

Les microbiotes des ruminants : état des lieux de la recherche et impacts des microbiotes sur les performances et la santé des animaux

ZENED A. (1), FORANO E. (2), DELBES C. (3), VERDIER-METZ I. (3), MORGAVI D. (4), POPOVA M. (4), RAMAYO-CALDAS Y. (5), BERGONIER D. (6), MEYNADIER A. (1), MARIE-ETANCELIN C. (1)

- (1) Université de Toulouse, ENVT, INP-PURPAN, INRAE, UMR GenPhySE, Castanet-Tolosan
- (2) Université Clermont Auvergne, INRAE, UMR MEDIS, Saint-Genès-Champanelle
- (3) Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Fromage, Aurillac
- (4) Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR Herbivores, Saint-Genès-Champanelle
- (5) Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR GABI, Jouy-en-Josas
- (6) Université de Toulouse, ENVT, INRAE, UMR IHAP, UMT Pilotage de la santé des ruminants.

RESUME

Les ruminants, tout comme l'Homme et les autres mammifères, hébergent des milliards de microbes symbiotiques, constituant les « microbiotes » de la peau, des voies digestives, respiratoires et génitales. La composition et les fonctions de ces microbiotes dépendent de leur emplacement. Une particularité des ruminants est la présence d'un microbiote spécialisé dans le rumen, composé principalement de bactéries (50 % de la biomasse), de protozoaires, d'archées et de champignons. L'application des approches omiques, en particulier le séquençage de nouvelle génération a permis de caractériser les membres du microbiote, leurs gènes et leurs activités. Le microbiote ruminal, situé en amont des sites d'absorption, joue un rôle central dans la nutrition des ruminants. La production des ruminants est aussi particulièrement influencée par le microbiote intestinal et le microbiote associé à la peau de la mamelle. Les populations microbiennes intestinales sont diversifiées et leur composition est spécifique des segments considérés. Enfin, le microbiote cutané de la mamelle est un réservoir important de la diversité microbienne du lait cru. Ces différents microbes interagissent entre eux et avec leur hôte sous l'influence de divers facteurs de variation. Le régime alimentaire est le principal facteur de modulation des microbiotes digestifs, tandis que les pratiques d'alimentation au début de la vie influencent également la cinétique d'implantation et la structure de ces microbiotes. Le milieu de vie de l'animal, en relation avec l'alimentation, a un impact particulier sur le microbiote cutané mammaire. Des études récentes montrent un contrôle génétique potentiel par l'hôte de ses communautés microbiennes. En outre, il existe une accumulation de preuves des liens entre le microbiote et la santé animale, l'efficacité de l'alimentation, les performances, la qualité des produits et la production de gaz à effet de serre. Ces constatations justifient l'intérêt croissant des éleveurs pour les microbiotes des animaux et leur modulation.

Ruminants microbiota: state of research and impacts of microbiota on animal performance and health

ZENED A. (1), FORANO E. (2), DELBES C. (3), VERDIER-METZ I. (3), MORGAVI D. (4), POPOVA M. (4), RAMAYO-CALDAS Y. (5), BERGONIER D. (6), MEYNADIER A. (1), MARIE-ETANCELIN C. (1)

- (1) Université de Toulouse, ENVT, INP-PURPAN, INRAE, UMR GenPhySE, Castanet-Tolosan Cedex

SUMMARY

Ruminants, similar to humans and other mammals, host trillions of symbiotic microbes, the microbiota, in their skin, digestive, respiratory and genital tracts. The composition and functions of these microbiotas depends on their location. A particularity of ruminants is the presence of a specialized microbiota in the

rumen composed by bacteria (50 % of biomass), protozoa, archaea and fungi. Omics approaches, particularly new-generation sequencing, have made possible to characterize members of the microbiota, their genes and their activities. The ruminal microbiota, located upstream of the absorption sites, has a central role in ruminant nutrition. Ruminant production is also impacted by the gut microbiota and the microbiota associated to the udder skin. The intestinal microbiota is diverse and specific to the segments under consideration. Finally, the microbiota of the udder skin is a major reservoir of the microbial diversity of raw milk. These different microbes interact with each other and with their host under the influence of various factors of variation. Diet is the main factor in the modulation of gut microbiota, whereas feeding practices in early life also influence the implantation kinetics and structure of the microbiota. The living environment of the animal, in connection with diet, has a particular impact on the microbiota of the udder skin. Recent studies show a potential genetic control by the host of its microbial communities. Also, there is accumulated evidence of the links between microbiota and animal health, feed efficiency, performance, products quality and greenhouse gas production. Such findings justify the growing interest of farmers on animal microbiotas and their modulation.

INTRODUCTION

Le ruminant, comme les autres organismes complexes, tisse et maintient des liens étroits avec les multiples micro-organismes qui l'habitent et qui constituent ses microbiotes. L'association de l'organisme hôte (ici l'animal) et de la cohorte de micro-organismes qu'il héberge constitue une entité vivante appelée holobionte (du grec holos, "tout", et bios, "vie"). Le microbiome correspond à l'ensemble de ces micro-organismes et de leurs génomes, de leur habitat et de leurs conditions environnantes (Marchesi et Ravel, 2015). Chez les ruminants, les microbiotes sont hébergés dans différents habitats : sur la peau, en particulier du trayon (Frétin et al., 2018) et de l'espace interdigité (Zinicola et al., 2015), et dans les tractus digestif, respiratoire, génital, ... (Tapio et al., 2016 ; Swartz et al., 2014 ; Zeineldin et al., 2019). Ces microbiotes sont d'une grande importance pour la physiologie (Alipour et al., 2018) et la santé (Nicola et al., 2017) de l'animal ; ils contribuent tant aux performances zootechniques (Li et al., 2019a ; Ramayo-Caldas et al., 2020) qu'à la qualité des produits (Frétin et al., 2018). En particulier, le microbiote ruminal, composé essentiellement de bactéries et de protozoaires mais aussi d'archées et de champignons, joue un rôle central dans la nutrition et la santé de son hôte ; chez les ruminants, ceci est d'autant plus vrai que le rumen se situe en amont des sites d'absorption. Il est donc crucial dans la nutrition de son hôte *via* la valorisation des fibres d'origine végétale. Il assure 70 % de la couverture du besoin journalier en énergie de son hôte, synthétise des acides aminés essentiels et des vitamines (Bergman, 1990). La position anatomique du rumen, rend son microbiote plus sensible aux facteurs environnementaux que les microbiotes digestifs situés en aval. Parmi les facteurs de variation des microbiotes des ruminants, les principaux sont l'environnement, dont l'alimentation et les pratiques d'élevage, et l'hôte, dont l'âge et la génétique.

Après une brève présentation de la composition des microbiotes des ruminants, nous détaillerons les apports potentiels des nouvelles approches analytiques, au travers d'études récentes, pour

l'étude des facteurs de variation des microbiotes. Dans un second temps, les relations entre ceux-ci et les caractères d'intérêt pour les éleveurs, à savoir ceux liés à la santé, au bien-être et aux performances des animaux seront discutés.

1. LES MICROBIOTES DES RUMINANTS

Chez les ruminants, des communautés microbiennes complexes et diversifiées sont présentes dans différents sites dont le tube digestif, et en particulier le rumen. Ecosystème dynamique, le rumen est de loin le plus étudié. Ses microbes interagissent entre eux lors de la dégradation des glucides complexes de la paroi cellulaire végétale qui sont peu utilisés par l'Homme (Huws et al., 2018). Les microbes symbiotiques digestifs (rumen et intestin) jouent un rôle essentiel dans l'interaction animal-hôte avec l'environnement, lui fournissent des nutriments tout en stimulant son système immunitaire. Dans cette synthèse, nous aborderons en particulier les microbiotes digestifs et de la mamelle, en nous focalisant principalement sur les données obtenues chez le bovin, qui représente l'espèce la plus étudiée.

1.1. LES METHODES D'ETUDES

Depuis les travaux pionniers de R. Hungate (1966), notre capacité à cultiver les micro-organismes anaérobies s'est améliorée grâce au développement de milieux de culture spécifiques et d'outils à haut débit (Borrel et al., 2014 ; Kenters et al., 2011). Cependant, bien que de nouveaux micro-organismes soient constamment découverts et mis en culture, un grand nombre de bactéries, d'archées (Creevey et al., 2014), de champignons (Seshadri et al., 2018) et surtout de protozoaires (Firkins et al., 2020) ne sont pas encore cultivés. Les efforts pour obtenir de nouveaux isolats se poursuivent en particulier avec le projet Hungate 1000 dont l'objectif est de séquencer le génome de 1000 souches de bactéries et d'archées pour déterminer leur potentiel fonctionnel (Seshadri et al., 2018).

