Cluster_2652	0,265778617	0,032 < 0,05
	Cluster_832	-0,258114825	0,035 < 0,05
	Cluster_1907	0,243338916	0,06
	Cluster_1271	0,240879141	0,56
	Cluster_1344	-0,210963380	0,25
	Cluster_3330	-0,207047280	0,037 < 0,05
	Cluster_871	-0,205509741	0,24
	Cluster_1481	-0,203365214	0,04 < 0,05
Jour 1	Cluster_786	0,557871243	0,001 < 0,01
	Cluster_1457	-0,507918536	0,005 < 0,01
	Cluster_2659	0,475461902	0,004 < 0,01
	Cluster_1905	0,321182934	0,006 < 0,01
Jour 2	Cluster_1926	-0,49538691	0,004 < 0,01
	Cluster_1716	0,46548994	0,005 < 0,01
	Cluster_3043	0,45025359	0,003 < 0,01
	Cluster_2704	-0,40597866	0,005 < 0,01
	Cluster_1945	-0,25373201	0,006 < 0,01
	Cluster_1365	0,24185416	0,006 < 0,01
Jour 3	Cluster_1659	-0,84610297	0,0004 < 0,001
	Cluster_0081	-0,38483618	0,003 < 0,01
	Cluster_1950	-0,21636245	0,006 < 0,01
Jour 4	Cluster_1427	0,85256325	$1,46 \times 10^{-5} < 0,001$
	Cluster_2111	-0,34537761	0,001 < 0,01
	Cluster_2498	0,25049634	0,002 < 0,01

Tableau 7 : OTUs discriminés par la composante 1 de l'analyse sPLS-DA avec leur significativité et les corrélations associées.

Le tableau 8, ci-dessous, nous présente les affiliations des OTUs retenus, leurs abondances relatives et leurs associations avec un niveau de lipomobilisation.

	Clusters	Phylum	Famille	Genre	Abondance relative en % (groupe lipomobilisation)
Day all	Cluster_612	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotella	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_832	Firmicutes	Hungateiclostridiaceae	Saccharofermentans	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1481	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotella	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
Day 1	Cluster_786	Firmicutes	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae XPB1014 group	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1457	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotella	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1905	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-001	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%

Day 2	Cluster_1926	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotella	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1716	Firmicutes	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae AC2044 group	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_2704	Bacteroidota	F082	Unknown genus	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1945	Firmicutes	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1365	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotella	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%

Day 3	Cluster_1659	Firmicutes	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_81	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotella	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_1950	Firmicutes	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-008	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
Day 4	Cluster_1427	Bacteroidota	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-001	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%
	Cluster_2111	Spirochaetota	Spirochaetaceae	Treponema	Faible : <1% Moyen : <1% Fort : <1%

Tableau 8 : Affiliations des OTUs associés à un niveau de lipomobilisation, avec lipomobilisation faible : fond bleu, lipomobilisation forte : fond orange et lipomobilisation moyenne : fond gris.

Les familles *Lachnospiraceae*, *Christensenellaceae*, *Saccharofermentans*, *Spirochaetaceae* et *Prevotellaceae* sont discriminantes de la lipomobilisation.

- Les *Lachnospiraceae*, dont le genre *Lachnospiraceae XPB1014 group* est associé au groupe faible lipomobilisation et le genre *Lachnospiraceae AC2044 group*, associé au groupe moyenne lipomobilisation
- Les genres *Christensenellaceae R-7 group*, *Lachnospiraceae UCG-008*, *Saccharofermentans* et *Treponema* sont associés au groupe forte lipomobilisation
- Les *Prevotellaceae* sont associés aux trois groupes de lipomobilisation. C'est la famille la plus représentée sur toutes les dates

Les abondances relatives de chaque OTUs sont toutes inférieures à 1%. Ce qui pourrait expliquer les faibles pourcentages de variabilité sur toutes les dates, en lien avec la lipomobilisation.

3. Microbiote et acide gras du rumen

Nous avons cherché s'il existe un lien entre la production d'acides gras du rumen et la lipomobilisation, et l'influence de la date de prélèvement. Les analyses statistiques sont les mêmes que précédemment. Les figures 22 et 23 ci-dessous sont les représentations graphiques des analyses par PCA des acides gras du rumen en fonction de la lipomobilisation ou des jours de prélèvement. Les composantes 1 et 2 sont respectivement de 31% et 13%, soit 44% de variabilité expliquées par les OTUs.

Sur la figure 22, la PCA permet de dissocier 2 nuages de points regroupant chacun deux dates :

- À gauche : le nuage de points regroupe les valeurs de Day 2 et Day 4
- À droite : le nuage de points regroupe les valeurs de Day 1 et Day 3

Sur la figure 23, la PCA ne permet de pas de faire de différence selon le degré de lipomobilisation (faible, moyenne et forte).

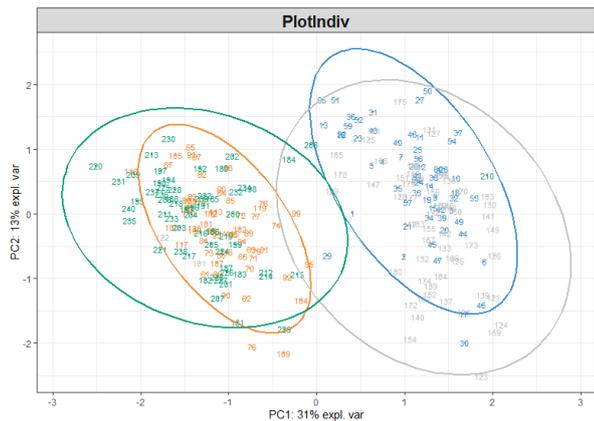


Figure 22 : Représentation graphique de l'analyse PCA des acides gras du rumen en fonction de la date de prélèvements

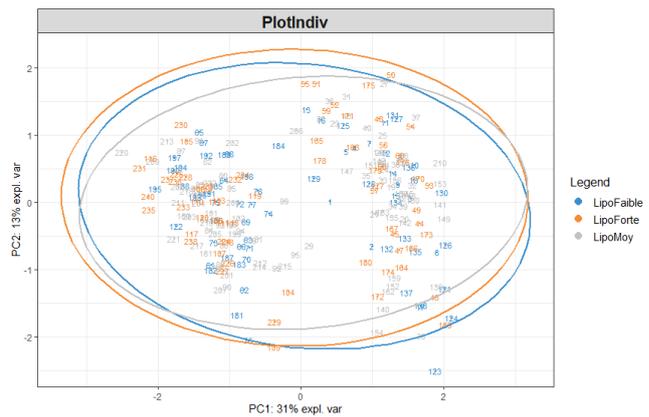


Figure 23 : Représentation graphique de l'analyse PCA des acides gras du rumen en fonction de la lipomobilisation

L'analyse sPLS-DA n'a pas permis de discriminer les acides gras en fonction de la lipomobilisation. Les valeurs d'AUC sont trop éloignées de 1 (valeurs comprises entre 0,73 et 0,83) (figure 24). Le modèle est moyennement précis. Le lien est très faible entre le microbiote et les acides gras du rumen.

Il n'y a donc pas de discrimination des acides gras en fonction de la lipomobilisation.

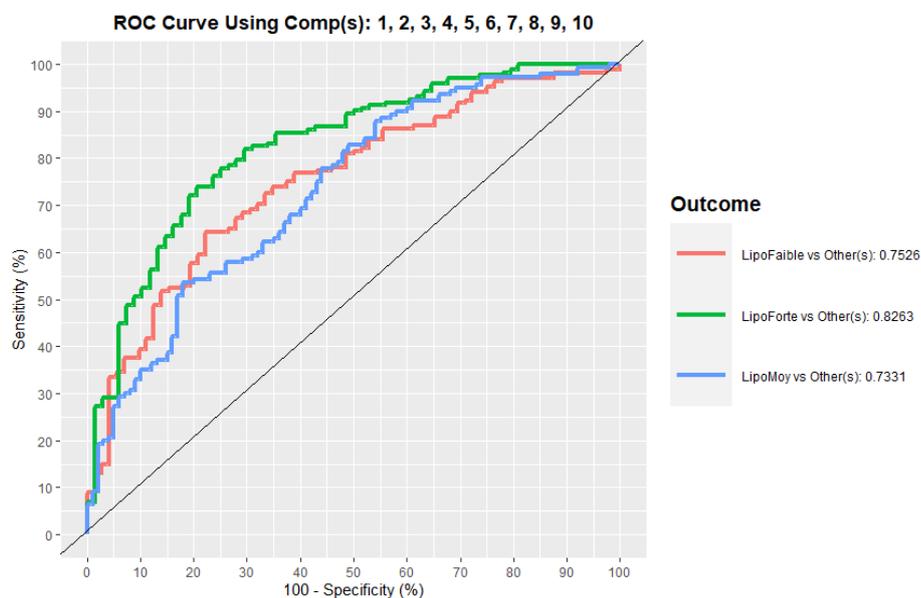


Figure 24 : Courbe ROC observée lors de l'évaluation du modèle de classification par la sPLS-DA des acides gras du rumen selon la lipomobilisation

4. Interactions microbiote et acides gras

La sPLS a généré des graphiques représentatifs des interactions entre le microbiote et les acides gras du rumen, en fonction de la lipomobilisation pour chaque période et en retenant un seuil de corrélation $\geq 0,4$ (annexe 8). Ces graphiques mettent également en valeurs les corrélations entre le microbiote et les acides gras. L'ensemble est reporté puis affilié dans le tableau de l'annexe 9. Les familles bactériennes retenues sont celles retrouvées pour un même acide gras sur au moins deux dates différentes. Les autres familles non retenues sont non répétables et mineures. On observe ainsi :

- Une corrélation positive entre les *Prevotellaceae* et le C17:0 (acide margarique) et le C16:0 (acide palmitique)
- Une corrélation négative entre les *Ruminococcaceae* et le C15:0 (acide pentadécylique)
- Une corrélation positive entre les *Lachnospiraceae* et le *trans*-11-C18:1 (acide vaccénique)
- Une corrélation positive entre les *Lachnospiraceae* et le *cis*-9-C18:1 (acide oléique)
- Une corrélation positive entre les *Ruminococcaceae* et le *cis*-9-C18:1

IV. Discussion

1. Lien entre la lipomobilisation et le microbiote

L'analyse du microbiote par la sPLS-DA n'a révélé qu'un lien infime entre la lipomobilisation des brebis laitières et le microbiote ruminal. Les familles *Lachnospiraceae*, *Christensenellaceae*, *Saccharofermentans*, *Spirochaetaceae* et *Prevotellaceae* sont discriminantes du niveau de lipomobilisation :

- Les *Lachnospiraceae*, dont le genre *Lachnospiraceae* *XPB1014 group* est associé au groupe faible lipomobilisation et le genre *Lachnospiraceae* *AC2044 group*, associé au groupe moyenne lipomobilisation
- Les genres *Christensenellaceae* *R-7 group*, *Lachnospiraceae* *UCG-008*, *Saccharofermentans* et *Treponema* sont associés au groupe forte lipomobilisation

- Les *Prevotellaceae* sont associées aux trois groupes de lipomobilisation. C'est la famille la plus représentée sur toutes les dates

Nos résultats montrent que les *Prevotellaceae* et les *Lachnospiraceae* sont plutôt corrélées positivement à un niveau de lipomobilisation faible et négativement à un niveau de lipomobilisation forte (tableau 8). Les *Christensenellaceae* sont, elles, associées à une forte lipomobilisation.

