



HAL
open science

Evolution structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes digestives sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques. Développement d'une biopuce ADN ciblant les gènes impliqués dans la dégradation des glucides complexes alimentaires

Sophie Comtet-Marre

► To cite this version:

Sophie Comtet-Marre. Evolution structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes digestives sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques. Développement d'une biopuce ADN ciblant les gènes impliqués dans la dégradation des glucides complexes alimentaires. Biologie animale. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22467 . tel-01809566

HAL Id: tel-01809566

<https://theses.hal.science/tel-01809566>

Submitted on 6 Jun 2018

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.

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 634

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de
DOCTEUR D'UNIVERSITE
(Spécialité : Génomique et Ecologie Microbienne)

soutenue le 26 juin 2014

Sophie COMTET-MARRE

**EVOLUTION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES
COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DIGESTIVES SOUS
L'INFLUENCE DE FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES –
DEVELOPPEMENT D'UNE BIOPUCE ADN CIBLANT LES GENES
IMPLIQUÉS DANS LA DEGRADATION DES GLUCIDES
COMPLEXES ALIMENTAIRES**

Président	Gérard FONTY, DR émérite, CNRS, Université Blaise Pascal
Rapporteurs	Gabrielle POTOKI-VERONESE, DR, LISBP, UMR 5504/UMR 792, Université de Toulouse/INSA/INRA/CNRS Pascal SIMONET, DR, Laboratoire Ampère, UMR 5005, Université Claude Bernard de Lyon Christel BERA-MAILLET, CR, Micalis, UMR 1319, INRA de Jouy-en-Josas
Directeurs	Evelyne FORANO, DR, Unité de Microbiologie, UR 454, INRA de Theix Pierre PEYRET, Pr., CIDAM, EA 4678, Université d'Auvergne
Invitée	Frédérique CHAUCHEYRAS-DURAND, Chargée de recherche, Lallemand Animal Nutrition, Clermont-Ferrand

**Equipe MINHOS, Unité de Microbiologie UR454,
Centre de Recherche INRA de Clermont-Ferrand/Theix**
Equipe d'Accueil CIDAM, EA 4678, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

RESUME

La dégradation des fibres alimentaires est une fonction essentielle des écosystèmes digestifs microbiens. Chez le ruminant, elle est assurée par des bactéries, champignons et protozoaires capables de produire de nombreuses enzymes nécessaires à l'hydrolyse des polysaccharides de paroi végétale. Parmi les facteurs susceptibles d'influencer l'efficacité de dégradation des fibres, qui est une composante importante de la productivité et de la santé animales, des additifs tels que des levures probiotiques apparaissent comme un levier intéressant. Afin d'approfondir les connaissances sur les facteurs de modulation de l'activité fibrolytique, une biopuce ADN fonctionnelle, outil moléculaire haut-débit, ciblant les gènes codant les enzymes clés de la dégradation de la cellulose et des xylanes dans les écosystèmes digestifs a été développée. Aussi, une méthode efficace dédiée à des échantillons ruminants pour la soustraction des ARNr à partir des ARN totaux a été mise au point afin d'accroître la sensibilité de l'outil. La biopuce fonctionnelle a été validée sur échantillons de complexité croissante et démontre d'excellents caractères de spécificité et de sensibilité tout en étant exploratoire et quantitative. Des régulations différentielles de l'arsenal des gènes de la fibrolyse de la bactérie du rumen *Fibrobacter succinogenes* ont pu être montrées. De même, les résultats sur échantillons de rumen suggèrent un rôle des microorganismes eucaryotes dans la fibrolyse pouvant être plus important qu'initialement envisagé. Cette approche métatranscriptomique dirigée pourra *in fine* continuer d'être appliquée dans l'étude de l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur la fonction fibrolytique microbienne chez les animaux d'élevage.

Mots clés : écosystèmes microbiens digestifs, dégradation des fibres alimentaires, glycoside hydrolases, carbohydrate estérases, biopuce ADN fonctionnelle, capture de gènes, métatranscriptomique.

ABSTRACT

Dietary fibre degradation is an essential function of microbial digestive ecosystems. In ruminants, this function is ensured by bacteria, fungi and protozoa, producing a large array of enzymes able to degrade plant cell wall polysaccharides. Among factors likely to influence the efficiency of fibre degradation, which is an important component in animal productivity and health, dietary additives such as probiotic yeasts appear as an interesting tool. To provide more insight on factors modulating fibrolytic activity, we designed a functional DNA microarray targeting genes coding for key enzymes involved in cellulose and xylan degradation by digestive microbiota. Also, an efficient method dedicated to rumen samples for removing microorganisms' rRNA from total RNA samples was developed to increase the sensitivity of the tool. The DNA microarray was validated using targets of increasing complexity and demonstrated sensitivity and specificity as well as explorative and quantitative potential. Differential expression of genes involved in fibrolysis was evidenced in the rumen bacterium *Fibrobacter succinogenes*. Moreover, results on rumen samples suggest a more important role of eucaryotes in fibre degradation than previously thought. This targeted metatranscriptomic approach will be further applied to the study of the impact of biotic and abiotic factors on the microbial mechanisms of fibre degradation in livestock.

Key words: digestive microbiota, dietary fibre degradation, glycoside hydrolases, carbohydrate esterase, functional DNA microarray, gene capture, metatranscriptomics.

REMERCIEMENTS

Je remercie Régine Talon, directrice de l'Unité UR 454 de Microbiologie, Monique Alric, directrice de l'équipe d'accueil Conception Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament (EA 4678), et Christian Amblard, directeur du Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (UMR CNRS 6023) pour m'avoir accueillie dans leur structure, et permis de réaliser ce travail de thèse dans les meilleures conditions.

Je souhaite remercier l'ANRT et la société Lallemand pour leur soutien financier. J'aimerais particulièrement remercier Henri Durand, directeur scientifique du département de Nutrition Animale de la société Lallemand, pour la confiance qu'il a bien voulu m'accorder pour ce projet.

Je remercie les membres du jury, Gérard Fonty, Gabrielle Véronèse-Potoki, Pascal Simonet et Christel Béra-Maillet, d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Mes plus sincères remerciements vont bien sûr à mes deux directeurs de thèse Evelyne Forano et Pierre Peyret. Evelyne, merci pour ta gentillesse et ton optimisme à toute épreuve. Pierre, merci pour votre vision éclairée des choses et votre capacité à tirer le meilleur de tout. Enfin, merci à tous les deux pour votre disponibilité, vos conseils scientifiques, vos encouragements constants et la liberté que vous m'avez laissée pour mener à bien ce projet.

Je souhaite vivement remercier, Frédérique Chaucheyras-Durand, chargée de recherche chez Lallemand Animal Nutrition, qui a également encadré mes travaux de thèse. Merci pour ta confiance, ton oreille attentive et ta franchise, ainsi que ton concours dans la rédaction de ce mémoire. Il y a bien plus qu'une chef en toi.

Un grand merci à Pascale Mosoni qui a également collaboré à l'encadrement de cette thèse. Merci pour ton soutien, tes conseils avisés et ta participation à nos brainstormings du vendredi.

Je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à ce projet de thèse. Mes remerciements vont en premier lieu à Ourdia Bouzid, « co-auteur » de cette biopuce. Merci également à Faouzi Jaziri, Nicolas Parisot et Mohieddine Missaoui pour leurs conseils et les développements bioinformatiques qui ont concouru à la réussite de ce travail. Merci à Aurélie Ameilbonne, alias Fohet, et Pascale Lepercq pour leur aide technique d'urgence, leur

enthousiasme et leur amitié. Merci à Réjane Beugnot pour son aide dans la validation de la biopuce. Je souhaite aussi remercier Alireza Bayat du MTT Agrifood Research Finland pour nos échanges fructueux et la mise à disposition des échantillons qui ont servi dans ce projet. Je remercie également David Guillou pour sa sympathie, sa pédagogie et cette inoubliable journée d'échantillonnage. Merci également à mes deux stagiaires, Marion Chappuis et Laurie Guillot, pour leur aide efficace et bienvenue au cours de ce travail de thèse.

Je remercie Céline Boby et Anne de la Foye, de la plateforme transcriptomique de l'INRA de Theix, pour leur disponibilité.

Je remercie Pascale de Philip, Jean-Christophe Avarre et Diego Morgavi pour leur participation à mes comités de thèse, pour leurs conseils et leurs encouragements tout au long de ce projet.

Je tiens également à remercier tout le personnel de l'équipe MINHOS, passé et présent, pour leur bonne humeur et leur soutien. J'aimerais remercier Annick Bernalier pour son accueil au sein de son équipe. Merci à mes voisines de bureau, Pascale et Eve, à Fohet, à Coco, à Gégé mon soleil, à Monsieur G. Vert, à Jordane ma colocataire de bureau et partenaire de galères, à celles qui m'ont précédée, Laureen et Priscilla, et à tous les éclats de rires du coin café. Merci pour le bol d'air frais que vous avez su m'apporter.

J'aimerais également adresser mes remerciements à l'ensemble du personnel de l'EA CIDAM pour leur accueil, et plus particulièrement au groupe de recherches passé et présent de Pierre Peyret, Corinne Petit, Eric Peyretailade, Delphine Boucher, les anciens thésards, Sébastien Terrat, Eric Dugat-Bony, Jérémie Denonfoux, celles qui le sont encore, Céline Ribière et Cyrielle Gasc, et William Tottey pour nos échanges scientifiques et parfois beaucoup moins studieux.

J'adresse également mes remerciements à l'équipe Bactéries lactiques du LMGM (UMR 5100) pour m'avoir accueillie pendant mon stage de Master 1. Merci de m'avoir redonné la flamme. Je n'en serais peut-être pas là sans vous!

Enfin, je souhaite profondément remercier mes parents et mes proches pour le soutien constant qu'ils m'ont apporté. Merci à toi, Xavier, pour toutes les concessions que tu as faites pour moi, et d'avoir toujours été auprès de moi dans les moments les plus difficiles.

Ce mémoire vient clore 13 années de ma vie et je terminerai par un proverbe de Elbert Hubbard que j'ai longtemps médité : « Il n'y a pas d'échec, sauf à ne plus essayer ». Je suis aujourd'hui heureuse de l'avoir suivi. A l'avenir !

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
Partie I LE MICROBIOTE DIGESTIF DU RUMEN DES BOVINS : DIVERSITE ET FONCTION.....	9
I.1. Tractus gastro-intestinal et digestion des bovins	9
I.2. Caractéristiques physico-chimiques du rumen	10
I.3. Diversité du microbiote digestif ruminal	11
I.3.1. Les bactéries	11
I.3.2. Les archées	14
I.3.3. Les protozoaires.....	16
I.3.4. Les champignons	17
I.3.5. Les bactériophages.....	18
I.4. Fonctions du microbiote ruminal.....	18
I.4.1. Rôle dans le développement et la santé de l'hôte.....	18
I.4.2. Dégradation et fermentation des composés alimentaires.....	19
Partie II FIBRES VEGETALES ET ALIMENTATION DES BOVINS	23
II.1. Structure et organisation des parois végétales	23
II.2. Les constituants de la paroi végétale	25
II.2.1. La cellulose	25
II.2.2. Les hémicelluloses	26
II.2.3. Les pectines	29
II.2.4. La lignine	30
II.2.5. Autres constituants des parois végétales	31
II.2.6. Composition et diversité des parois végétales	31
II.3. Les fibres végétales dans l'alimentation des bovins d'élevage	32
II.3.1. Les fourrages, principale source de fibres des bovins	33
II.3.2. Digestibilité des composants de la ration.....	34
Partie III LES MICROORGANISMES FIBROLYTIQUES ET LEUR EQUIPEMENT ENZYMATIQUE	35
III.1. Les microorganismes fibrolytiques ruminiaux	35
III.1.1. Les bactéries fibrolytiques.....	37
III.1.2. Les champignons fibrolytiques.....	37
III.1.3. Les protozoaires fibrolytiques	38
III.2. Les enzymes nécessaires à la dégradation de la cellulose et des xylanes	38
III.2.1. Organisation modulaire des enzymes cellulolytiques et xylanolytiques	40
III.2.2. Dégradation de la cellulose et enzymes cellulolytiques.....	46
III.2.3. Dégradation des xylanes et enzymes xylanolytiques	49
III.2.4. Organisation des systèmes fibrolytiques	53
III.2.5. Répertoire enzymatique des microorganismes fibrolytiques	56
III.2.6. Régulation de l'expression des gènes des enzymes fibrolytiques	64

Partie IV FACTEURS MODULANT LA STRUCTURE DU MICROBIOTE RUMINAL ET LEUR ACTIVITE FIBROLYTIQUE	67
IV.1. Facteurs abiotiques : exemple du régime alimentaire	67
IV.2. Facteurs biotiques : exemple des levures probiotiques	69
IV.2.1. Probiotiques en nutrition animale : définition et intérêt	69
IV.2.2. Effets zootechniques d'une supplémentation en probiotiques chez le ruminant	70
IV.2.3. Modes d'action des levures probiotiques	72
IV.2.4. Effets <i>in vivo</i> des levures probiotiques sur le microbiote ruminal	74
IV.2.5. Vers d'autres applications des probiotiques	76
Partie V APPROCHES POUR L'ETUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DU MICROBIOTE RUMINAL.....	77
V.1. Méthodes culturales	77
V.2. Techniques d'écologie moléculaire.....	78
V.2.1. Les marqueurs génétiques ciblés	78
V.2.2. Techniques d'écologie moléculaire	79
 OBJECTIFS.....	 93
 RESULTATS.....	 97
 Chapitre 1 OPTIMISATION D'UNE METHODE D'EXTRACTION D'ARN ET DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE ORIGINALE D'ENRICHISSEMENT EN ARNm.....	 99
I. Introduction.....	101
II. Matériel et méthodes.....	102
III. Résultats	108
III.1. Co-extraction d'ADN et d'ARN à partir de contenus ruminiaux	108
III.2. Enrichissement des ARN en ARNm	109
IV. Discussion	114
IV.1. Co-extraction d'ADN et d'ARN à partir de contenus ruminiaux	114
IV.2. Enrichissement en ARNm.....	115
V. Conclusion.....	115
 Chapitre 2 DEVELOPPEMENT D'UNE BIOPUCE ADN CIBLANT LES GENES CODANT DES ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE ET DES XYLANES.....	 119
I. Introduction.....	121
II. Matériel et méthodes.....	124
III. Résultats	135
III.1. Développement de la biopuce fonctionnelle « fibrolyse ».....	135
III.2. Evaluation et validation de la biopuce fonctionnelle	137
III.3. Hybridation d'ARN issus de contenus ruminiaux et optimisations	147
IV. Discussion	154
IV.1. Pertinence du choix des familles ciblées	154
IV.2. Détermination des sondes	155

IV.3. Evaluation et validation de la biopuce ADN	156
V. Conclusion	163
Chapitre 3 STRUCTURE ET FONCTION DU MICROBIOTE RUMINAL SOUS L’EFFET DE FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES - APPLICABILITE DE LA BIOPUCE ADN FONCTIONNELLE.....	165
I. Introduction	167
II. Matériel et méthodes	169
III. Résultats	177
III.1. Fermentations ruminales et digestibilité de la ration	177
III.2. Production de méthane et de dioxyde de carbone ruminiaux	178
III.3. Structure des communautés procaryotiques	179
III.4. Effets des traitements sur les communautés ruminales	185
III.5. Etude fonctionnelle du microbiote ruminal et application de la biopuce ADN	190
IV. Discussion	197
IV.1. Communautés microbiennes du rumen	197
IV.2. Effet des traitements sur les communautés microbiennes ruminales	201
IV.3. Intérêt des échantillons pour la validation de la biopuce ADN	205
IV.4. Etude fonctionnelle du microbiote ruminal et application de la biopuce	205
V. Conclusion	208
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	211
VALORISATION DES TRAVAUX.....	221
ANNEXES.....	267
REFERENCES.....	275

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Tube digestif des bovins.	9
Figure 2 – Arbre phylogénétique des 19 phyla bactériens du rumen	12
Figure 3 – Arbre phylogénétique des archées du rumen.	15
Figure 4 – Etapes clés de la transformation des lipides estérifiés d'origine végétale en acides gras partiellement saturés via la lipolyse et la biohydrogénation par les enzymes bactériennes ruminales.	20
Figure 5 – Hydrolyse des polysaccharides pariétaux et fermentations microbiennes.	21
Figure 6 - Structure de la paroi végétale.	23
Figure 7 - Organisation des composants pariétaux au sein de la paroi primaire.	24
Figure 8 - Structure d'une chaîne de cellulose.	25
Figure 9 - Organisation de chaînes de cellulose en microfibrille.	26
Figure 10 - Exemples de structure des différents types de xylanes.	27
Figure 11 - Implication des acides féruliques dans la formation de liaisons entre deux molécules de xylanes et entre xylane et lignine	28
Figure 12 – Exemples de structure du xyloglucane, des mannanes et des β -glucanes.	29
Figure 13 - Structure schématique de 4 types de pectines, le rhamnogalacturonane I, le xylogalacturonane, l'homogalacturonane et le rhamnogalacturonane II	30
Figure 14 - Principaux composants de la lignine et leur association en polymère.	30
Figure 15 - Parts moyennes des fourrages et des aliments concentrés consommées en France par les bovins des élevages producteurs de lait et viande et producteurs de viande	33
Figure 16 - Microorganismes fibrolytiques du rumen observés en microscopie électronique à balayage.	35
Figure 17 - Exemples de modularité de cellulases.	40
Figure 18 - Diversité de structures des glycoside hydrolases.	42
Figure 19 - Topologies du site actif des glycoside hydrolases.	43
Figure 20 – Structure canonique des carbohydrate estérases : type hydrolase α/β	44
Figure 21 - Activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de la cellulose	46
Figure 22 - Activités enzymatiques nécessaires à la dégradation complète des xylanes.	50
Figure 23 – Structure de 6 polysaccharidases cellulosomales de <i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1 et leur association en cellulosome.	54
Figure 24 – Modèle du système Xus de <i>Prevotella bryantii</i> B ₁₄	55

Figure 25 - Occurrences des familles de GH impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes chez les bactéries <i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A, <i>Prevotella ruminicola</i> 23, <i>Ruminococcus albus</i> 7 et <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85.	58
Figure 26 - Occurrences des familles de GH impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes chez <i>Orpinomyces</i> sp. C1A.	60
Figure 27 – Les différents modes d’action proposés des probiotiques.	72
Figure 28 – Principe des biopuces ADN.	85
Figure 29 - Schéma de la stratégie GoArrays comparée à celle utilisée classiquement pour la détermination de sondes oligonucléotidiques	90
Figure 30 – Chronologie de la mise en place de l’approche de biopuce ADN fonctionnelle .	95
Figure 31 – Principe des alignements itératifs utilisés pour la détermination des sondes de capture.	104
Figure 32 – Procédure simplifiée pour l’enrichissement en ARNm à partir d’ARN totaux de contenu ruminal.	105
Figure 33 – Profils de Bioanalyzer Agilent de l’échantillon d’ARN total de départ et du même échantillon ayant subi toute la procédure d’enrichissement sans capture des ARNr (contrôle).	112
Figure 34 – Profils de Bioanalyzer Agilent des ARN enrichis avec le kit MicroExpress et la méthode d’enrichissement développée.	112
Figure 35 – Familles d’enzymes ciblées par la biopuce ADN et activités enzymatiques associées, impliquées dans la dégradation des xylanes et de la cellulose.	123
Figure 36 - Stratégie de détermination des sondes oligonucléotides pour la biopuce ADN fonctionnelle.	125
Figure 37 – Expression différentielle des gènes de <i>Fibrobacter succinogenes</i> S85 en condition de culture « paille de blé » versus « cellobiose ».	146
Figure 38 – Conditions testées pour l’hybridation d’ARN issus de contenu ruminal.	148
Figure 39 - Conditions testées pour les hybridations à 55 et 60°C.	150
Figure 40 – Courbes de raréfaction obtenues avec les séquences de bactéries pour chacun des 16 échantillons.	180
Figure 41 – Répartition des séquences assignées au niveau du phylum pour chaque échantillon.	181
Figure 42 – Pourcentage de séquences assignées à un taxon en fonction de différents niveaux taxonomiques.	182
Figure 43 - Courbes de raréfaction obtenues avec les séquences d’archées pour chacun des 16 échantillons.	184
Figure 44 – Répartition taxonomique des archées.	185

Figure 45 – Analyse en composantes principales des séquences de bactéries des 16 échantillons ruminiaux analysés.....	187
Figure 46 - Répartition des gènes exprimés détectés comme étant exprimés avec les sondes 25 mers à partir d'ARN de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement.....	191
Figure 47 – Nombre de gènes de bactéries exprimés détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays à partir de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement.....	192
Figure 48 – Nombre de gènes de champignons détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays à partir de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement.....	193
Figure 49 – Nombre de gènes de protozoaires détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays à partir de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement.....	193
Figure 50 – Répartition des valeurs de SNR des gènes détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays.....	194

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Caractéristiques physico-chimiques du rumen.....	10
Tableau 2 - Composition approximative de la paroi végétale des graminées (plantes monocotylédones) et des plantes dicotylédones, en % de la matière sèche.	32
Tableau 3 - Microorganismes ruminiaux fibrolytiques et leur activité enzymatique	36
Tableau 4 - Principales enzymes impliquées dans l’hydrolyse des parois végétales.....	39
Tableau 5 - Classes d’enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux selon la base de données CAZy	41
Tableau 6 - Familles de glycoside hydrolases comportant des cellulases et des xylanases....	42
Tableau 7 - Souches microbiennes fibrolytiques, ruminales et coliques, séquencées et occurrence des gènes codant des glycoside hydrolases (GH) et des carbohydate estérases (CE) identifiés dans leur génome.....	57
Tableau 8 - Familles de GH identifiées dans les métagénomomes de rumen de vaches, renne et yak	63
Tableau 9 – Facteurs biotiques et abiotiques influençant la structure des microbiotes digestifs et leur activité fibrolytique	67
Tableau 10 – Effets zootechniques visés lors d’une supplémentation en probiotiques en production bovine.....	71
Tableau 11 – Quantité ajoutée pour chacune des sondes déterminées.....	105
Tableau 12 – Amorces utilisées pour la PCR et la RT-PCR quantitative.	107
Tableau 13 – Quantité et qualité des ADN et des ARN obtenus pour chaque duplicat d'extraction en fonction des conditions de lyse.	109
Tableau 14 – Nombre de séquences utilisées pour construire la base de séquences dédiée à l’écosystème ruminal et nombre de genres ciblés.....	110
Tableau 15 – Séquences des sondes de soustraction, ciblant l’ADNr 16S et 23S des bactéries et des archées, et l’ADNr 18S et 28S des champignons et des protozoaires.	111
Tableau 16 – Quantification du nombre de copies d’ADNr avant et après enrichissement en ARNm évaluée par RT-qPCR et pourcentage d’élimination des ARNr observée dans les fractions d’ARN enrichies en ARNm comparée aux ARN totaux.....	113
Tableau 17 – Gènes ciblés et amorces utilisées pour leurs amplifications par PCR dans le cadre de la validation de la biopuce ADN fibrolytique.....	128
Tableau 18 – Amorces utilisées pour la rétrotranscription et l’amplification par PCR réalisées sur des ARN de contenu ruminal afin de vérifier la spécificité de sondes ciblant le gène codant une GH11 de <i>Piromyces communis</i> (AAG18439).....	135