L'essor du séquençage de nouvelle génération a entraîné une explosion des publications explorant la métataxonomie (séquençage d'amplicons 16S, 18S

et ITS pour les bactéries et les archées, les protozoaires et les champignons, respectivement) du microbiome ruminal dans différentes conditions (Ramayo-Caldas et al., 2020; Popova et al., 2019; Morgavi et al., 2015). Bien que ces études soient d'un grand intérêt, l'interprétation des données générées par différentes publications reste un défi, du fait de résultats contradictoires potentiellement liés aux différences dans les méthodes utilisées. Des efforts sont faits pour standardiser ce type d'analyses (Pollock et al., 2018). L'inconvénient majeur de la métataxonomique reste l'impossibilité d'accéder à la fonction microbienne, malgré le développement de logiciels de prédiction de fonctions à partir des séquences de l'ADNr 16S (Langille et al., 2013). Seule la métagénomique permet d'identifier les gènes présents et les fonctions potentielles associées. La métagénomique appliquée au microbiote du rumen a d'abord permis de découvrir de nouvelles enzymes dégradant la biomasse (Hess et al., 2011), puis métatoxonomique et métagénomique ont été appliquées à l'étude de nombreux autres aspects : les émissions de méthane, les effets de la génétique dont la race et l'espèce hôte, de l'alimentation et des additifs alimentaires sur la composition du microbiome du rumen (Auffret et al., 2017). Un autre progrès majeur rendu possible par la métagénomique est la reconstruction de génomes d'espèces inconnues à partir des séquences métagénomiques : ainsi chez le bovin, les génomes de 4941 bactéries du rumen ont pu être assemblés à partir des métagénomes (Stewart et al., 2019). Alors que la métagénomique nous renseigne sur la diversité et la capacité fonctionnelle au sein d'un microbiome, la métatranscriptomique permet de faire un pas de plus vers la compréhension de son fonctionnement en donnant une vision globale des gènes exprimés (Li et al., 2019a). Cette approche est limitée par la difficulté d'extraire des ARN de bonne qualité et la durée de vie très courte des ARNm. Ces contraintes pourraient être levées par l'étude du métaprotéome, qui permet d'identifier les protéines réellement synthétisées (Honan et Greenwood, 2020). La métabolomique donnant accès aux métabolites primaires ou secondaires, intimement liés à la composition et au fonctionnement de l'écosystème microbien, complète ces approches omiques (Morgavi et al., 2015).

1.2. LE MICROBIOTE RUMINAL

Le rumen comprend une population très dense et diversifiée de microbes englobant les trois domaines de la vie : les bactéries, les archées, les eucaryotes, auxquels s'ajoutent les virus, principalement les phages. Les bactéries sont prédominantes, 10^{10} – 10^{11} cellules par g de contenu ruminal et couvrent la plupart des fonctions métaboliques existantes dans le rumen. Les eucaryotes comprennent des protozoaires (10^6 cellules par g de contenu ruminal), qui représentent de 30 à 40 % de la biomasse microbienne du rumen, et des champignons (10^5 zoospores par g de contenu ruminal). Bactéries, protozoaires et champignons dégradent et fermentent les aliments ingérés et les transforment en acides gras à chaîne courte (AGCC) et en CO_2 . Les archées (10^6 - 10^9 cellules par g de contenu

ruminal) sont essentiellement des méthanogènes et utilisent surtout du CO_2 et du H_2 produits par les autres microbes pour synthétiser le méthane. Les micro-organismes du rumen ont développé diverses interactions entre eux pour assurer le fonctionnement efficace de la chaîne trophique permettant une transformation microbienne des composants végétaux en produits utiles pour l'animal hôte (majoritairement des AGCC et des protéines microbiennes, mais aussi des vitamines).

On estime à plus de 5 000 le nombre d'espèces bactériennes dans le rumen (Kim et al., 2011), la majorité d'entre elles n'ayant pas de représentant cultivé. Ces espèces bactériennes appartiennent en grande majorité (~80 % des séquences) aux phyla Firmicutes et Bacteroidetes. En comparant la phylogénie bactérienne dans plus de 700 échantillons, provenant de 32 espèces de ruminants de 35 pays, Henderson et collaborateurs (2015) ont identifié 7 groupes bactériens ubiquitaires, représentant 67 % de l'ensemble des séquences détectées : *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, et les non-classifiés *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales*, et *Clostridiales*. Leurs proportions varient aussi en fonction de la fraction considérée : libres dans la phase liquide, attachées aux particules alimentaires ou à l'épithélium ruminal. Par des critères morphologiques classiques, plus de 25 genres de protozoaires ont été identifiés dans le rumen (Williams et Coleman, 1997) ; 18 genres de champignons anaérobies (phylum *Neocallimastigomycota*, ordre *Neocallimastigales*) ont été décrits, mais ce nombre pourrait être encore étendu car des analyses métataxonomiques ont identifié des clades supplémentaires (Edwards et al., 2017 ; Hess et al., 2020). Le nombre total de genres et d'espèces eucaryotes du rumen est probablement encore sous-estimé. La diversité des archées méthanogènes du rumen se limite à 4 ordres, dont les espèces les plus fréquentes appartiennent aux genres *Methanobrevibacter* et *Methanosaera* (Morgavi et al., 2010), et est hautement conservée parmi les 32 espèces de ruminants étudiées (Henderson et al., 2015). Les phages (estimés jusqu'à 10^9 à 10^{10} /ml de contenu ruminal) présentent différents morphotypes, et appartiennent en majorité aux familles *Siphoviridae*, *Myoviridae* et *Podoviridae* (ordre *Caudovirales*). Ils jouent probablement un rôle dans la dynamique des populations bactériennes via leur activité de lyse, participant ainsi au recyclage de nutriments (protéines, ADN), et permettent le transfert de matériel génétique (Gilbert et al., 2020).

1.3. LE MICROBIOTE INTESTINAL

La fermentation microbienne prend aussi place dans les compartiments intestinaux du ruminant, en particulier dans le cæcum et le colon. En effet, les substrats qui ont échappé à la dégradation ruminale et à la digestion enzymatique duodénale, en particulier les glucides pariétaux et l'amidon, y sont fermentés (Plaizier et al., 2018). Un microbiote très diversifié est présent dans tous les compartiments intestinaux, mais sa composition varie selon les segments considérés, et entre la lumière et la muqueuse. Les différences physiologiques, de pH, la présence abondante de mucus ainsi que sa

composition, conduisent à un microbiote spécifique à chaque compartiment intestinal (Plaizier et al., 2018). Encore peu d'études ont comparé la composition taxonomique du jéjunum, de l'iléon, du caecum, du colon et du rectum chez le bovin, la majorité des travaux ciblant les fèces, plus faciles à obtenir. De plus, la plupart de ces études s'intéresse à la colonisation du microbiote intestinal du jeune veau, essentielle à sa santé (Malmuthuge et al., 2015). La richesse et la diversité des populations microbiennes de la partie distale du tube digestif sont plus faibles comparées à celles du rumen, le colon présentant la plus grande diversité bactérienne intestinale (Lopes et al., 2019). Les variations de composition microbienne des différents compartiments intestinaux sont principalement dues aux conditions physico-chimiques (pH, potentiel redox, oxygène), à la disponibilité des nutriments et des sites d'adhésion, aux sécrétions de mucines et à l'exposition de l'intestin à des composés exogènes (Carbonero et al., 2014).