Ces résultats sont confirmés par la littérature scientifique. Les *Prevotella* fréquemment retrouvées dans le microbiote ruminal des ruminants, ont un spectre large de substrat (Xiang et al. 2022), allant des hémicelluloses à l'amidon. Les *Lachnospiraceae* et des *Christensenellaceae* sont principalement des bactéries fibrolytiques, l'une dégradant préférentiellement la pectine et l'autre la plupart des glucides pariétaux (pectine, hémicellulose, cellulose) (Hobson et Stewart 1997; Zhu et al. 2017). Elles sont favorisées par les régimes alimentaires à base de fourrages, comme ceux distribués dans cette étude.

Le lien entre le microbiote et la lipomobilisation des brebis pourrait s'expliquer par les activités fermentaires des bactéries. L'étude de Huang montre que Les *Prevotella_7* et les *Succinivibrionaceae_UCG-001* font parties des bactéries productrices d'AGV. Leurs abondances relatives sont significativement et positivement corrélées à la concentration de C2, C3, C4, valérate et d'AGV totaux (Huang et al. 2021). Les *Prevotellaceae*, connues pour dégrader et fermenter les glucides en AGV, produisent majoritairement du C3 (Huang et al. 2021; Betancur-Murillo et al 2022), alors que les bactéries fibrolytiques, de la famille des *Lachnospiraceae* et *Christensenellaceae*, produisent plutôt du C2 ou du C4 (Hobson et Stewart 1997; Zhu et al. 2017).

D'après Huang et al., les abondances relatives des *Prevotellaceae* et les *Lachnospiraceae* sont associées à une production laitière accrue et sont fortement corrélées à la MSI (Huang et al. 2021). L'étude de Huang, montre également une corrélation forte et positive entre la production laitière et les OTUs au sein de *Prevotella_1*, *Anaeroplasm* et *Treponema_2*. (Huang et al. 2021)

Bien que peu d'éléments ressortent de notre étude, celle de Gebreyesus et al. (2020) identifie des taxons microbiens spécifiques du rumen, qui sont associés de manière hautement significative à la variation des concentrations d'acétone et de β OH dans le lait. Ces OTUs appartiennent principalement aux familles des *Prevotellaceae* et des *Ruminococcaceae*. Elles ont montré des associations négatives avec les taux plasmatiques de β OH dans le sang et un bilan énergétique négatif. Pour Gebreyesus et al. , la composition microbienne du rumen

explique une plus grande proportion de la variation des concentrations d'acétone et de β OH dans le lait que la génétique de l'hôte (Gebreyesus et al. 2020).

L'étude de Xiang a démontré que le microbiote ruminal de la vache en cétose est significativement différent de celui de vaches saines. Si la richesse microbienne est diminuée, la diversité est plus élevée chez les animaux en cétose. Alors que le phylum Bacteroidota et la famille *Prevotellaceae* dominant chez les animaux sains, celui des animaux atteints de cétose est dominé par les Firmicutes et la famille *Lachnospiraceae*. Ainsi, les animaux qui lipomobilisent fortement voient leur ratio Firmicutes/Bacteroidota augmenter de manière significative par rapport aux vaches témoins. Les genres bactériens *Christensenellaceae R-7 group*, *NK4A214 group*, *Butyrivibrio* et *Saccharofermentans* sont fortement corrélés positivement avec le taux de β OH sanguin. Le genre *Christensenellaceae R-7 group* est lié à la malnutrition en altérant l'absorption et l'utilisation d'énergie par l'hôte. Au contraire, le taux de β OH sanguin est corrélé négativement avec les *Lactobacillus*, *Syntrophococcus*, *Vibrio*, *Sharpea*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Erysipelotrichaceae_UCG-002*, *Succinivibrionaceae_UCG-001* et *Prevotella* (Xiang et al. 2022).

Pendant le pre-partum, les *Prevotella* dominant la communauté bactérienne du rumen chez les animaux nourris au foin et aux céréales. Elles peuvent utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et prospèrent dans une large gamme de régimes. La réduction de la MSI peut être la principale cause de la cétose par diminution de l'abondance relative de *Prevotella* et de *Streptococcus* (Xiang et al. 2022).

La littérature scientifique associée à nos résultats montrent que les *Prevotellaceae* réduiraient la survenue de déficit énergétique en augmentant la production d'AGV. Nous avons cherché à le démontrer en étudiant les interactions microbiote et acide gras du rumen.

2. Acides gras et lipomobilisation

Au moment du péri-partum, les besoins nutritionnels s'accroissent alors que la capacité d'ingestion diminue. Les réserves hépatiques de glycogène étant limitées chez les ruminants, l'organisme s'oriente vers la néoglucogénèse, principale voie métabolique lors de déficit énergétique. Elle permet la formation de glucose à partir de précurseurs non glucidiques tels que les AGV ou les acides aminés. La mobilisation des réserves adipeuses induit la libération

d'AGNE dans le sang. Ils sont transformés dans le foie, par β oxydation, pour produire de l'énergie via l'ATP. Cette oxydation peut être complète ou partielle :

- Complète : formation d'acétyl CoA qui intègre le cycle de Krebs et former de l'ATP
- Partielle : formation de corps cétoniques (β OH, acétone, acéto-acétate)

Les AGNE peuvent aussi être reconvertis en triglycérides et stockés dans les hépatocytes (Lenogue et al 2023) ou exportés dans les lipoprotéines.

La concentration sanguine en AGNE ou en β OH est le reflet du niveau de lipomobilisation. Ils sont significativement positivement corrélés (Puppel et al. 2019). Si notre étude n'a pas permis de révéler de lien entre les acides gras du rumen et la lipomobilisation, certains scientifiques, comme Puppel ou Melendez, ont montré un lien étroit entre les acides gras du lait (dont près de 50% proviennent des acides gras de l'alimentation plus ou moins remaniés par le microbiote ruminal) et le déficit énergétique.

Au cours du déficit énergétique, les AGNE plasmatiques augmentent et l'apport d'acides gras aux glandes mammaires est modifié. Les AGNE libérés par la lipolyse sont principalement : C16:0, C18:0 et C18:1 *cis* -9, avec une conversion possible supplémentaire de C18:0 en C18:1 *cis* -9 dans les glandes mammaires grâce à l'action de la Δ 9-désaturase. Les acides gras du lait présentent un intérêt croissant dans la détection de taux plasmatiques élevés de β OH et d'AGNE sanguins. Le C18:1 *cis* -9 peut être utilisé comme biomarqueur pour le diagnostic précoce des taux sanguins élevés d'AGNE au cours des premiers stades de la lactation. Certains de ces acides gras issus de la biohydrogénation ruminale sont significativement influencés par le β OH. C'est le cas de l'acide linoléique (C18:2 n-6), dont le taux diminue lorsque les β OH dépassent une concentration de 1,2 mmol/l. Les isomères de l'acide linoléique, tels que les acides linoléiques conjugués (CLA 9 et CLA10), produits en partie au niveau ruminal lors de la biohydrogénation microbienne, sont également corrélés négativement avec les β OH sanguins (Puppel et al. 2019; Melendez et al. 2016).

Les résultats de notre étude ne permettent pas de révéler d'effets entre les acides gras ruminiaux et la lipomobilisation chez les brebis laitières. Aucun des acides gras n'a pu être discriminé en fonction de la lipomobilisation.

3. Microbiote et acides gras

Notre étude montre des interactions entre le microbiote ruminal et les acides gras :

- Une corrélation positive entre les *Prevotella* et le C17:0 (acide margarique) et le C16:0 (acide palmitique)
- Une corrélation négative entre les *Ruminococcaceae* et le C15:0 (acide pentadécylique)
- Une corrélation positive entre les *Lachnospiraceae* et le *trans*-11-C18:1 (acide vaccénique)
- Une corrélation positive entre les *Lachnospiraceae* et le *cis*-9-C18:1 (acide oléique)
- Une corrélation positive entre les *Ruminococcaceae* et le *cis*-9-C18:1

Ces résultats sont en partie corroborés par la littérature scientifique. Les acides gras à chaînes impaires et ramifiées sont en grande partie issus de synthèses bactériennes. Ce sont des marqueurs de microbiote ruminal, ils sont principalement présents dans les lipides membranaires bactériens (Vlaeminck et al. 2006). Les acides gras à chaînes impaires (C15:0 et C17:0) sont formés par élongation du propionate ou du valérate, alors que les précurseurs des acides gras à chaînes ramifiées (iso C13:0, iso C14:0, iso C15:0, iso C16:0, iso C17:0, iso C18:0, anteiso C13:0, anteiso C15:0, anteiso C17:0) sont des acides aminés à chaînes ramifiées (valine, leucine et isoleucine). La variation du profil de ces acides gras en sortie du rumen est le reflet des changements dans l'abondance relative des populations bactériennes (Fievez et al. 2012). D'après Vlaemink, les bactéries cellulolytiques contiennent de grandes quantités d'iso-acides gras². Les *Ruminococcus flavefaciens* sont enrichies en iso-acides gras à chaînes impaires et les *Ruminococcus albus* en iso-acides gras à chaînes paires. Par opposition, les bactéries amylolytiques présentent de faibles niveaux d'acides gras à chaînes ramifiées, elles sont plutôt enrichies en acides gras linéaires à chaînes impaires comme les souches de *Prevotella* enrichies en anteiso-C15:0 et les souches de *L. multiparus* ou *S. dextrinosolvans* (Fievez et al. 2012; Vlaeminck et al. 2006).

² « Les acides gras ramifiés se trouvent dans les graisses de ruminants et d'animaux marins principalement. Les plus fréquemment rencontrés portent un méthyle sur le pénultième ou l'antépénultième carbone. Ils sont respectivement désignés par les préfixes «iso-» et «anteiso» précédant le nom usuel de l'acide à même nombre de carbones. » (Ledoux 2012)

Au regard de nos résultats et d'après l'étude de Huws, les *Lachnospiraceae* sont associées au *trans*11-C18 :1 qui est un composé intermédiaire lors de la biohydrogénation de l'acide linoléique (Huws et al. 2011).

Concernant les *Ruminococcaceae*, il est difficile de conclure sans connaissance de l'espèce.

Pour les *Prevotella* (corrélation positive avec C17:0 et C16:0), nos résultats sont en accord avec les connaissances scientifiques actuelles et nous permettent de déduire qu'elles sont à l'origine des acides gras à chaînes impaires (C15:0 et C17:0) par la production de propionate et de valérate. Cependant, nous n'avons pas trouvé de lien significatif entre les *Prevotella* et la production d'AGV, ne nous permettant pas de conclure sur l'effet du microbiote ruminal en lien avec l'état d'engraissement des brebis laitières en péri-partum.

CONCLUSION

Cette thèse présente une étude *in vivo* des relations entre l'évolution de l'état d'engraissement des brebis laitières, la population bactérienne ruminale et le métabolisme ruminal des acides gras sur la période du péri-partum. C'est une phase peu étudiée chez les ovins et une période de transition particulière pour la brebis et son microbiote ruminal, se caractérisant par un déficit énergétique. Les données recueillies s'appuient sur le troupeau de race Lacaune de la station expérimentale de Lafage, dans le bassin de Roquefort. Le microbiote ruminal, les NEC et les prélèvements sanguins ont été étudiés pendant le mois d'allaitement-traite, sur 4 dates successives. Cette étude confirme que le statut énergétique des brebis laitières n'est que faiblement influencé par le microbiote ruminal lors du péri-partum. La lipomobilisation des animaux serait d'avantage liée à d'autres facteurs non étudiés ici. Néanmoins, certaines familles bactériennes comme les *Christensenellaceae* ont été identifiées et associées à un niveau de forte lipomobilisation et les *Prevotellaceae* à une faible lipomobilisation par augmentation de la production d'AGV. En étudiant les interactions entre le microbiote et les acides gras, nous n'avons pas pu le démontrer, de même qu'aucun des acides gras n'a pu être discriminé en fonction du niveau de lipomobilisation.