Tableau 19 - Nombre de sondes déterminées pour chaque famille d'enzymes portée par les microorganismes sélectionnés.....	136
Tableau 20 – Comparaison des séquences clonées du gène cel48 de <i>Piromyces sp.</i> M4 et des sondes déterminées pour cibler ce gène.	138
Tableau 21 – Nombre de sondes 25 mers et GoArrays détectées positives après hybridation des produits de PCR et SNR associé du gène cible.....	139
Tableau 22 – SNR des sondes 25 mers et des sondes GoArrays ciblant le gène GH48 <i>Piromyces sp.</i> M4.....	140
Tableau 23 –Nombre de gènes détectés, d'hybridations croisées observés après hybridation des ADNg de 4 souches bactériennes.....	142
Tableau 24 – SNR des gènes détectés avec les sondes 25 mers ou les sondes GoArrays après hybridations des ADNg de 3 souches fibrolytiques.	144
Tableau 25 – SNR des gènes détectés simultanément par les sondes 25 mers et les sondes GoArrays en condition « paille de blé ».....	145
Tableau 26 – Nombre de gènes détectés et nombre de faux positifs détectés avec les sondes 25 mers et les sondes GoArrays, aux trois températures d'hybridation testées.	151
Tableau 27 – Nombre de gènes ou de groupe de gènes détectés en fonction de la quantité d'ARN de contenu ruminal hybridé et du seuil de SNR appliqué.	152
Tableau 28 – Protéines des gènes induits ($\log_2 \text{ratio} > 2$) ou réprimés ($\log_2 \text{ratio} < 2$) en condition « paille de blé » comparée à la condition « cellobiose ».....	161
Tableau 29 - Plan expérimental et allocation des régimes alimentaires	170
Tableau 30 – Formulation et composition chimique des régimes alimentaires expérimentaux.. ..	171
Tableau 31 - Amorces utilisées pour la PCR quantitative	173
Tableau 32 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures (A ou B) ou d'huile de cameline (CO) sur les paramètres fermentaires et la digestibilité totale de la ration.	178
Tableau 33 - Effets de la supplémentation de deux souches de levures (A ou B) ou d'huile de cameline (CO) sur les émissions de méthane et de dioxyde de carbone entériques.	179
Tableau 34 – Abondance relative (% des séquences totales) des 10 genres les plus abondants classés par ordre décroissant.	183
Tableau 35 – Abondance relative (% des séquences totales) des genres non classés présentant une abondance supérieure à 0,9%.	183
Tableau 36 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures (A ou B) ou d'huile de cameline (CO) sur l'abondance des grands groupes microbiens ruminiaux (exprimée en log copies/ μg d'ADN) et de bactéries fibrolytiques, déterminée par PCR quantitative.	186
Tableau 37 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures ou d'huile de cameline sur la diversité des bactéries.....	186

Tableau 38 – Effets des traitements sur l’abondance des bactéries à différents niveaux taxonomiques.	189
Tableau 39 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures ou d’huile de cameline sur la diversité des archées.	188
Tableau 40 – Nombre de gènes exprimés détectés avec les sondes GoArrays et les sondes 25 mers et nombre de gènes ciblés par la biopuce pour chaque famille ciblée.	190
Tableau 41 – Gènes exprimés détectés avec les SNR les plus élevés.	195
Tableau 42 – Gènes de <i>Fibrobacter succinogenes</i> , <i>Ruminococcus flavefaciens</i> et <i>R. albus</i> détectés comme étant exprimés avec le biopuce ADN.	196

LISTE DES ABREVIATIONS

ADF	Acid Detergent Fibre
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNg	Acide DésoxyriboNucléique génomique
ADNr	Acide DésoxyriboNucléique ribosomique
AGV	Acide Gras Volatil
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomique
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CARD-FISH	CATalyzed Reporter Deposition-FISH
CAZy	Carbohydrate Active enZyme
CBM	Carbohydrate Binding Module
cds	CoDing Sequences
CE	Carbohydrate Esterase
DEPC	DiEthyl PiroCarbonate
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
EC	Enzyme Commission
ECF	ExtraCytoplasmic Function
EHEC	EnteroHemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EST	Expressed Sequence Tags
FGA	Functional Gene Array
FISH	Fluorescent <i>In situ</i> Hybridisation
GH	Glycoside Hydrolase
HG	HomoGalacturonane
HTCS	Hybrid Two-Component System
Ig-like	ImmunoGlobulin-like
ITS	Internal Transcribed Spacer
LA	Acide linoléique
LNA	Acide linolénique
LPMO	Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenase
MAR-FISH	Micro-AutoRadiographie-FISH
MS	Matière Sèche
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDF	Neutral Detergent Fibre
OTU	Operational Taxonomic Unit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PL	Pectine Lyase
POA	Phylogenetic Oligonucleotide Array
PUL	Polysaccharide Utilization Loci
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RCC	Rumen Cluster C
RDP	Ribosomal Database Program

RG	RhamnoGalacturonane
RIN	RNA Integrity Number
RNA-Seq	RNA sequencing
RT-qPCR	Reverse Tanscription - quantitative Polymerase Chain Reaction
SLH	Surface Layer Homology
SNR	Signal-to-Noise Ratio
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
STEC	Shiga Toxin-producing <i>Escherichia coli</i>
Sus	Starch utilization system
T-RFLP	Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
XGA	XyloGAlacturonane
Xus	Xylan utilization system

AVANT-PROPOS

Le tube digestif des Mammifères est colonisé par une communauté complexe et diversifiée de microorganismes symbiotiques, pour la plupart anaérobies stricts, que l'on regroupe sous le terme de « microbiote digestif ». Le rôle important du microbiote digestif dans la santé et la nutrition de son hôte est de mieux en mieux compris et conduit aujourd'hui à le considérer comme un organe à part entière.

L'une des fonctions principales des microbiotes digestifs est la dégradation et la fermentation des fibres végétales issues de l'alimentation. En effet, ces fibres, essentiellement constituées de polysaccharides végétaux (cellulose, hémicellulose, amidon résistant...), ne peuvent être dégradées par les enzymes digestives de l'hôte. La fonction de fibrolyse est ainsi principalement assurée dans le colon chez l'homme et l'animal monogastrique, et dans le rumen chez l'animal polygastrique. La dégradation des fibres végétales fait intervenir plusieurs groupes microbiens organisés en une chaîne trophique dont le premier maillon est constitué par une communauté de microorganismes clés, capables de produire un vaste répertoire d'enzymes qui agissent en synergie et réduisent la complexité des polysaccharides végétaux. La fermentation des oses libérés, assurée par les microorganismes fibrolytiques ou non, conduit à la production de gaz (H_2 , CO_2 et CH_4), et d'acides gras volatils qui représentent une source d'énergie pour l'hôte. D'un point de vue zootechnique, la fibrolyse permet d'optimiser l'utilisation de la ration alimentaire chez l'animal monogastrique non herbivore, et elle est primordiale chez les herbivores dont près de 70% de l'énergie est apportée grâce à ce processus. La compréhension du mécanisme de dégradation et de fermentation des fibres végétales au sein du microbiote digestif représente donc un intérêt certain en situation d'élevage. L'Unité UR 454 de Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand/Theix étudie depuis de nombreuses années les communautés fibrolytiques du rumen des ruminants d'élevage et du colon de l'homme, en particulier la physiologie des microorganismes fibrolytiques, leurs interactions avec d'autres communautés fonctionnelles au sein du microbiote et l'équipement enzymatique dont ils disposent pour dégrader les fibres végétales. Elle a par ailleurs développé un partenariat depuis plus de 20 ans avec la société Lallemand Animal Nutrition, qui produit et commercialise des levures probiotiques en nutrition animale. Ces deux entités collaborent en particulier à mieux comprendre l'effet de différents facteurs, biotiques (probiotiques...) ou abiotiques (alimentation...), sur la structure des microbiotes digestifs d'animaux d'élevage ainsi que leur activité, en particulier fibrolytique.

Chez le ruminant, des additifs alimentaires tels que les levures probiotiques exercent des effets bénéfiques sur la dégradation des parois végétales *in vivo* ainsi que sur l'abondance de certaines espèces bactériennes et fongiques. Cependant, du fait de la grande complexité

structurale et fonctionnelle des communautés microbiennes fibrolytiques, les mécanismes qui sous-tendent ces effets positifs, ainsi que les étapes limitant la dégradation des fibres dans l'écosystème sont encore mal connus. Les biopuces ADN fonctionnelles, outils moléculaires haut-débit ciblant les fonctions microbiennes, ont trouvé de nombreuses applications en écologie microbienne du fait de leur simplicité d'utilisation, de la rapidité d'acquisition de données pour un grand nombre d'échantillons et de leur facilité d'interprétation. Le groupe de recherche du Pr. Pierre Peyret (CIDAM, EA 4678, Université d'Auvergne) développe des logiciels de conception de sondes pour biopuces (PhylArray, PhylGrid2.0, GoArrays, HiSpOD, KASpOD, MetaExploArrays, P-MetaStackPrt) dédiées aux écosystèmes environnementaux, des bases de données de sondes (PhylOPDb) et des biopuces ADN fonctionnelles (DechloArray) ou phylogénétiques (HuGChip) qui ont montré leur intérêt et leur efficacité. Aussi, afin d'étudier l'activité fibrolytique du microbiote digestif de l'animal (monogastrique et polygastrique) soumis à différentes conditions nutritionnelles ou physiologiques, une approche biopuce ADN ciblant spécifiquement les gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides végétaux (cellulose et xylanes) a été mise en place au cours de ce travail de thèse. Une attention particulière a été portée à toutes les étapes intervenant dans cette approche de métatranscriptomique (de la préparation des échantillons à la validation de l'outil). Pour ceci, des échantillons de contenu de rumen issus d'une expérimentation animale bovine ont été utilisés pour la mise au point de toutes les étapes. Afin d'étudier l'influence des additifs alimentaires utilisés dans cette expérimentation sur le microbiote ruminal, une étude structurale par séquençage d'amplicons a également été réalisée.

Afin de présenter le contexte scientifique de ce travail, une synthèse bibliographique découpée en cinq parties, précède les résultats expérimentaux. Bien que la biopuce ADN développée cible simultanément les gènes de microorganismes fibrolytiques de l'animal monogastrique (porc) et de l'animal polygastrique (bovins), nous nous sommes focalisés dans ce manuscrit essentiellement sur le microbiote ruminal et sa fonction de fibrolyse. Ainsi, la partie 1 débute par un bref rappel de l'anatomie du tube digestif et de la digestion des bovins. La composition et la diversité du microbiote ruminal, et les diverses fonctions qu'il assure pour son hôte sont ensuite traités. La deuxième partie porte sur les différents composants des fibres végétales entrant dans l'alimentation des bovins d'élevage et leur digestibilité. Dans la partie 3, la diversité des microorganismes fibrolytiques du rumen est rapidement abordée pour se consacrer aux enzymes nécessaires à la dégradation des fibres végétales. Les capacités

métaboliques des microorganismes fibrolytiques, appréhendées par des approches de génomique et de transcriptomique, sont développées et un point rapide sur les mécanismes de régulation des gènes codant les enzymes de fibrolyse est réalisé. La partie 4 est dédiée à l'effet de facteurs biotiques et abiotiques sur la structure et l'activité fibrolytique du microbiote ruminal, où le régime alimentaire et l'apport de levures probiotiques sont traités en temps qu'exemples détaillés. Enfin, la partie 5 récapitule succinctement les différentes approches utilisées en écologie digestive pour étudier la structure et la fonction des microbiotes digestifs, avec une emphase particulière sur les approches moléculaires haut-débit et les biopuces ADN.

A la suite de cette revue bibliographique, les principaux objectifs de thèse sont présentés. Les résultats expérimentaux sont ensuite abordés sous la forme de trois chapitres. Le premier chapitre est dédié à la préparation des échantillons d'ARN, étape clé des études de métatranscriptomique. Ce chapitre aborde une optimisation de la co-extraction d'ADN et d'ARN à partir de contenus ruminiaux, et du développement d'une méthode efficace d'enrichissement en ARNm dédiée à ces échantillons. Le deuxième chapitre est consacré aux phases de conception et de validation de la biopuce ADN fonctionnelle. Enfin, une partie de mon travail s'est inscrite dans le contexte d'une expérimentation animale au cours de laquelle l'effet d'additifs alimentaires (huile de cameline et levures probiotiques) sur la structure du microbiote ruminal ainsi que l'application de la biopuce ADN à des échantillons d'ARN complexes issus de contenus ruminiaux ont été évalués, ce qui fait l'objet du dernier chapitre de ce manuscrit.

Une conclusion générale synthétisant les différents points abordés et la présentation des perspectives de recherche, et enfin une publication à laquelle je suis associée et actuellement en révision dans *Journal of Dairy Science* ainsi qu'une liste de communications, viennent clore ce mémoire.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I

LE MICROBIOTE DIGESTIF DU RUMEN DES BOVINS : DIVERSITE ET FONCTION

I.1. TRACTUS GASTRO-INTESTINAL ET DIGESTION DES BOVINS

Le tube digestif des bovins est caractérisé par la présence de trois pré-estomacs non-sécrétoires (successivement le rumen, le réticulum et l'omasum) en amont d'un estomac sécrétoire (l'abomasum) comparable à l'estomac des monogastriques (Figure 1).

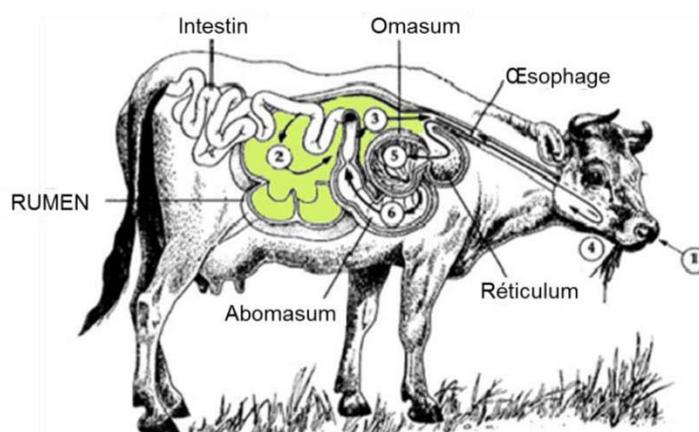


Figure 1 - Tube digestif des bovins.

Le transit des digesta est signalé par des flèches numérotées.

Le compartiment ruminal est coloré en vert.

Crédit : <http://www.afblum.be/bioafb/phystube/phystube.htm>

Parmi ceux-ci, le rumen est de loin le plus volumineux. Il représente 60 à 70% du volume du tube digestif et peut atteindre 150 litres chez le bovin adulte. Il permet ainsi le stockage d'une grande quantité d'aliments ingérés par l'animal tout au long de la journée. Le réticulum largement ouvert sur le rumen sert de tamis en empêchant le passage des grosses particules vers l'omasum. Ainsi, les particules indigestibles séjournent entre 25 et 60 h dans le rumen et ne seront évacuées que lorsque leur taille atteindra quelques millimètres. Leur réduction en particules fines est assurée au cours des ruminations méryciques grâce à leur remastication et leur brassage réguliers (Rémond *et al.*, 1995). Durant leur séjour, les polymères végétaux sont également fermentés par une communauté complexe de microorganismes symbiotiques qui assurent leur conversion en monomères puis acides gras volatils (AGV) rapidement absorbés

par la muqueuse ruminale (Jouany *et al.*, 1995). Cette activité fermentaire s'accompagne de la production de plus de 1000 litres de gaz par jour comprenant 65% de CO₂, 27% de CH₄, 7% de N₂ et moins de 1% de O₂, H₂ et H₂S (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Le contenu du rumen s'organise ainsi en trois phases : une phase liquide en partie ventrale contenant des particules fines et imbibées en suspension, une phase gazeuse en partie dorsale régulièrement vidangée par éructation et une phase intermédiaire solide dans laquelle les particules les plus grosses s'accumulent (Rémond *et al.*, 1995). Les particules les plus petites sont évacuées vers l'omasum dans lequel les fermentations seront en partie poursuivies, et où les AGV ayant échappé à l'absorption dans le rumen, et une partie de l'eau et des sels minéraux seront absorbés (Deswysen *et al.*, 1995). La digestion proprement dite est réalisée dans l'abomasum en présence des enzymes digestives de l'hôte et de sécrétions acides (Toullec et Lallès, 1995). Les digesta sont ensuite dirigés vers l'intestin comprenant l'intestin grêle, le cæcum et le colon spiralé. La digestion y est poursuivie et l'eau et les nutriments disponibles sont absorbés (Toullec et Lallès, 1995 ; Tisserand et Demarquilly, 1995). Comme le rumen, cæcum et colon sont le siège de fermentations microbiennes. Cependant, chez le ruminant, le rôle des microorganismes intestinaux est considéré comme mineur étant donné que le rumen assure 80 à 90% des capacités fermentaires du tube digestif (Tisserand et Demarquilly, 1995).

I.2. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU RUMEN

Le rumen est caractérisé par des conditions physico-chimiques constantes. On note en particulier un potentiel d'oxydo-réduction très négatif reflétant une atmosphère anaérobie, un pH proche de la neutralité, et une température constante (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007) (Tableau 1).

Tableau 1 – Caractéristiques physico-chimiques du rumen.

Paramètres physico-chimiques	
pH	5,7-7,3
Potentiel d'oxydoréduction	-0,35 V
Température	38-41°C

Ces conditions sont favorables au développement et à l'établissement d'une communauté complexe et diversifiée de microorganismes anaérobies stricts. Le microbiote ruminal est ainsi constitué de procaryotes (bactéries et archées) et d'eucaryotes (champignons et protozoaires). Ces microorganismes ont suscité et suscitent encore un intérêt particulier du fait

de leur rôle majeur dans la digestion et la nutrition, mais aussi dans le développement et le maintien de la santé de leur hôte.

I.3. DIVERSITE DU MICROBIOTE DIGESTIF RUMINAL

A la naissance, le tube digestif des ruminants est stérile. Néanmoins, il est rapidement colonisé par une communauté abondante et diversifiée de microorganismes. Les premiers colonisateurs sont des bactéries aérobies et anaérobies facultatives, issues de l'environnement et de la mère, rapidement supplantés par des microorganismes anaérobies qui s'installent selon une séquence bien déterminée pour constituer le microbiote de l'adulte (Fonty *et al.*, 1987, 1988). Les méthodes culturales ont permis dans un premier temps de considérablement progresser dans la connaissance de la diversité des microbiotes digestifs. Cependant, le développement et l'amélioration constante des méthodes moléculaires permettent aujourd'hui de prendre en compte la diversité des microorganismes non cultivables. Aussi, les données présentées ci-après sont essentiellement issues de travaux d'écologie moléculaire.

I.3.1. LES BACTERIES

Les bactéries constituent la communauté microbienne la plus abondante dans le rumen. Elles sont généralement retrouvées à 10^{11} cellules/mL de contenu et représentent environ 40% de la biomasse microbienne (Fonty *et al.*, 1995). Elles sont essentielles à la nutrition de leur hôte qui ne peut survivre en leur absence (Baldwin et Allison, 1983). Les bactéries occupent différentes niches écologiques du rumen (Edwards *et al.*, 2008) au sein desquelles leur diversité varie (Sadet *et al.*, 2007 ; de Menezes *et al.*, 2011). Il est estimé que 1/4 d'entre elles sont libres dans la phase liquide et 3/4 sont attachées aux particules alimentaires (Forsberg et Lam, 1977 ; Craig *et al.*, 1987). Une faible proportion, de l'ordre de 1%, est attachée à l'épithélium ruminal (Mueller *et al.*, 1984). La communauté bactérienne ruminale se caractérise par une extrême diversité. Une méta-analyse réalisée sur l'ensemble des séquences déposées dans la base de données RDP (Cole *et al.*, 2009) et issues d'études taxonomiques sur le microbiote ruminal met en évidence que les bactéries ruminales ont été affiliées à 19 phyla différents (Kim *et al.*, 2011) (Figure 2). Les études de métagénomique et de séquençage haut débit de l'ADNr 16S ont évalué la diversité ruminale individuelle entre 200 (Pinloche *et al.*, 2013 ; Jami et Mizrahi, 2012) et 2000 OTUs (Fouts *et al.*, 2012 ; Jami et Mizrahi, 2012b)

mais le nombre d'OTUs identifiés sur l'ensemble des échantillons de l'expérimentation peut atteindre 500 à 1000 (Pitta *et al.*, 2010 ; Hess *et al.*, 2011 ; Kittelmann *et al.*, 2013), 4000 à 5000 (Fouts *et al.*, 2012 ; Jami et Mizrahi, 2012b ; Li *et al.*, 2012) voire 14000 (de Menezes *et al.*, 2011).

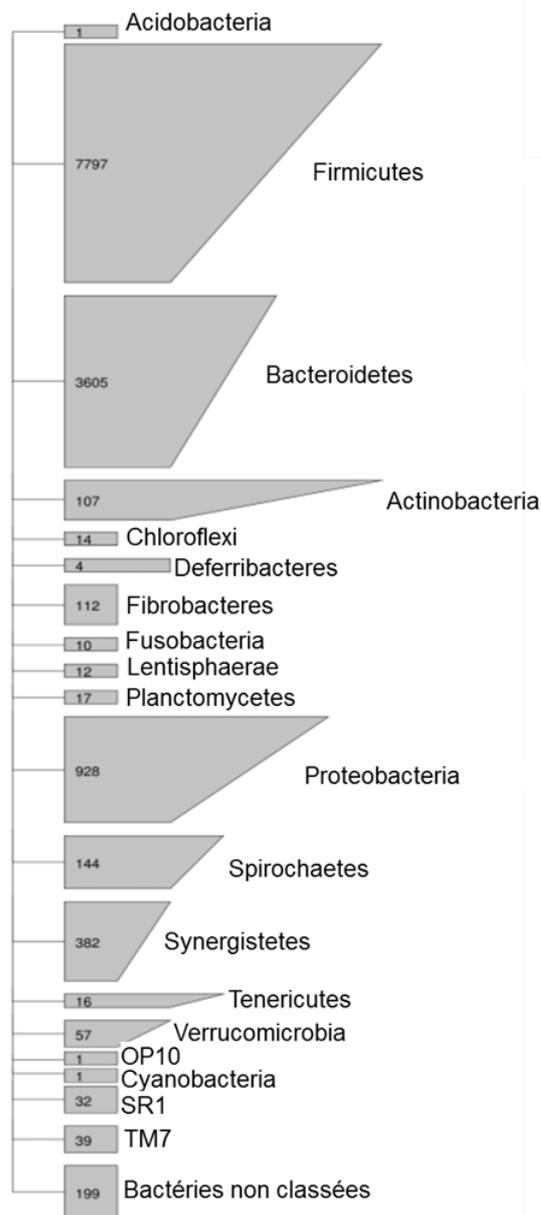


Figure 2 – Arbre phylogénétique des 19 phyla bactériens du rumen (Kim *et al.*, 2011). L'arbre a été construit à partir de l'ensemble des séquences du gène de l'ADNr 16S déposées dans les bases de données et provenant du rumen. Le nombre de séquences utilisées est indiqué dans les rectangles et les parallélogrammes. Les séquences dans les rectangles ont toutes été affiliées au même rang taxonomique tandis que les séquences dans les parallélogrammes ont été affiliées à différents rangs taxonomiques.