Les phyla bactériens intestinaux majoritaires sont, comme dans le rumen, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*, les *Firmicutes* étant particulièrement abondants (Mao et al., 2015). Des séquences affiliées à des bactéries associées à la dégradation des fibres (principalement représentées par les familles des *Lachnospiraceae* et des *Ruminococcaceae*) sont retrouvées tout au long du tractus digestif (Lopes et al., 2019). On note aussi la présence d'archées méthanogènes et de champignons anaérobies. La communauté mucosale diffère de la communauté luminale, avec par exemple pour l'iléon du veau, une dominance des *Firmicutes* dans la lumière, et la présence de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* au niveau de la muqueuse, incluant des genres spécifiques à cette région (Malmuthuge et al., 2014). Ces différences sont retrouvées chez l'adulte (Mao et al., 2015). Au niveau fécal, une méthanalyse métataxonomique d'échantillons bovins a retrouvé les genres méthanogènes *Methanobrevibacter* et *Methanosphaera* dans plus de 99 % des échantillons, et pour les bactéries, une prévalence des genres *Prevotella* (*Bacteroidetes*) et *Ruminococcus* (Holman et Gzyl, 2019). *Alistipes*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Faecalibacterium* et *Escherichia/Shigella* étaient également associés aux fèces.

Il faut cependant noter que, comme pour le rumen, la structure des communautés intestinales (et fécales) varie d'une étude à l'autre mais aussi d'un individu à l'autre, et que différents facteurs tels que le régime alimentaire ou l'âge des animaux influencent fortement les résultats obtenus (Holman et Gzyl, 2019).

1.4. LE MICROBIOTE DE LA PEAU DE LA MAMELLE

Au cours de la dernière décennie, le microbiote de la peau des trayons des vaches laitières a fait l'objet de nombreuses études (Verdier-Metz et al., 2012; Doyle et al., 2017 ; Frélin et al., 2018 ; Andrews et al., 2019) associant les méthodes culture-dépendantes et les approches basées sur le séquençage de l'ADN. Il est depuis considéré comme un réservoir majeur de la diversité microbienne du lait cru (Doyle et al., 2017). En effet, de nombreux genres détectés dans le lait

cru sont également présents sur la peau des trayons. Pourtant, la majeure partie de ces publications traite du cas de la vache laitière contemporaine, pour laquelle, à chaque traite, les trayons sont recouverts d'antiseptiques dit « à large spectre » (au moins après la traite, et souvent avant). Ce n'est pas le cas des caprins, et surtout des ovins. Cet écosystème est constitué de nombreux micro-organismes (bactéries, virus et champignons comprenant levures et moisissures), commensaux pour la plupart, pathogènes pour certains pour le ruminant ou pour l'Homme.

Selon les études, près d'une centaine de genres bactériens a pu être identifiée. Si les espèces à coagulase négative du genre *Staphylococcus* (SCN) sont largement représentées, les genres les plus fréquemment identifiés comprennent des bactéries à Gram positif telles que *Corynebacterium*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Turicibacter*, *Trichococcus*, *Eremococcus* et *Bifidobacterium*, et des bactéries à Gram négatif telles que *Romboutsia*, *Proteiniphilum* et *Psychrobacter*. Parmi ces groupes, seul le premier (SCN) et les quatre genres suivants sont potentiellement pathogènes pour la mamelle (de *Corynebacterium* à *Streptococcus*). Nombre de ces bactéries sont couramment retrouvées dans le lait et les produits laitiers, telles que *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* ou *Corynebacterium*. Certaines seraient issues du tractus intestinal des animaux (*Bifidobacterium* ou *Proteiniphilum*), tandis que d'autres, comme *Rhizobium*, *Xanthomonas*, *Variovorax*, *Devosia* et *Stenotrophomonas*, sont habituellement rencontrées dans le sol (Doyle et al., 2017).

La communauté fongique de la peau des trayons est encore relativement peu étudiée. D'après Andrews et al. (2019), *Debaryomyces prosopidis* semble être l'espèce la plus abondante, observée dans 69 % des échantillons analysés par amplification de la région ITS1 de l'ARNr. Parmi les autres genres courants, ont été identifiés *Cryptococcus*, *Caecomyces*, *Penicillium* et *Rhodotorula*.

Chacun des microbiotes hébergés par l'animal présente des traits spécifiques en termes de composition taxonomique et de fonctionnalités. Cependant, les propriétés intrinsèques de ces microbiotes et la manière dont ils interagissent entre eux et avec leur hôte varient en fonction de nombreux facteurs transversaux en particulier l'environnement, dont l'alimentation, et la génétique de leur hôte.

2. LES PRINCIPAUX FACTEURS DE VARIATION

Les microbiotes digestifs sont principalement affectés par l'alimentation, la génétique et l'âge des animaux. Le microbiote de la peau des trayons de la vache laitière est, quant à lui, un carrefour de transferts microbiens entre les différents environnements de la ferme et le lait. Il est affecté par le processus de traite, y compris la nature des matières actives appliquées sur les trayons au moment de la traite, et par les conditions environnementales générales de l'exploitation.

2.1. L'ENVIRONNEMENT

Les fourrages, le pâturage, les litières, les bouses, les micro-organismes aéroportés dans les bâtiments, l'eau, ainsi que la machine à traire et les pratiques associées sont autant de sources potentielles de micro-organismes susceptibles de contaminer le trayon (peau et/ou canal) des animaux et le lait ou d'impacter le microbiote digestif.

Les conditions de logement des animaux semblent jouer un rôle central dans la composition microbienne de la peau des trayons. En effet, des différences de diversité bactérienne d'échantillons de lait, de fèces et de surface de trayons ont été mises en évidence selon le mode de conduite des animaux, en bâtiment ou au pâturage (Doyle et al., 2017). D'autres facteurs inhérents aux modes d'hébergement des animaux sont à considérer, tels le type de litière ou la saison. L'influence du type de litière sur la charge microbienne en surface des trayons a été démontrée (Guarin et al., 2017 ; Rowbotham et Ruegg, 2016), ainsi que la plus grande diversité des profils microbiens de l'apex de trayons prélevés pendant l'hiver comparés à ceux prélevés l'été (Derakhshani et al., 2018). Par ailleurs, si les populations microbiennes identifiées dans le lait de citerne de vaches primipares logées sur du sable neuf ou recyclé semblent comparables, elles diffèrent de celles d'animaux logés sur de la sciure ou du fumier (Metzger et al., 2018). Les sources microbiennes pouvant conduire à une contamination accidentelle par des bactéries pathogènes étant nombreuses, les pratiques de traite sont souvent choisies pour les éliminer sans tenir compte des réservoirs potentiels en micro-organismes utiles (Rowbotham et Ruegg, 2016). L'application de procédures d'hygiène drastiques (nettoyage des trayons pré et/ou post-traite, désinfection des trayons par pré et/ou post-trempage, nettoyage et décontamination de la machine à traire) peut réduire de 2,6 log(ufc/ml) les niveaux microbiens sur la peau des trayons (Guarin et al., 2017 ; Rowbotham et Ruegg, 2016). En particulier, une hygiène de traite intensive serait associée à des niveaux plus faibles de bactéries Gram-positives catalase-positives, et de levures (Monsallier et al., 2012). D'autres pratiques, comme la monotraite ou la traite robotisée, ainsi que l'antibiothérapie intra-mammaire, les obturateurs externes voire internes des trayons, pourraient également être associées à des modifications qualitatives ou quantitatives de certains microbiotes commensaux et/ou opportunistes de la peau des trayons, et par conséquent du lait.

2.2. LA COMPOSITION DE LA RATION CHEZ L'ADULTE

L'alimentation est le facteur de variation le plus important du microbiote ruminal (Malmuthuge et Guan, 2017). L'alimentation modifie également le microbiote intestinal.

En élevage, l'élément de la ration qui a le plus de répercussion est le ratio fourrages/concentrés. Fréquemment, les vaches laitières reçoivent une alimentation riche en céréales pour satisfaire leurs besoins énergétiques élevés. Généralement, dans le rumen, on observe une augmentation des bactéries amylolytiques avec les rations riches en concentrés

et à l'opposé des bactéries fibrolytiques avec des rations riches en fourrages. Au sein de ces 2 grands groupes fonctionnels de bactéries, il existe des variations de réponse en fonction de la nature des fourrages et des concentrés. Par exemple dans le rumen, une ration riche en amidon peut être associée à une augmentation importante de la population de *Lactobacillus* (Zened et al., 2013). Plus globalement, l'effet principal d'une ration riche en céréales est une baisse de la diversité des bactéries, associée à une diminution marquée des populations de protozoaires et de champignons (Ishaq et al., 2017). Le microbiote du gros intestin est aussi modifié par des rations riches en céréales (Plaizier et al., 2017). Ce type de ration provoque dans certains cas une acidose ruminale et intestinale qui altère les fonctionnalités du microbiote digestif, diminue l'utilisation des nutriments de la ration et peut parfois déclencher des réponses inflammatoires (Plaizier et al., 2008). Au-delà de ces phénomènes inflammatoires, ce type de ration favoriserait certaines bactéries pathogènes pour la mamelle (Zhang et al., 2015), et pourrait, directement ou indirectement, modifier le microbiote de la peau des mamelles. Par ailleurs, Frétin et al. (2018) ont mis en évidence des différences d'abondance de taxons bactériens (regroupement de bactéries sur la base de leurs relations phylogénétiques) en surface des trayons des vaches laitières selon si la conduite au pâturage avait lieu avec ou sans concentrés ajoutés : le genre *Clostridium* plus abondant sur les trayons des animaux en système semi-extensif, pourrait provenir des fèces ; il pourrait être favorisé par la distribution de concentrés.