Répéter cette expérience sur plusieurs années successives, permettrait peut-être d'avoir plus d'éléments.

BIBLIOGRAPHIE

Agabriel, C., J.B. Coulon, G. Marty, et B. Bonaiti. 1993. « Facteurs de variation de la composition chimique du lait dans des exploitations à haut niveau de production ». *INRAE Productions Animales* 6 (1): 53-60. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1993.6.1.4187>.

Allaix, Philippe, Nathalie Augas, Maeva Antheme, Jean-Louis Balme, Marie-Line Barjou, Jean-Claude Baup, Marie Breissand, et al. 2022. « Dossier annuel ovins - Année 2022 - Perspective 2023 », Institut de l'élevage.

Betancur-Murillo et al, Claudia Lorena. 2022. « Prevotella: A Key Player in Ruminant Metabolism ». *Microorganisms* 11 (1): 1. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010001>.

Boggio, Guillermo Martinez, Annabelle Meynadier, Pepus Daunis-i-Estadella, et Christel Marie-Etancelin. 2021. « Compositional analysis of ruminal bacteria from ewes selected for somatic cell score and milk persistency ». *PLOS ONE* 16 (7): e0254874. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254874>.

« Brochure institutionnelle confédération de Roquefort.pdf ». s. d.

« Cahier des charges de l'appellation d'origine Roquefort ». 2017.

Caja, Gerardo, Alfred Ferret, Gasa J., Pérez-Oguez L., Bocquier Francois, Josefina Plaixats, et Oregui L. 2002. « Capacité d'ingestion des ovins laitiers : Effets des principaux facteurs de variation. » In , 9-36.

Chilliard, Y. 1987. « Revue bibliographique : Variations quantitatives et métabolisme des lipides dans les tissus adipeux et le foie au cours du cycle gestation-lactation 2e partie : chez la brebis et la vache ». *Reproduction Nutrition Développement* 27 (2A): 327-96. <https://doi.org/10.1051/rnd:19870301>.

CNIEL. 2023. « La filière laitière française en chiffres ». 2023. <https://www.filiere-laitiere.fr/fr/chiffres-cles/filiere-laitiere-francaise-en-chiffres>.

Edwards, Joan E., Robert J. Forster, Tony M. Callaghan, Veronika Dollhofer, Sumit S. Dagar, Yanfen Cheng, Jongsoo Chang, et al. 2017. « PCR and Omics Based Techniques to Study the

Diversity, Ecology and Biology of Anaerobic Fungi: Insights, Challenges and Opportunities ». *Frontiers in Microbiology* 8 (septembre): 1657. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01657>.

Enjalbert, F., S. Combes, A. Zened, et A. Meynadier. 2017. « Rumen Microbiota and Dietary Fat: A Mutual Shaping ». *Journal of Applied Microbiology* 123 (4): 782-97. <https://doi.org/10.1111/jam.13501>.

Escudié, Frédéric, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Katia Vidal, Sarah Maman, Guillermina Hernandez-Raquet, Sylvie Combes, et Géraldine Pascal. 2018. « FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution ». Édité par Bonnie Berger. *Bioinformatics* 34 (8): 1287-94. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.

FIDOCL. 2023. « Composition du lait | FIDOCL Conseil Elevage ». 2023. <http://www.fidocl.fr/content/composition-du-lait>.

Fievez, V., E. Colman, J.M. Castro-Montoya, I. Stefanov, et B. Vlaeminck. 2012. « Milk Odd- and Branched-Chain Fatty Acids as Biomarkers of Rumen Function—An Update ». *Animal Feed Science and Technology* 172 (1-2): 51-65. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.008>.

Gebreyesus, Grum, Gareth F. Difford, Bart Buitenhuis, Jan Lassen, Samantha Joan Noel, Ole Højberg, Damian R. Plichta, et al. 2020. « Predictive Ability of Host Genetics and Rumen Microbiome for Subclinical Ketosis ». *Journal of Dairy Science* 103 (5): 4557-69. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17824>.

Hardy, Clément. 2018. « Exploration des méthodes d'analyse de données compositionnelles pour l'étude du microbiome ». Stage de M1 du Master « Mathématiques Appliquées ». INRA, Domaine de Vilvert, Jouy-En-Josas.

Henderson, Gemma, Faith Cox, Siva Ganesh, Arjan Jonker, Wayne Young, Global Rumen Census Collaborators, Leticia Abecia, et al. 2015. « Rumen Microbial Community Composition Varies with Diet and Host, but a Core Microbiome Is Found across a Wide Geographical Range ». *Scientific Reports* 5 (1): 14567. <https://doi.org/10.1038/srep14567>.

Hobson, P. N., et C. S. Stewart, éd. 1997. *The Rumen Microbial Ecosystem*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7>.

Huang, Shuai, Shoukun Ji, Garret Suen, Feiran Wang, et Shengli Li. 2021. « The Rumen Bacterial Community in Dairy Cows Is Correlated to Production Traits During Freshening

Period ». *Frontiers in Microbiology* 12 (mars): 630605.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630605>.

Huws, Sharon A., Eun J. Kim, Michael R. F. Lee, Mark B. Scott, John K. S. Tweed, Eric Pinloche, R. John Wallace, et Nigel D. Scollan. 2011. « As yet Uncultured Bacteria Phylogenetically Classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae* Incertae Sedis and Unclassified, *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* May Play a Predominant Role in Ruminal Biohydrogenation ». *Environmental Microbiology* 13 (6): 1500-1512.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02452.x>.

Idele. 2016. « Guide abreusement Idele ».

INRA. 2018. *Alimentation des ruminants*. Éditions Quae.

INRA 2018. *Alimentation des ruminants : INRA 2018* -. Consulté le 8 septembre 2021.
<https://univ-toulouse-scholarvox-com.gorgone.univ-toulouse.fr/reader/docid/88863541/page/5>.

Jami, Elie, Bryan A. White, et Itzhak Mizrahi. 2014. « Potential Role of the Bovine Rumen Microbiome in Modulating Milk Composition and Feed Efficiency ». Édité par Markus M. Heimesaat. *PLoS ONE* 9 (1): e85423. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085423>.

Jarrige, Robert, éd. 1995. *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion*. Mieux comprendre. Paris: INRA.

Kopečný, J., et Blanka Hodrová. 1995. « Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi ». *Letters in Applied Microbiology* 20 (5): 312-16. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00453.x>.

La langue française. 2023. « Dictionnaire français ». La langue française. 2023.
<https://www.lalanguefrancaise.com/dictionnaire/definition/chimioautotrophe>.

Laur. 2003. « Cétose et toxémie de gestation : étude comparée ».

Ledoux. 2012. « Principaux constituants des lipides : structure, classification et nomenclature chimiques. »

Légifrance. s. d. *Arrêté du 22 décembre 2022 relatif à la modification temporaire du cahier des charges de l'appellation d'origine protégée (AOP) « Roquefort »*. Consulté le 10 novembre 2023.

Lenogue et al, Léa. 2023. « Évaluation péri-partum d'indicateurs du déficit énergétique comme marqueurs prédictifs de troubles de la reproduction chez la vache laitière ».

Lima, Fabio S., Georgios Oikonomou, Svetlana F. Lima, Marcela L. S. Bicalho, Erika K. Ganda, Jose C. De Oliveira Filho, Gustavo Lorenzo, Plamen Trojancanec, et Rodrigo C. Bicalho. 2015. « Prepartum and Postpartum Rumen Fluid Microbiomes: Characterization and Correlation with Production Traits in Dairy Cows ». Édité par M. W. Griffiths. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (4): 1327-37. <https://doi.org/10.1128/AEM.03138-14>.

Lobo, Richard R., et Antonio P. Faciola. 2021. « Ruminant Phages – A Review ». *Frontiers in Microbiology* 12 (décembre): 763416. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.763416>.

Marie-Etancelin, Christel, Beatrice Gabinaud, Géraldine Pascal, Regis Tomas, Jean Marie Menras, Francis Enjalbert, Charlotte Allain, Helene Larroque, Rachel Rupp, et Annabelle Meynadier. 2020. « Genetic Determinism of Dairy Sheep Ruminant Microbiota ».

Melendez, Pedro, Pablo Pinedo, José Bastias, Maria Paz Marin, Carolina Rios, Consuelo Bustamante, Natalia Adaro, et Mario Duchens. 2016. « The association between serum β -hydroxybutyrate and milk fatty acid profile with special emphasis on conjugated linoleic acid in postpartum Holstein cows ». *BMC Veterinary Research* 12 (1): 50. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0679-7>.

Meynadier et al. 2019. « La digestion ruminale des aliments ». Planet-Vie. 2019. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-digestif/la-digestion-ruminale-des-aliments>.

Michelland, R., S. Combes, V. Monteils, C. Bayourthe, L. Cauquil, F. Enjalbert, C. Julien, et al. 2012. « Analyse comparée des écosystèmes digestifs du rumen de la vache et du caecum du lapin ». *INRAE Productions Animales* 25 (5): 395-406. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2012.25.5.3227>.

« mixOmics ». 2023. <http://mixomics.org/case-studies/splsda-srbct-case-study/>.

Pace, Mélissa. 2019. « Étude tomodynamométrique chez l'agneau à l'engraissement. »

Pitta, D. W., S. Kumar, B. Vecchiarelli, D. J. Shirley, K. Bittinger, L. D. Baker, J. D. Ferguson, et N. Thomsen. 2014. « Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period ». *Journal of Animal Science* 92 (9): 4014-22. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7621>.

Popova, Milka. 2012. « Structure et activité de la communauté des Archaea méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants ».

Puppel, Kamila, Marcin Gołębiewski, Paweł Solarczyk, Grzegorz Grodkowski, Jan Słószarz, Małgorzata Kunowska-Słószarz, Marek Balcerak, Tomasz Przysucha, Aleksandra Kalińska, et Beata Kuczyńska. 2019. « The Relationship between Plasma β -Hydroxybutyric Acid and Conjugated Linoleic Acid in Milk as a Biomarker for Early Diagnosis of Ketosis in Postpartum Polish Holstein-Friesian Cows ». *BMC Veterinary Research* 15 (1): 367. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2131-2>.

« Rapport d'activité 2022 de la confédération générale des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort ». 2022.

Rous, Simonne. 1977. « Régulation de l'activité des enzymes de la lipolyse et de la lipogenèse dans le tissu adipeux ». *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 17 (5B): 807-25. <https://doi.org/10.1051/rnd:19770705>.

Rousseau, J.-P. 1968. « Étude de l'activité du électrique de la musculature lisse de l'estomac (réseau) chez les petits ruminants. Action de la stimulation vagale ». *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 8 (2): 301-11. <https://doi.org/10.1051/rnd:19680211>.

Ruckebusch, Y, et R N B Kay. 1971. « Étude critique de la motricité gastrique chez les bovins ».

Schmidely et al. 2001. « Taux butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants : effets de l'apport de matière grasse ou d'aliment concentré ». IINRA-INAPG.