Dans l'ensemble des études, les phyla majoritaires sont les Firmicutes et les Bacteroidetes, et représentent à eux seuls jusqu'à 90% de la communauté bactérienne. Dans une moindre mesure, d'autres phyla apparaissent prépondérants : les Proteobacteria, les Actinobacteria, les Synergistetes et les Fibrobacteres mais ceux-ci sont retrouvés dans des proportions inférieures à 5%. Si l'on se place au niveau de la famille, les *Prevotellaceae*, les *Lachnospiraceae*, les *Veillonellaceae*, les *Succinivibrionaceae* et les *Ruminococcaceae* sont prédominants. Une cinquantaine de genres (Fouts *et al.*, 2012 ; Pinloche *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2012) sont généralement détectés, parmi lesquels relativement peu sont présents à plus de 1% de la population bactérienne totale (Pinloche *et al.*, 2013). Les genres prédominants sont *Prevotella* (phylum des Bacteroidetes), de loin le plus abondant (entre 20 et 30% des séquences), *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Succinivibrionaceae*, *Selenomonas* (phylum des Firmicutes), *Fibrobacter* (phylum des Fibrobacteres), *Treponema* (phylum des Spirochaetes) et *Succinivibrio* (phylum des Proteobacteria). La diversité des bactéries est essentiellement affectée chez l'adulte par des facteurs abiotiques comme la nature de la ration (Voir Partie IV de cette synthèse bibliographique) mais il est important de noter que des variations interindividuelles ont été observées chez des animaux recevant une même ration (Welkie *et al.*, 2010 ; Brulc *et al.*, 2009 ; Jami et Mizrahi, 2012b). Ceci avait été auparavant observé chez l'homme (Tap *et al.*, 2009). Pour exemple, Jami et Mizrahi (2012a) ont montré que l'abondance du phylum des Bacteroidetes oscillait entre 26 et 70% des séquences totales, malgré un traitement identique de tous les échantillons. Par ailleurs, ils n'ont observé que 51% de similarité entre les 16 échantillons étudiés, en ne tenant compte que de la présence/absence des OTUs identifiés. La similarité des échantillons atteignait toutefois 82% lorsque la position phylogénétique des OTUs a été prise en compte, ce qui indique que même si les espèces bactériennes diffèrent entre individus, elles sont relativement proches phylogénétiquement. Les auteurs suggèrent ainsi qu'il existerait un « core microbiome », ici constitué de 32 genres, composé de taxa communs à tous les animaux et qui pourraient remplir des fonctions essentielles au bon fonctionnement du rumen ou occuper une niche écologique spécifique au sein du rumen. Néanmoins, dans cette étude, les animaux ont tous reçu la même ration et la définition du « core microbiome » serait plus adéquate pour des animaux différant dans leur alimentation (Li *et al.*, 2012) ou dans les conditions physico-chimiques du milieu ruminal (Pinloche *et al.*, 2013). La connaissance de la structure de la communauté bactérienne ruminale est d'un intérêt particulier en production animale car elle pourrait avoir un impact direct sur l'efficacité alimentaire de leur hôte. En effet, une analyse DGGE des bactéries de la phase liquide a montré que les empreintes moléculaires obtenues

pour des animaux à haute efficacité alimentaire et des animaux à faible efficacité alimentaire pouvaient être clairement séparés quelle que soit la race, suggérant la présence de groupes bactériens spécifiques en lien avec les performances animales (Guan *et al.*, 2008). Les bactéries sont associées à différents métabolismes. Selon le substrat qu'elles utilisent, on distingue les bactéries fibrolytiques (cellulolytiques et hémicellulolytiques), amylolytiques, pectinolytiques, saccharolytiques, protéolytiques et lipolytiques. Une espèce peut présenter un large éventail de substrat comme être très spécialisée. Pour exemple, *Prevotella ruminicola* est capable de métaboliser les hémicelluloses, la pectine, l'amidon et les protéines et d'utiliser les produits de dégradation résultants tandis qu'*Anaerovibrio lipolytica* ne peut qu'hydrolyser les lipides et fermenter le glycérol et le lactate. D'une manière générale, les fonctions métaboliques ne sont pas corrélées avec la taxonomie des bactéries et sont bien souvent retrouvées chez plusieurs espèces ou genres. La redondance des fonctions assure sans doute une stabilité de l'écosystème en cas de perturbations (Edwards *et al.*, 2008).

I.3.2. LES ARCHEES

Les archées retrouvées dans les écosystèmes digestifs sont essentiellement anaérobies et méthanogènes. Les archées méthanogènes utilisent pour la plupart le H₂ et le formiate (parfois le méthanol) comme sources d'énergie pour réduire le CO₂ en CH₄. De ce fait, elles jouent un rôle majeur dans le bon fonctionnement des microbiotes digestifs (rumen et colon) en assurant l'élimination d'H₂, connu pour son effet inhibiteur sur les fermentations. Dans le rumen, les archées ont été dénombrées à 10⁸-10¹⁰ cellules/mL de contenu par méthodes culturales (Morvan *et al.*, 1996 ; Leedle et Greening, 1988) et représentent moins de 4% de la population microbienne ruminale (Kong *et al.*, 2010). Elles peuvent être libres dans la phase liquide, associées aux particules végétales ou à l'épithélium, ou fixées aux protozoaires en tant qu'ectosymbiontes ou endosymbiontes. Les méthodes culturales n'ont permis d'isoler que 8 espèces d'archées méthanogènes à partir de contenu de rumen. Toutefois, les études par séquençage de l'ADNr 16S montrent que la population archéenne ruminale est bien plus diverse avec la présence de séquences de près de 1000 espèces différentes dans les bases de données (Kim *et al.*, 2011a). Selon une méta-analyse réalisée à partir de 14 études de clonage-séquençage de l'ADNr 16S (Janssen et Kirs, 2008), les archées méthanogènes du rumen appartiennent majoritairement au phylum des *Euryarcheota* et sont pour une grande part affiliées à des espèces cultivées ou proches de celles-ci (Figure 3).

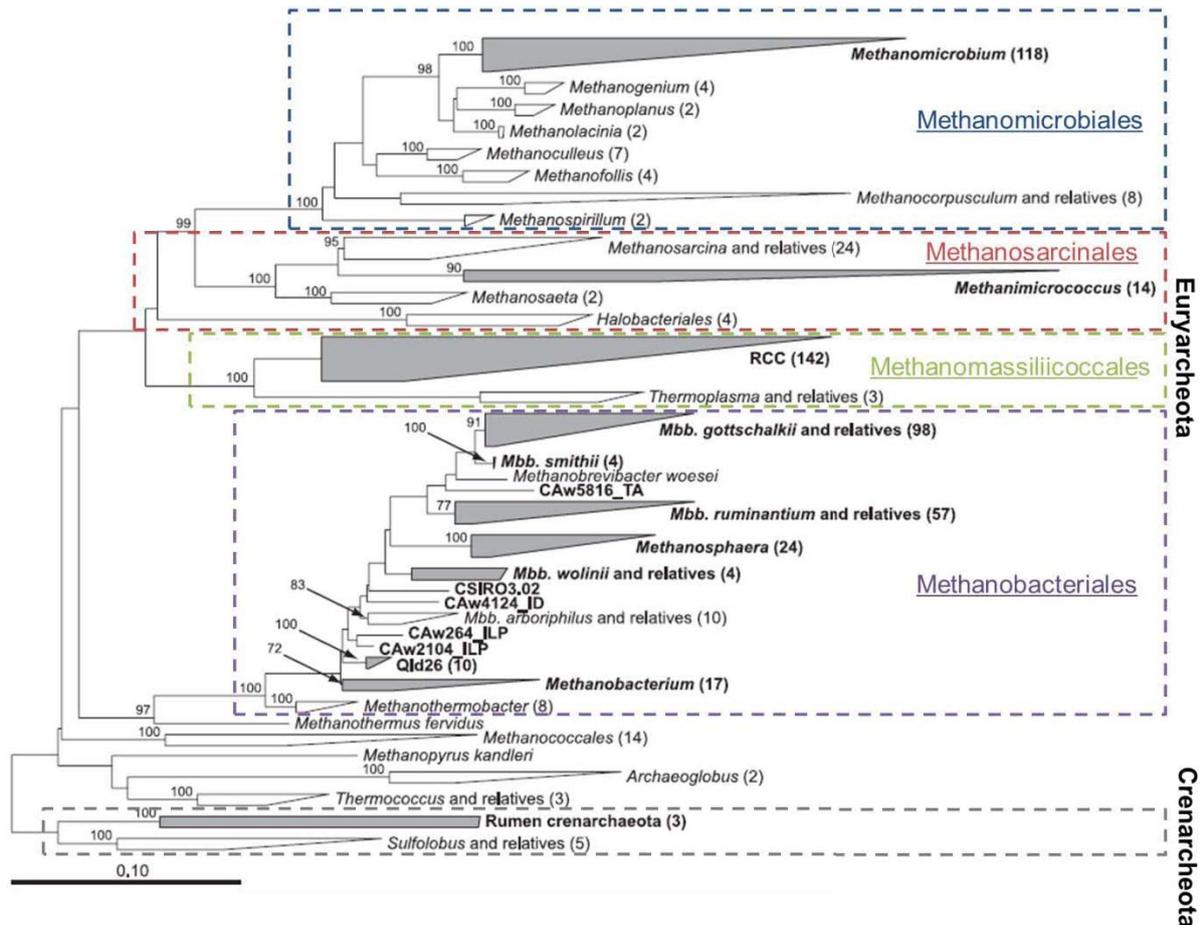


Figure 3 – Arbre phylogénétique des archées du rumen (Janssen et Kirs, 2008).

L'arbre a été construit avec les séquences du gène de l'ADNr16S provenant de 14 études. Le nombre de séquences utilisées est indiqué en parenthèses. Les classes soulignées contiennent les genres majoritaires. Mbb., *Methanobrevibacter*.

Ainsi, le genre *Methanobrevibacter* (62% des séquences), appartenant à l'ordre des Methanobacteriales, et le genre *Methanomicrobium* (15% des séquences), appartenant à l'ordre des Methanomicrobiales, sont les plus abondants. Le genre *Methanobrevibacter* est principalement représenté par le clade *M. gottschalkii* (défini par les espèces *M. gottschalkii*, *M. thaueri*, *M. millerae*) et le clade *M. ruminantium* (défini par les espèces *M. ruminantium* et *M. olleyae*). D'autres espèces comme *Methanobrevibacter smithii* et *M. wolinii*, et d'autres genres comme *Methanimicrococcus* (ordre des Methanosarcinales) et, *Methanosphaera* et *Methanobacterium* (ordre des Methanobacteriales) sont retrouvées plus rarement. Dans cette même étude, 16% des séquences ont été affiliées à un groupe d'archées non cultivées, proche des Thermoplasmatales, désigné Rumen Cluster C (RCC), récemment affilié au 7^{ème} ordre d'archées méthanogènes méthylophes, les Methanomassiliicoccales (Borrel *et al.*, 2013 ; Mihajlovski *et al.*, 2008). Par ailleurs d'autres groupes d'Archées non cultivées ont également été reportés : le groupe Qld26 (Janssen et Kirs, 2008) et le groupe des *Crenarchaeota* (Shin *et*

al., 2004 ; Skillman *et al.*, 2006), mais ceux-ci n'ont été retrouvés que dans peu d'études. Si dans la plupart des études le genre *Methanobrevibacter* est dominant, certaines ont mis en évidence que d'autres groupes pouvaient être dominants. Le groupe RCC a ainsi été retrouvé dominant chez des moutons au pâturage (Wright *et al.*, 2006), chez des vaches recevant une ration à base de pomme de terre (Wright *et al.*, 2007) et chez le Yak (Huang *et al.*, 2012) tandis que les *Methanomicrobiaceae* dominaient la population méthanogène de vache nourries au son de blé et concentré (Shin *et al.*, 2004).

I.3.3. LES PROTOZOAIRES

Les protozoaires sont retrouvés à 10^5 - 10^6 individus/ml par méthodes culturales (Dehority, 1984) et qPCR (Sylvester *et al.*, 2004), et peuvent représenter jusqu'à 50% de la biomasse ruminale. Ils sont prédateurs des bactéries et ainsi considérés comme des régulateurs de la population bactérienne et ont un rôle primordial dans le recyclage de l'azote des bactéries (Koenig *et al.*, 2000). Les protozoaires sont essentiellement ciliés mais on observe également la présence de flagellés. Les protozoaires flagellés constituent généralement une faible proportion de la population et de ce fait, ils n'ont été que très peu étudiés. Seulement 4 espèces ont été décrites (*Chilomastix sp.*, *Monocercomonas sp.*, *Pentatrichomonas sp.* et *Tetratrichomonas sp.*) et leur rôle n'est pas connu (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Les protozoaires ciliés présentent une taille variant de 20 à 150 μm qui permet facilement de réaliser leur observation et leur comptage sous un microscope. Ils sont divisés en deux groupes : les Entodiniomorphes et les Holotriches, et sont classés en plusieurs genres selon leur morphologie (Fonty *et al.*, 1995). Les Entodiniomorphes ruminiaux comprennent les genres *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium* et *Ophryoscolex*. Ils appartiennent à la famille des *Ophryoscoleicidae*. Les Holotriches, affiliés à la famille des *Isotrichidae*, sont principalement représentés par les genres *Dasytricha* et *Isotricha* (Williams et Coleman, 1992 ; Karnati *et al.*, 2003). D'une manière générale, les protozoaires ruminiaux sont dominés par le genre *Entodinium* qui a été retrouvé le plus abondant par microscopie (Sylvester *et al.*, 2004), T-RFLP (Tymensen *et al.*, 2012) et clonage-séquençage du gène de l'ARNr 18S (Kittelmann et Janssen, 2011). Il peut représenter plus de 90% des protozoaires totaux. Néanmoins, plusieurs types de communautés protozoales dominées par différents genres ont été observés en microscopie (Eadie, 1962) et récemment confirmés par séquençage haut débit d'amplicons de l'ADNr 18S (Kittelmann *et al.*, 2013). Des populations différentes ont également été trouvées

entre la phase liquide et la phase solide, suggérant des rôles spécifiques au sein du rumen (Shin *et al.*, 2004). Bien qu'ils ne soient pas essentiels aux ruminants (Eugène *et al.*, 2004), le rôle des protozoaires est primordial lorsque les animaux reçoivent des rations riches en substrats rapidement fermentescibles. Les Holotriches utilisent essentiellement les glucides solubles suivant un spectre différent selon les genres (Williams et Coleman, 1997) tandis que le genre *Dasytricha* et les Entodiniomorphes sont capables d'ingérer des grains d'amidon. En soustrayant aux bactéries les sucres solubles et l'amidon qu'ils métabolisent lentement, les protozoaires limitent les fermentations et retardent ainsi l'apparition du phénomène d'acidose. Les Entodiniomorphes ingèrent également les fragments végétaux et digèrent efficacement les glucides pariétaux qui les constituent. Les protozoaires, forts producteurs d'H₂, interagissent étroitement avec les archées méthanogènes.

I.3.4. LES CHAMPIGNONS

Découverts dans les années 1970 (Orpin, 1975), les champignons ruminiaux apparaissent singuliers au sein du règne des Fungi. En effet, ils sont anaérobies stricts et ont exclusivement été isolés du tractus gastro-intestinal de mammifères et de reptiles herbivores (Liggenstoffer *et al.*, 2010). Ils ne possèdent pas de mitochondries mais des hydrogénosomes d'origine mitochondriale et sont également caractérisés par un génome particulièrement riche en AT (Nicholson *et al.*, 2005). Ces champignons sont classés dans le récent phylum des *Neocallimastigomycota* qui comprend une unique classe, les *Neocallimastigomycetes*, et un unique ordre, les *Neocallimastigales* (Hibbett *et al.*, 2007). Six genres, principalement identifiés sur la base de critères morphologiques (morphologie du thalle et nombre de flagelles par zoospore), ont pu être isolés : *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* et *Piromyces*, et une vingtaine d'espèces ont été décrites (Griffith *et al.*, 2010). Ces champignons sont généralement retrouvés à 10³-10⁵ zoospores/mL par méthodes culturales (Joblin, 1981) et par qPCR (Lwin *et al.*, 2011), et pourraient représenter entre 8 et 20% de la biomasse microbienne ruminale (Orpin, 1981 ; Rezaeian *et al.*, 2004). Deux études métagénomiques par séquençage de la région ITS1 ont montré que les genres *Piromyces* et *Neocallimastix* sont les plus abondants chez les ruminants domestiques (Liggenstoffer *et al.*, 2010 ; Kittelmann *et al.*, 2013), ce qui est en accord avec les méthodes culturales. Ces travaux ont également mis en évidence de nouveaux clades (clades NG1 à NG8, Liggenstoffer *et al.*, 2010 ; clades SK1 à SK4, Kittelmann *et al.*, 2012) pouvant représenter jusqu'à 16% de la population fongique ruminale (Kittelmann *et al.*, 2012),

soulignant que la diversité de ces champignons a été largement sous-estimée par méthodes culturales. Les *Neocallimastigomycota* produisent une large gamme d'enzymes qui leur permettent de dépolymériser la cellulose et les hémicelluloses, et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés. Les métabolites terminaux générés par la fermentation des glucides sont généralement du formiate, de l'acétate, du lactate, du succinate, de l'éthanol, du CO₂ et de l'H₂ (Bauchop & Mountfort, 1981).

I.3.5. LES BACTERIOPHAGES

Les bactériophages sont estimés à 10⁹-10¹⁰ entités/mL de contenu de rumen (Klieve et Swain, 1993) et 26 types morphologiques ont été observés (Klieve et Bauchop, 1988). L'implication des bactériophages dans l'évolution des communautés bactériennes par facilitation du transfert horizontal de gènes et dans la régulation des populations bactériennes a conduit à des investigations plus approfondies du virome ruminal. Le métagénome viral du fluide ruminal (Berg Miller *et al.*, 2012) a ainsi permis l'identification de plus de 28000 génotypes viraux dont 78% sont inconnus. Les prophages seraient dominants vis-à-vis des phages lytiques.

Il est à noter que de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, discutés dans la Partie IV de cette synthèse bibliographique, sont responsables d'une modulation de la structure du microbiote.

I.4. FONCTIONS DU MICROBIOTE RUMINAL

I.4.1. ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA SANTE DE L'HOTE

Les microbiotes digestifs jouent un rôle essentiel dans le développement et la maturation du compartiment qui les héberge (Hooper, 2004). En particulier, le microbiote ruminal est impliqué dans le développement des parois et des vaisseaux sanguins du rumen ainsi que la maturation du système immunitaire associé à ce compartiment. Leur mode d'action est essentiellement lié au contact étroit des microorganismes avec la muqueuse et à la production de métabolites. Par ailleurs, le métabolisme des microbiotes conduit à la production de composés bénéfiques pour l'hôte, notamment les vitamines B et K (LeBlanc *et al.*, 2013), et à

la neutralisation de composés toxiques issus de l'alimentation (oxalate et mimosine des végétaux, mycotoxines) (Dominguez-Bello, 1996 ; Fonty *et al.*, 1995).

I.4.2. DEGRADATION ET FERMENTATION DES COMPOSES ALIMENTAIRES

I.4.2.1. Dégradation des protéines

Chez le ruminant, la dégradation des protéines alimentaires est uniquement microbienne puisqu'essentiellement réalisée dans le rumen. La protéolyse au niveau du rumen n'a pas vraiment de rôle dans la nutrition azotée de l'hôte car les composés azotés sont rapidement utilisés pour la synthèse bactérienne. Les protéines microbiennes dégradées dans les compartiments bas du tube digestif serviront par contre à la synthèse protéique de l'animal (Jouany *et al.*, 1995). Dans le rumen, les protéines solubles sont principalement dégradées par les bactéries tandis que les protéines insolubles sont surtout dégradées par les protozoaires. Ces derniers contribuent également au taux de renouvellement des protéines bactériennes par prédation (Bach *et al.*, 2005). D'une manière générale, 30 à 50% des bactéries isolées présentent une activité protéolytique (Prins *et al.*, 1983). Le processus de protéolyse est divisé en 3 phases successives: hydrolyse des protéines en peptides, dégradation des peptides et finalement désamination des acides aminés, pour aboutir à la formation d'ammoniaque et de squelettes carbonés (Bach *et al.*, 2005). Les différents produits de protéolyse sont essentiels à la nutrition des microbiotes digestifs. Pour exemple, les acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine et valine) sont des facteurs de croissance des bactéries cellulolytiques (Bryant et Robinson, 1961). L'ammoniaque est une source préférentielle d'azote de nombreux microorganismes ruminants (Jouany *et al.*, 1995).

I.4.2.2. Dégradation et hydrogénation des lipides

Dans le rumen, la lipolyse est assurée par des bactéries spécialisées, en particulier *Anaerovibrio lipolytica* et *Butyrivibrio fibrisolvens*, et conduit à la formation d'acides gras libres et de glycérol par hydrolyse de liaisons esters. Le rôle des protozoaires dans ce processus a été suggéré mais non confirmé (Lourenço *et al.*, 2010). Les acides gras polyinsaturés (acides linoléiques (LA) et linoléiques (LNA) principalement) ainsi formés, toxiques pour l'écosystème ruminal, sont rapidement biohydrogénés pour conduire à la formation d'acides gras saturés. Il est estimé qu'en moyenne 86% des LA et 87% des LNA

sont hydrogénés dans le rumen (Glasser *et al.*, 2008) mais ces moyennes peuvent être fortement diminuées lors de l'ingestion de rations riches en concentré (Doreau *et al.*, 2012). La biohydrogénation fait appel à plusieurs étapes successives d'isomérisation et d'hydrogénation des acides gras insaturés (Buccioni *et al.*, 2012) (Figure 4). Des souches de *Butyrivibrio hungatei*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio sp.* et de *Butyrivibrio proteoclasticus* sont impliquées dans ces processus. Certaines sont capables de produire de l'acide vaccénique, mono-insaturé, tandis que d'autres poursuivront la biohydrogénation jusqu'à l'acide stéarique, insaturé (Lourenço *et al.*, 2010). Les acides gras saturés issus des processus de biohydrogénation constituent l'essentiel de la matière grasse des carcasses et du lait des ruminants, et sont connus pour leur effet néfaste sur la santé humaine.

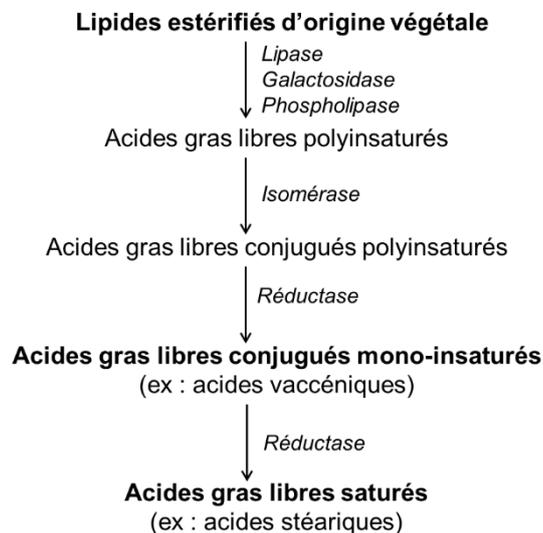


Figure 4 – Etapes clés de la transformation des lipides estérifiés d'origine végétale en acides gras partiellement saturés via la lipolyse et la biohydrogénation par les enzymes bactériennes ruminales (Buccioni *et al.*, 2012).

I.4.2.3. Dégradation des polymères végétaux

(i) Dégradation de l'amidon

Chez le bovin, l'amidon est entièrement dégradé dans le rumen par une communauté de microorganismes amylolytiques, composée de bactéries et de protozoaires (Fonty *et al.*, 1995). *Streptococcus bovis* et *Ruminobacter amylophilus* sont parmi les espèces bactériennes amylolytiques clés.

(ii) Dégradation des polymères pariétaux

Chez les Mammifères, les polysaccharides des parois végétales ne peuvent être dégradés par l'animal lui-même. Chez le bovin, ce sont les microorganismes présents dans le rumen, principalement, et le colon, très secondairement, qui sont responsables de cette activité. La dégradation des polysaccharides pariétaux est assurée par les microorganismes fibrolytiques. Cette communauté microbienne est caractérisée par sa capacité à produire de nombreuses enzymes capables d'hydrolyser les liaisons entre les différents constituants pariétaux et présentant des activités variées répondant à la diversité des polysaccharides pariétaux. Les polysaccharides pariétaux et les microorganismes fibrolytiques sont à l'origine d'une chaîne trophique faisant intervenir tous les groupes microbiens du rumen (Figure 5). Les oligosides et osides produits lors de l'hydrolyse des polysaccharides pariétaux sont en effet fermentés par les microorganismes fibrolytiques eux-mêmes mais aussi par les espèces non fibrolytiques (espèces glycolytiques) qui sont incapables de dégrader les polysaccharides mais qui se maintiennent grâce à l'utilisation de leurs produits d'hydrolyse. La croissance des espèces glycolytiques est ainsi étroitement liée à l'activité des espèces fibrolytiques et leurs caractéristiques physiologiques, la disponibilité en glucides libérés, ainsi que par la compétition pour le substrat entre ces différentes espèces.