Le deuxième grand facteur de variation du microbiote ruminal et de son activité sont les acides gras polyinsaturés, potentiellement toxiques pour certaines bactéries (Enjalbert et al., 2017). En outre, l'effet des acides gras insaturés est fonction de la teneur en amidon de la ration (Zened et al., 2013). Les probiotiques sont également capables de modifier le microbiote ruminal et intestinal. Les plus étudiées chez les ruminants sont les levures. Celles-ci peuvent privilégier certaines populations de bactéries, champignons et protozoaires (Ishaq et al., 2017).

Enfin d'autres substances en particulier d'origine végétale sont de potentiels modulateurs mais leur efficacité/innocuité reste à prouver pour nombre d'entre elles. On peut néanmoins citer les tanins qui se montrent assez efficaces (Buccioni et al., 2017 ; Corrèa et al., 2020).

2.3. LA GENETIQUE DE L'HOTE

Chez les ruminants, le contrôle génétique du microbiote par l'hôte est encore assez méconnu, bien moins détaillé que chez l'Homme où des liens entre génétique de l'hôte, microbiote digestif et santé, en particulier, sont clairement établis. Néanmoins des études très récentes, centrées sur le microbiote ruminal chez les bovins (Li et al., 2019b ; Wallace et al., 2019 ; Zhang et al., 2020) et les ovins (Rowe et al., 2015 ; Marie-Etancelin et al., 2018) rapportent l'existence d'un contrôle génétique des communautés microbiennes, que ce soit en

productions laitière ou allaitante. Chez les ovins, dès 2015, Rowe et al. ont démontré l'existence d'un déterminisme génétique de la communauté microbienne en synthétisant la variabilité de celle-ci à l'aide d'une analyse de correspondance. Des estimations d'héritabilité d'abondances de taxons bactériens ont ensuite été publiées : selon les auteurs, 22 % des genres bactériens, 59 taxons bactériens ou 39 OTUs (Operational Taxonomic Unit, i.e. regroupement de séquences d'ARN 16S sur la base de leur similarité) présentent des héritabilités significatives respectivement supérieures à 0,10, 0,15 ou 0,20 (Marie-Etancelin et al., 2018 ; Li et al., 2019 ; Wallace et al., 2019). Deux de ces auteurs rapportent une indépendance entre le niveau d'abondance de ces OTUs ou taxons et leur niveau d'héritabilité ; aussi des OTUs même faiblement abondants peuvent être héritables. Contrairement aux bactéries membres du phylum *Bacteroidetes* très affectées par les facteurs d'environnement, les bactéries du genre *Ruminococcus* semblent fortement associées à la génétique de l'hôte (Li et al., 2019) : la grande diversité de ces *Ruminococcus* et de leurs modèles d'association avec l'hôte suggère l'existence de relations de coévolution entre *Ruminococcus* et son hôte (La Reau et al., 2016). De plus, ces OTUs héritables semblent co-agir entre eux (plus que les OTUs non héritables), et sont en grande partie liés aux acides gras ruminiaux produits de la fermentation ruminale (Wallace et al., 2019). L'existence d'un déterminisme génétique des indices de diversité semble en revanche controversée. Une seule analyse d'association pangénomique entre des marqueurs du génome de l'hôte et l'abondance des taxons microbiens du rumen a été publiée (Li et al., 2019). Dix-neuf QTL situés sur 12 chromosomes bovins ont été associés à 14 taxons bactériens dont 12 avaient été identifiés comme héritables ; ni les indices de diversité, ni les abondances d'archées n'ont présenté de QTL. Comme proposé par Difford et al. (2018), il serait souhaitable de prendre en compte simultanément les contributions du métagénome du microbiote et du génome de l'hôte dans l'analyse de la variabilité des caractères d'intérêt chez les ruminants, sachant que le microbiote est lui-même sous la dépendance des gènes de l'hôte. Des études postérieures (Zhang et al., 2020) ont illustré l'utilité d'inclure à la fois des informations microbiennes et génétiques de l'hôte pour mieux comprendre les caractères complexes.

2.4. L'INFLUENCE DE PRATIQUES ALIMENTAIRES DANS LE JEUNE AGE

Chez les ruminants, le tube digestif est stérile, peu développé et non fonctionnel à la naissance mais il est très rapidement colonisé et les fonctions digestives se mettent en place progressivement (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Tous les travaux menés sur le jeune s'accordent à dire que la richesse et la diversité augmentent avec l'âge et le microbiote devient plus mature et plus stable avec le temps (Malmuthuge et Guan, 2017). Par exemple, la dynamique de mise en place du microbiote ruminal chez les jeunes est liée à l'âge et au changement de régime alimentaire. Elle pourrait être divisée en trois étapes chez le veau (Rey et al., 2014).

Les 2 à 3 premiers jours de vie correspondent à une phase initiale de colonisation par des bactéries essentiellement anaérobies facultatives (*Proteobacteria* à plus de 50 %) ; celles-ci vont avoir un rôle important dans la mise en place du milieu ruminal, notamment pour les populations strictement anaérobies (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Gomez-Arango et al. (2017) soulignent le rôle important que joue la mère dans l'inoculation microbienne à travers différentes matrices (vagin, fèces, peau, salive, colostrum).

La deuxième phase arrive après 3 jours de vie avec le passage à l'aliment d'allaitement ou au lait maternel. Durant cette phase, un changement important de la communauté bactérienne a lieu. Les bactéries anaérobies strictes dominent, les premières archées s'installent ensuite, puis les premiers champignons à 10 jours d'âge (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Après la phase colostrale, la colonisation bactérienne est très différente d'un individu à l'autre. Ceci est probablement dû à une communauté pionnière variable qui se met en place dès la naissance, préparant différemment l'écosystème pour l'implantation du microbiote anaérobie (Jami et al., 2013).

La dernière étape de colonisation se situe entre 14 jours et le sevrage (70 jours en moyenne). Elle dépend de l'ingestion d'aliment solide, de l'âge au sevrage et de la présence ou pas d'animaux adultes (Rey et al., 2014). Les protozoaires vont s'installer durant cette phase à partir de 21 jours d'âge (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Par exemple, des études réalisées sur des veaux (Meale et al., 2016) et sur des chevreaux (Abecia et al., 2017) nourris avec un aliment d'allaitement montrent que le genre *Bacteroides* diminue fortement avec l'introduction de céréales dans le régime. Anderson et al. (1987) ont montré que l'introduction d'aliments solides chez des veaux sevrés à 4 semaines favorisait une plus grande abondance microbienne dans le rumen par rapport à des veaux sevrés à 6 semaines sans introduction d'aliments solides.

Il existe donc un effet important de l'âge de l'animal jusqu'au sevrage sur le microbiote digestif, ainsi que de l'alimentation. Piloter le microbiote et son implantation dans le tube digestif, juste après la naissance des animaux, pourrait être une piste pour programmer le microbiote et l'orienter (Malmuthuge et Guan, 2017).

3. LES PRINCIPAUX LIENS AVEC LES CARACTERES D'INTERET POUR LES ELEVEURS

Les rations riches en concentrés sont à l'origine d'une modification importante des microbiotes conduisant à une potentielle altération de l'efficacité alimentaire, du bien-être et de la santé des animaux (acidose). Parallèlement à l'acidose, d'autres troubles digestifs (diarrhées d'origines infectieuse ou non) voire extra-digestifs (boiteries), peuvent être liées à des altérations des équilibres microbiens (ou dysbiose) au sein du tractus digestif. Toute dysbiose intestinale peut en particulier influencer la susceptibilité de l'hôte aux infections (Malmuthuge et

Guan, 2017). Enfin, au-delà du lien étroit existant entre efficacité alimentaire et microbiotes digestifs, ceux-ci influent sur les émissions de rejets polluants pour l'environnement et la qualité des productions animales.