Thivend, P., G. Fonty, J. P. Jouany, Michelle Durand, et Ph. Gouet. 1985. « Le fermenteur rumen ». *Reproduction Nutrition Développement* 25 (4B): 729-53. <https://doi.org/10.1051/rnd:19850601>.

UPRA Lacaune. 2023. « Système d'élevage traditionnel ». UPRA Lacaune. 2023. <https://www.race-lacaune.fr/les-races-lacaune/lacaune-lait/systeme-delevage-traditionnel/>.

Vézignol, Thomas. 2020. « Comparaison de la composition du microbiote ruminal de brebis de race Lacaune, issues de deux lignées divergentes selon leur persistance laitière : étude sur trois lactations successives ». Other. <https://oatao.univ-toulouse.fr/27498/>.

Vlaeminck, B., V. Fievez, A.R.J. Cabrita, A.J.M. Fonseca, et R.J. Dewhurst. 2006. « Factors Affecting Odd- and Branched-Chain Fatty Acids in Milk: A Review ». *Animal Feed Science and Technology* 131 (3-4): 389-417. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.017>.

Weimer, Paul J. 2022. « Degradation of Cellulose and Hemicellulose by Ruminant Microorganisms ». *Microorganisms* 10 (12): 2345. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122345>.

Xiang, Kaihe, Shuang Li, Maimaiti Tuniyazi, Ruiying Mu, Ying Wang, Naisheng Zhang, Xiaoyu Hu, et Yunhe Fu. 2022. « Changes in the Rumen Microbiota Community in Ketosis Cows during Propylene Glycol Treatment ». *Food & Function* 13 (13): 7144-56. <https://doi.org/10.1039/D1FO03800A>.

Zened, Asma, Evelyne Forano, Céline Delbes, Isabelle Verdier-Metz, Diego Morgavi, Milka Popova, Yulixaxis Ramayo-Caldas, Dominique Bergonier, Annabelle Meynadier, et Christel Marie-Etancelin. 2021. « Les microbiotes des ruminants : état des lieux de la recherche et impacts des microbiotes sur les performances et la santé des animaux ». *INRAE Productions Animales*, mars, 249-60. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2020.33.4.4597>.

Zhang, Qianqian, Gareth Difford, Goutam Sahana, Peter Løvendahl, Jan Lassen, Mogens Sandø Lund, Bernt Guldbbrandtsen, et Luc Janss. 2020. « Bayesian Modeling Reveals Host Genetics Associated with Rumen Microbiota Jointly Influence Methane Emission in Dairy Cows ». *The ISME Journal* 14 (8): 2019-33. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0663-x>.

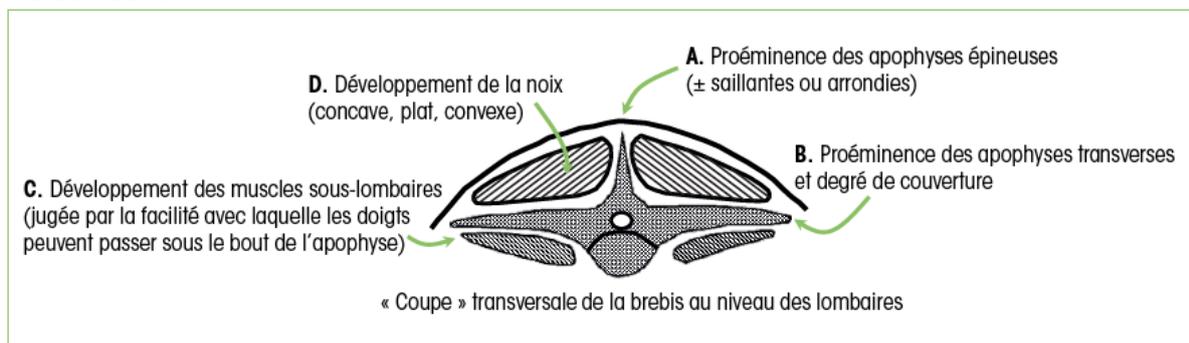
Zhu, Zhigang, Lise Kristensen, Gareth F. Difford, Morten Poulsen, Samantha J. Noel, Waleed Abu Al-Soud, Søren J. Sørensen, Jan Lassen, Peter Løvendahl, et Ole Højberg. 2018. « Changes in Rumen Bacterial and Archaeal Communities over the Transition Period in Primiparous Holstein Dairy Cows ». *Journal of Dairy Science* 101 (11): 9847-62. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14366>.

Zhu, Zhigang, Samantha Joan Noel, Gareth Frank Difford, Waleed Abu Al-Soud, Asker Brejnrod, Søren Johannes Sørensen, Jan Lassen, Peter Løvendahl, et Ole Højberg. 2017. « Community Structure of the Metabolically Active Rumen Bacterial and Archaeal Communities of Dairy Cows over the Transition Period ». Édité par Garret Suen. *PLOS ONE* 12 (11): e0187858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187858>.

ANNEXES

Annexe 1 : Grille d'évaluation de la NEC des brebis laitières

Grille pour noter l'état corporel des brebis laitières
Source : GIS id64



Note	A. Apophyses épineuses	B. Apophyses transverses	C. Passage des doigts sous l'extrémité des apophyses transverses	D. Noix du muscle	Couverture grasseuse
1 - Brebis très maigre	Saillantes, pointues	Saillantes	Facile	Peu épaisse, indétectable, franchement concave	Absente
2 - Brebis assez maigre	Saillantes, lisses (ondulations)	Plates, plus rondes	Légère pression	Épaisseur modérée, légèrement concave	Faible
3 - Brebis en état	Petite élévation plate et arrondie Pression pour sentir chaque os	Plates, bien couvertes	Importante	Remplie, plate	Modérée
4 - Brebis grasse	En appuyant : ligne dure	Non détectables	Pas possible	Remplie, légèrement convexe	Épaisse
5 - Brebis très grasse	Non détectable : dépression entre les couches de graisse	Non détectables	Pas possible	Très remplie, franchement convexe	Très épaisse

Tableau 9 : Grille d'évaluation des notes d'état corporelles chez les ovins (Idele 2022)

Annexe 2 : Méthode de quantification des AGNE

Méthode enzymatique automatique de dosage des AGNE (acides gras non estérifiés) dans du plasma à l'aide du lecteur de plaques FluoStar

Réaliser 2 plaques par jour (80 échantillons par plaque). Il faut 45min pour la préparation d'une plaque de 80 échantillons

Préparation du plan de plaque sous Excel.

Il est plus simple de traiter les échantillons, dans l'ordre du fichier Excel transmis par Fabien.

Trier les tubes sur un portoir de manière à représenter le plan de plaque. Utiliser un portoir bleu (8 X 16 positions). Conserver ce portoir au réfrigérateur. **Bien agiter chaque tube à l'aide d'un vortex avant chaque prélèvement ou manuellement s'ils sont trop remplis.**

Identifier une plaque vide 96 puits et la placer sur lit de glace pilée. Placer un film d'aluminium entre la glace et la plaque.

Sortir 32 échantillons et les disposer dans une boîte en carton (10X10 positions) sur lit de glace
Voir modèle d'organisation sur la photo ci-dessous.



Prélever 250 μ l de chaque échantillon, à l'aide d'une pipette mono-canal, et déposer dans un puit, tout en respectant le plan de plaque.

Faire attention de ne pas créer de bulle dans chaque puit.

Inutile d'ajouter sur cette plaque l'eau, l'étalon analytique et le QC Haut (échantillon de sérum humain à une concentration de 0.83 mmole/l en AGNE).

Lorsque la plaque est remplie, coller un adhésif sur la plaque et stocker au congélateur.

Si la lecture a lieu l'après-midi, la plaque peut être conservée au réfrigérateur, avec le film adhésif.

A savoir : la plaque se décongèle au bout de 30min-1H, à température ambiante. Ne pas l'agiter au risque de provoquer des contaminations de puit à puit.

La centrifuger à l'aide de la SORVALL ST8 du laboratoire de BIOMOL.

Déroulement de la préparation de la plaque de lecture :

Dans l'ordre :

Verser 2 flacons de R1 dans un réservoir en polystyrène de 25 ml

- Déposer 200 µl de R1 en 1^{er} dans chaque puit
- Déposer délicatement 5µl d'échantillon à l'aide de la pipette multicanaux 8 positions, cône plongé dans R1

IMPORTANT : Cône plongé dans le liquide, au cœur du puit, repipeter-distribuer délicatement 1 seconde fois (jusqu'au 1^{er} arrêt) > éviter l'apparition de bulles.

- Introduire la plaque dans le FluoStar et laisser réagir 3min à 37°C
- Réaliser la lecture A1

Verser le flacon de R2 dans un réservoir en polystyrène de 25 ml

- Déposer 100µl de R2, cône plongé dans le liquide en plein milieu du puit jusqu'au 1^{er} arrêt

IMPORTANT : Cône plongé dans le liquide, au cœur du puit, repipeter-distribuer délicatement 1 seconde fois (jusqu'au 1^{er} arrêt) > éviter l'apparition de bulles. Bien assurer le mélange

Option : il est possible de déposer délicatement, les dernières gouttes de liquide, contenu dans chaque cône, sur la paroi de chaque puit.

- Introduire la plaque dans le FluoStar et laisser réagir 4min30 à 37°C
- Réaliser la lecture A2

Lecture à l'aide du FLUOSTAR de BMG Labtech (équipe INTHERES)

Pas d'agitation de plaque, Four à 37°C (incubation à l'intérieur du four) 20 flashes par puits
lecture de Haut en bas puis Bas en haut, etc. Lecture à 546 nm

Plaque de préparation transparente Greiner-One **650101**

Plaque pour la lecture à bord blanc Greiner-One réf : **655098**

Référence des kits :

- Free fatty acids reagent set enzymatic method 20-100 tests ref 3055 (INSTRUCHEMIE fournisseur SOBIODA)
- Free fatty acids control high level (QC Haut) réf. 3052 > 0.8 mmole/l en valeur moyenne

Annexe 3 : Méthode de dosage des AGV du rumen

Méthode utilisée pour déterminer la concentration des AGV dans le jus de rumen ainsi que dans les in vitro comme témoin fermentaire.



1. Principe de la méthode

Les acides gras volatils (AGV), contenus dans le jus de rumen, déprotéinisé puis dilué, sont dosés par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme, selon une méthode de dosage par étalon interne.

2. Réactifs (chimiques et biologiques)

Tous les réactifs sont de qualité analytique.

- Acide métaphosphorique 25% (p/v)
- Etalons des AGV : acides acétique, propionique, butyrique et isobutyrique, valérique et isovalérique.
- Etalon interne : acide 4-méthylvalérique à 0.2% (v/v) : diluer 100 µl d'acide 4-méthylvalérique dans 50 ml d'eau ultra pure et soniquer la solution pour une meilleure solubilisation.