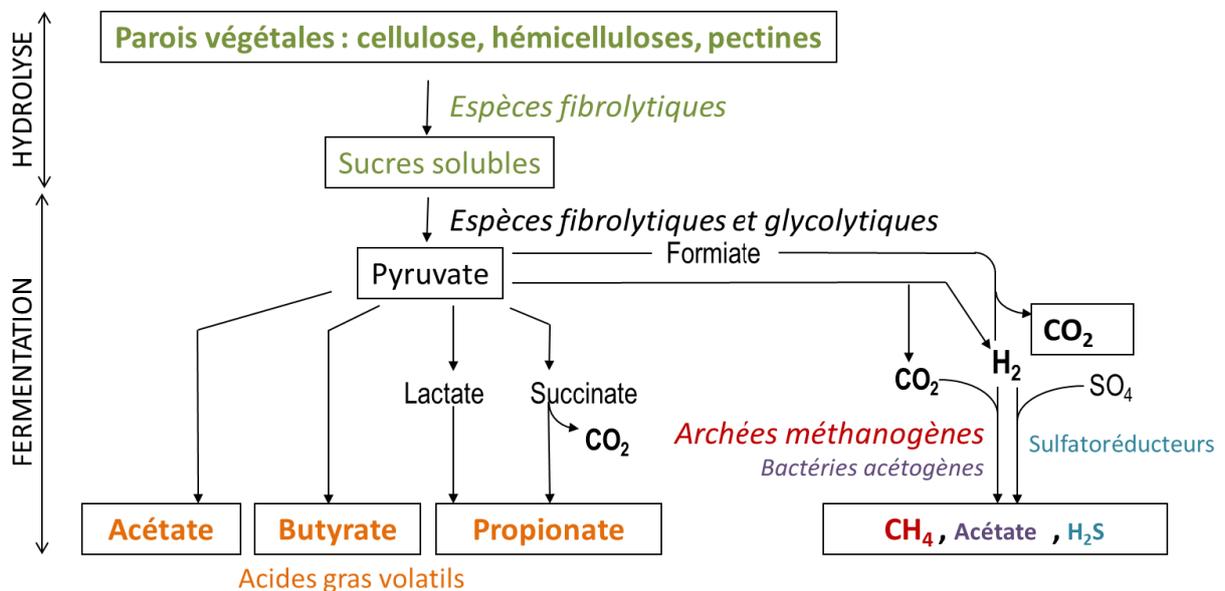


Figure 5 – Hydrolyse des polysaccharides pariétaux et fermentations microbiennes.

Au cours de la fermentation des oses, des métabolites intermédiaires comme le lactate, le formiate ou le succinate sont formés mais en conditions normales, ils ne s'accumulent pas

dans l'écosystème et sont rapidement utilisés par d'autres espèces. Ainsi, les produits terminaux de la fermentation des oses sont des acides gras volatils (AGV) et des gaz (hydrogène H₂ et dioxyde de carbone CO₂). L'hydrogène, métabolite gazeux majeur, est pour une grande part réutilisé *in situ* par la communauté hydrogénotrophe. Trois mécanismes hydrogénotrophes sont connus : l'acétogénèse réductrice, conduisant à la production d'acétate, source d'énergie pour les cellules eucaryotes ; la sulfato-réduction conduisant à la formation de sulfure d'hydrogène potentiellement toxique pour les cellules eucaryotes ; la méthanogénèse conduisant à la formation de méthane. La méthanogénèse est quasiment la seule voie de réutilisation de l'H₂ dans le rumen et conduit à une perte inéluctable d'énergie de l'ordre de 12% pour l'animal (Johnson et Johnson, 1995). Les AGV, rapidement absorbés par la muqueuse, contribuent à la fourniture d'énergie à l'animal et comblent jusqu'à 70% des besoins énergétiques des bovins (Bergman, 1990). Les microorganismes fibrolytiques, à l'origine de cette chaîne trophique, ont par conséquent un rôle majeur dans la digestion et la nutrition de l'animal.

Partie II

FIBRES VEGETALES ET ALIMENTATION DES BOVINS

Le terme « fibres végétales » regroupe d'une manière générale les polysaccharides des parois végétales, l'amidon résistant et certains oses et oligosides. Dans l'alimentation des bovins, les fibres végétales proviennent majoritairement de la paroi végétale des matières premières, ce pourquoi nous restreindrons cette définition aux polysaccharides pariétaux ou «fibres pariétales». Retrouvées en grande quantité dans l'alimentation des bovins, ces fibres constituent leur principale source d'énergie et sont par conséquent d'une grande importance nutritive.

II.1. STRUCTURE ET ORGANISATION DES PAROIS VEGETALES

La paroi qui enveloppe la membrane cytoplasmique des cellules végétales est une structure complexe et dynamique, propre aux végétaux. Elle assure un rôle essentiellement structural en garantissant la cohésion des cellules végétales (figure 6A) et en leur conférant une forme adaptée à leur fonction et une résistance à la pression osmotique intracellulaire indispensable au port de la plante (Burton *et al.*, 2010). La paroi végétale joue aussi un rôle de barrière physique vis-à-vis des pathogènes et peut être engagée dans la réponse de défense de la plante (Cantu *et al.*, 2008).

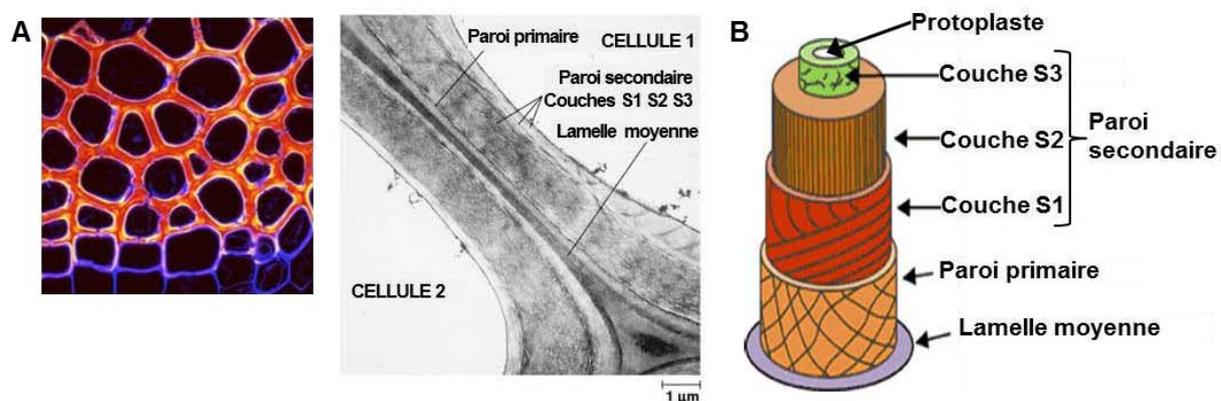


Figure 6 - Structure de la paroi végétale.

A : coupe transversale d'une racine observée au microscope confocal (gauche) (Crédits : Jim Haseloff, Cambridge University) ou au microscope photonique (droite) (Crédits : Pearson education),
B : structure schématisée de la paroi végétale.

La paroi des cellules végétales est composée d'un réseau complexe de polymères non glucidiques (protéines, lipides, lignine) et de polymères glucidiques (cellulose, hémicelluloses, pectines) représentant jusqu'à 90% de la paroi. La paroi est sécrétée par le protoplaste, à l'extérieur de la membrane cellulaire. Elle est constituée de plusieurs couches distinctes, synthétisées séquentiellement, la couche la plus extérieure étant la plus ancienne. La lamelle moyenne, riche en pectine, est synthétisée en premier puis deux structures, la paroi primaire et la paroi secondaire, sont produites (figure 6B) (Vogel, 2008 ; Burton *et al.*, 2010). La paroi primaire est synthétisée pendant la croissance de la cellule et est donc caractéristique des cellules jeunes. Elle est composée de fibres de cellulose, d'hémicelluloses et de pectines. La cohésion entre ces différents constituants pariétaux est assurée par de nombreuses liaisons, covalentes ou non (Fry, 2004 ; Hosmer *et al.*, 2009 ; Zhou *et al.*, 2010) dont la complexité n'est pas encore parfaitement élucidée. Au cours des années, plusieurs modèles ont été proposés (Cosgrove, 2001 ; Park et Cosgrove, 2012) et, aujourd'hui, le modèle le plus accepté comprend un échafaudage constitué d'un enchevêtrement de microfibrilles de cellulose peu ordonnées insérées dans une matrice lâche d'hémicelluloses et de pectines (Somerville *et al.*, 2004 ; Cosgrove, 2005 ; Doblin *et al.*, 2010) (Figure 7).

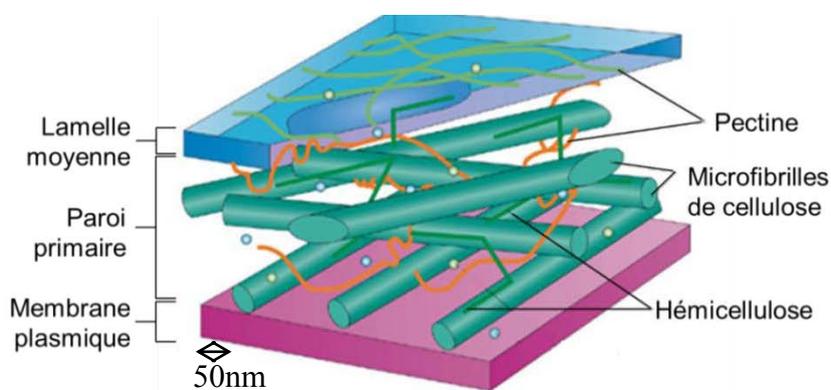


Figure 7 - Organisation des composants pariétaux au sein de la paroi primaire.

A la fin de la croissance cellulaire, au début de la différenciation, la paroi subit des modifications et une paroi plus épaisse et mieux organisée, la paroi secondaire, est synthétisée. Stratifiée en trois couches (S1, S2 et S3) (Figure 6B), la paroi secondaire est composée d'une matrice compacte d'hémicelluloses et de microfibrilles de cellulose, très cristallines, organisées en faisceaux, dont l'orientation change d'une couche à l'autre (Zhong et Ye, 2009 ; Cosgrove et Jarvis, 2012). Après le dépôt des polysaccharides pariétaux, la paroi

secondaire est progressivement incrustée de lignine à partir de la lamelle moyenne, ce qui lui offre une grande résistance mécanique et chimique mais ne permet plus la croissance et l'élongation cellulaire (Vanholme *et al.*, 2010).

II.2. LES CONSTITUANTS DE LA PAROI VÉGÉTALE

II.2.1. LA CELLULOSE

La cellulose est le polymère organique le plus abondant de la biosphère et représente jusqu'à $1,5 \times 10^{12}$ tonnes de la production annuelle de biomasse. Elle constitue le composé majeur des parois des cellules végétales pour lesquelles elle assure essentiellement la rigidité. Elle peut également être produite par les bactéries (Ross *et al.*, 1991 ; Klemm *et al.*, 2005), les algues (Sanandiya *et al.*, 2010) et les animaux (Nakashima *et al.*, 2008). La cellulose est un homopolymère linéaire constitué d'unités de D-glucose, ayant alternativement subi une rotation de 180° , liées par des liaisons β -1,4. Deux unités structurales successives définissent le disaccharide cellobiose (Figure 8). Le degré de polymérisation de la cellulose est très variable selon son origine et est compris entre 250 et 15000 (Hallac et Ragauskas, 2011).

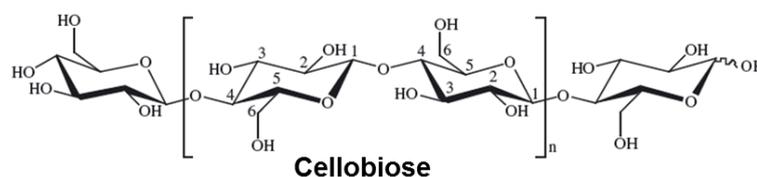


Figure 8 - Structure d'une chaîne de cellulose.

Les chaînes linéaires de glucose s'organisent en microfibrilles en s'associant de manière parallèle, via la formation de liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires entre groupes hydroxyl libres (Figure 9). Les microfibrilles présentent des régions non ordonnées (amorphes) et hautement ordonnées (cristallines) où les liaisons entre chaînes sont plus nombreuses et plus régulières, les rendant beaucoup plus résistantes à l'action des agents chimiques ou enzymatiques que les zones amorphes qui les séparent (O'Sullivan, 1997). Les microfibrilles sont également capables de s'aligner pour s'organiser en macrofibrilles dont le diamètre peut atteindre 60 nm et la longueur plusieurs micromètres (Donaldson, 2007 ; Thomas *et al.*, 2013).

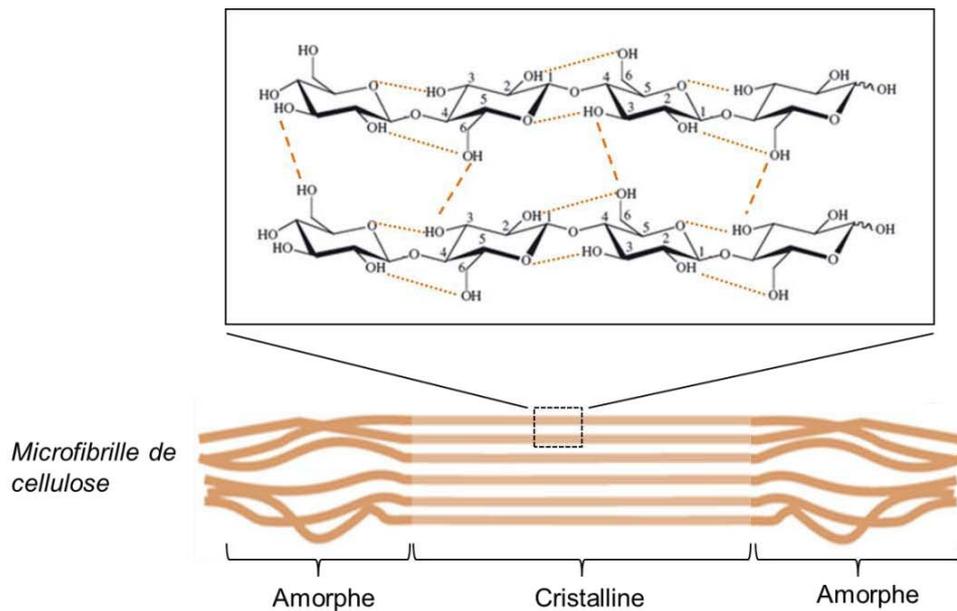


Figure 9 - Organisation de chaînes de cellulose en microfibrille (modifié, d'après Quiroz-Castañeda et Folch-Mallol (2011) et, Visakh et Thomas (2010)). Les chaînes de cellulose s'associent entre elles et sont stabilisées par des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires dont la densité détermine les régions amorphes ou cristallines de la microfibrille.

II.2.2. LES HEMICELLULOSES

Les hémicelluloses représentent le second polymère le plus abondant chez les plantes supérieures. Elles participent au renforcement de la paroi des cellules végétales en interagissant avec la cellulose et parfois la lignine et ont un rôle structural dans la flexibilité et la plasticité des parois cellulaires. Les hémicelluloses constituent un groupe hétérogène de polysaccharides qui ont pour dénominateur commun un squelette de glucose, mannose ou xylose liés en β -1,4 avec une même configuration équatoriale en C1 et C4 (Scheller et Ulvskov, 2010). Selon leur structure primaire, les hémicelluloses sont classées en quatre types, les xylanes, le xyloglucane, les mannanes, et les β -glucanes, dont la proportion et la diversité varient en fonction de l'espèce végétale et du tissu considérés (Ebringerová, 2005 ; Scheller et Ulvskov, 2010).

II.2.2.1. Les xylanes

Les xylanes regroupent les polysaccharides dont le squelette est uniquement composé de résidus xylose, souvent acétylés, liés en β -1,4. Ce squelette peut être ramifié à différents degrés par des chaînes latérales de monosaccharides ou de disaccharides.

Sur la base de la nature de ces substituants, 5 sous-types de xylandes sont définis (Figure 10) :

- les **glucuronoxylanes** substitués par des acides glucuroniques et/ou leur dérivé 4-O-méthyl,
- les **arabinoxylanes** substitués par des α -L-arabinofuranoses,
- les **glucuronoarabinoxylanes** ou les **arabinoglucuronoxylanes** nommés selon la prédominance de l'un des deux substituants précédents,
- les **hétéroxylanes** qui présentent une combinaison complexe d'arabinose, xylose, galactose et acide glucuronique.

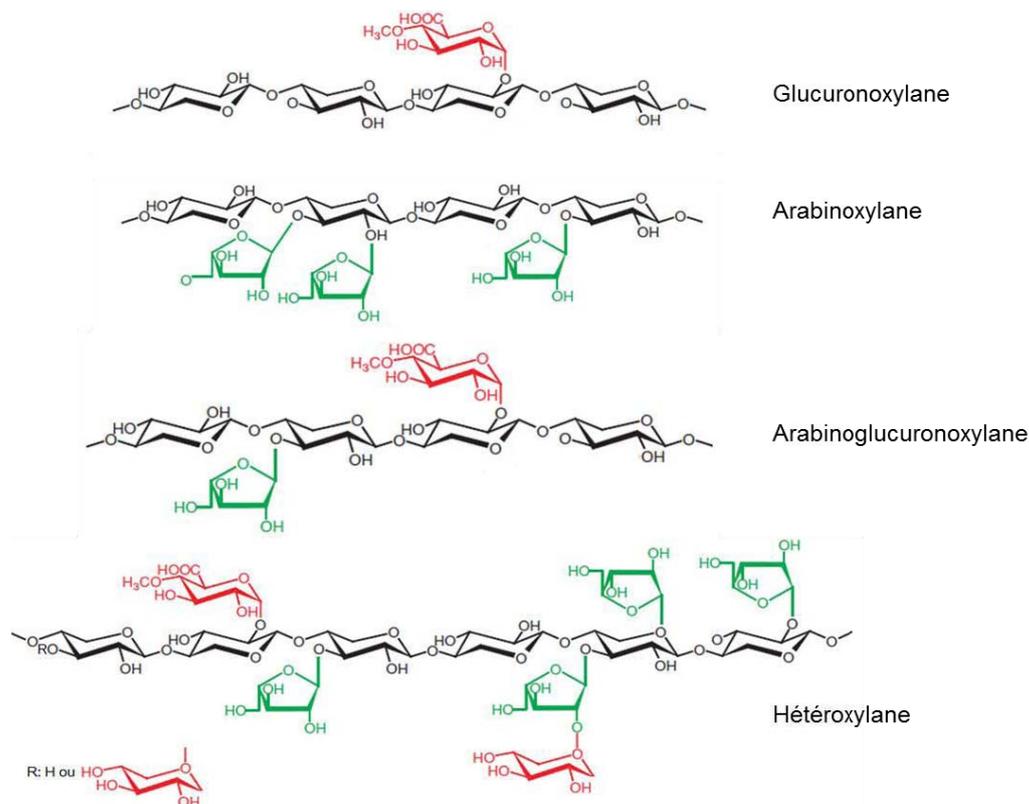


Figure 10 - Exemples de structure des différents types de xylandes.

Les résidus arabinosyl branchés sur les chaînes de xylane peuvent eux-mêmes être substitués par des acides phénoliques (acides férulique et p -coumarique). Sous forme libre, ils permettent de connecter deux polymères d'hémicelluloses. Sous forme de dimères, ces acides peuvent créer des liaisons covalentes éthers avec des molécules de lignine (figure 11).

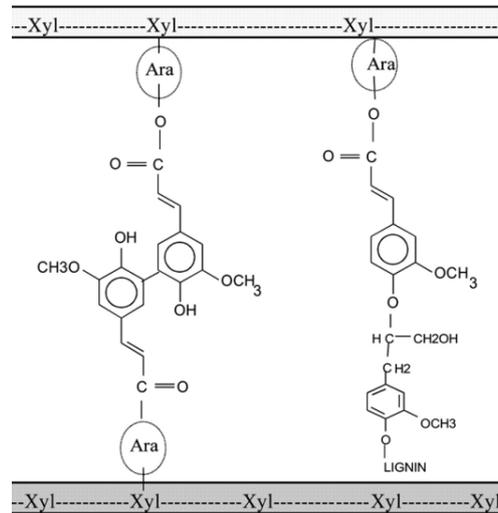


Figure 11 - Implication des acides féruliques dans la formation de liaisons entre deux molécules de xylanes et entre xylane et lignine (d'après de O Buanafina, 2009). Le squelette de xyloses du xylane est représenté par les lignes en pointillés et les résidus arabinosyl sont encerclés.

II.2.2.2. Les autres hémicelluloses

Le **xyloglucane** est constitué par un squelette de résidus glucose liés en β -1,4 portant des D-xyloses branchés en position 6 (Figure 12). La xylosylation des résidus glucose varie en fonction de l'espèce végétale, allant de 30% à 75%. Deux sous-types sont définis selon l'enchaînement des glucoses xylosés (X) ou non (G) : XXXG et XXGG. Les résidus xylose peuvent également être substitués par des β -galactose ou des α -L-arabinofuranose.

Les **mannanes** comprennent 2 groupes d'hémicelluloses classés en rapport avec la structure de leur squelette : les galactomannanes et les glucomannanes. Les *galactomannanes* sont constitués par une chaîne principale de résidus mannose liés en β -1,4 présentant des branchements plus ou moins abondants de résidus de D-galactose en position 6. Les *glucomannanes* sont constitués par une chaîne principale de résidus mannose et glucose liés en β -1,4 eux aussi branchés par des D-galactose (Figure 12).

Les **β -glucanes** sont constitués d'une unique chaîne de D-glucoses liés par des liaisons mixtes β -1,3 et β -1,4 (Figure 12).

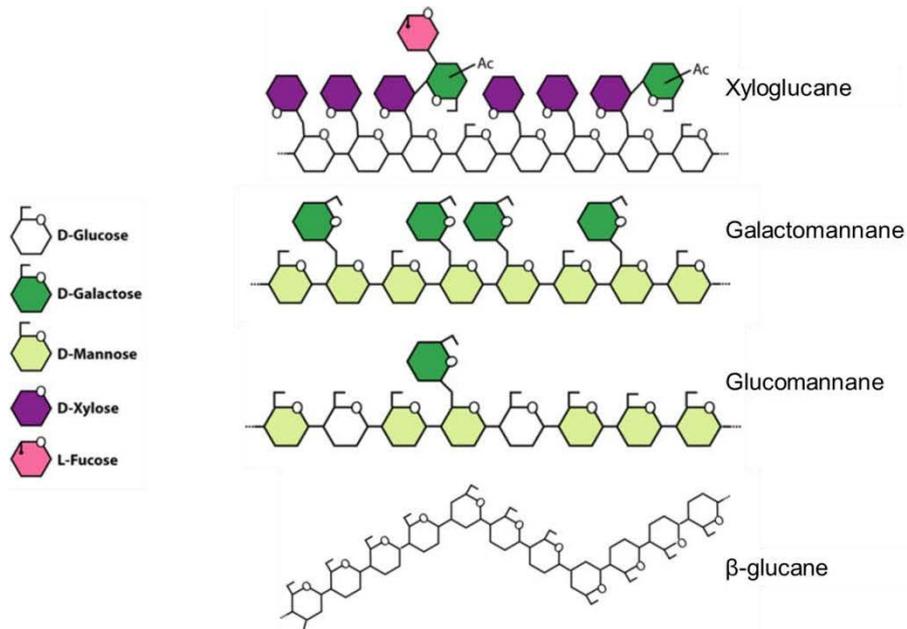


Figure 12 – Exemples de structure du xyloglucane, des mannanes et des β -glucanes (Scheller et Ulvskov, 2010).