3.1. MICROBIOTES ET SANTE

Comme évoqué ci-dessus, l'acidose induite par les rations riches en concentrés peut provoquer une dysbiose caractérisée par une diminution de la richesse et de la diversité du microbiote ruminal, voire intestinal (Khafipour et al., 2016 ; Mao et al., 2013). Elle est marquée par une réduction de l'abondance de taxons ayant un effet bénéfique pour l'hôte et, a contrario, l'augmentation de l'abondance de bactéries ayant un effet défavorable voire pathogène (Plaizier et al., 2018). Plusieurs auteurs rapportent qu'avec ce type de ration, l'abondance relative des *Firmicutes* augmente au détriment de celle des *Bacteroidetes* (Plaizier et al., 2017 ; Mao et al., 2013), ce qui ne serait pas favorable d'un point de vue fonctionnel (El Kaoutari et al., 2013). Par ailleurs, dans certaines études (Li et al., 2011 ; Plaizier et al., 2017), on voit apparaître une augmentation de certaines souches potentiellement pathogènes d'*Escherichia coli* qui déclenchent une réponse inflammatoire dans ces conditions ruminales (Khafipour et al., 2011). Les effets de l'acidose sur la composition du microbiote diffèrent entre les études et même entre les vaches au sein d'une même étude. Zaneveld et al. (2008) expliquent ces différences par une coévolution permanente de l'hôte et du microbiote. Différentes stratégies de prévention de l'acidose ont été testées et semblent prometteuses. Elles consistent pour la plupart à augmenter dans la ration la part de fibres pour favoriser la communauté fibrolytique, mais également à ajouter des compléments alimentaires et des additifs, comme les tampons et les probiotiques (Plaizier et al., 2018). Enfin, une alimentation riche en concentrés serait associée à une proportion plus élevée dans le lait de certaines bactéries opportunistes telles que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus parauberis* et *Brevundimonas diminuta* (Zhang et al., 2015).

Le veau nouveau-né est fréquemment infecté par différents agents pathogènes entériques conduisant à des diarrhées plus ou moins sévères, responsables de pertes économiques importantes (Cho et Yonn, 2014). Or au niveau intestinal, il existe un lien marqué entre les dysbioses et les diarrhées ou la présence de pathogènes. Par exemple, des veaux nouveau-nés infectés par des cryptosporidies ont un microbiote fécal enrichi en *Fusobacterium* (Ichikawa-Seki et al., 2019). De même, chez des veaux en feedlot, une diarrhée hémorragique est associée à une dysbiose du microbiote fécal (Zeineldin et al., 2018). Dans ces exemples, il n'est pas possible de savoir si la dysbiose observée est la cause ou la conséquence de la maladie, mais une augmentation des *Proteobacteria*, et en particulier des *Enterobacteriaceae* dans le microbiote fécal semble être aussi la signature de diverses maladies et états diarrhéiques chez l'Homme et chez l'animal monogastrique (Shin et al., 2015). Des stratégies nutritionnelles n'utilisant pas d'antibiotiques sont développées pour lutter contre les affections

entériques, en particulier l'utilisation de probiotiques pour orienter le microbiote intestinal au bénéfice de la santé de l'animal (Plaizier et al., 2018).

Il existe également un lien entre le microbiome des ruminants et le risque de mammites. Le type de litière, par exemple, semble influencer sur l'exposition de la peau des trayons aux micro-organismes pathogènes associés aux mammites (Rowbotham et Ruegg, 2016). En outre, des études récentes (Falentin et al., 2016 ; Derakhshani et al., 2020) ont montré que la communauté bactérienne du canal des trayons des bovins laitiers varie en fonction des antécédents de mammites de l'animal : les quartiers sains présentaient des profils taxonomiques différents de ceux ayant déjà développé une mammite. Rappelons que les mammites cliniques s'ensuivent d'une antibiothérapie, en particulier locale. Par ailleurs, les mammites subcliniques ovines semblent être associées à l'augmentation significative dans le lait de certains genres microbiens habituels de la glande mammaire et à une réduction concomitante de sa diversité microbienne (Esteban-Blanco et al., 2020). Enfin, la comparaison de brebis laitières appartenant à des lignées divergentes pour la susceptibilité aux mammites a mis en évidence une augmentation de l'abondance de 4 genres de bactéries ruminales (*Olsenella*, *Prevotella* 1, *Prevotellaceae* Ga6a1, *Syntrophococcus*) chez les animaux les plus susceptibles aux infections mammaires (Marie-Etancelin et al., 2018).

La pathologie mammaire en général, et les mammites en particulier, a un impact de premier ordre sur le bien-être animal. En effet, les mammites représentent l'affection la plus fréquente en élevage laitier chez les trois espèces, tout particulièrement chez la vache. De plus, une partie des infections mammaires, variable en fonction de l'espèce hôte, est à l'origine de tableaux cliniques aigus à suraigus.

3.2. MICROBIOTES ET ENVIRONNEMENT

Le secteur de l'élevage représente une source importante de gaz à effet de serre (GES) dans le monde. Ce secteur émet environ 14,5 % du total des émissions anthropiques mondiales de GES (Gerber et al., 2013) ; le méthane entérique produit essentiellement par les ruminants en représente 44 %.

Le CH₄ est un coproduit naturel, résultant de la dégradation microbienne des aliments dans le rumen, permettant de recycler l'hydrogène produit par les fermentations. Ce phénomène est indispensable car l'accumulation d'hydrogène aurait des effets négatifs sur les fermentations.

Des tentatives ont été faites pour réduire la production de méthane dans le rumen en utilisant plusieurs stratégies (Morgavi et al., 2010, Martin et al., 2010 ; Huws et al., 2018). La plupart d'entre elles n'est pas largement utilisée en raison d'une faible efficacité, d'une mauvaise sélectivité, de la toxicité des produits chimiques envers l'animal ou encore du développement d'une résistance microbienne aux composés anti-méthanogènes. Un certain nombre de ces approches cible le métabolisme du H₂ en diminuant les producteurs de H₂ tels que les protozoaires, mais très peu d'entre-elles visent à

augmenter les voies de consommation de H₂ autres que la méthanogenèse.

Rowe et al. (2015) rapportent des corrélations génétiques significatives entre les communautés microbiennes ruminales et les émissions de méthane. Ramayo-Caldas et al. (2019) ont identifié un ruminotype composé de 86 OTUs associé avec une augmentation des émissions de méthane. Ces OTUs expliquent 24 % de la variance phénotypique de la quantité de méthane produit, tandis que la contribution du génome de l'hôte est estimée à 14 %. Par ailleurs, les pertes d'azote dans les fèces et l'urine des ruminants peuvent présenter jusqu'à 90% de l'azote consommé par l'animal ce qui pose un problème vis-à-vis de l'équilibre de la ration, mais aussi environnemental dans certaines régions de production (Dijkstra et al., 2013). Ces pertes sont particulièrement liées à l'importante activité protéolytique des microbes du rumen produisant de l'ammoniaque ; celui-ci n'est pas totalement réutilisé pour la synthèse de protéines microbiennes et est ensuite excrété par l'animal, modulant la digestibilité et l'utilisation métabolique de l'azote. Des rations alimentaires respectant au mieux les recommandations tenant compte de la physiologie de l'animal sont la meilleure solution pour diminuer les rejets azotés. Enfin, le microbiote ruminal produit des phytases permettant de valoriser efficacement le P d'origine végétale et donc de limiter sa teneur dans les déjections de ruminants.