Réactif	Formule	N° CAS	Masse moléculaire (g/mol)	Point ébullition (°C)	Phrase de Risque	Phrase de Sécurité
Acide métaphosphorique	(HPO ₃) _n	37267-86-0			R34	S26
Acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	64-19-7	60,1	118	R10-35	S1/2-23-26-45
Acide propionique	C ₃ H ₆ O ₂	79-09-4	74,1	141	R10-34	S2-23-26
Acide isobutyrique	C ₄ H ₈ O ₂	79-31-2	88,1	154	R21/22	S26
Acide n-butyrique	C ₄ H ₈ O ₂	107-92-6	88,1	163	R34	S1/2-26-36-45
Acide isovalérique	C ₅ H ₁₀ O ₂	503-74-20	102,1	176	R34	S26
Acide n-valérique	C ₅ H ₁₀ O ₂	109-52-4	102,1	186	R34	S26-36
Acide 4-méthylvalérique	C ₆ H ₁₂ O ₂	646-07-1	116,1		R34	S26

3. Mode opératoire

- **Prélèvement des échantillons de contenu ruminal**

Déposer 5 ml d'échantillon de contenu ruminal dans un tube en polypropylène contenant 0,5 ml d'une solution à 25% (v/v) d'acide sulfurique concentré. Agiter le tube par retournement puis congeler immédiatement.

- **Préparation des échantillons**

Mettre à décongeler les échantillons, à température ambiante. Agiter manuellement les échantillons.

Centrifuger à 4000 tr/min et à 4°C pendant 20 min pour éliminer les particules grossières. Dans un microtube à centrifuger, déposer 200 µl d'acide métaphosphorique à 25% (p/v) puis 1 ml de sumageant. Agiter vigoureusement. Centrifuger à 14770 tr/min et à 4°C pendant 15 min (**extrait 1**).

Dans un flacon d'injection, déposer 75 µl d'étalon interne (acide 4-méthylvalérique à 0,2 % (v/v)), 900 µl d'eau et 100 µl du sumageant provenant de l'**extrait 1**.

Note :

Les AGV étant très volatils, il est préférable de traiter les échantillons par petites séries.

- **Préparation des solutions de calibration**

Préparer une solution mère contenant :

Acide acétique	30 g/l	soit	500 mmole/l
Acide propionique	12 g/l	soit	161,9 mmole/l
Acide isobutyrique	1,5 g/l	soit	17 mmole/l
Acide butyrique	11 g/l	soit	124,8 mmole/l
Acide isovalérique	2,0 g/l	soit	19,6 mmole/l
Acide valérique	1,5 g/l	soit	14,7 mmole/l
Acide 4-méthylvalérique (0.2% v/v)	1,84 g/l	soit	15,9 mmole/l (avec d = 0.922 g/ml)

Diluer cette solution mère afin d'obtenir les concentrations suivantes.

SOL	Dilution	Concentration des AGV (mmole/l)					
		Acide acétique	Acide propionique	Acide isobutyrique	Acide butyrique	Acide isovalérique	Acide valérique
A	1/200 ^{ème}	2,5	0,810	0,085	0,625	0,098	0,074
B	1/100 ^{ème}	5,0	1,620	0,170	1,250	0,196	0,147
C	1/50 ^{ème}	10,0	3,24	0,340	2,500	0,392	0,294
D	1/20 ^{ème}	25,0	8,1	0,850	6,250	0,98	0,735
E	3/20 ^{ème}	75,0	24,3	2,550	18,750	2,94	2,205
F	6/20 ^{ème}	150,0	48,6	5,1	37,5	5,88	4,410

Dans un micro tube à centrifuger, déposer 200 µl d'acide métaphosphorique puis 1 ml de chaque point de gamme (**SOL A à F**). Agiter vigoureusement.

Dans un flacon d'injection, déposer 75 µl d'étalon interne (acide 4-méthylvalérique), 100 µl du mélange préparé ci-dessus et 900 µl d'eau.

- **Conditions chromatographiques (privilégier le mode splitless)**

***Attention** : injecter en mode split avec un injecteur splitless donne des résultats non répétables.*

Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme (CPG/FID).

Appareillage

Chromatographe en phase gazeuse : 7890A Agilent Technologies
Passeur automatique d'échantillons : 7683B Agilent Technologies

Acquisition du signal

Module d'acquisition (UCI-50, Dionex)
Logiciel d'acquisition : Chromquest (version 6.60 build 1428, Dionex)

Injection en mode splitless (front inlet)

Liner HP : 5062-3587
Volume injecté : 1 µl
Solvant de rinçage A : méthanol
Solvant de rinçage B : eau ultra-pure

NB : l'injection en mode split (utilisation d'un liner 5183-4711) donne des résultats non répétables.

Séparation

Température de l'injecteur : 250 °C.
Gaz vecteur : azote
Débit du gaz vecteur : 4 ml/min

Colonne : Alltech EC-1000 (PEG Acid Modified) : L=15 m, dc =
0.53 mm et épaisseur de film : 1.2 µm
Programmation de température : 100°C (5 min) 6°C/min 148°C 20°C/min 188°C (6 min)

Détection FID

Température du détecteur : 250 °C.
Débit du make-up : 8 ml/min
Débit d'hydrogène : 35 ml/min
Débit d'air : 350 ml/min

Dans ces conditions chromatographiques, le temps de rétention est de 3.99 min pour l'acide acétique, 5.03 min pour l'acide propionique, 5.38 min pour l'acide iso butyrique, 6.24 min pour l'acide butyrique, 6.82 min pour l'acide iso valérique, 7.85 min pour l'acide valérique et 8,72 min pour l'acide méthyle-4 iso valérique.

4. Expression des résultats

Les concentrations en AGV sont exprimées en millimoles par litre. Pour prendre en compte la dilution engendrée par l'ajout de chlorure mercurique dans le jus de rumen, il faut multiplier par 5,5 et diviser par 5 pour avoir la concentration exacte de chaque AGV dans le jus de rumen.

5. Références bibliographiques

Playne M.J. (1985). Determination of ethanol, fatty acids, lactic acid and succinic acid in fermentation liquids by gas chromatography. *J.SCI.Food Agric.* 36 : 638-644

Annexe 4 : Méthode de dosage des acides gras du rumen

Station d'acquisition et traitement du signal

SLI

Logiciel de retraitement : peakwin (version 3.28)



1. Réactifs et solvants utilisés

Solvants	qualité	Fournisseur, référence
Méthanol	HPLC grade	Fisher Scientific, M/4056/15
Hexane	HPLC grade	Fisher Scientific, H/0406/15
Dichlorométhane	Multisolvent	Scharlau
Eau	ultra-pure	Système Purite select
Standard interne	qualité	Fournisseur, référence
Acide nonadécanoïque (C19:0)	Standard for GC	Fluka, 72332 5 g
Filtres, cartouches		
Hydroxyde de sodium	Pour analyses	Fisher Scientific, S/4920/60
Acétylchlorure	analytical reagent grade	Fisher Scientific, A/0920/PB05
K ₂ CO ₃	qualité analytique	Merck, 104298.1000

- Extraction méthylation in-situ.

Dans un tube en verre Pyrex, muni d'un bouchon à vis, peser environ 100mg* (entre 95 et 100mg) d'extrait « in vitro » lyophilisé.

Déposer dans le tube, à l'aide d'une micropipette « Transferpettor Fix», 200 µl de standard interne (4 mg/ml de C19:0 dans le dichlorométhane) et 200 µl de dichlorométhane. Le standard doit être conservé au congélateur et maintenu à température ambiante avant pipetage. Pour l'ajout de standard interne, il est recommandé d'utiliser une micropipette en verre pour une meilleure précision des prélèvements.

- Dérivation en milieu basique (dérivation des triglycérides/ transestérification).

A l'aide d'une pipette à répétition « HandyStep® » muni d'un « Combitips », ajouter 2 ml de soude méthanolique à 0.5M (1 g pour 50 ml), préparée extemporanément. Boucher fermement le tube à centrifuger pour éviter toute évaporation de composés méthylés. Agiter à l'aide d'un vortex pendant une durée de 60 secondes à la vitesse de 1000 tr/min.

Laisser réagir pendant 10' à 50°C dans un bain thermostaté. Refroidir le tube pendant 7 minutes dans un bain d'eau froide.

- **Dérivation en milieu acide (dérivation des acides gras libres et des phospholipides).**

A l'aide d'une pipette à répétition HandyStep® muni d'un Combitips, ajouter dans le tube, 3 ml d'acétylchlorure à 10% préparé extemporanément. Agiter à l'aide d'un vortex pendant une durée de 60 secondes à la vitesse de 1000 tr/min.

Laisser réagir pendant 10' à 80°C dans un bain thermostaté. Refroidir le tube pendant 7 minutes dans un bain d'eau froide.

A l'aide d'une pipette à répétition HandyStep® muni d'un Combitips, ajouter délicatement 5 ml d'une solution de K₂CO₃ à 6% (p/v), préparée extemporanément puis 1,6 ml d'hexane HPLC. Prendre des précautions lorsque le K₂CO₃ est déposé dans le tube, car au contact de l'acétylchlorure, une effervescence se produit.

Agiter le tube rapidement à la main puis pendant 5 min, à l'aide d'un agitateur rotatif. Centrifuger à 4000 tr/min pendant 10 min à une température de 10°C. Prélever délicatement une partie de la phase supérieure puis la répartir dans 2 flacons ambrés.

Attention, l'opération de prélèvement final est délicate. Il ne faut surtout pas prélever de la phase aqueuse inférieure, néfaste pour la colonne chromatographique.

L'extrait final présente une concentration en matrice de 0,05 g d'extrait/ml de solvant.
Injecter en CPG/FID

2. Dosage par chromatographie en phase gazeuse.

Les extraits sont dosés par chromatographie gazeuse couplée à une détection par ionisation de flamme (CPG/FID) selon 2 méthodes chromatographiques afin de séparer au mieux tous les C18:1 cis et trans ainsi que les CLA :

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- **Méthode 2 (in-vitro)**

Acquisition des données

Module d'acquisition (Model 202, SRI Instruments)

Logiciel d'acquisition (PeakSimple : version 2.83)

Injection

injecteur automatique : 7683 Series AGILENT technologies

split ratio : 50

T° injecteur : 255°C

Pression : 118 kPa (à 60°C)

Séparation

chromatographe en phase gazeuse : 6890N AGILENT technologies

gaz vecteur : hydrogène (débit 1 ml/min) **débit constant**

volume injecté : 1 µl (split)

chromatographe : AGILENT 6890N avec détecteur FID

colonne : CP7489 : WCOT fused silica CP-Sil88 100 m, ø interne 0,25 mm, épaisseur phase stationnaire 0.2 µm

T° colonne : départ: 60°C (2 min) gradient 8°C/min 150°C (12 min) 2°C/min 175°C (20 min) 5°C/min 225°C (10 min) 5°C/min 240°C (10 min)

Dosage

T° détecteur : 260°C

Débit des gaz vecteur : H₂ : 35 ml/min et débit Air : 400 ml/min

Front Inlet :	split
Temp :	255°C
Pression :	118 (à 60°C)
Split ratio :	50
Split flow :	20
Total flow :	28.6
Gas saver :	ON
Saver flow :	20
Saver time :	2'

Front injector :	1
Sample pumps :	4
Viscosity delayt :	0
Sample washs :	2
Solvent A washs :	3
Solvent B washs :	3
Slow plunger :	off
Pre dwell time :	0.03
Post dwell time :	0.01
Samp offset :	0.0
Solv A pre wash	Hexane
Solv B pre wash	MeOH

Front detector	
Temp :	260°C
H2 flow :	35
Air flow /	400
MoDe Const Make-up	
Mkup N2	25
Flame	ON
Output	5.8

- **Méthode 9 (in-vitro)**

Acquisition des données

Module d'acquisition (Model 202, SRI Instruments)

Logiciel d'acquisition (PeakSimple : version 2.83)

Injection

injecteur automatique : 7683 Series AGILENT technologies

split ratio : 50

T° injecteur : 255°C

Pression : 150 kPa

Séparation

chromatographe en phase gazeuse : 6890N AGILENT technologies

gaz vecteur : hydrogène (débit 1 ml/min) **pression constante**
volume injecté : 1 µl (split)
chromatographe : AGILENT 6890 avec détecteur FID
colonne : WCOT fused silica CP-Sil88 100 m, ø interne 0,25 mm, épaisseur phase stationnaire 0.2 µm
T° colonne : départ: 60°C (3min) gradient 8°C/min 190°C (13 min) 5°C/min 225°C (10 min) 10°C/min 230°C (1 min)

Dosage

T° détecteur : 260°C
Débit : H₂ : 35 ml/min et débit Air : 400 ml/min

3. Bibliographie

La méthode utilisée entre 2007 et 2013 (Park et Goin modifiée) a mis en évidence sur certaines expérimentations des problèmes de quantification de certains AG dans des échantillons in-vitro.