II.2.3. LES PECTINES

De par leur capacité à un former un gel, les pectines jouent un rôle important dans l'hydratation et le maintien de l'intégrité de la paroi en favorisant l'adhésion des cellules entre elles. Elles facilitent également la mise en place des différents constituants pariétaux et la diffusion des ions et molécules de petite taille (Harholt *et al.*, 2010 ; Mohnen, 2008 ; Hosmer *et al.*, 2009). Les pectines sont des polysaccharides riches en acides galacturoniques liés en β -1,4. Selon leur composition, plusieurs types de pectines sont définis (figure 13) :

- l'**homogalacturonane** (HG), le plus abondant, est constitué par une chaîne linéaire d'acides galacturoniques pouvant être méthylestérifiés ou O-acétylés,

- les **galacturonanes substitués** présentent une chaîne principale similaire aux HG mais celle-ci est ramifiée par divers substituants : D-apiofuranose et xylose chez l'apiogalacturonane et le xylogalacturonane (XGA) respectivement, et jusqu'à 12 sucres différents pouvant être liés par 20 liaisons différentes dans le cas du rhamnogalacturonane II (RG-II),

- le **rhamnogalacturonane I** (RG-I) dont le squelette est constitué par une répétition du disaccharide [α -D-galacturonane-1,2- α -L-rhamnose-1-4-]. Le type et le nombre de sucres, oligosaccharides, et d'oligosaccharides branchés au squelette varie considérablement selon le type de cellule et le stade de développement.

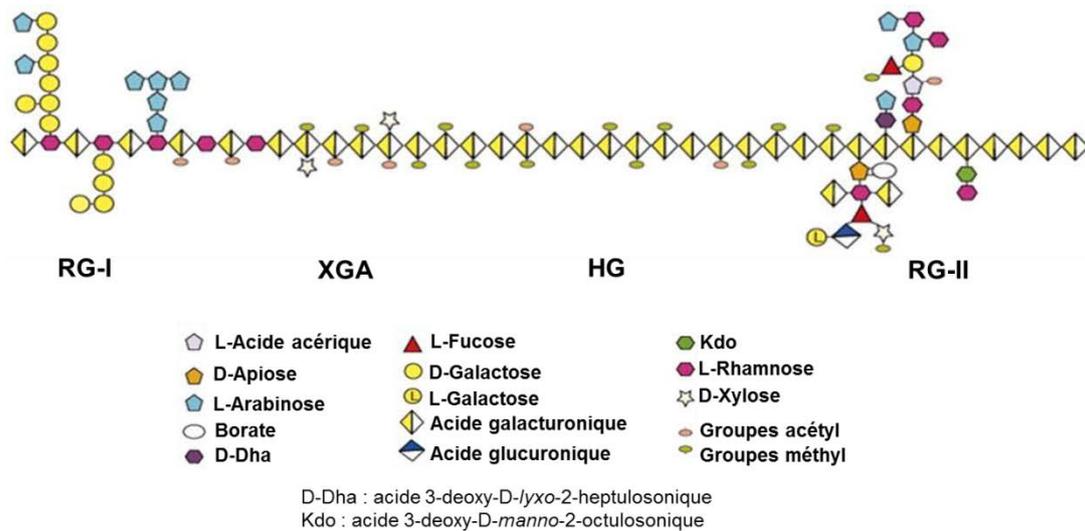


Figure 13 - Structure schématique de 4 types de pectines, le rhamnogalacturonane I (RG-I), le xylogalacturonane (XGA), l’homogalacturonane (HG) et le rhamnogalacturonane II (RG-II) (Mohnen, 2008).

Au sein de la paroi, ces différentes formes sont associées entre elles de manière covalente (Hosmer *et al.*, 2009) et forment la matrice pectique.

II.2.4. LA LIGNINE

La lignine, caractéristique des parois secondaires, rend les parois hydrophobes et augmente leur rigidité. Le terme lignine désigne un large groupe de polymères aromatiques composés en majorité de 3 alcools hydroxycinnamoyl (monolignols) qui sont des dérivés de l’acide aminé phénylalanine: l’alcool conyférylique, l’alcool sinapylique et l’alcool p-coumarylique. L’abondance de chaque monomère varie en fonction de l’espèce végétale et du type de cellule considérés (Vanholme *et al.*, 2010 ; Ralph *et al.*, 2004). Les monomères sont associés par différentes liaisons non ordonnées ce qui en fait un polymère amorphe (Hatfield et Vermerris, 2001) (figure 14).

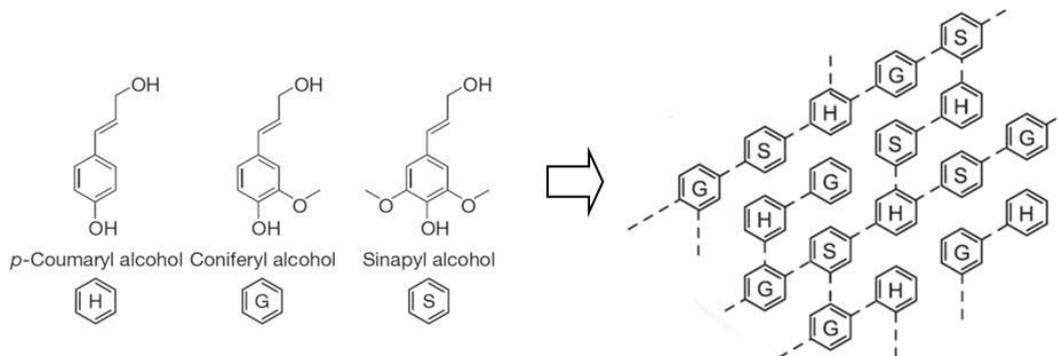


Figure 14 - Principaux composants de la lignine et leur association en polymère.

La lignine constitue un puissant rempart contre l'attaque des microorganismes du fait de sa dégradation difficile (Bhuiyan et Selvaraj, 2009 ; Denness *et al.*, 2011).

II.2.5. AUTRES CONSTITUANTS DES PAROIS VEGETALES

La paroi végétale contient une variété de glycoprotéines riches en glycine (GRP) ou en hydroxyproline (HRGP) comprenant les arabinogalactane-protéines et les extensines. Elles interviennent à divers niveaux dans la croissance et le développement de la plante, incluant le contrôle de la différenciation et de la morphogénèse, et les interactions cellule-cellule (Josè-Estanyol et Puigdomènech, 2000 ; Seifert et Roberts, 2007). Les extensines sont également capables de former un réseau par auto-assemblage qui consolide et stabilise la paroi (Lamport *et al.*, 2011). De nombreuses protéines enzymatiques (oxydatives et hydrolytiques) et non-enzymatiques (expansines) sont également retrouvées dans les parois. Elles interviennent dans le métabolisme et le remodelage de celles-ci (Fry, 2004 ; Cosgrove, 2005). Des composants lipidiques (subérine, cutine et cires) peuvent aussi être retrouvés à la surface de la paroi secondaire. Ils forment une couche protectrice qui limite les pertes d'eau et les attaques de pathogènes (Pollard *et al.*, 2008).

II.2.6. COMPOSITION ET DIVERSITE DES PAROIS VEGETALES

Bien que toutes les parois végétales présentent des caractéristiques structurales communes, leur composition en polymères glucidiques et non glucidiques varie considérablement entre espèces végétales et en fonction de l'âge et de la nature des tissus considérés (tableau 2) (Fry, 2004 ; Saulnier et Guillon, 2012 ; Popper *et al.*, 2011). Cependant, la cellulose et les hémicelluloses restent les polysaccharides les plus abondants toutes plantes confondues. La cellulose est le polysaccharide majoritaire des parois, pouvant atteindre 50% des constituants de la paroi secondaire. Les parois végétales se distinguent avant tout par leur contenu en hémicelluloses dont les proportions et la diversité varient d'une espèce à l'autre et au cours du développement de la plante. Dans les parois primaires des dicotylédones et des monocotylédones non graminées, le xyloglucane est l'hémicellulose la plus abondante (environ 20%) tandis que les xylanes sont majoritaires chez les graminées (30% en moyenne). Dans les parois secondaires, les xylanes sont les principales hémicelluloses et constituent ainsi 20 à 30% des parois des dicotylédones et jusqu'à 50% de la paroi des graminées et des

céréales. Les pectines, essentiellement retrouvées sous forme d'homogalacturonane, sont abondantes uniquement dans la paroi primaire des plantes dicotylédones. Enfin, les lignines, caractéristiques des parois secondaires, sont particulièrement abondantes chez les graminées.

Tableau 2 - Composition approximative de la paroi végétale des graminées (plantes monocotylédones) et des plantes dicotylédones, en % de la matière sèche (Vogel, 2008).

	Paroi primaire		Paroi secondaire	
	Graminées	Dicotylédones	Graminées	Dicotylédones
<i>Polymères glucidiques</i>				
Cellulose	20-30	15-30	35-45	45-50
Hémicelluloses				
Xylanes	20-40	5	40-50	20-30
β -glucanes mixtes	10-30	absent	mineur	absent
Xyloglucanes	1-5	20-25	mineur	mineur
(Gluco) mannanes	mineur	5-10	mineur	3-5
Pectines	5	20-35	0,1	0,1
<i>Autres</i>				
Protéines	1	10	mineur	mineur
Lignines	mineur	mineur	20	7-10

II.3. LES FIBRES VEGETALES DANS L'ALIMENTATION DES BOVINS D'ELEVAGE

En élevage, la ration des animaux est déterminée de manière à assurer au mieux la couverture de leur besoin d'entretien et de production, qui vont dépendre de facteurs liés à l'animal (type génétique, âge, sexe, poids, gain de poids, stade physiologique...) et à son type de production (lait, viande, élevage). La ration, souvent composée de plusieurs aliments offrant des apports complémentaires, est donc formulée en fonction de chaque condition d'élevage. Elle prend également en compte la valeur nutritive et la digestibilité de chaque aliment, essentiellement liées à sa teneur en parois végétales (Demarquilly et Andrieu, 1988 ; Noblet *et al.*, 1989 ; Perez, 1990). La composition chimique des aliments entrant en nutrition animale est donc fréquemment déterminée pour ajuster au mieux les apports. Concernant la teneur en parois végétales, les critères de Van Soest (Van Soest, 1967) sont les plus largement utilisés, notamment la fraction NDF (Neutral Detergent Fiber) qui comprend les polysaccharides insolubles (cellulose et hémicellulose) et la lignine de la paroi des végétaux.

II.3.1. LES FOURRAGES, PRINCIPALE SOURCE DE FIBRES DES BOVINS

La ration moyenne des bovins français est constituée à près de 80% par les fourrages pâturés ou conservés (ensilage et foin). Dépendant de la qualité nutritionnelle de ceux-ci, des protéines et de l'énergie complémentaires sont apportées par des aliments « concentrés » sous forme simple (céréales, protéagineux et tourteaux) ou d'assemblage de matières premières (concentrés composés) (Figure 15). Les aliments concentrés sont avant tout utilisés pour leur teneur élevée en énergie utilisable par l'animal et leur richesse en matières azotées et grasses. Ils contiennent cependant une teneur non négligeable en NDF. Dans les céréales, les NDF représentent 12 à 37% de la matière sèche (MS) pour le maïs et l'avoine respectivement avec une forte proportion en hémicelluloses peu digestibles. Les graines oléoprotéagineuses sont constituées de 14 à 31% de NDF. Les tourteaux qui sont les résidus d'extraction de l'huile à partir de graines oléoprotéagineuses contiennent 10 à 50% de NDF dans la MS. La teneur en lignine est par ailleurs particulièrement élevée dans les tourteaux de colza et de tournesol (de l'ordre de 10%). Les fourrages, riches en parois végétales, représentent la principale source de fibres végétales et d'énergie pour les bovins. Ils sont constitués par l'appareil végétatif de végétaux qui appartiennent à des familles botaniques diverses, comprenant essentiellement des monocotylédones (graminées) et secondairement des dicotylédones (légumineuses et brassicacées).

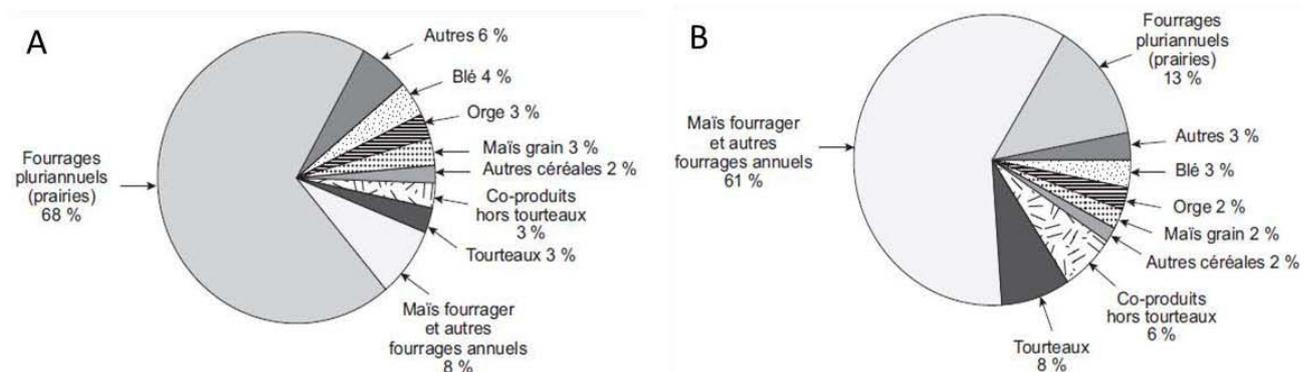


Figure 15 - Parts moyennes des fourrages et des aliments concentrés consommés en France par les bovins des élevages producteurs de lait et viande (A) et producteurs de viande (B) (Rapport du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et des Forêts - synthèses n°2013/208).

Leur teneur en parois peut varier de 40% à 80% de la matière sèche selon la plante fourragère, son mode de conservation ou encore le stade de développement au moment où elle est

consommée (Baumont *et al.*, 2008, 2009). Outre leur valeur nutritive, les parois végétales des fourrages ont un rôle très important dans le fonctionnement du rumen en augmentant le temps de rétention du bol alimentaire dans ce compartiment et en favorisant l'activité de rumination. Une quantité minimale de 35% de NDF dans la ration a ainsi été recommandée par Sauvant, les 3/4 provenant des fourrages (Sauvant *et al.*, 1999). Une vache laitière de 700 kg qui ingère 21 kg de matière sèche par jour doit ainsi consommer au moins 7,4 kg de NDF.

II.3.2. DIGESTIBILITE DES COMPOSANTS DE LA RATION

D'une manière générale, la digestibilité des glucides cytoplasmiques (sucres, amidon), des lipides et des protides intracellulaires des fourrages et des aliments concentrés est très élevée chez les bovins. Celle des parois varie en fonction du temps de rétention des digesta dans le rumen et du taux de lignification des parois. La digestibilité des glucides pariétaux de constituants non lignifiés est ainsi comprise entre 80 et 90%. Les pectines sont presque totalement digérées tandis que la digestibilité des hémicelluloses et de la cellulose varie, celle des hémicelluloses étant en général meilleure que celle de la cellulose (Jarrige *et al.*, 1995). La digestibilité de la cellulose et des xylanes est ainsi estimée de 43 à 73% et de 36 à 79% respectivement chez le bovin (Van Soest, 1982). La digestibilité de la cellulose et des hémicelluloses est inversement corrélée à la teneur en lignine pariétale, ce qui signifie que plus la paroi est lignifiée moins elle est digestible. Les fourrages, plus riches en lignine, sont donc moins digestibles que les concentrés.

Partie III

LES MICROORGANISMES FIBROLYTIQUES DU RUMEN ET LEUR EQUIPEMENT ENZYMATIQUE

III.1. LES MICROORGANISMES FIBROLYTIQUES RUMINAUX

Le rumen est le premier écosystème digestif pour lequel la dégradation des fibres a été étudiée. Ainsi, la plupart des connaissances sur la fibrolyse dans les écosystèmes digestifs découlent des travaux réalisés sur le ruminant. Dans le rumen, les fibres végétales sont dégradées par une communauté de bactéries, champignons et protozoaires (Figure 16 et Tableau 3), avec une contribution de l'ordre de 80% pour les bactéries et les champignons, et de 20% pour les protozoaires (Dijkstra et Tamminga, 1995).

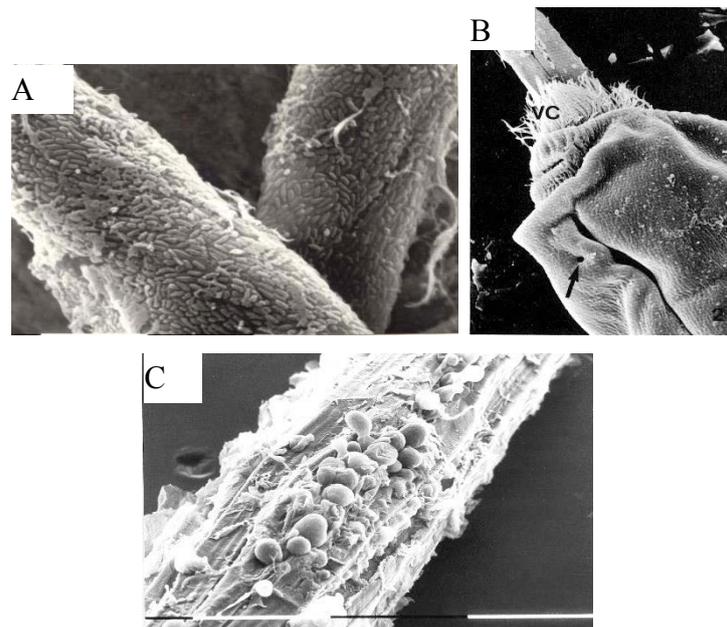


Figure 16 - Microorganismes fibrolytiques du rumen observés en microscopie électronique à balayage.

- A. Bactéries colonisant une particule végétale ((B. Gaillard-Martinie, INRA UR 454)
- B. Protozoaire ingérant une particule végétale (Bohatier *et al.*, 1990)
- C. Champignons colonisant une particule végétale (B. Gaillard-Martinie, INRA UR 454)

Tableau 3 - Microorganismes ruminiaux fibrolytiques et leur activité enzymatique (adapté d'après Wang et McAllister, 2002 et Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

Microorganismes	Activités	
	Cellulolytique	Hémicellulolytique
Bactéries		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	+
<i>Cellulosilyticum ruminicola</i>	+	+
<i>Clostridium longisporum</i>	+	
<i>Clostridium polysaccharum</i>	+	
<i>Eubacterium cellulosolvens</i>	+	
<i>Eubacterium limosum</i>		+
<i>Eubacterium ruminantium</i>		+
<i>Eubacterium xylanophilum</i>		+
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+
<i>Lachnospira multiparus</i>		+
<i>Megasphaera elsdenii</i>		+
<i>Prevotella bryantii</i>		+
<i>Prevotella ruminantium</i>		+
<i>Prevotella ruminicola</i>		+
<i>Ruminobacter amylophilus</i>		+
<i>Ruminococcus albus</i>	+	+
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+
<i>Selenomonas lactilytica</i>		+
<i>Selenomonas ruminantium</i>	+	+
<i>Streptococcus bovis</i>	+	+
<i>Succinimonas amylolytica</i>		+
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>		+
Protozoaires		
<i>Eudiplodinium maggii</i>	+	+
<i>Ostracodinium dilobum</i>	+	+
<i>Epidinium caudatum</i>	+	+
<i>Metadinium affine</i>	+	+
<i>Eudiplodinium bovis</i>	+	+
<i>Orphyroscolex caudatus</i>	+	+
<i>Polyplastron multivesiculatum</i>	+	+
<i>Diplodinium pentacanthum</i>	+	
<i>Endoploplastron triloricatum</i>	+	
<i>Orphyroscolex tricornatus</i>	+	
<i>Ostracodinium gracile</i>	+	
<i>Entodinium caudatum</i>	+	+
<i>Isotricha intestinalis</i>	+	+
<i>Isotricha prostoma</i>	+	+
Champignons		
<i>Neocallimastix frontalis</i>	+	+
<i>Neocallimastix patriciarum</i>	+	+
<i>Neocallimastix joyonii</i>	+	+
<i>Caecomyces communis</i>	+	+
<i>Piromyces communis</i>	+	+
<i>Orpinomyces bovis</i>	+	+
<i>Ruminomyces elegans</i>	+	+

III.1.1. LES BACTERIES FIBROLYTIQUES

L'ensemble des bactéries fibrolytiques ne représente que 1 à 5 % de la population bactérienne totale (Weimer *et al.*, 1999 ; Michalet-Doreau *et al.*, 2002) et pourtant elles ont un rôle majeur dans le fonctionnement du rumen. Trois espèces cultivables sont considérées comme prépondérantes ; il s'agit de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens* qui ont fait l'objet de nombreuses études. *F. succinogenes*, retrouvée en moyenne à 10^9 cellules/g de MS, est la plus abondante (Michalet-Doreau *et al.*, 2001 ; Kobayashi *et al.*, 2008). Elle est très active sur la cellulose cristalline et les xylanes mais est uniquement capable d'utiliser les produits d'hydrolyse de la cellulose. Les ruminocoques *R. albus* et *R. flavefaciens* sont généralement retrouvés à 10^7 - 10^8 cellules/g de MS et sont également capables de dégrader la cellulose et les xylanes. D'autres espèces comme *Prevotella ruminicola*, *P. bryantii* et *Butyrivibrio fibrisolvens* présentent également des activités similaires (Dodd *et al.*, 2011) mais sont souvent considérées comme secondaires du fait leur incapacité à dégrader la cellulose cristalline (Tableau 3). Des études récentes suggèrent que d'autres espèces bactériennes, encore peu ou pas étudiées, participent à la dégradation des fibres végétales (Cai *et al.*, 2010).

Près de 75% des bactéries fibrolytiques sont associées aux particules végétales (Koike *et al.*, 2003a), ce qui témoigne de la nécessité d'une étroite interaction entre les bactéries et leur substrat. Leur adhésion aux fibres végétales est réalisée en quatre étapes : 1) transport des bactéries libres au substrat par chimiotactisme, 2) adhésion initiale non spécifique, 3) adhésion spécifique au substrat, 4) prolifération et colonisation des tissus végétaux. Les bactéries pourraient utiliser plusieurs mécanismes d'adhésion spécifique du substrat, comprenant des cellulosomes, des *pili* ou *fimbriae*, des épitopes des carbohydrates présents sur le glycocalyx et des domaines de liaisons au substrat (Miron *et al.*, 2001). Les espèces glycolytiques qui dépendent de l'activité des espèces fibrolytiques sont également retrouvées associées aux fibres végétales et forment un consortium autour des particules végétales.

III.1.2. LES CHAMPIGNONS FIBROLYTIQUES

Toutes les espèces fongiques ruminales connues présentent une activité fibrolytique et plus particulièrement, cellulolytiques et xylanolytiques (Tableau 3). Sous forme végétative, les *Neocallismatigomycota* sont capables de se fixer aux tissus végétaux, y compris les plus récalcitrants, et de pénétrer à l'intérieur de ceux-ci grâce à leur réseau de rhizoïdes, facilitant

ainsi l'accès de leurs enzymes fibrolytiques et également des bactéries fibrolytiques aux différents composants pariétaux. Ils ont donc un rôle primordial dans la déstructuration des parois végétales. Ils ont montré par ailleurs *in vitro* la plus forte activité cellulolytique comparée aux bactéries et aux protozoaires (Lee *et al.*, 2000). Toutefois, leur contribution au processus de fibrolyse *in vivo* n'est pas connue.

III.1.3. LES PROTOZOAIRES FIBROLYTIQUES

Seuls les protozoaires Entodiniomorphes tels qu'*Entodinium sp.*, *Eudiplodinium sp.* et *Polyplastron sp.* sont considérés comme fibrolytiques (Tableau 3). Ils sont capables d'ingérer les particules végétales par phagocytose. Leur digestion est réalisée dans les vacuoles issues de ce processus dans lesquelles se déversent les enzymes fibrolytiques. Des expériences de défaunation du rumen, c'est-à-dire de suppression des protozoaires, montrent que l'absence de protozoaires conduit à une baisse de la fibrolyse (Eugène *et al.*, 2004), suggérant un rôle significatif dans la dégradation des fibres qui peut être direct par la production active d'enzymes fibrolytiques ou indirect par la création de conditions favorables pour les bactéries fibrolytiques (Jouany, 2006).