3.3. MICROBIOTES ET EFFICACITE ALIMENTAIRE

Le microbiote ruminal est fortement lié aux performances des animaux et à leur ingestion, et contribuerait à de nombreux phénotypes (Xue et al., 2018) pour lesquels des modèles prédictifs incluant le microbiote ruminal ont été proposés (Gleason et White, 2018). Le microbiote ruminal dépend fortement de la quantité de matière sèche ingérée et de l'efficacité alimentaire des animaux (Delgado et al., 2019) : par exemple, le genre *Prevotella* a une abondance relative plus élevée dans le rumen des vaches laitières les plus efficaces. Néanmoins, l'abondance de ce genre n'est que très faiblement corrélée aux paramètres d'efficacité alimentaire mesurés par les auteurs. Ainsi, Malmuthuge et Guan (2017) ont rapporté dans leur synthèse que les relations entre le microbiote ruminal d'une part et la production laitière et l'efficacité alimentaire d'autre part, sont encore incertaines car de nombreuses études se contredisent. Par exemple, le genre *Prevotella* peut être corrélé négativement ou positivement à ces deux paramètres. L'une des raisons possibles à ces différences est que les auteurs utilisent la plupart du temps des faibles tailles d'échantillons. L'autre raison provient de la multiplicité des approches statistiques utilisées, dont certaines sont inadéquates à ces données de comptage microbien.

Dès 2016, Roehe et al. indiquaient que pour prédire 85 % des variations de l'indice de consommation, il fallait prendre en compte les abondances relatives de 49 gènes microbiens du rumen. De même, la plupart des taxons microbiens héréditaires identifiés par Li et al. (2019) contribuent fortement à expliquer les variations de l'indice de consommation et de la

matière sèche ingérée, mais peu ou pas les variations du critère composite qui est la consommation résiduelle.

3.4. MICROBIOTES ET QUALITE DES PRODUITS

Les microbiotes peuvent influencer sur les différentes composantes de la qualité d'un produit : organoleptiques, technologiques, sanitaires et nutritionnelles. Nous nous limiterons à l'exemple du lait. Une récente étude (Carafa et al., 2020) a montré que les niveaux microbiens des laits d'alpage sont significativement plus élevés que ceux des laits issus de prairies permanentes de plaine. De nombreuses souches appartenant à des espèces bien connues pour leurs activités technologiques ou probiotiques ont été isolées dans le lait d'alpage (20 % de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis/cremoris*, 18 % de *Lactobacillus paracasei*, 14 % de *Bifidobacterium crudilactis* et 18 % de *Propionibacterium* sp.) contre 16 %, 6 %, 2 % et 5 % respectivement dans le lait de plaine. De plus, le lait d'alpages présentait une réduction significative des *Pseudomonas* et une augmentation des genres *Lactococcus*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. De la même manière, le système de pâturage (pâturage exclusif vs pâturage + concentrés) des vaches laitières est associé, via le trayon, au microbiote du lait et du fromage dont il est issu (Frétin et al., 2018) : 85 % des OTUS identifiés dans le lait cru et 27 % de ceux identifiés dans le fromage affiné ont été trouvés sur la peau des trayons. Les voies et les facteurs de dissémination de germes pathogènes alimentaires de l'animal, et de son environnement au lait, ont fait l'objet de nombreuses études. La mamelle (surface des trayons, glande) est considérée comme un réservoir de germes pathogènes (*S. aureus* ; Rainard et al., 2018) ou un vecteur de ceux-ci (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines ; Castro et al., 2018 ; Frémaux et al., 2006). Mais rares sont les études qui explorent les déterminants des équilibres entre les microbiotes commensaux et les pathogènes pour le consommateur. Monsallier et al. (2012) ont montré que certaines pratiques, comme l'utilisation de litière de paille et une hygiène de traite modérée (désinfection non systématique du trayon), tendent à éliminer les agents pathogènes et à préserver les populations microbiennes d'intérêt technologique. Enfin, il est à noter que le profil en acides gras du lait, qui module la texture et les propriétés nutritionnelles des matières grasses du lait, est très dépendant du phénomène de biohydrogénation réalisé par les bactéries ruminales (Enjalbert et al., 2017). Par exemple, lorsque la voie de biohydrogénation en trans-11 est inhibée dans le rumen, les acides vaccénique et ruménique diminuent dans le lait des vaches (Kaleem et al, 2018). Or, ces acides gras présenteraient des propriétés intéressantes pour le consommateur humain (Troegeler-Meynadier et al., 2005). Il en va de même pour la viande.

CONCLUSION

Les microbiotes des ruminants sont composés de bactéries, d'archées, d'eucaryotes, et de virus. Les bactéries sont les plus nombreuses et les plus

impliquées dans les rôles biologiques des microbiomes ; elles sont aussi les plus étudiées. Les archées participent essentiellement à la méthanogenèse dans le tube digestif. Les eucaryotes sont minoritaires, mais leur rôle exact est encore peu connu et leur importance au sein des écosystèmes reste à préciser. Actuellement, les études des effets des microbiotes sur leur hôte concernent presque uniquement les relations avec la santé des animaux, et pour les microbiotes digestifs, les performances de production et l'efficacité alimentaire. Par ailleurs, la présente synthèse souligne l'importance des facteurs environnementaux et individuels, avec des leviers potentiels à utiliser en élevage : alimentation, hygiène des pratiques, conduite des animaux, génétique et âge. Ces facteurs interagissent dans un élevage et une approche globale devra être développée pour proposer aux éleveurs des solutions intégrées.

- Abecia, L., Jiménez, E., Martínez-Fernandez, G., Martín-García, A.I., Ramos-Morales, E., Pinloche, E., Denman, S.E., Newbold, C.J., Yáñez-Ruiz, D.R. 2017.** PLoS ONE 12(8): e0182235.
- Alipour, M.J., Jalanka, J., Pessa-Morikawa, T., Kokkonen, T., Satokari, R., Hynönen, U., Livanainen, A., Niku, M. 2018.** Sci. Rep. 8:10437.
- Anderson, K., Nagaraja, T., Morrill, J. 1987.** J Dairy Sci. 70, 1000–1005.
- Andrews, T., Neher, D. A., Weicht, T. R., Barlow, J. W. 2019.** PLoS ONE, 14(11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225001>.
- Auffret, M.D., Stewart, R., Dewhurst, R.J., Duthie, C.A., Rooke, J.A., Wallace, R.J., Freeman, T.C., Snelling, T.J., Watson, M., Roehe, R. 2017.** Front Microbiol 8:2642.
- Bergman, E.N. 1990.** Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol rev.* 70:567–90.
- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., Bardot, O., Raymann, K., Gribaldo, S., Peyret, P., O'Toole, P., Brugère, J-F. 2014.** BMC Genomics 15:679.
- Buccioni, A., Pallara, G., Pastorelli, R., Bellini, L., Cappucci, A., Mannelli, F., Minieri, S., Roscini, V., Rapaccini, S., Mele, M., Giovannetti, L., Viti, C., Pauselli, M. 2017.** Accessed October 29, 2020. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/496907/6/>.
- Carafa, I., Navarro, I. C., Bittante, G., Tagliapietra, F., Gallo, L., Tuohy, K., & Franciosi, E. 2020.** Food Microbiol., 91(February), 103504. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103504>
- Carbonero, F., Oakley, B. B., and Purdy, K. J. 2014.** PLoS One 9: e85105. doi: 10.1371/journal.pone.0085105.
- Castro, H., Jaakkonen, A., Hakkinen, M., Korkeala, H., & Lindström, M. 2018.** Appl. Environ. Microbiol., 84(4), 1–14. <https://doi.org/10.1128/AEM.02000-17>.
- Cho, Y., Yoon, K.J. 2014.** J Vet Sci 15:1–17. doi:10.4142/jvs.2014.15.1.1.
- Corréa, P.S., Mendes, L.W., Lemos, L.N., Cruzoulon, P., Niderkorn, V., Hoste, H., Costa-Júnior, L.M., Tsai, S.M., Faciola, A.P., Abdalla, A.L., Louvandini, H. 2020.** FEMS Microbiol. Ecol. 96. doi:10.1093/femsec/fiaa024.
- Creevey, C.J., Kelly, W.J., Henderson, G., Leahy, S.C. 2014.** Microb. Biotechnol. 7:467-479.
- Delgado, B., Bach, A., Guasch, I., González, C., Elcoso, G., Pryce, J.E., et al. 2019.** Sci Rep; 9: 1–13.
- Derakhshani, H., Fehr, K. B., Sepehri, S., Francoz, D., De Buck, J., Barkema, H. W., ... Khafipour, E. 2018.** J.I Dairy Sci., 101, 10605-10625. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14860>
- Derakhshani, H., Plaizier, J.C., De Buck, J., Barkema, H.W., E. Khafipour. 2020.** Animal Microbiome 2:11. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00028-6>
- Difford, G.F., Plichtal, D.R., Løvendahl, P., Lassen, J., Noell, S.J., Højberg, O., Wright, A.D.G., Zhu, Z., Kristensen, L., Nielsen, H.B., Gulbrandtsen, B., Sahana, G., 2018.** PLoS Genet 14(10): e1007580. doi.org/10.1371/journal.pgen.1007580.
- Dijkstra, J., Reynolds, C.K., Kebreab, E., Bannink, A., Ellis, J.L., France, J., van Vuuren, A.M. 2013.** p 47-58. In Oltjen JW, Kebreab E, Lapierre H (ed), Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production: 4th Int. Symp. Energy and Protein Metabolism Nutrition, Sacramento, California, USA 9-12 September 2013 doi:10.3920/978-90-8686-781-3_3. Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Doyle, C. J., Gleeson, D., O'Toole, P. W., Cotter, P. D. 2017.** Appl. Environ. Microbiol., 83(2), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.02694-16>.
- Edwards JE, Forster RJ, Callaghan TM, Dollhofer V, Dagar SS, Cheng Y, Chang J, Kittelmann S, Fliiegerova K, Puniya AK, Henske JK, Gilmore SP, O'Malley MA, Griffith GW, Smidt H. 2017.** Front Microbiol. 8:1657. doi: 10.3389/fmicb.2017.01657.
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., et Henrissat, B. 2013.** Nat. Rev. Microbiol. 11, 497–504.
- Enjalbert, F., Combes, S., Zened, A., Meynadier, A. 2017.** J. Appl. Microbiol.. 123:782-797.
- Esteban-Blanco, C., Gutiérrez-Gil, B., Puente-Sánchez, F., Marina, H., Tamames, J., Acedo, A., Arranz, J. J. 2020.** J. Anim. Breed. Genet., 137(1), 73–83. <https://doi.org/10.1111/jbg.12446>
- Falentin, H., Rault, L., Nicolas, A., Bouchard, D. S., Lassalas, J., Lambertson, P., ... Even, S. 2016.** Front. Microbiol., 7(APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00480>
- Firkins, J.L., Yu, Z., Park, T., Plank, J.E. 2020.** Front. Microbiol. 11 :123-123.
- Fonty, G., Chaucheyras-Durand, F. 2007.** Les écosystèmes digestifs. In : Les Communautés microbiennes du tube digestif des mammifères : Diversité et structure. Tec&Doc Lavoisier, Paris, France. pp. 71– 126. 23.
- Frémaux, B., Raynaud, S., Beutin, L., & Rozand, C. V. 2006.** Vet. Microbiol., 117(2–4), 180–191. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.030>
- Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Verdier-Metz, I., Pomiès, D., Ferlay, A., Montel, M.C., Delbès, C. 2018.** Sci. Rep., 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18447-y>.

- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Faluccci, A., Tempio, G. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Gilbert RA, Townsend EM, Crew KS, Hitch TCA, Friedersdorff JCA, Creevey CJ, Pope PB, Ouwerkerk D, Jameson E. 2020. *Front Microbiol.* 11:450. doi: 10.3389/fmicb.2020.00450.
- Gleason, C.B., White, R.R. 2018. *J. Animal Sci.* 96:4658-4673.
- Gomez-Arango, L.F., Barrett, H.L., McIntyre, H.D., Callaway, L.K., Morrison, M., Nitert, M.D. 2017. *Sci Rep.* 7 (1): 2860.
- Guarín, J. F., Baumberger, C., & Ruegg, P. L., 2017. *J. Dairy Sci.*, 100(2), 1436–1444. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11514>.
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Janssen, P.H. 2015. *Sci Rep* 5:14567.
- Hess, M., Sczyrba, A., Egan, R., Kim, T.W., Chokhwalala, H., Schroth, G., Luo, S., Clark, D.S., Chen, F., Zhang, T., Mackie, R.I., Pennacchio, L.A., Tringe, S.G., Visel, A., Woyke, T., Wang, Z., Rubin, E.M. 2011. *Science* 331:463-7.
- Hess, M., Paul S. S., Puniya A. K., van der Giezen M, Shaw C., Edwards J. E., Fliegerová K. 2020. *Front. Microbiol.* 11, 2621.
- Holman, DB., Gzyl, KE. 2019. *FEMS Microbiol. Ecol.* 95 (6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz072>.
- Honan, M.C., Greenwood, S.L. 2020. *Sci.c Rep.* 10 :3179.
- Hungate, R.E. 1966. CHAPTER III - The Rumen Protozoa, p 91-147. *In* Hungate RE (ed), *The Rumen and its Microbes* doi:<https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3308-6.50006-1>. Academic Press.
- Hungate, RE. 1966. CHAPTER II - The Rumen Bacteria, p 8-90. *In* Hungate RE (ed), *The Rumen and its Microbes* doi:<https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3308-6.50005-X>. Academic Press.
- Huws, S.A., Creevey, C.J., Oyama, L.B., Mizrahi, I., Denman, S.E., Popova, M., Munoz-Tamayo, R., Forano, E., Waters, S.M., Hess, M., Tapio, I., Smidt, H., Krizsan, S.J., Yanez-Ruiz, D.R., Belanche, A., Guan, L., Gruninger, R.J., McAllister, T.A., Newbold, C.J., Roehe, R., Dewhurst, R.J., Snelling, T.J., Watson, M., Suen, G., Hart, E.H., Kingston-Smith, A.H., Scollan, N.D., do Prado, R.M., Pilau, E.J., Mantovani, H.C., Attwood, G.T., Edwards, J.E., McEwan, N.R., Morrisson, S., Mayorga, O.L., Elliott, C., Morgavi, D.P. 2018. *Front Microbiol* 9:2161.
- Ichikawa-Seki, M., Motooka, D., Kinami, A., et al., 2019. *Sci Rep.* 9(1):12517. Published 2019 Aug 29. doi:10.1038/s41598-019-48969-6.
- Ishaq, S.L., Alzahal, O., Walker, N., McBride, B. 2017. *Front. Microbiol.* 8:1943.
- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., Mizrahi, I. 2013. *ISME J.* 7 : 1069–1079.
- Kaleem, M., Enjalbert, F., Farizon, Y., Meynadier, A. 2018. *Animal* 12: 183–188.
- Kenters, N., Henderson, G., Jeyanathan, J., Kittelmann, S., Janssen, P.H. 2011. *Journal of Microbiological Methods* 84:52-60.
- Khafipour, E., Plaizier, J.C., Aikman, P.C., et Krause, D.O. 2011. *J. Dairy Sci.* 94, 351–360.
- Khafipour, E., Li, S., Tun, H., Derakhshani, H., Moossavi, S., Plaizier, J.C. 2016. *Anim.l Front.* 6, 13–19.
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z. 2011. *Folia Microbiol (Praha)* 56:453-8.
- Langille, M.G.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., a Reyes, J., Clemente, J.C., Burkepile, D.E., Vega Thurber, R.L., Knight, R., Beiko, R.G., Huttenhower, C. 2013. *Nature Biotechnology*, 1-10. 8.
- La Reau, A.J., Meier-Kolthoff, J.P., Suen, G. 2016. *Microb Genom.* 2: e000099.
- Li, S., Plaizier, J. C., Khafipour, E. et Krause, D. O. 2011. *J. Dairy Sci.* 94 (E-Suppl. 1): 624.
- Li, F., Li, C., Chen, Y., Liu, J., Zhang, C., Irving, B., Fitzsimmons, C., Plastow, G., Guan, L.L. 2019. *Microbiome* 7, 92. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0699-1>.
- Lopes, D.R.G., La Reau, A.J., Duarte, M.S., Detmann, E., Bento, C.B.P., Mercadante, M.E.Z., Bonilha, S.F.M., Suen, G., Mantovani, H.C. 2019. *Front Microbiol.* Jun 25 ;10 :1263. doi : 10.3389/fmicb.2019.01263.
- Malmuthuge, N., Griebel, P.J., Guan le, L. 2014. *Appl Environ Microbiol.* Mar;80(6):2021-8. doi: 10.1128/AEM.03864-13.
- Malmuthuge, N., Griebel, P.J., Guan le, L. 2015. *Front Vet Sci.* Sep 23; 2:36. doi: 10.3389/fvets.2015.00036.
- Malmuthuge, N., Guan, L. 2017. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8:8.
- Mao, S., Zhang, R., Wang, D., Zhu, W. 2013. *Anaerobe* 24, 12–19.
- Mao, S., Zhang, M., Liu, J., Zhu, W.. 2015. *Sci Rep* 5:16116. <https://doi.org/10.1038/srep16116>
- Marchesi, J. R., Ravel, J. 2015. *Microbiome* 3:31. <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>.
- Marie-Etancelin, C., Gabinaud, B., Pascal, G., Tomas, R., Menras, J.M., Enjalbert, J., Allain, C., Larroque, H., Rupp, R., Meynadier, A. 2018. *Proc. 69. Annual Meeting of EAAP, 27-31/08/2018, Dubrovnik.*
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M. 2010. *Animal* 4:351–365.
- Meale, S.J., Li, S., Azevedo, P., Derakhshani, H., Plaizier, J.C., Khafipour, E. et al. 2016. *Front Microbiol.* 7 : 582.
- Metzger, S. A., Hernandez, L. L., Skarlupka, J. H., Suen, G., Walker, T. M., & Ruegg, P. L. 2018. *J. Dairy Sci.*, 101(7), 6346–6356. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14212>
- Monsallier, F., Verdier-Metz, I., Agabriel, C., Martin, B., Montel, M. C. 2012. *Dairy Sci. Technol.*, 92, 265–278.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J. 2010. *Animal* 4:1024-36.
- Morgavi, D.P., Rathahao-Paris, E., Popova, M., Bocard, J., Nielsen, K.F., Boudra, H. 2015. *Front Microbiol* 6:1060.
- Nicola, I., Cerutti, F., Grego, E., Bertone, I., Gianella, P., D'Angelo, A., Peletto, S., Bellino, C. 2017. *Microbiome* 5:152-152.
- Plaizier, J.C., Krause, D.O., Gozho, G.N., McBride, B.W. 2008. *Vet. J.* 176 (2008) 21–31
- Plaizier, J.C., Li, S., Tun, H.M., Khafipour, E. 2017. *Front. Microbiol.* 7:2128.