C'est pourquoi, nous avons décidé d'améliorer l'ancienne méthode et d'utiliser la méthode de Jenkins.

Cette nouvelle méthode est tirée de :

- Jenkins, T. C. (2010) "Technical note: Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples." Journal of Dairy Science 93 (3): 1170-1174.
- Sukhija, P. S. and D. I. Palmquist (1988) "Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces." Journal of Agricultural and Food Chemistry 36(6): 1202-1206.

Annexe 5 : Mode opératoire d'extraction du microbiote au laboratoire

- Production d'amplicons par le séquençage à haut débit

Pour produire des amplicons, il faut avant tout récupérer l'ADN contenu dans les bactéries du rumen :

1. On procède à la lyse des membranes bactériennes : une lyse mécanique avec un rack de lyse ZR BashingBead™ (billes de 0,1-0,5 mm)
2. Une fois l'ADN libérée, on le coupe en morceaux, on l'isole et le purifie à l'aide de la technologie Zymo-Spin™ qui nous permet également d'éliminer les inhibiteurs de la PCR
3. Lancement de la 1^{ère} PCR pour obtenir des amplicons du gène codant pour l'ARN ribosomique, plus précisément amplification des régions V3-V4 du gène codant l'ARN de la sous unité 16S spécifique des procaryotes. Ces régions sont utilisées pour l'identification des bactéries, car elles comportent des zones communes aux bactéries et d'autres suffisamment variables pour nous permettre d'affilier ces bactéries.

Pour plus de détails, dans les pages qui suivent se trouve le guide d'utilisation du Quick DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 kit.

1. Highlights

- Rapid, high-throughput (96-well) method for the isolation of inhibitor-free, PCR-quality DNA from microbes including Gram positive and negative bacteria, fungi, algae, protozoa, etc. in fecal and soil samples in as little as 50 minutes.
- State-of-the-art, ultra-high density **BashingBeads™** are fracture resistant and chemically inert.
- Omits the use of organic denaturants as well as proteinases.

2. Product Contents

Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe 96 Kit (Kit Size)	D6011 (2x96 preps.)	Storage Temperature
ZR BashingBead™ Lysis Rack (0.1 & 0.5 mm)	2	Room Temp.
Lysis Solution	(2) 40 ml	Room Temp.
Genomic Lysis Buffer¹	150 ml	Room Temp.
DNA Pre-Wash Buffer²	50 ml	Room Temp.
g-DNA Wash Buffer	100 ml	Room Temp.
DNA Elution Buffer	(2) 10 ml	Room Temp.
Prep Solution (DNase/RNase-Free)	30 ml	Room Temp.
Deep-Well Block	2	Room Temp.
Silicon-A™ Plate	2	Room Temp.
Silicon-A™-HRC Plate	2	Room Temp.
Collection Plate	2	Room Temp.
Elution Plate	6	Room Temp.
Cover Foil	4	Room Temp.
Instruction Manual	1	-

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

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

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

3. Specifications

- **Format** – Bead Beating, 96-Well Plate Purification.
- **Sample Sources** – Host, bacterial, fungal, algal, protozoan, viral DNA can be isolated from ≤ 80 mg sample of mammalian feces or ≤ 135 mg soil. Additionally, 10 – 20 mg (wet weight) fungal/bacterial cells³ can be processed.
- **DNA Purity** – High quality, inhibitor-free DNA is eluted with **DNA Elution Buffer** suitable for the amplification of bacterial, protist, and/or mammalian templates ($A_{260}/A_{280} > 1.8$).
- **DNA Size Limits** – Capable of recovering genomic DNA sized fragments from 100 bp to ≥ 40 kb. Typical fragment sizes range from 25 kb - 35 kb. If present, parasitic and viral DNA will also be recovered.
- **DNA Recovery** – Typically, up to 5 μ g total DNA is eluted into 100 μ l (50 μ l minimum) **DNA Elution Buffer** per sample.
- **Equipment** – Centrifuge w/ microplate carrier, 96-well plate/block disruptor or pulverizer.

4. Product Description

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

5. Protocol

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

1. Add ≤ 80 mg of fecal sample or ≤ 135 mg of soil to the tubes of a **ZR BashingBead™ Lysis Rack (0.1 & 0.5 mm)**. Add 400 μ l **Lysis Solution** to each tube. Cap tubes tightly to prevent leakage.

Note: Alternatively, add 10-20 mg (wet weight) fungal and/or bacterial cells¹ that have been resuspended in up to 50 μ l of water or isotonic buffer (e.g., PBS) to the tubes of a ZR BashingBead™ Lysis Rack.

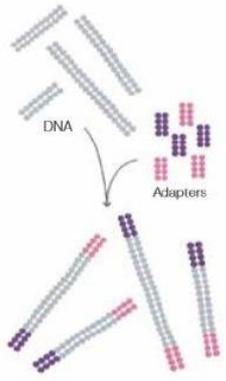
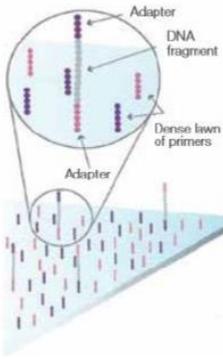
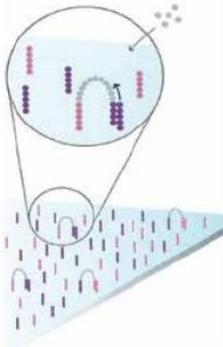
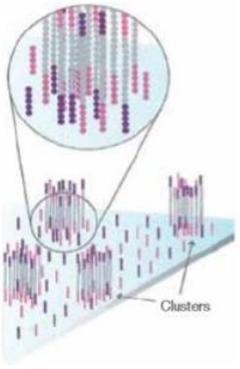
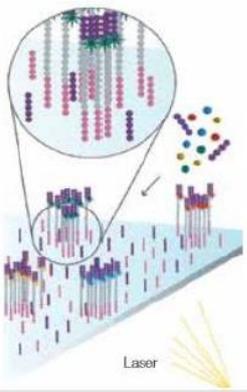
2. Secure in a 96-well block/plate bead beater (e.g., 2010 GenoGrinder®) and process samples. Optimization of processing time/speed will be necessary for complete sample lysis.

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

3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Rack (0.1 & 0.5 mm) at $\geq 3,000 \times g$ ($5,000 \times g$ max.) for 5 minutes.
 4. Transfer up to 250 μl supernatant to each well of a **96-Well Block**.
 5. Add 750 μl of **Genomic Lysis Buffer** to the supernatant in the 96-Well Block from Step 4. Cover completely with **Cover Foil** and mix thoroughly by vortexing for 2 minutes. Centrifuge the 96-Well Block at $\geq 3,000 \times g$ ($5,000 \times g$ max.) for 5 minutes.
 6. Remove or pierce foil and transfer 500 μl from the wells of Step 5 to the wells² of a **Silicon-A™ Plate**, mounted on a **Collection Plate**. Centrifuge the assembly at $\geq 3,000 \times g$ ($5,000 \times g$ max.) for 5 minutes.
 7. Discard the flow-through from the Collection Plate and repeat Step 6.
 8. Add 200 μl **DNA Pre-Wash Buffer** to the wells of the Silicon-A™ Plate, mounted on the emptied Collection Plate, and centrifuge the assembly at $\geq 3,000 \times g$ for 5 minutes.
 9. Add 500 μl **g-DNA Wash Buffer** to the wells of the Silicon-A™ Plate on the Collection Plate and centrifuge the assembly at $\geq 3,000 \times g$ for 5 minutes.
 10. Prepare the **Silicon-A™-HRC Plate**³ by mounting it on an **Elution Plate**. Add 150 μl **Prep Solution** to the wells by piercing through the cover foil. Incubate at room temperature for 5 minutes, and centrifuge the assembly at exactly $3,500 \times g$ for 5 minutes.
 11. Place the Silicon-A™ Plate directly onto a prepared Silicon-A™-HRC Plate, and then mount the assembly on a new Elution Plate (this new assembly is a 3 plate stack).
 12. Add 100 μl (50 μl minimum) **DNA Elution Buffer** directly to the matrices to the Silicon-A™ Plate on top. Centrifuge the assembly at exactly $3,500 \times g$ for 3 minutes.
- Eluted, ultra-pure DNA is now ready for use in your experiments, or the Elution Plate can be covered with Cover Foil for storage of the DNA.

Annexe 6 : Le séquençage haut débit

L'objectif de cette étape est d'obtenir une lecture des brins d'ADN extrait. Un run correspond à un séquençage regroupant plusieurs échantillons, donc il faut préalablement étiqueter les échantillons à l'aide de petites séquences d'ADN. Ces étiquettes sont appelées barre-code et donne le nom à la méthode : métabarcoding. Le séquençage nécessite 3 étapes :

<p>Prepare Genomic DNA Sampl</p> 	<p>Attach DNA to Surface</p> 	<p>Pour préparer le séquençage, il faut mettre en place des adaptateurs aux deux extrémités du brin à amplifier (biomarqueurs phylogénétiques). Ces zones vont se fixer à la plaque de lecture de l'appareil. → Ils sont représentés sur le schéma par les fragments d'ADN de couleurs rose et violette.</p>
<p>Bridge Amplification</p> 	<p>Complete Amplification</p> 	<p>En plus des adaptateurs mis en place, sont ajoutés des amorces, des nucléotides et des enzymes non marqués pour initier une amplification par pont (figure ci-contre)</p> <p>La polymérase synthétise de nouveaux brins pour obtenir plusieurs copies de la même séquence jusqu'à obtenir un cluster (=ensemble de copies).</p>
<p>Determine First Base</p> 	<p>Image First Base</p> 	<p>Des marqueurs fluorescents sont ajoutés et se fixent sur les brins d'ADN. Ils sont spécifiques d'une base.</p> <p>Après excitation, une longueur d'ondes est émise, ce qui permet d'identifier la première base, puis au cycle suivant, la seconde base et ainsi de suite. On obtient à la fin la liste des bases composant le brin d'ADN.</p>

Le séquenceur livre des séquences débarrassées de leurs étiquettes et des adaptateurs (Escudié et al. 2018).

Annexe 7 : Analyse des données issues du séquenceur par FROGS

Pre-process



Le pré-process est une étape nécessaire à la fusion des lectures appariées (forward/reverse) à l'aide de l'outil FLASH.

FROGS élimine les données présentant des séquences trop longues ou trop petites, celles ne contenant pas les bonnes amorces et contenant des bases ambiguës.