Notons que chez le ruminant le rumen n'est pas le seul compartiment digestif à héberger des microorganismes fibrolytiques puisque l'on en retrouve également dans le colon. Des bactéries fibrolytiques sont aussi retrouvées dans le colon de monogastriques comme le porc et l'homme dans des abondances proches de celles du rumen. Leur diversité varie en fonction de l'espèce animale mais leurs rôles écologique et fonctionnel restent tout aussi importants.

III.2. LES ENZYMES NECESSAIRES A LA DEGRADATION DE LA CELLULOSE ET DES XYLANES

Les polysaccharides des parois végétales présentent une structure et une composition chimique à la fois complexes et variables selon le tissu et l'espèce végétale considérés. L'efficacité des microorganismes à dégrader ces polysaccharides réside donc dans leur capacité à produire un répertoire varié d'enzymes leur permettant de s'adapter à la diversité des polysaccharides et de leurs liaisons. La dégradation des sucres complexes de la paroi végétale nécessite ainsi l'intervention de nombreuses activités enzymatiques capables d'agir

en synergie. Le tableau 4 résume les principales activités enzymatiques impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose, des hémicelluloses et des pectines.

Tableau 4 - Principales enzymes impliquées dans l'hydrolyse des parois végétales (White *et al.*, 1993).

	Enzymes	Substrats	Liaisons clivées	Produits d'hydrolyse
Cellulose	Endo- β -1,4-glucanase	Cellulose	β -1,4-glucose	Cellooligomères
	Exo- β -1,4-glucanase	Cellulose	β -1,4-glucose	Cellulose
	Cellodextrinase	Cellulooligomères solubles	β -1,4-glucose	Cellulose et cellobiose
	Cellobiase	Cellobiose	β -1,4-glucose	Glucose
	Endo- β -1,4-xylanases	Xylane	β -1,4-xylane	Xylooligomères
	Exo- β -1,4-xylanases	Xylane (extrémités)	β -1,4-xylane	Xylobiose
	β -1,4 xylosidase	Xylobiose	β -1,4-xylane	Xylose
	α -L-arabinofuranosidase	Arabinoxylane	α -1,3-xylane	Arabinoxylane et arabinose
	α -glucuronidase	Glucuronoxylane	α -1,3 ou 1,2 ac glucuronique	Glucuronoxylane et ac glucuronique
	O-acétyl xylane estérase	Acétyl xylane	Acétyl ester	Acétyl xylane et acétate
Acide férulique estérase	Ac férulique lié aux résidus arabinose	Féruloyl ester	Acide férulique et xylane	
Acide p-coumarique estérase	Ac p-coumarique lié aux résidus arabinose	p-coumarique ester	Acide p-coumarique et xylane	
Hemicelluloses	β -1,3-glucanase	Laminarine	β -1,3-hexose	Laminarine oligomères
	β -1,3-1,4-glucanase	Lichénine, β -glucanes	β -1,3 et 1,4 hexose	Lichénine oligomère, β -glucanes oligomères
	β -1,4-glucanase	Lichénine, β -glucanes	β -1,4-glucose	Lichénine oligomère, β -glucanes oligomères
	Polygalacturonase	Polygalacturane désestérifié	α -1,4 galacturonide	Acide polygalacturonique oligomères
	Polygalacturonate lyase	Méthylester de polygalacturane et pectines	α -1,4 galacturonide	Acide polygalacturonique oligomères
	Pectine méthyl estérase	Pectines	Méthyl ester	Méthanol et polygalacturane

Bien que des microorganismes aérobies soient capables de produire des peroxydases et laccases impliquées dans sa dégradation (Chen *et al.*, 2012), la lignine est considérée comme non dégradée dans les conditions anaérobies rencontrées au sein du tube digestif (McSweeney *et al.*, 1994).

Nous nous intéresserons par la suite exclusivement aux enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes et à l'équipement enzymatique des microorganismes ruminants impliqués dans ces processus.

III.2.1. ORGANISATION MODULAIRE DES ENZYMES CELLULOLYTIQUES ET XYLANOLYTIQUES

Les enzymes dégradant la cellulose et les xylanes présentent souvent une structure modulaire comprenant parfois plusieurs domaines catalytiques responsables de l'hydrolyse des polysaccharides et des modules annexes permettant de faciliter l'activité hydrolytique (figure 17).

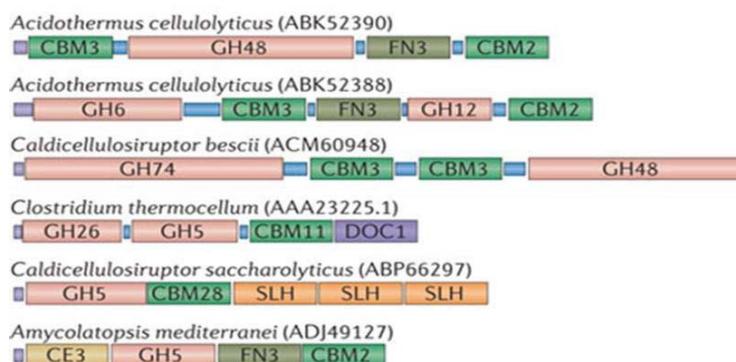


Figure 17 - Exemples de modularité de cellulases. Les modules catalytiques sont représentés en rose (GH, Glycoside Hydrolase) et en beige (CE, Carbohydrate estérase). Les modules non catalytiques sont les CBM (Carbohydrate-Binding Modules), des domaines SLH (Surface Layer Homology), dockérine (DOC1) et fibronectine de type III (FN3). Le numéro d'accèsion des protéines est indiqué entre parenthèses. (modifié, d'après Mba Medie *et al.*, 2012)

III.2.1.1. Les modules catalytiques

La base de données CAZy (pour Carbohydrate Active enZymes, www.cazy.org; Levasseur *et al.*, 2013) fournit un répertoire régulièrement actualisé des modules catalytiques d'enzymes qui dégradent, modifient ou créent des liaisons glycosidiques. Selon la réaction qu'ils catalysent, les modules d'enzymes qui dégradent les liaisons glycosidiques sont répartis en 4

classes : les Glycosides Hydrolases (GH), les Polysaccharides Lyases (PL), les Carbohydrates Estérases (CE) et les Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenases (LPMO) (tableau 5). Chaque classe d'enzymes est divisée en familles numérotées (e.i. GH5, CE4), sur la base de la séquence en acides aminés des protéines, reflétant ainsi une structure tridimensionnelle commune. Il a été montré que pour la majorité des familles le domaine catalytique et le mécanisme moléculaire étaient conservés (Henrissat et Davies, 1997), ce qui représente donc un grand intérêt de prédiction de la fonction des protéines étant donné que beaucoup d'enzymes ne sont pas caractérisées biochimiquement. Cependant, cette classification ne reflète pas l'activité enzymatique telle qu'elle est définie selon la nomenclature EC, (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) car une famille peut présenter plusieurs activités (famille polyspécifique) et inversement une activité enzymatique peut être retrouvée dans plusieurs familles (Aspeborg *et al.*, 2012).

Tableau 5 - Classes d'enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux selon la base de données CAZy : réaction catalysée, activité associée selon la nomenclature EC, nombre de familles et modules recensés au 10/10/13.

Classe d'enzymes CAZy	Réaction catalysée	Nomenclature EC associée	Nombre de familles	Nombre de modules présents
Glycoside hydrolase (GH)	Hydrolyse/réarrangement de liaisons glycosidiques	2.4.1-, 3.2.1.-, 3.5.2-, 4.2.2.-, 5.4.99-	132	157349
Polysaccharide lyase (PL)	Clivage non-hydrolytique de liaisons glycosidiques	4.2.2.-	22	3920
Carbohydrate estérase (CE)	Desesthérification des saccharides substitués	3.1.1.- 3.5.1-,	16	15905
Lytic Polysaccharide Mono-Oxygenases (LPMO)	Clivage oxydatif de la cellulose	EC 1...-	2 (familles AA9 et AA10)	1040

Dans la suite de cette synthèse bibliographique, nous nous intéresserons en particulier aux glycoside hydrolases et carbohydrate estérases, familles dans lesquelles les enzymes cellulolytiques et xylanolytiques sont retrouvées.

III.2.1.1.1. Les glycosides hydrolases

De toutes les CAZymes, les glycosides hydrolases sont les plus représentées et leur classification en de nombreuses familles démontre qu'elles présentent une grande diversité de séquences protéiques impliquant une grande diversité de structures (figure 18).

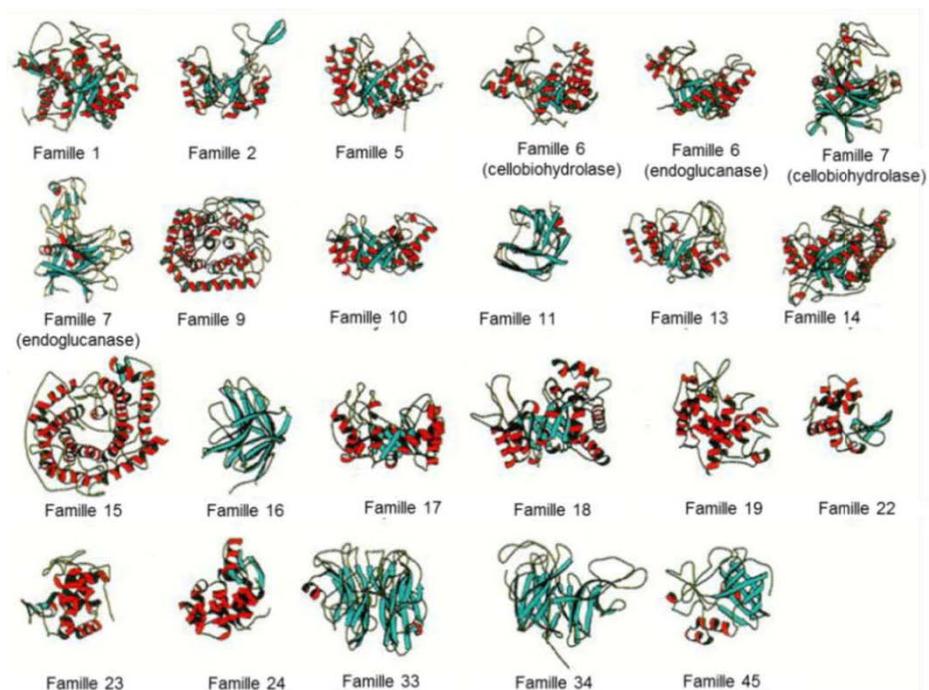


Figure 18 - Diversité de structures des glycoside hydrolases. Les feuilletts β sont représentés en bleu, les hélices α en rouge (Davies et Henrissat, 1995).

Leurs activités sont également très variées puisque près de 170 codes EC sont associés aux différentes familles de GH (<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>) dont plus d'une trentaine sont impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes (tableau 6).

Tableau 6 - Familles de glycoside hydrolases comportant des cellulases et des xylanases.

	Enzymes	Familles de GH
Cellulases	Endo- β -1,4-glucanases	5-9, 12, 44, 45, 48, 51, 74, 124
	Exo- β -1,4-glucanases	5, 6, 7, 9, 48
	β -glucosidases	1, 3, 5, 9, 30, 116
	Cellodextrinase	5, 9
Xylanases	β -1,4-xylanases	5, 8, 10, 11, 43
	β -1,4-xylosidases	3, 30, 39, 43, 52, 54, 116, 120
	α -glucuronidases	4, 67
	α -L-arabinofuranosidases	3, 43, 51, 54, 62

Malgré cette apparente diversité, la topologie des sites actifs et le mécanisme moléculaire mis en jeu sont assez bien conservés.

(i) Mécanismes moléculaires des GH

Le clivage des liaisons osidiques par les GH se fait par un mécanisme de type acide/base. Il requiert l'intervention de deux acides aminés du site catalytique, un donneur de proton (acide aminé acide) et un nucléophile (acide aminé basique). Selon la distance entre ces deux acides aminés, deux types de mécanismes peuvent être mis en jeu ; les enzymes agissent soit avec un *mécanisme de rétention* de configuration, en libérant un produit dont la configuration du carbone anomère est identique à celle du substrat, soit avec un *mécanisme d'inversion* de configuration, en libérant un oligosaccharide de configuration opposée à celle du substrat (Koshland, 1953 ; Davies et Henrissat, 1995). Si ces mécanismes de type acide-base restent largement majoritaires, un certain nombre de nouveaux mécanismes ont été mis en évidence dans lesquels l'intervention d'un des acides aminés catalytiques est remplacée par un groupement du substrat hydrolysé ou d'autres acides aminés formant ou non un réseau nucléophile alternatif ou bien encore nécessitant l'intervention d'un co-facteur (Vuong et Wilson, 2010).

(ii) Topologie du site actif et modes d'action des GH

Le mode d'action des enzymes est en lien direct avec la conformation du site actif de la GH. Ce dernier peut présenter trois types de topologie, et ce, indépendamment du mécanisme moléculaire utilisé pour l'hydrolyse du substrat (Davies et Henrissat, 1995).

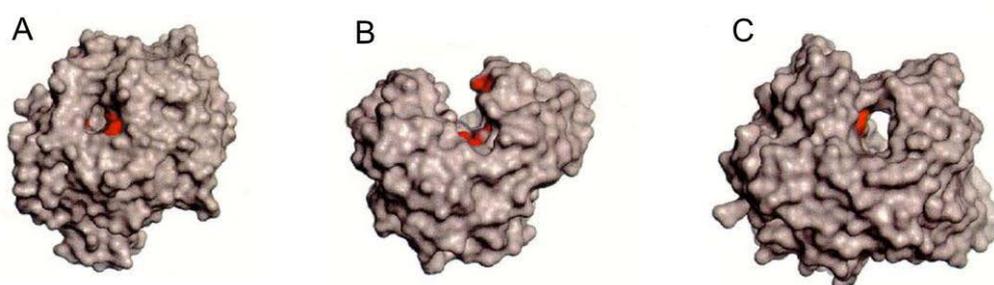


Figure 19 - Topologies du site actif des glycoside hydrolases.
A, en poche ; B, en sillon ; C, en tunnel. (Davies et Henrissat, 1995)

- *Topologie en « poche »* (figure 19A): elle est typique des *exo*-enzymes (β -xylosidases, β -glucosidases...), c'est-à-dire des enzymes capables d'hydrolyser une chaîne polysaccharidique ou oligosaccharidique à partir d'une de ses extrémités. Ce mode d'action est dit processif du fait que l'enzyme progresse le long de la chaîne glucidique à partir d'une

extrémité. De par leur mode d'action, ces *exo*-enzymes sont peu efficaces sur les substrats cristallins, tels que la cellulose cristalline, et nécessitent donc l'action préalable d'autres enzymes permettant de rendre accessibles les extrémités.

- *Topologie en « sillon »* (figure 19B): cette structure ouverte permet à l'enzyme d'agir à l'intérieur des chaînes de résidus glucidiques de manière aléatoire. Elle est caractéristique des *endo*-enzymes composées entre autres des *endo*- β -1,4-glucanases et des *endo*- β -1,4-xylanases. Leur activité permet de diminuer la longueur des chaînes glucidiques et d'augmenter le nombre d'extrémités accessibles aux *exo*-enzymes.

- *Topologie en « tunnel »* (figure 19C): cette topologie correspond à un sillon recouvert par de longues boucles. Elle est retrouvée chez les exoglucanases qui présentent à la fois les caractéristiques des *exo*- et des *endo*-enzymes grâce à leur capacité à ouvrir temporairement leur site actif. Ces enzymes sont ainsi capables d'hydrolyser à l'intérieur de la cellulose (mode d'action « *endo* ») puis de progresser à partir d'une des extrémités produites en libérant essentiellement du cellobiose (mode « *exo* ») (Teeri, 1997 ; Divne *et al.*, 1998). Ces enzymes sont dites endoprocessives.

III.2.1.1.2. Les carbohydate estérases

Les carbohydate estérases (CE) correspondent au deuxième type de modules catalytiques retrouvés dans les enzymes attaquant les xylanes. Les CE sont des enzymes « débranchantes » qui catalysent l'hydrolyse de groupements acétyl (acétyl estérases) ou d'acides féruliques (féruloïl estérases) de saccharides substitués. Seize familles ont été identifiées sur la base de leur similarité de séquences protéiques.

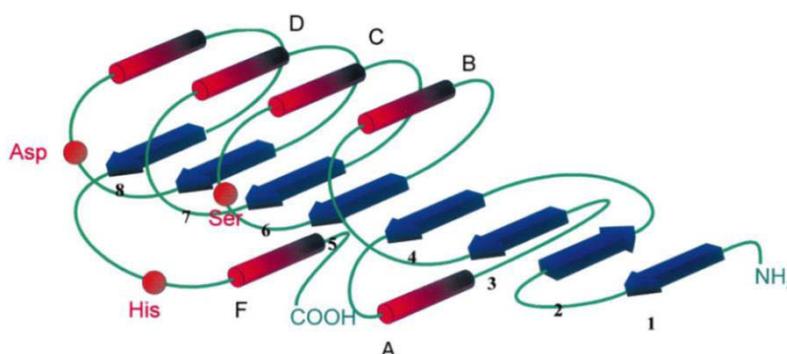


Figure 20 – Structure canonique des carbohydate estérases : type hydrolase α/β . Les feuillets β et les hélices α sont représentés en bleu et rouge respectivement. La position relative des acides aminés constituant la triade catalytique est indiquée par des sphères rouges (Bornscheuer, 2002).

Elles présentent en général une structure de type hydrolase α/β et un mécanisme réactionnel faisant intervenir une triade catalytique Sérine-Histidine-Acide aspartique, analogue aux sérine protéases et aux lipases (figure 20) (Fazary et Ju, 2007 ; Biely, 2012), à l'exception des CE4 qui présentent une structure de type barrel $(\beta/\alpha)_8$ et dont certains représentants sont métallo-dépendants (Biely, 2012).

III.2.1.2. Les modules non catalytiques des enzymes cellulolytiques et xylanolytiques

III.2.1.2.1. Les modules CBM (Carbohydrate Binding Module)

Les interactions entre les divers polysaccharides pariétaux restreignent leur accessibilité aux attaques enzymatiques. Pour pallier à ce problème, la plupart des enzymes fibrolytiques présente une architecture moléculaire complexe comprenant à la fois des domaines catalytiques et des modules de fixation au substrat (CBM). Les CBM sont des modules non catalytiques constitués de 30 à 200 acides aminés qui peuvent être présents en une ou plusieurs répétitions dans une même protéine. En se fixant au substrat, les CBM potentialisent et optimisent l'hydrolyse enzymatique en maintenant le domaine catalytique à proximité de son substrat (Shoseyov *et al.*, 2006 ; Blake *et al.*, 2006 ; Hervé *et al.*, 2010 ; Gilbert, 2010). Par ailleurs, les CBM pourraient être impliqués dans la désorganisation de la cellulose cristalline sans activité catalytique (Gilbert, 2010) et le maintien des chaînes de cellulose dans le tunnel des cellulases processives (Jindou *et al.*, 2006).

III.2.1.2.2. Les autres domaines

D'autres domaines peuvent être associés aux modules catalytiques. Leur fonction reste encore hypothétique pour certains.

Les **modules fibronectines de type III** sont souvent retrouvés en copies multiples dans les glycoside hydrolases. Ils pourraient agir comme destabilisateurs de la cellulose et amélioreraient ainsi les capacités hydrolytiques des cellulases. Une autre hypothèse est qu'ils seraient des formes de stockage de peptide linker permettant de connecter les autres modules de l'enzyme (Alahuhta *et al.*, 2010).

Les **modules Ig-like** ne seraient pas directement impliqués dans la fixation au substrat ni l'hydrolyse mais permettraient de stabiliser le domaine catalytique. Leur délétion entraîne une perte ou une diminution de l'activité de l'enzyme (Liu *et al.*, 2010).

Les **domaines SLH** (Surface Layer Homology) sont retrouvés en position N- ou C-terminale de certaines GH. Ils sont impliqués dans la fixation des protéines à la surface de la cellule et ont un rôle dans l'attachement des cellulosomes à la membrane (Xu *et al.*, 2003, 2004b).

Les **modules dockérines** sont le plus souvent retrouvés à l'extrémité C-terminale des cellulases et permettent l'ancrage des enzymes sur des protéines d'échafaudage pour former des complexes multienzymatiques appelés « cellulosomes » (voir III.2.4.1).

De nombreux modules présents aux côtés des modules catalytiques des enzymes ont encore des fonctions inconnues.

III.2.2. DEGRADATION DE LA CELLULOSE ET ENZYMES CELLULOLYTIQUES

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose sont génériquement appelées cellulases. La dégradation complète de la cellulose nécessite la coopération de trois types d'enzymes : les endoglucanases, les exoglucanases et les β -glucosidases (Figure 21).

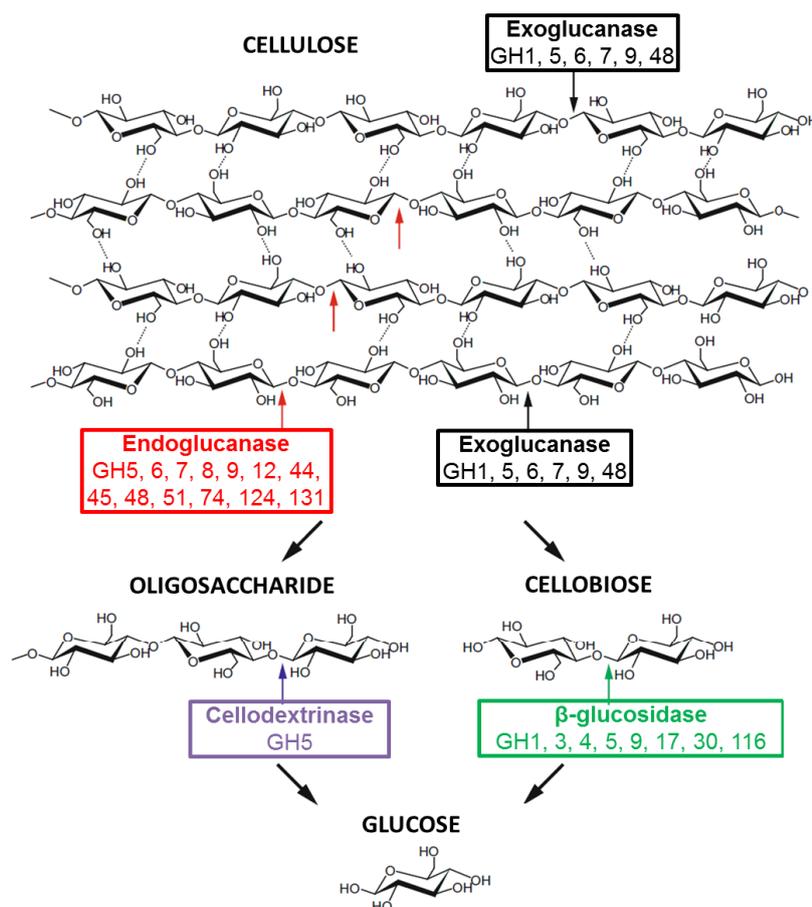


Figure 21 - Activités enzymatiques nécessaires à la dégradation de la cellulose (Yeoman *et al.*, 2010). Les familles de glycosidase (GH) impliquées sont indiquées sous chaque activité enzymatique correspondante.

III.2.2.1. Les endoglucanases

Les endo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.4) facilitent la dégradation de la cellulose, en agissant synergiquement avec les exo- β -1,4-glucanases. Les endoglucanases coupent les polymères de cellulose de manière aléatoire et permettent de déstabiliser les régions cristallines de la cellulose qui pourront être hydrolysées par les exoglucanases. La synergie entre endoglucanases et exoglucanases a particulièrement été mise en évidence lors de la dégradation de la cellulose cristalline qui, par sa structure, ne présente que peu de sites d'attaques enzymatiques. L'action conjointe d'au moins deux enzymes, provenant du même organisme ou non, qui attaquent deux régions différentes de la cellulose, permet ainsi d'accélérer la dégradation de la cellulose cristalline (Qi *et al.*, 2007). Les endoglucanases sont retrouvées dans un grand nombre de familles de glycoside hydrolases, incluant les GH5-9, 12, 44, 45, 48, 51, 74 et 124 (<http://www.cazy.org/>).