- Plaizier, J., Danesh Mesgaran, M., Derakhshani, H., Golder, H., Khafipour, E., Kleen, J., . . . Zebeli, Q. 2018. *Animal*, 12(S2), S399-S418. doi:10.1017/S1751731118001921.
- Pollock, J., Glendinning, L., Wisedchanwet, T., Watson, M. 2018. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: e02627-17.
- Popova, M., Guyader, J., Silberberg, M., Seradj, A.R., Saro, C., Bernard, A., Gerard, C., Martin, C., Morgavi, D.P. 2019. *Appl Environ Microbiol* 85.
- Rainard, P., Foucras, G., Fitzgerald, J. R., Watts, J. L., Koop, G., Middleton, J. R. 2018. *Transbound Emerg Dis*, 65, 149–165. <https://doi.org/10.1111/tbed.12698>.
- Ramayo-Caldas, Y., Zingaretti, L., Popova, M., Estellé, J., Bernard, A., Pons, N., Bellot, P., Mach, N., Rau, A., Roume, H., Perez-Enciso, M., Faverdin, P., Edouard, N., Ehrlich, D., Morgavi, D.P., Renand, G., 2019. *J Anim Breed Genet.*, 137(1):49-59. doi: 10.1111/jbg.12427.
- Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., Monteils, V. 2014. *J Appl Microbiol*; 116: 245–257.
- Roehe, R., Dewhurst, R.J., Duthie, C.A., Rooke, J.A., McKain, N., Ross, D.W., Hyslop, J.J., Waterhouse, A., Freeman, T.C., Watson, M., Wallace, R.J. 2016. *PLoS Genet.* 12(2): e1005846. doi: 10.1371/journal.pgen.1005846.
- Rowbotham, R. F., Ruegg, P. L. 2016. *J. Dairy Science*, 99(8), 6594–6608. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10674>
- Rowe, S.J., Kittelmann, S., Pinares-Patiño, C., Wood, G.R., Dodds, K.G., Kirk, M.R., Ganesh, S., Hickey, S.M., Janssen, P.H., McEwan, J.C. 2015. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* 2015. Vol 75, 67-69.
- Seshadri, R., Leahy, S.C., Attwood, G.T., The, K.H., Lambie, S.C., Cookson, A.L., Elloe-Fadrosch, E.A., Pavlopoulos, G.A., Hadjithomas, M., Varghese, N.J., Paez-Espino, D., Palevich, N., Janssen, P.H., Ronimus, R.S., Noel, S., Soni, P., Reilly, K., Atherly, T., Ziemer, C., Wright, A.-D., Ishaq, S., Cotta, M., Thompson, S., Crosley, K., McKain, N., Wallace, R.J., Flint, H.J., Martin, J.C., Forster, R.J., Gruninger, R.J., McAllister, T., Gilbert, R., Ouwerkerk, D., Klieve, A., Jassim, R.A., Denman, S., McSweeney, C., Rosewarne, C., Koike, S., Kobayashi, Y., Mitsumori, M., Shinkai, T., Cravero, S., Cucchi, M.C., Perry, R., Henderson, G., Creevey, C.J., Terrapon, N., Lapebie, P., Drula, E., et al. 2018. *Nat. Biotechnol.* 36:359-367.
- Shin, N.R., Whon, T.W., Bae, J.W. 2015. *Trends Biotechnol.*, 33, pp. 496-503.
- Stewart, R.D., Auffret, M.D., Warr, A., Walker, A.W., Roehe, R., Watson, M. 2019. *Nat Biotechnol* 37:953-961.
- Swartz, J.D., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R.W., Berardinelli, J.G., Hatfield, P.G., Thomson, J.M., Roberts, A., Yeoman, C.J. 2014. *Front. Vet. Sci.* 1.
- Tapio, I., Shingfield, K.J., McKain, N., Bonin, A., Fischer, D., Bayat, A.R., Vilkki, J., Taberlet, P., Snelling, T.J., Wallace, R.J. 2016. *PloS one* 11: e0151220-e0151220.
- Troegeler-Meynadier, A. 2005. *Rev Med Vet* 2005; 10.
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., Montel, M. C. 2012. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 326–333.
- Wallace, R.J., Sasson, G., Garnsworthy, P.C., Tapio, I., Gregson, E., Bani, P., Huhtanen, P., Bayat, A.R., Strozzi, F., Biscarini, F., Snelling, T.J., Saunders, N., Potterton, S.L., Craigon, J., Minuti, A., Trevisi, E., Callegari, M.L., Cappelli, F.P., Cabezas-Garcia, E.H., Vilkki, J., Pinares-Patino, C., Fliegerová, K.O., Mrázek, J., Sechovcová, H., Kopečný, J., Bonin, A., Boyer, F., Taberlet, P., Kokou, F., Halperin, E., Williams, J.L., Shingfield, K.J., Mizrahi, I. 2019. *Sci Adv.* 3:5(7): eaav8391. doi: 10.1126/sciadv.aav8391.
- Williams, A.G., Coleman, G.S. 1997. The rumen protozoa, p 73-139. In Hobson PN, Stewart CS (ed), *The Rumen Microbial Ecosystem* doi:10.1007/978-94-009-1453-7_3. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Xue M, Sun H, Wu X, Guan LL, Liu J. 2018. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (19), e00970-18, doi : 10.1128/AEM.00970-18
- Zaneveld, J., Turnbaugh, P.J., Lozupone, C., Ley, R.E., Hamady, M., Gordon, J.I. et Knight, R. 2008. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 109–114.
- Zeineldin, M., Aldridge, B., Lowe, J. 2018. *Microb Pathog.* Feb; 115:123-130. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.059.
- Zeineldin, M., Lowe, J., Aldridge, B. 2019. *Trends Microbiol.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.005>.
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., Enjalbert, F. 2013. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83:504-514.
- Zhang, R., Huo, W., Zhu, W., & Mao, S. 2015. *J. Sci. Food Agric.*, 95(5), 1072–1079. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6800>.
- Zhang, Q., Difford, G., Sahana, G., Løvendahl, P., Lassen, J., Lund, M.S., Guldbrandtsen, B., Janss, L., 2020. *ISME J.* doi: 10.1038/s41396-020-0663-x.
- Zinicola, M., Lima, F., Lima, S., Machado, V., Gomez, M., Döpfer, D., Guard, C., Bicalho, R. 2015. *PloS one* 10:e0120504-e0120504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120504>