Clustering



Cette étape nécessite l'utilisation de l'outil SWARM. Cet outil fournit un algorithme de groupe pour générer des grands ensembles d'amplicons : les clusters. Il utilise un processus de croissance itératif et de valeurs d'abondance de séquences pour délimiter des OTU (Operational Taxonomy Unit = ensemble de micro-organismes présentant un niveau de similarité de séquence d'ADN) (Site : MixOmics)

A chaque étape de croissance, la séquence de l'étape précédente est utilisée pour trouver les autres séquences avec un nombre de différences inférieur ou égal à 1. Après l'agrégation, Swarm affine les clusters en examinant les abondances le long des connexions. Lorsque l'on s'éloigne de la base, les abondances décroissent. En revanche, si cette abondance augmente à nouveau, cela signifie que deux amas différents sont connectés par des séquences peu abondantes. Dans ce cas, SWARM coupe la connexion.

Chimera



La détection des chimères repose sur l'outil VSEARCH. Les chimères sont générées par PCR lorsqu'un amplicon avorté agit comme une amorce pour une matrice hétérologue. FROGS supprime les chimères.

Filters



Les filtres permettent de sélectionner les résultats grâce à différents critères sur :

- L'abondance : filtre Bokulich : suppression des OTUs $< 0.005\%$ des séquences totales
- Sur la qualité de l'affiliation (à faire uniquement après avoir obtenu les résultats de l'étape suivante)
- Sur phixcontaminant

Affiliation

Affiliation taxonomique allant jusqu'à l'espèce

Annexe 8 : Graphiques représentatifs des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen, par date.

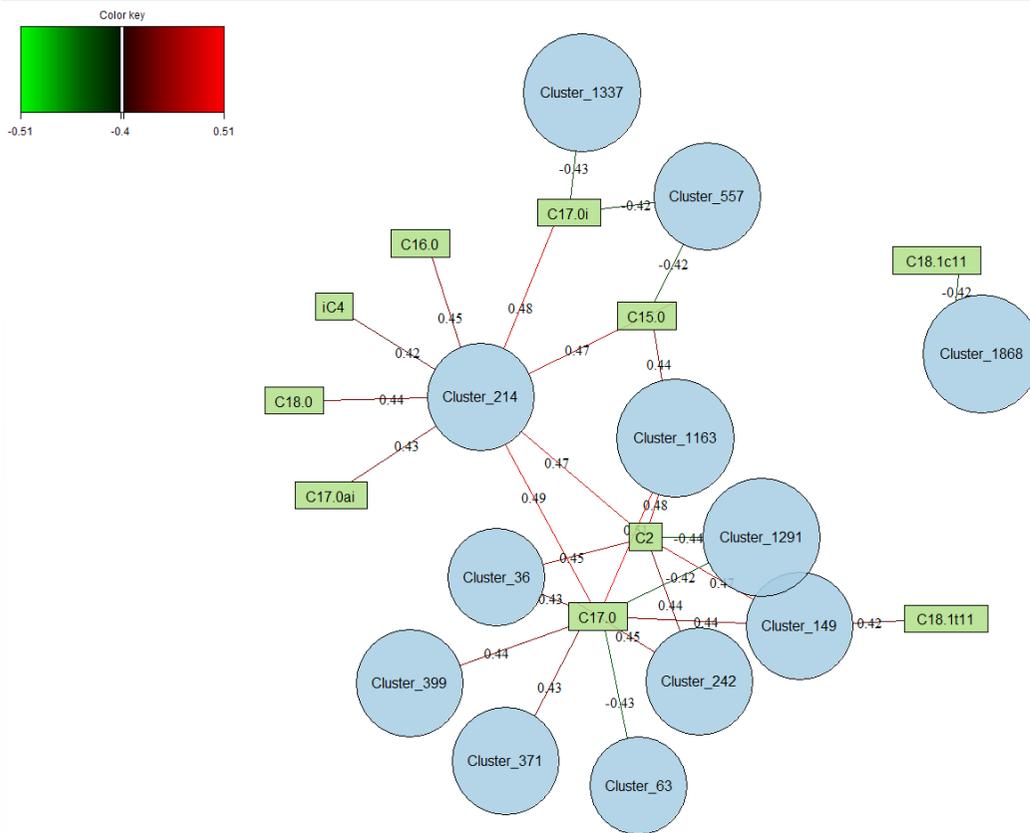


Figure 25 : Graphique représentatif des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen sur D1

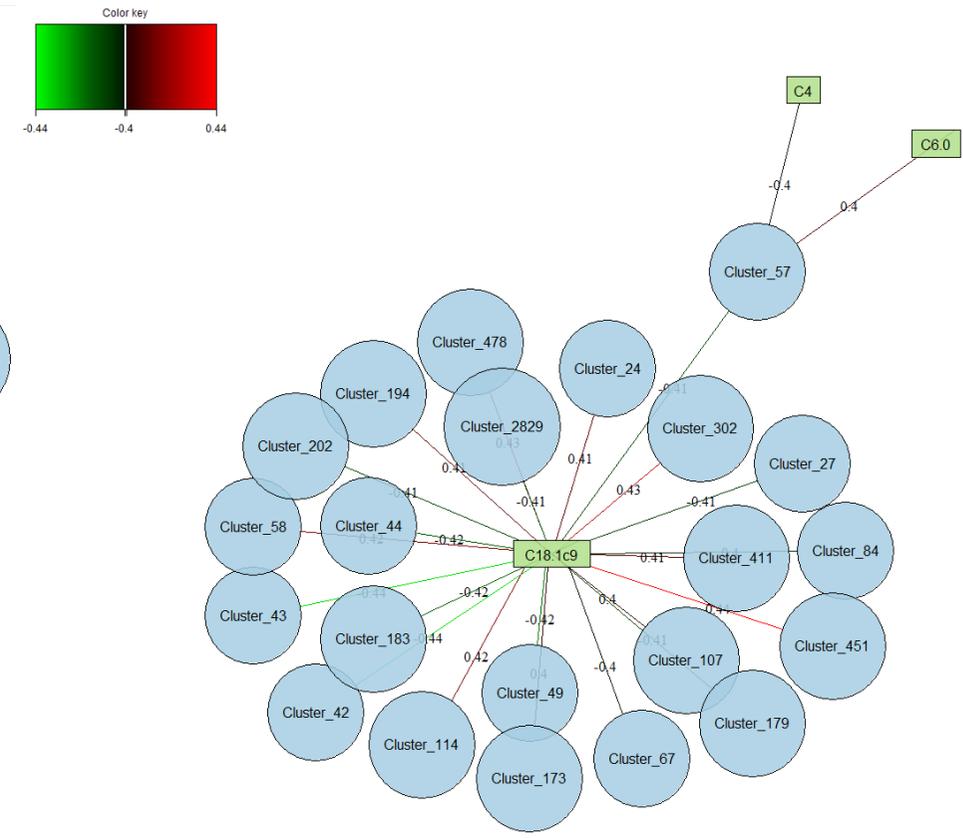


Figure 26 : Graphique représentatif des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen sur D2

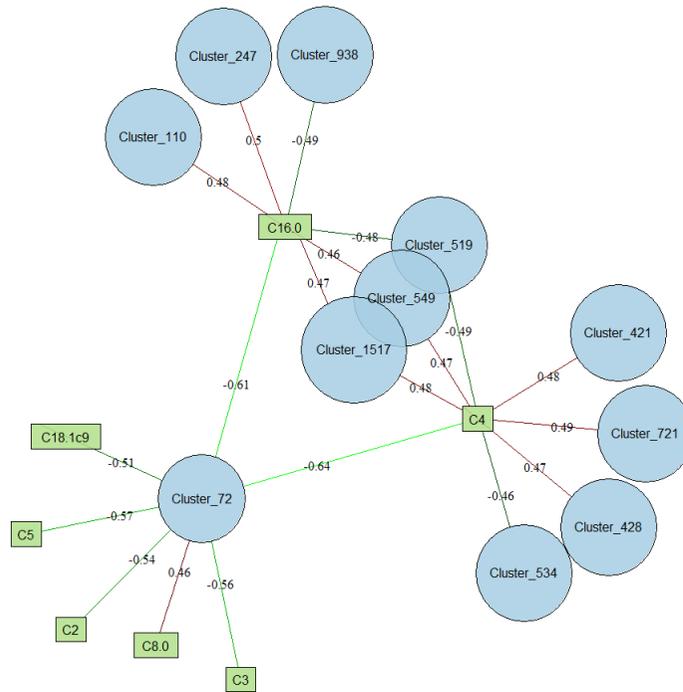
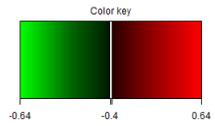


Figure 27 : Graphique représentatif des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen sur D3

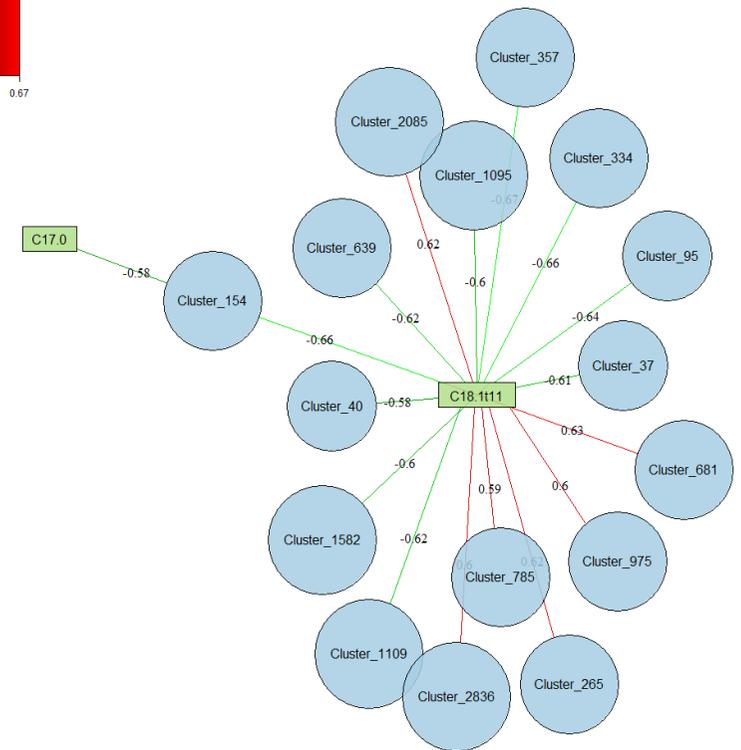
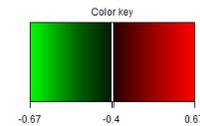


Figure 28 : Graphique représentatif des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen sur D4