III.2.2.2. Les exoglucanases (ou cellobiohydrolases)

Les exo- β -1,4-glucanases (EC 3.2.1.176 et EC 3.2.1.91) sont également significativement importantes dans les systèmes cellulolytiques car elles produisent en grande partie du cellobiose utilisable par les β -glucosidases qui sont les derniers maillons de la dégradation de la cellulose. Ces enzymes sont avant tout retrouvées dans les familles GH6, 7, 9 et 48 mais aussi dans la famille GH5 (<http://www.cazy.org/>). Les exo- β -1,4-glucanases agissent de manière processive, elles se déplacent le long des chaînes de cellulose à partir d'une des extrémités et relarguent du cellobiose au fur et à mesure de leur avancée. Les enzymes des familles GH6 et GH7 hydrolysent spécifiquement la cellulose à partir des extrémités non-réductrices et réductrices respectivement (Boisset *et al.*, 2000 ; Divne *et al.*, 1998) tandis que certaines GH48 sont capables d'agir indifféremment à partir des extrémités réductrices et non-réductrices (Irwin *et al.*, 2000 ; Sánchez *et al.*, 2003).

III.2.2.3. Les cellodextrinases et les glucosidases

Les cellodextrinases (EC3.2.1.74) génèrent à partir de cellodextrines (oligosaccharides composés de 3 à 7 unités de glucose) du cellobiose ou du cellotriose. Les β -1,4-glucosidases (EC3.2.1.21) convertissent la cellodextrine et le cellobiose en glucose. Ces enzymes sont retrouvées dans les familles GH1, 3, 5, 9, 30 et 116 (<http://www.cazy.org/>). Les glucosidases

sont généralement associées à la régulation du processus cellulolytique en permettant d'éliminer le cellobiose connu pour son effet inhibiteur sur les activités endo- et exo-glucanases (Bok *et al.*, 1998 ; Kruus *et al.*, 1995).

III.2.2.4. Familles de glycoside hydrolases d'intérêt pour la cellulolyse

III.2.2.4.1. La famille GH5

La famille GH5 est l'une des plus grandes familles de glycoside hydrolases. Il s'agit de la première famille de cellulases décrites et est historiquement connue sous le nom de « cellulases de la famille A » (Henrissat *et al.*, 1989). La famille GH5 regroupe une large variété d'activités enzymatiques représentées par près de 20 codes EC incluant essentiellement des glucanases à large spécificité (endoglucanases ou cellobiohydrolases coupant les liaisons β -1,3, β -1,4 ou β -1,6) mais aussi des mannanases, des mannosidases, des xylanases et des licheninases (<http://www.cazy.org/>). Les enzymes de la famille GH5 sont fréquemment identifiées en abondance dans les génomes et les études métagénomiques. Cette famille a été récemment reclassée en 51 sous-familles par une approche phylogénétique (Aspeborg *et al.*, 2012). Les endo- β -1,4-glucanases sont particulièrement retrouvées dans la plus grande sous-famille, la sous-famille GH5_2 dont beaucoup d'enzymes présentes ont été caractérisées et sont pour la plupart des cellulases strictes associées à des modules CBM et dockérines, indiquant leur possible intégration dans des structures celluloso-males. Les endoglucanases sont également retrouvées dans les sous-familles GH5_1, dont les représentants sont également multimodulaires, GH5_4, qui regroupe des enzymes extracellulaires, sans CBM, de bactéries et quelques champignons et protozoaires ruminiaux, et GH5_5, cette dernière étant la plus grande sous-famille monospécifique. Des activités cellodextrinases sont également retrouvées dans la famille GH5_52.

III.2.2.4.2. La famille GH9

La famille GH 9 est la seconde plus grande famille de cellulases et est largement représentées à travers l'évolution puisqu'elle est retrouvée aussi bien chez les métazoaires, les plantes, les champignons et les bactéries (Davison et Blaxter, 2005). Elle contient presque exclusivement des cellulases, en particulier des endoglucanases, dont peu sont processives, et des cellobiohydrolases. Toutes les endoglucanases processives identifiées présentent un module

CBM3c fusionné en position C-terminale du domaine catalytique qui permet une solide fixation de l'enzyme à la cellulose (Gilad *et al.*, 2003). La plupart des microorganismes cellulolytiques présentent plusieurs copies de gènes codant des GH9 et un grand nombre de cellulases de la famille GH9 a également été retrouvé dans des structures cellulosomales. Chez *Clostridium cellulovorans*, l'analyse de quatre GH9 cellulosomales a montré que leur mode d'action était différent, de même que leurs produits de dégradation, ce qui suggère que l'intégration de différentes cellulases GH9 dans le cellulosome pourrait avoir un intérêt dans l'optimisation de la dégradation de la cellulose (Arai *et al.*, 2006).

III.2.2.4.3. La famille GH48

Les membres de la famille GH48 sont en particulier associés à des activités endo- β -1,4-glucanase et cellobiohydrolases. Cette famille semble être un élément clé des cellulosomes (Sukharnikov *et al.*, 2012) puisque qu'elle a été retrouvée dans tous les systèmes cellulosomaux décrits à ce jour. Chaque microorganisme contient généralement une copie d'un gène codant une cellulase GH48 alors que les gènes codant les cellulases GH5 et GH9 sont souvent présents en plus grand nombre de copies. Il a cependant été montré récemment que les gènes de GH48 sont présents en grand nombre de copies chez les champignons du rumen (Youssef *et al.*, 2013). Le rôle prépondérant des GH48 dans l'efficacité de dégradation de la cellulose par les cellulosomes a été mis en évidence par des expériences de knock-out. En effet, la délétion des gènes codant les GH48 du cellulosome de *Clostridium thermocellum* a mené à une diminution significative de l'efficacité de dégradation de la cellulose (Olson *et al.*, 2010) tandis que la délétion du gène de la GH48 de *Ruminococcus albus* a conduit à une quasi abolition de l'activité cellulase (Devillard *et al.*, 2004). Par ailleurs, les cellulases GH48 agissent toujours en synergie avec les cellulases de la famille GH9, ce qui augmente de manière importante leur activité hydrolytique (Irwin *et al.*, 2000).

III.2.3. DEGRADATION DES XYLANES ET ENZYMES XYLANOLYTIQUES

La conversion des xylanes en monosaccharides xylose, arabinose et acide glucuronique assimilables par les microorganismes nécessite l'action coordonnée de plusieurs enzymes. Certaines agissent sur la chaîne principale (β -1,4-xylanase et xylosidase) tandis que d'autres décrochent les substituants (glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, estérases) (Figure 22).

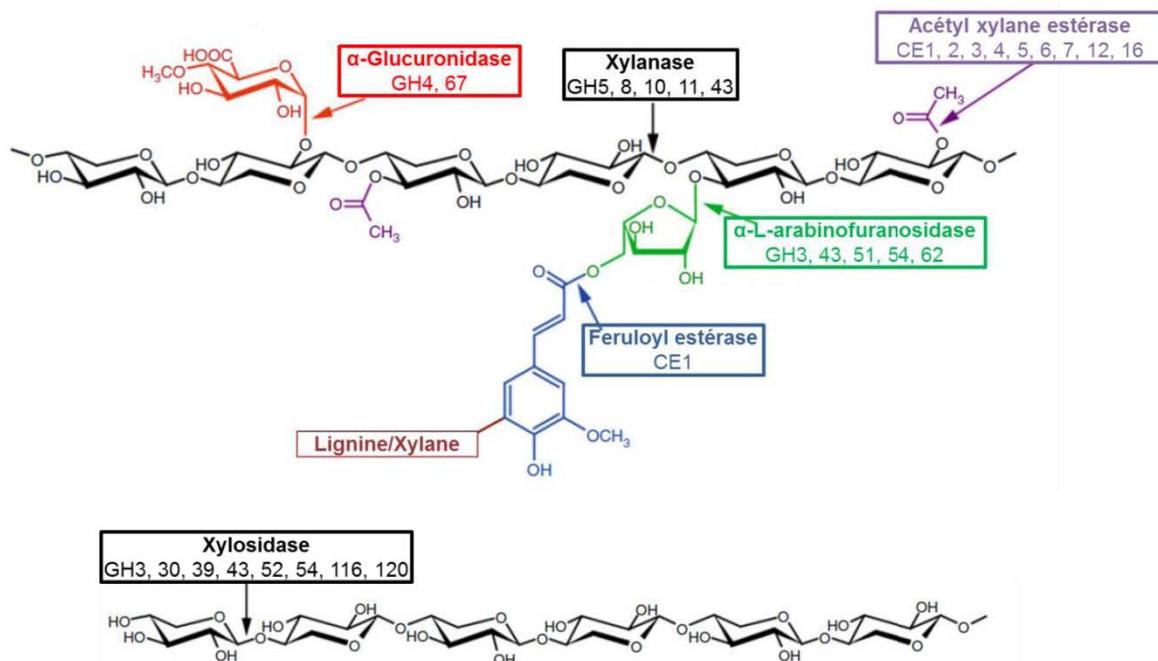


Figure 22 - Activités enzymatiques nécessaires à la dégradation complète des xylanes (Yeoman *et al.*, 2010). Les familles de glycoside hydrolases (GH) et de carbohydrate estérases (CE) impliquées sont indiquées sous chaque activité enzymatique correspondante.

III.2.3.1. Les xylanases

Les xylanases ou endo-1,4- β -xylanases (EC 3.2.1.8) sont d'une importance critique dans la dégradation des xylanes car elles coupent les liaisons internes β -1,4 de la chaîne principale des xylanes. Les enzymes dont l'activité xylanase a été démontrée sont retrouvées dans les familles GH5, 8, 10, 11 et 43.

III.2.3.1.1. Les glycoside hydrolases GH10 et GH11

Les xylanases des familles GH10 et GH11 sont les xylanases les mieux étudiées. La famille GH10 comprend des endo-xylanases- β -1,4, en majorité, et des endo-xylanases- β -1,3. Les xylanases de cette famille dégradent les xylanes mais aussi les substrats cellulotiques de faible masse moléculaire comme les aryl-cellobiosides et les cello-oligosaccharides. La famille GH11 est quant à elle monospécifique et ne contient que des xylanases qui sont par ailleurs considérées comme de « vraies xylanases » en ne dégradant que des substrats contenant du D-xylose. Les xylanases de la famille GH11 sont plus actives que les GH10 sur les longues chaînes de xylooligosaccharides (Biely *et al.*, 1997) et leurs produits d'hydrolyse de grande taille peuvent constituer un substrat pour les xylanases de la famille GH10. Le

produit principal d'hydrolyse des xylooligosaccharides par les xylanases GH11 sont des xylobioses et des xylotrioses (Berrin *et al.*, 2007) tandis que les GH10 sont capables de relarguer du xylose comme produit terminal (Charnock *et al.*, 1997). Les substituants présents sur les chaînes de xylane peuvent être reconnus par les xylanases et le degré de substitution des xylanes influence les produits d'hydrolyse des xylanases (Dodd *et al.*, 2010). Les GH11, contrairement aux GH10, ne clivent pas les zones fortement substituées des xylanes (Biely *et al.*, 1997).

III.2.3.1.2. Les glycoside hydrolases GH43

La famille GH43 est polyspécifique : on y retrouve principalement des β -D-xylosidases qui coupent les résidus xylobiose libérés par les endoxylanases, ainsi que des endo- α -L-arabinanases et des enzymes débranchantes telles que des arabinofuranosidases. Bien que quelques représentants des xylanases GH43 soient présents dans la base de données CAZY, peu de données sur leur mode d'action sont disponibles. La xylanase XynD de *Paenibacillus polymyxa* (Gosalbes *et al.*, 1991) est la seule à avoir été caractérisée et présente une double activité xylanase et α -L-arabinofuranosidase. Cependant, l'interaction de XynD avec les xylanes n'a pas été confirmée par des données structurales, et les GH43 les plus proches en séquence ne présentent pas d'activité xylanase, mais sont des α -L-arabinofuranosidases (Bourgeois *et al.*, 2007). Le nombre élevé de copies de gènes de GH43 (Suen *et al.*, 2011a ; b) dans le génome des microorganismes fibrolytiques laisse cependant penser que cette famille a un rôle important dans la dégradation des polysaccharides pariétaux.

III.2.3.1.3. Les glycoside hydrolases GH5

Les xylanases de la famille GH5 sont retrouvées dans les sous-familles GH5_4 et GH5_21 (Aspeborg *et al.*, 2012). La sous-famille GH5_4 contient peu de xylanases. La sous-famille GH5_21 contient uniquement des endo- β -1,4-xylanases provenant des genres *Prevotella* et *Bacteroides*. Des gènes codant des endoxylanases GH5 ont été plusieurs fois retrouvés dans des clusters Xus, caractéristiques des Bacteroidetes (Dodd *et al.*, 2011). Trois xylanases ont été particulièrement bien caractérisées. PbXyn5A et BiXyn5A sont des endoxylanases strictes tandis que BeXyn5A est une endoxylanase/arabinofuranosidase. Toutes trois hydrolysent les arabinoxylanes en xylooligosaccharides mais le profil de leurs hydrolysats est très différent.

Une synergie entre ces enzymes et PbAra43A, une arabinofuranosidase, a par ailleurs été observée (Dodd *et al.*, 2010).

III.2.3.1.4. Les glycoside hydrolases GH8

La famille GH8 est composée en grande partie de cellulases mais elle contient aussi des chitosanases, licheninases, exo-oligoxylanases et endo- β -1,4-xylanases. Seulement 5 endo-xylanases GH8 ont été identifiées et caractérisées ; elles proviennent de *Bacillus sp.* KK-1, *Glaciecola mesophila* KMM241, *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAH3A, de bactéries non cultivées environnementales ou provenant du tube digestif de lépidoptère. Ces xylanases sont toutes des endo-xylanases strictes et ne présentent aucune activité β -glucanase. Certaines dégradent les xylanes en xylotrioses et xylo-tetraoses et sont plus actives sur les longues chaînes de xylooligosaccharides (Collins *et al.*, 2002 ; Brennan *et al.*, 2004 ; Guo *et al.*, 2013a) tandis que d'autres hydrolysent sélectivement les xylo-tetraoses et les xylo-pentaoses pour produire des xylotrioses (Lee *et al.*, 2006).

III.2.3.2. Xylosidases et enzymes débranchantes

Les **xylosidases** (EC 3.2.1.37) hydrolysent la chaîne principale de xylose tandis que les **α -L-arabinofuranosidases** (EC 3.2.1.55) décrochent les résidus α -L-arabinofuranoses branchés sur les xyloses. Ces enzymes sont essentiellement retrouvées dans la famille GH43. Les α -L-arabinofuranosidases de cette famille présentent un large spectre de spécificité pour les substrats contenant de l'arabinose, comme les arabinoxylanes et sont capables d'hydrolyser les liaisons α -1,2 et/ou α -1,3 ou α -1,5 entre les résidus arabinosyl et xylosyl de la chaîne principale d'oligo- et polysaccharides à partir de l'extrémité non réductrice. A titre d'exemple, XynD de *Bacillus subtilis* retire spécifiquement les groupements arabinofuranoses branchés au squelette de xylose par des liaisons α -1,2 ou α -1,3 (Bourgois *et al.*, 2007) tandis que AXHd3 de *Bifidobacterium adolescentis* retire les arabinofuranoses liés en α -1,3 des xylanes dont les résidus xylose sont substitués à la fois en α -1,2 et α -1,3 par des arabinoses (van den Broek *et al.*, 2005). D'autres arabinofuranosidases sont des exo- α -1,5-L-arabinanases (Matsuo *et al.*, 2000). Les arabinofuranosidases sont aussi retrouvées dans les familles GH3, 51, 54 et 62, et les xylosidases dans les familles GH3, 30, 39, 52, 54, 116 et 120 (<http://www.cazy.org/>). Des enzymes bifonctionnelles, affichant à la fois des activités β -

D-xylosidase et α -L-arabinofuranosidase sont retrouvées chez de nombreuses espèces, et dans les familles GH3, GH30, GH43, GH51 et GH54. SXA de *Selenomonas ruminantium*, enzyme bifonctionnelle appartenant à la famille GH43, a ainsi révélé une forte activité d'hydrolyse des xylooligosaccharides (Jordan et Li, 2007).

Les **α -glucuronidases** (EC 3.2.1.131) décrochent les ornements d'acide glucuronique branchés sur les xyloses de la chaîne principale. Ces enzymes appartiennent aux familles GH4 et 67, cette dernière étant exclusivement composée d' α -glucuronidases. Ces enzymes clivent la liaison α -1,2 entre un acide glucuronique branché au xylose terminal de l'extrémité non-réductrice des xylo-oligosaccharides. Elles sont incapables d'agir dans les régions internes des xylanes (Bronnenmeier *et al.*, 1995). L'action préalable de xylanases est donc nécessaire à la mise à disposition de substrats pour ces enzymes.

III.2.3.3. Les carbohydate estérases

Les groupes acétyl présents sur les chaînes de xyloses peuvent affecter la capacité des xylanases et des α -glucuronidases pour se fixer et hydrolyser leur substrat. De même, les groupements d'acides féruliques et coumariques qui peuvent être liés covalamment aux lignines ou à d'autres xylanes peuvent limiter significativement l'hydrolyse des xylanes. De ce fait, beaucoup de microorganismes xylanolytiques produisent des carbohydate estérases impliquées dans le débranchement de ces groupements. Sur les seize familles identifiées dans CAZy, douze contiennent des enzymes impliquées dans la dégradation des polysaccharides pariétaux comme les xylanes, les pectines et les rhamnogalacturonanes. Les **féruloyl estérases** (EC 3.1.1.73) et les **acétyl xylane estérases** (EC 3.1.1.72), plus spécifiquement impliquées dans la dégradation du xylane, sont retrouvées dans les familles CE1 et CE1 à 7, 12 et 16 respectivement (<http://www.cazy.org/>). Elles ont une action synergique avec les autres hémicellulases (Faulds *et al.*, 2006 ; Gottschalk *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011) et ont un rôle très important dans la dégradation des fibres végétales en permettant de dissocier la lignine des hémicelluloses. Elles facilitent ainsi l'accès de nombreuses enzymes aux chaînes principales de polysaccharides complexes comme les pectines et les hémicelluloses.

III.2.4. ORGANISATION DES SYSTEMES FIBROLYTIQUES

Alors que la plupart des microorganismes fibrolytiques aérobies secrètent une grande quantité d'enzymes essentiellement libres, il semble que les microorganismes anaérobies aient opté

pour une stratégie moins coûteuse en énergie et plus compétitive, par la production de complexes multi-enzymatiques ancrés à la membrane qui peuvent être distingués selon deux types : les cellulosomes et les systèmes Sus-like.

III.2.4.1. Chez les ruminocoques et les champignons : les cellulosomes

Les cellulosomes sont des complexes multi-enzymatiques de haute masse moléculaire, ancrés à la membrane externe, qui permettent une activité synergique, localisée, de plusieurs enzymes fibrolytiques (Figure 23) (Bayer *et al.*, 2004). Ils offrent ainsi une efficacité de dégradation optimale de la cellulose et des hémicelluloses des parois végétales. La sous-unité non catalytique centrale, la protéine « scaffoldine », ou protéine d'échafaudage, sert à l'assemblage de la structure cellulosomal. Elle comporte un ou plusieurs modules cohésines qui par interaction avec des domaines dockérines de cellulases ou de xylanases permettent l'incorporation de ces enzymes au complexe. La protéine d'échafaudage contient souvent des modules CBM qui permettent d'ancrer le cellulosome aux polysaccharides pariétaux et ainsi de maintenir le microorganisme et les enzymes hydrolytiques proches de leur substrat.

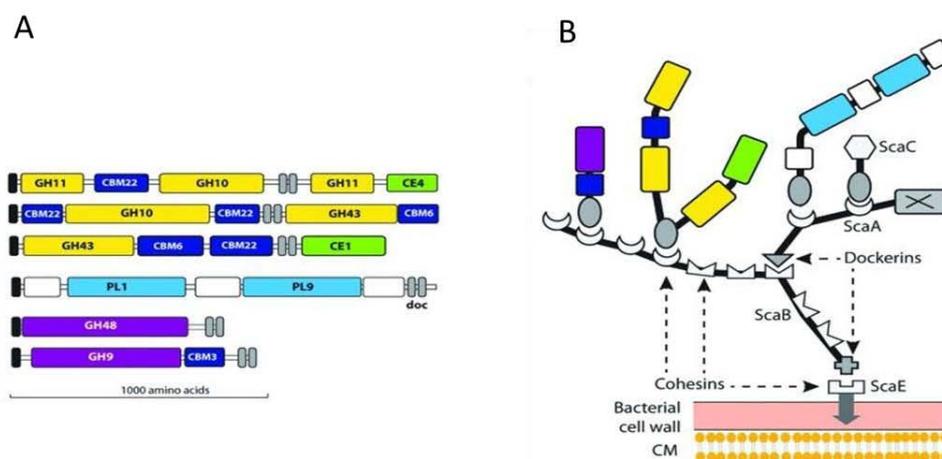


Figure 23 – Structure de 6 polysaccharidases cellulosomales de *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (A) et leur association en cellulosome (B).

scaE, scaB, scaA et scaC sont des protéines d'échafaudage codées par un cluster unique. La flèche indique l'attachement de la structure à la membrane (Flint *et al.*, 2012).

Les cellulosomes ont été particulièrement bien décrits chez *Ruminococcus flavefaciens*. Le génome de la souche *R. flavefaciens* FD-1 présente 220 gènes codant des protéines associées à des domaines dockérines qui sont potentiellement autant de sous-unités cellulosomales

(Rincon *et al.*, 2010), et de nombreux gènes codant des protéines scaffoldines contenant des domaines cohésines (Rincon *et al.*, 2001). Chez *R. albus*, des domaines dockérines ont été identifiés sur le génome (Suen *et al.*, 2011) et une organisation en complexe multienzymatique de type cellulosome a été proposée (Ohara *et al.*, 2000). Cependant, aucune protéine d'échafaudage n'a été identifiée, et les cellulases GH9 et GH48 majeures de cette bactérie portent un domaine CBM37 et non un domaine dockérine (Rakotoarivonina *et al.*, 2009). La présence d'un cellulosome chez *R. albus* reste donc à démontrer. Les champignons ruminiaux du genre *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Orpinomyces* produisent également des cellulosomes (Bayer *et al.*, 2008 ; Fontes et Gilbert, 2010).

III.2.4.2. Chez les Bacteroidetes : le système Sus-like

Chez les Bacteroidetes, des loci génétiques appelés PULs (Polysaccharide Utilization Loci) ont été mis évidence. Ceux-ci contiennent des gènes qui codent pour des systèmes multiprotéiques associés à la membrane et spécifiques d'un polysaccharide. Ce système a été initialement caractérisé chez *Bacteroides thetaiotaomicron* qui est une espèce amylolytique majeure du colon humain et a d'abord été appelé système Sus pour Starch utilization system. Un système analogue « Xus » pour Xylan utilization system a aussi été mis en évidence pour l'utilisation du xylane chez les Bacteroidetes xylanolytiques. Une organisation du système Xus a été proposée pour *Prevotella bryantii* pB₁₄ (Figure 24).