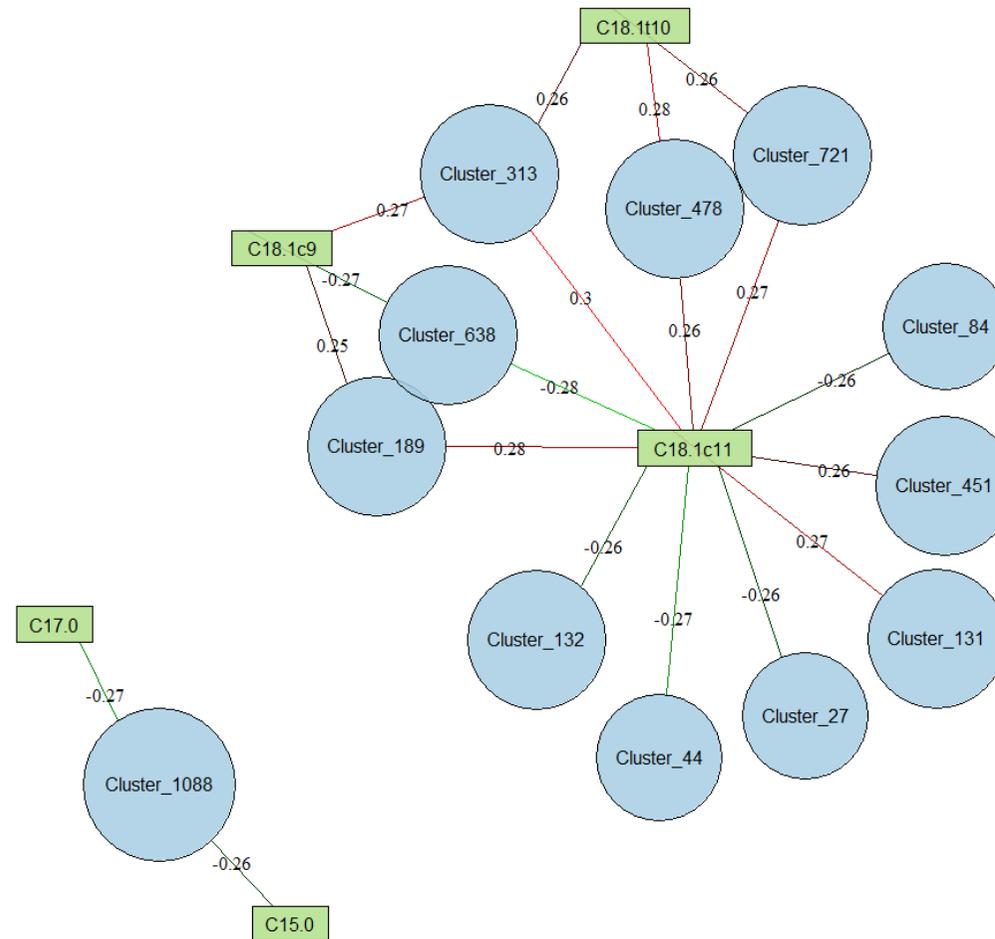
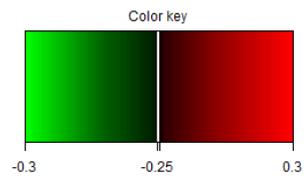


Figure 29 : Graphiques représentatifs des relations établies grâce à une sPLS-DA entre le microbiote et les acides gras du rumen sur Day all

Annexe 9 : Tableau de corrélation des acides gras du rumen - microbiote ruminal et affiliation par date de prélèvements

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
	Day	AG rumen	Cluster	Corrélation	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	
2	Day 1	C17: 0	Cluster_1163	0,51	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species	
3			Cluster_214	0,49	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
4			Cluster_242	0,45	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
5			Cluster_399	0,44	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-004	unknown species	
6			Cluster_149	0,44	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group	unknown species	
7			Cluster_36	0,43	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
8			Cluster_371	0,43	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species	
9			Cluster_1291	-0,42	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae NK3B31 group	unknown species	
10			Cluster_63	-0,43	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK3A20 group	unknown species	
11			C17: 0i	Cluster_214	0,48	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
12		Cluster_557		-0,42	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	Multi-affiliation	
13		Cluster_1337		-0,43	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species	
14		C2	Cluster_1163	0,48	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species	
15			Cluster_214	0,47	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
16			Cluster_149	0,47	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group	unknown species	
17			Cluster_36	0,45	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
18			Cluster_1291	-0,44	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae NK3B31 group	unknown species	
19		C15 : 0	Cluster_214	0,47	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
20			Cluster_1163	0,44	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species	
21			Cluster_557	-0,42	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	Multi-affiliation	
22		C18 : 0	Cluster_214	0,44	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
23		C16 : 0	Cluster_214	0,45	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
24		C17 : 0ai	Cluster_214	0,43	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
25		C18.1C11	Cluster_1868	-0,42	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Muribaculaceae	unknown genus	unknown species	
26		C18.1t11	Cluster_149	0,42	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK4A136 group	unknown species	
27		Day 2	C6 : 0	Cluster_57	0,4	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	Multi-affiliation
28			C4	Cluster_57	-0,4	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	Multi-affiliation
29	C18.1c9		Cluster_451	0,44	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Ruminococcus] gauvreauii group	unknown species	
30			Cluster_302	0,43	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	unknown species	
31			Cluster_478	0,43	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
32			Cluster_58	0,42	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
33			Cluster_114	0,42	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	[Eubacterium] coprostanoligenes grou	unknown genus	unknown species	
34			Cluster_194	0,41	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	unknown species	
35			Cluster_24	0,41	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK3A20 group	unknown species	
36			Cluster_202	-0,41	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
37			Cluster_44	-0,42	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
38			Cluster_183	-0,42	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
39			Cluster_49	-0,42	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
40			Cluster_43	-0,44	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	Multi-affiliation	
41	Cluster_42	-0,44	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	Multi-affiliation			

42	Day 3	C16 : 0	Cluster_247	0,5	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK3A20 group	unknown species
43			Cluster_110	0,48	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
44			Cluster_1517	0,47	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema	unknown species
45			Cluster_549	0,46	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	unknown species
46			Cluster_519	-0,48	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NC2004 group	bacterium NC2004
47			Cluster_938	-0,49	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
48		Cluster_72	-0,61	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation	
49		C4	Cluster_721	0,49	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	unknown species
50			Cluster_421	0,48	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species
51			Cluster_1517	0,48	Spirochaetota	Spirochaetia	Spirochaetales	Spirochaetaceae	Treponema	unknown species
52	Cluster_549		0,47	Firmicutes	Clostridia	Christensenellales	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	unknown species	
53	Cluster_428		0,47	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Blautia	unknown species	
54	Cluster_534		-0,46	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus	unknown species	
55	Cluster_519		-0,49	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NC2004 group	bacterium NC2004	
56	Cluster_72	-0,64	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation		
57	C18.1c9	Cluster_72	-0,51	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation	
58	C5	Cluster_72	-0,57	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation	
59	C2	Cluster_72	0,54	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation	
60	C8 : 0	Cluster_72	0,46	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation	
61	C3	Cluster_72	-0,56	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Streptococcus	Multi-affiliation	
62	Day 4	C17: 0	Cluster_154	-0,58	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species
63		C18.1t11	Cluster_681	0,63	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	F082	unknown genus	unknown species
64			Cluster_265	0,62	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotellaceae UCG-003	unknown species
65			Cluster_2085	0,62	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Acetivomaculum	unknown species
66			Cluster_975	0,6	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
67			Cluster_785	0,59	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species
68			Cluster_40	-0,58	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
69			Cluster_1582	-0,6	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
70			Cluster_1095	-0,6	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
71			Cluster_371	-0,61	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species
72			Cluster_639	-0,62	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae UCG-006	unknown species
73			Cluster_1109	-0,62	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
74			Cluster_95	-0,64	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
75			Cluster_334	-0,66	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Oscillospiraceae	UCG-005	unknown species
76	Cluster_154	-0,66	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Rikenellaceae	Rikenellaceae RC9 gut group	unknown species		
77	Cluster_357	-0,67	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species		

78		C15 : 0	Cluster_1088	-0,26	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UCG-001	unknown species	
79		C17 : 0	Cluster_1088	-0,27	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	UCG-001	unknown species	
80			Cluster_313	0,27	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	unknown species	
81		C18.1c9	Cluster_189	0,25	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK3A20 group	unknown species	
82			Cluster_638	-0,27	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Eubacterium] coprostanoligenes grou	unknown genus	unknown species	
83		C18.1t10	Cluster_478	0,28	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
84			Cluster_721	0,26	Firmicutes	Clostridia	Christensenellale	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	unknown species	
85			Cluster_313	0,26	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	unknown species	
86	Dall		Cluster_313	0,3	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Ruminococcaceae	Ruminococcus	unknown species	
87			Cluster_189	0,28	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae NK3A20 group	unknown species	
88			Cluster_721	0,27	Firmicutes	Clostridia	Christensenellale	Christensenellaceae	Christensenellaceae R-7 group	unknown species	
89			Cluster_131	0,27	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
90			Cluster_478	0,26	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species	
91			C18.1c11	Cluster_451	0,26	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Ruminococcus] gauvreauii group	unknown species
92				Cluster_27	-0,26	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae XPB1014 group	Multi-affiliation
93				Cluster_132	-0,26	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Multi-affiliation	Multi-affiliation
94				Cluster_84	-0,26	Firmicutes	Clostridia	Lachnospirales	Lachnospiraceae	Eubacterium] xylanophilum grou	unknown species
95				Cluster_44	-0,27	Bacteroidota	Bacteroidia	Bacteroidales	Prevotellaceae	Prevotella	unknown species
96			Cluster_638	-0,28	Firmicutes	Clostridia	Oscillospirales	Eubacterium] coprostanoligenes grou	unknown genus	unknown species	

NOM, Prénom : GUINARD Léa

TITRE : EFFET DU MICROBIOTE RUMINAL SUR L'ETAT D'ENGRAISSEMENT DES BREBIS LAITIÈRES EN PERI-PARTUM : ETUDE EXPERIMENTALE DANS LE BASSIN DU ROQUEFORT

Résumé : Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet IRMA. Elle présente une étude *in vivo* des relations entre l'évolution de l'état d'engraissement des brebis laitières, la population bactérienne ruminale et le métabolisme ruminal des acides gras sur la période du péri-partum. C'est une phase peu étudiée chez les ovins et une période de transition particulière pour la brebis et son microbiote ruminal, se caractérisant par un déficit énergétique. Les données recueillies s'appuient sur le troupeau de race Lacaune de la station expérimentale de Lafage, dans le bassin de Roquefort. Le microbiote ruminal, les NEC et les prélèvements sanguins ont été étudiés pendant le mois d'allaitement-traite, sur 4 dates successives. Les résultats des analyses menées ont révélé que le statut énergétique des brebis laitières n'est que faiblement influencé par le microbiote ruminal. Néanmoins, certains taxons bactériens ont été identifiés et associés à un niveau de lipomobilisation, ouvrant la voie à de nouvelles investigations.

MOTS CLES : MICROBIOTE RUMINAL, ETAT ENGRAISSEMENT, BREBIS LAITIÈRES, PERI-PARTUM

TITLE : EFFECT OF RUMINAL MICROBIOTA ON FATTENING STATUS OF PERIPARTUM DAIRY EWES : EXPERIMENTAL STUDY IN THE ROQUEFORT AREA

Summary : This thesis is a part of the IRMA project. It presents an *in vivo* study of the relationships between the evolution of the fattening state of dairy ewes, the ruminal bacterial population and the ruminal metabolism of fatty acids over the peripartum period. This is a little-studied phase in sheep and a particular period of transition for the ewe and its ruminal microbiota, which is characterized by an energy deficit. The data collected is based on the Lacaune breed herd at the Lafage experimental station, in the Roquefort area. Ruminal microbiota, NEC and blood samples were studied during the month of lactation-milking, on 4 successive dates. The results of the analyses carried out revealed that the energy status of dairy ewes is only slightly influenced by ruminal microbiota. Nevertheless, certain bacterial taxa have been identified and associated with a level of lipomobilization, paving the way for further investigations.

KEY WORDS : RUMINAL MICROBIOTA, FATTENING STATUS, DAIRY EWES, PERIPARTUM