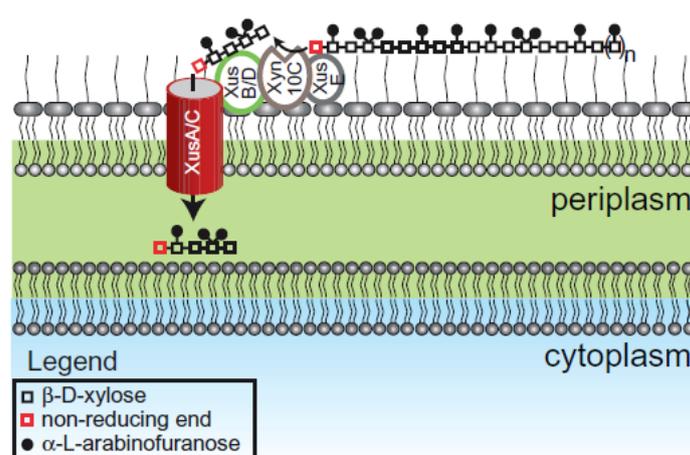


Figure 24 – Modèle du système Xus de *Prevotella bryantii* B₁₄ (Dodd *et al.*, 2010).

Le système pourrait être composé d'une endoglucanase (Xyn10C) qui clive le xylane en oligosaccharides qui sont ensuite pris en charge par XusB/D jusqu'à un transporteur XusA/C

qui va permettre d'internaliser le produit d'hydrolyse (Dodd *et al.*, 2010). Le système Xus permettrait ainsi une utilisation optimale des produits de dégradation des xylandes.

De nombreux systèmes PULs ont été mis en évidence chez différentes bactéries appartenant aux Bacteroidetes pour l'hydrolyse de la cellulose, des pectines, des mucines, etc. (Flint *et al.*, 2012), suggérant que ce système est très répandu dans ce phylum.

III.2.4.3. *Fibrobacter succinogenes* : une stratégie atypique ?

Fibrobacter succinogenes produit peu de cellulases libres (Groleau et Forsberg, 1981) et elle nécessite son adhésion aux polysaccharides, notamment la cellulose, pour les dégrader efficacement (Gong et Forsberg, 1989). Aucun domaine de type scaffoldine ou dockérine n'a été retrouvé dans son génome, suggérant que ses enzymes ne sont pas organisées en cellulosome (Suen, Weimer, *et al.*, 2011). Sa forte efficacité de dégradation de la cellulose cristalline (Halliwell et Bryant, 1963), l'absence de CBM associés aux cellulases et d'endoglucanases processives (Suen, Weimer, *et al.*, 2011) pourtant requises par les autres microorganismes suggèrent que *F. succinogenes* utilise un mécanisme de dégradation de la cellulose différent de ceux décrits à ce jour. Sa stratégie enzymatique reste encore incertaine et plusieurs modèles de dégradation de la cellulose ont été proposés (Suen *et al.*, 2011b ; Ransom-Jones *et al.*, 2012). Entre autres, Ransom-Jones *et al.* ont proposé un modèle se rapprochant des systèmes PULs.

III.2.5. REPERTOIRE ENZYMATIQUE DES MICROORGANISMES FIBROLYTIQUES

Le rôle prépondérant des microorganismes fibrolytiques dans le fonctionnement des écosystèmes digestifs a conduit au séquençage de leur génome afin de répertorier leur équipement enzymatique. L'analyse de leur génome a ainsi mis en évidence la présence de plus d'une centaine de GH et de CE (Tableau 7), suggérant la production d'un véritable cocktail d'enzymes. Il apparaît donc qu'un nombre relativement restreint de CAZymes a été caractérisé biochimiquement par rapport au répertoire enzymatique que possèdent les microorganismes fibrolytiques. Par ailleurs, en comparaison avec des microorganismes non fibrolytiques comme *Escherichia coli* K-12 *ssp.* MC4100 qui ne possède que 38 GH, le répertoire de CAZymes des microorganismes fibrolytiques apparaît totalement adapté à leur niche écologique.

Tableau 7 - Souches microbiennes fibrolytiques, ruminales et coliques, séquencées et occurrence des gènes codant des glycoside hydrolases (GH) et des carbohydrate estérases (CE) identifiés dans leur génome. Le nombre de familles de GH et de CE est indiqué entre parenthèses. ND, Non déterminé.

Microorganisme	Compartiment digestif d'origine	Référence	Nombre de	
			GH	CE
Bactérie				
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	Rumen	Suen <i>et al.</i> , 2011b	98 (28)	17 (6)
<i>Ruminococcus albus</i> 7	Rumen	Suen <i>et al.</i> , 2011a	98 (36)	18 (7)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> FD-1	Rumen	Berg Miller <i>et al.</i> , 2009	101 (25)	8 (ND)
<i>Prevotella bryantii</i> B ₁₄	Rumen	Purushe <i>et al.</i> , 2010	107(ND)	19 (ND)
<i>Prevotella ruminicola</i> 23	Rumen	Purushe <i>et al.</i> , 2010	133 (42)	19 (9)
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> 16/4	Colon homme	Pajon <i>et al.</i> , 2010	75 (26)	3 (2)
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> XB1A	Colon homme	Pajon <i>et al.</i> , 2013	228 (51)	17 (8)
Champignon				
<i>Orpinomyces</i> sp. C1A	Rumen	Youssef <i>et al.</i> , 2013	357(26)	92 (3)

Ceux-ci semblent également comporter un répertoire enzymatique en accord avec les capacités hydrolytiques observées expérimentalement (Weimann *et al.*, 2013).

III.2.5.1. Répertoire enzymatique des bactéries fibrolytiques

Afin d'illustrer au mieux le répertoire enzymatique des bactéries fibrolytiques, nous nous appuyons uniquement sur les bactéries pour lesquelles l'ensemble des CAZymes est répertorié dans la base de données CAZy. La bactérie *Bacteroides xylanisolvens*, isolée du colon humain et caractérisée au laboratoire (Chassard *et al.*, 2008 ; Mirande *et al.*, 2010a), est également présentée afin de montrer que l'équipement des bactéries fibrolytiques tient plus à leur niche écologique qu'à l'hôte qui les héberge.

III.2.5.1.1. Données génomiques

Fibrobacter succinogenes et *Ruminococcus albus* qui sont connues pour leur forte activité cellulolytique présentent un nombre important de cellulases avec 31 et 30 occurrences respectivement et une forte représentation des familles GH5 et GH9 (Figure 25A).

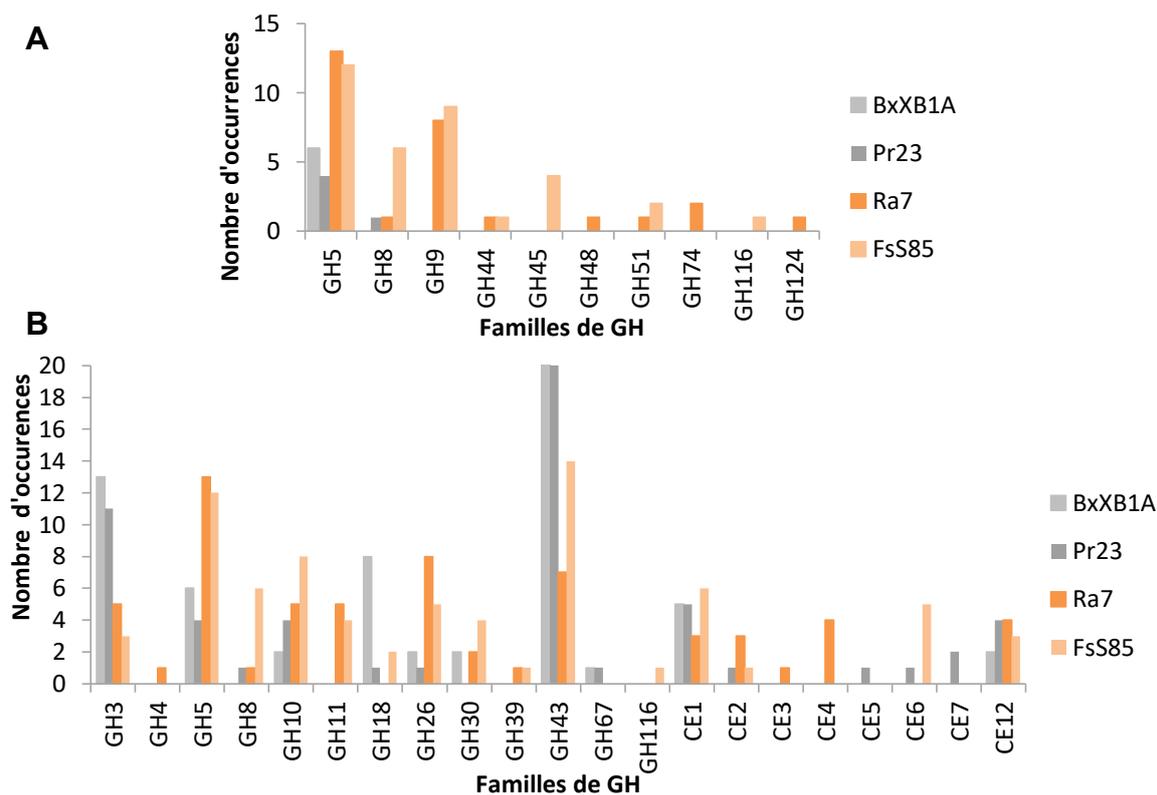


Figure 25 - Occurrences des familles de GH impliquées dans la dégradation de la cellulose (A) et des xylanes (B) chez les bactéries *Bacteroides xylanisolvens* XB1A (BxXB1A), *Prevotella ruminicola* 23 (Pr23), *Ruminococcus albus* 7 (Ra7) et *Fibrobacter succinogenes* S85 (FsS85).

Certaines familles de GH sont communes tandis que d'autres sont spécifiques de chaque bactérie. *F. succinogenes* qui est particulièrement active sur la cellulose cristalline possède des cellulases appartenant aux familles GH8 et GH45 qui pourraient être liées à cette spécificité. Elle ne possède pas de GH48 mais des GH9 processives pourraient avoir la même fonction. Chez *R. albus*, on retrouve une exoglucanase GH48 dont le rôle important a été suggéré dans l'activité des cellulosomes. *A contrario*, *Bacteroides xylanisolvens* et *Prevotella ruminicola*, essentiellement hémicellulolytiques, ne présentent que peu de GH impliquées dans la cellulolyse. Ces bactéries, toutes quatre capables d'hydrolyser les xylanes, présentent également une variété de GH impliquées dans la dégradation de ces polysaccharides (Figure 25B) incluant des endo- et des exo-hémicellulases des familles GH3, 10, 11, et d'une grande quantité de GH43. Les carbohydrate estérases sont représentées par les familles CE1-2, 6 et 12. L'analyse des génomes des microorganismes fibrolytiques présente l'intérêt de mettre en évidence le potentiel hydrolytique de ces microorganismes. Cependant, l'information concernant l'utilisation de ce potentiel n'est accessible qu'avec des données de transcriptomique.

III.2.5.1.2. Données transcriptomiques

(i) *Prevotella bryantii* Pb₁₄

Dans une étude transcriptomique par séquençage menée sur la souche *Prevotella bryantii* Pb₁₄ (Dodd *et al.*, 2010), 57 gènes ont été induits plus de quatre fois lors de la croissance de la bactérie dans un milieu contenant de l'arabinoxylane de blé par rapport à un milieu contenant un mélange de monosaccharides d'arabinose et de xylose comme seules sources de carbone. Parmi ceux-ci, 11 gènes dont la fonction prédite suggère leur implication dans la dégradation du xylane ont été induits et codent pour des endoxylanases (GH10 et 43), des β -xylosidases (GH3 et 43) et des arabinofuranosidases (GH43). De manière intéressante, des gènes impliqués dans la dégradation de polysaccharides autres que les xylandes (arabinanes, cellulose, amidon) ont été réprimés, ce qui indique que la bactérie élabore une réponse transcriptionnelle adaptée au type de substrat disponible.

(ii) *Ruminococcus flavefaciens* FD-1

Contrairement à *Prevotella bryantii* Pb₁₄, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, dont le transcriptome a été étudié par biopuce à ADN (Berg Miller *et al.*, 2009), montre une tout autre régulation des gènes codant les enzymes responsables de la dégradation des polysaccharides complexes. En effet, en culture en milieu cellulose en comparaison d'un milieu cellobiose, des gènes codant des protéines scaffoldines et des cellulases des familles GH5, 8, 9 et 48 ont été particulièrement induits mais ces derniers ne représentent que 25% des gènes surexprimés alors que les gènes codant des enzymes non-cellulolytiques, comprenant entre autres des GH10 et des GH11, représentent 34% des gènes surexprimés. Deux gènes d'hémicellulases sont par ailleurs les plus surexprimés de tous les gènes. Les auteurs expliquent cette réponse transcriptionnelle par le fait que dans son milieu naturel, *Ruminococcus flavefaciens* rencontre rarement de la cellulose pure mais plutôt associée à d'autres polysaccharides pariétaux. La coproduction de cellulases et d'hémicellulases représenterait donc un avantage compétitif qui permettrait de dégrader les hémicelluloses pour mieux dégrader la cellulose. L'étude des mécanismes régulant l'expression de ces gènes permettrait de mieux comprendre ces phénomènes de régulation catabolique.

Ces deux études transcriptomiques montrent que la réponse transcriptionnelle des deux bactéries est très complexe. Bien qu'elles présentent un grand répertoire enzymatique, il

semble que seule une petite partie soit recrutée pour la dégradation des substrats testés. La redondance des gènes d'enzymes fibrolytiques, qui comme on a pu le voir précédemment présentent des spécificités différentes à l'intérieur d'une même famille de GH, pourrait présenter un avantage sélectif et compétitif.

III.2.5.2. Répertoire enzymatique des *Neocallimastigomycota*

III.2.5.2.1. Données génomiques

Les *Neocallimastigomycota* sont considérés comme de véritables spécialistes de la fibrolyse, et particulièrement de la cellulose et des xylanes, principales hémicelluloses des fourrages des ruminants. Chez le champignon *Orpinomyces sp. C1A*, 133 gènes de cellulases essentiellement représentées par les GH5, 6 et 48, ainsi que 222 gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes, représentées par les GH3, 10, 11, 43 et CE1 ont été retrouvés dans son génome (Youssef *et al.*, 2013) (Figure 26).

Cette grande quantité d'enzymes putatives corrèle avec leur forte activité cellulolytique et hémicellulolytique observée *in vitro*. Parmi les glycosides hydrolases identifiées, 108 sont associées à un domaine dockérine qui pourrait intervenir dans l'élaboration de cellulosomes.

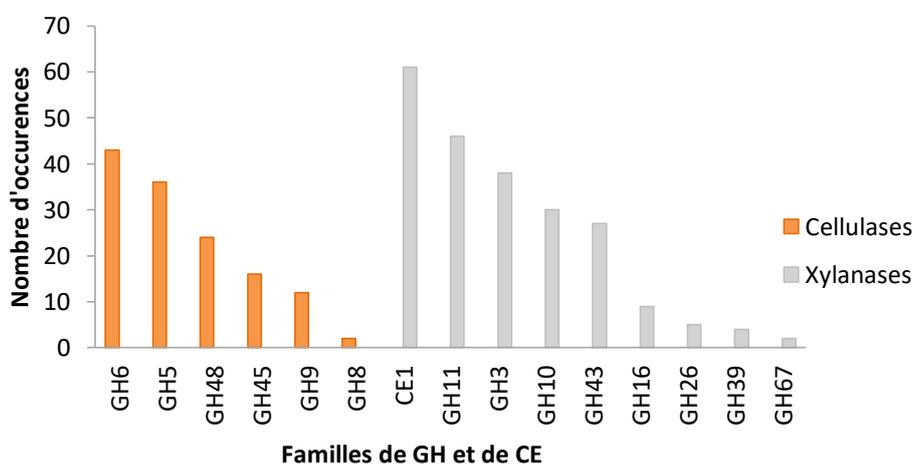


Figure 26 - Occurrences des familles de GH impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes chez *Orpinomyces sp. C1A*.

III.2.5.2.2. Données transcriptomiques

Une étude transcriptomique par séquençage menée sur ce même champignon (Youssef *et al.*, 2013) a montré que les gènes codant les cellulases GH5 et les cellobiohydrolases GH9 et 48

étaient les gènes dont l'expression était la plus induite au cours de sa croissance dans un milieu riche en cellulose microcristalline par rapport à un milieu riche en cellobiose. Ceci suggère donc leur rôle important dans la dégradation de ce type de substrat. Toutefois, de manière inattendue, les gènes codant les xylanases GH10 et GH11, les chitinases GH18 et les mannosidases GH26 ont également été induits significativement. En corroborant les données obtenues avec la souche *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, il semble que ce champignon tire un avantage sélectif à la coproduction de cellulases et d'hémicellulases.

III.2.5.3. Répertoire enzymatique des protozoaires fibrolytiques

L'équipement enzymatique des protozoaires ruminiaux a été longtemps peu investigué du fait de l'impossibilité de les maintenir dans des conditions axéniques. Jusqu'à la fin des années 1990, l'activité fibrolytique des protozoaires a été hypothétiquement attribuée à la présence de bactéries intracellulaires du fait de ne pas avoir pu mettre en évidence des gènes codant des cellulases ou des xylanases. Par la suite, des études par clonage moléculaire ont permis d'isoler et de caractériser un certain nombre de gènes codant des enzymes appartenant aux familles GH5, 10 et 11 (Takenaka *et al.*, 1999 ; Devillard *et al.*, 2003 ; Béra-Maillet *et al.*, 2005). Une banque ESTs (Expressed Sequence Tags) a également permis de mettre en évidence 12 xylanases et 9 cellulases (GH5 et 9), toutes appartenant aux Entodiniomorphidés. Aucun domaine scaffoldine ou dockérine n'a été retrouvé dans les séquences de ces protéines (Ricard *et al.*, 2006), indiquant l'absence d'un système cellulosomal. Les particules végétales étant internalisées par le protozoaire, un complexe enzymatique ne semble pas nécessaire. Une autre banque ESTs criblée sur xylane et cellulose a aussi permis d'isoler trois cellulases GH5 et 52 xylanases appartenant aux familles GH10 et 11 (Findley *et al.*, 2011). L'équipement enzymatique des protozoaires entodiniomorphes semble donc comporter un nombre non négligeable de GH impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes. Cependant, aucun génome n'est encore disponible, ce qui représente un obstacle à l'identification de la diversité des GH présentes chez ces protozoaires. Le projet Hungate 1000 (www.hungate1000.org.nz) lancé en 2011 et visant au séquençage de 1000 souches ruminales (bactéries, archées, champignons, protozoaires, virus) devrait permettre de compléter les bases de données de séquences actuellement disponibles et de mieux investiguer les capacités fibrolytiques des microorganismes ruminiaux.

III.2.5.4. Apport des données de métagénomique et métatranscriptomique

L'un des avantages des approches de méta-omiques (métagénomique et métatranscriptomique) est qu'elles permettent de s'affranchir des méthodes culturales et ainsi d'appréhender la diversité totale des équipements enzymatiques des microorganismes d'un environnement donné, avec la modération qu'il s'agit souvent de la diversité des microorganismes dominants.

Les microorganismes fibrolytiques du rumen sont considérés comme les microorganismes mésophiles les plus efficaces dans la dégradation des polysaccharides végétaux (Weimer, 1996) et, parce que la biotransformation des matériaux lignocellulosiques en biofuels fait l'objet d'un intérêt grandissant, de nombreuses études métagénomiques du rumen ont été réalisées dans l'objectif d'identifier de nouvelles enzymes fibrolytiques à haute efficacité pouvant être utilisées dans ce processus biotechnologique (Li *et al.*, 2009). Ainsi pas moins de cinq études métagénomiques portant sur le rumen de vaches (Brulc *et al.*, 2009 ; Hess *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2013) mais aussi de yak (Dai *et al.*, 2012) et de renne (Pope *et al.*, 2012) ont été réalisées depuis 2009. Ces études ont mis en évidence des milliers de glycoside hydrolases et de carbohydrate estérases impliquées dans l'hydrolyse de la cellulose et des hémicelluloses (Tableau 8), la plupart d'origine bactérienne, ce qui démontre une grande diversité d'enzymes produites par le microbiote ruminal. Si l'on s'intéresse en particulier aux études bovines, Hess *et al.* ont mis en évidence le plus grand nombre de GH cellulolytiques et hémicellulolytiques du fait d'un séquençage profond. Ainsi, 1086 β -1,4-endoglucanases (GH5 et GH9 essentiellement), 1477 β -glucosidases et 153 cellobiohydrolases putatives ont été retrouvées dont seulement 1% avaient une identité supérieure à 95% avec les séquences présentes dans la base de données CAZy, ce qui indique que la majorité des séquences identifiées n'avait pas encore été déposée dans les bases de données. Près de 2400 endohémicellulases représentées par les familles GH10, 8 et 26, essentiellement, ont également été retrouvées. De manière intéressante, seules 3 GH48 ont été identifiées. La présence de domaines dockérines et scaffoldines suggère que la stratégie enzymatique des cellulosomes est largement utilisée par le microbiote ruminal. De même, la détection de nombreux gènes *sus* suggère que de nombreuses bactéries présentent des systèmes Sus-like. Aujourd'hui, aucune étude métatranscriptomique, au sens large, n'a encore été réalisée pour étudier l'activité fibrolytique du microbiote ruminal, certainement du fait d'un manque de génomes de référence et de la nécessité d'un séquençage très profond.

Tableau 8 - Familles de GH identifiées dans les métagénomés de rumen de vaches, renne et yak (modifié, d'après Wang *et al.*, 2013). NR : non reporté

Familles de GH	Vache ⁽¹⁾		Vache ⁽²⁾	Vache ⁽³⁾	Renne ⁽⁴⁾	Yak ^{(5)*}
	Phase liquide	Phase solide				
Cellulases						
GH5 (cellulases)	7	7	1451	24	287	1302(12)
GH6 (endoglucanase)	NR	NR	0	1	0	0(0)
GH7 (endoglucanase)	NR	NR	1	0	0	0(0)
GH9 (endoglucanase)	7	6	795	8	109	767(7)
GH44 (endoglucanase)	0	0	99	0	5	0(0)
GH45 (endoglucanase)	NR	NR	115	0	0	13(1)
GH48 (cellobiohydrolases)	0	1	3	0	5	32(0)
Total	14	14	2464	33	406	2114(20)
Endo-hémicellulases						
GH8 (endoxyanase)	8	2	329	0	35	174(6)
GH10 (endo-1,4- β -xylanases)	10	5	1025	35	190	2664(14)
GH11 (xylanases)	2	1	165	0	8	244(0)
GH12 (xyloglucanases)	NR	NR	0	1	0	0(0)
GH26 (β -mannanase & xylanase)	2	5	369	1	153	537(9)
GH28 (galacturonases)	9	3	472	0	120	244(4)
GH53 (endo-1,4- β -galactanases)	15	17	483	18	125	1066(5)
Total	46	33	2843	55	631	4929(38)
Xyloglucanases						
GH16 (xyloglucanases)	0	1	483	0	116	563(2)
GH74 (xyloglucanases)	0	0	385	0	44	0(2)
Total	0	1	868	0	160	563(4)
Enzymes débranchantes						
GH51 (α -L-arabinofuranosidases)	73	61	1249	1	488	0(9)
GH54 (α -L-arabinofuranosidases)	0	1	76	0	23	111(1)
GH62 (α -L-arabinofuranosidases)	NR	NR	1	0	0	0(0)
GH67 (α -glucuronidases)	NR	NR	120	0	74	1090(2)
GH78 (α -L-rhamnosidases)	41	31	1260	13	313	426(7)
Total	114	93	2706	14	898	1627(19)
Oligosaccharidases						
GH1 (β -glucosidases)	7	10	253	10	122	331(1)
GH2 (β -galactosidases)	218	176	1436	16	716	942(13)
GH3 (β -glucosidases)	207	166	2844	48	844	5448(24)
GH29 (α -L-fucosidases)	31	26	939	3	268	899(1)
GH35 (β -galactosidases)	21	9	158	2	39	468(0)
GH38 (α -mannosidases)	22	15	272	1	116	90(1)
GH39 (β -xylosidases)	2	2	315	18	76	159(1)
GH42 (β -galactosidases)	10	12	374	0	95	207(4)
GH43 (arabino/xylosidases)	68	59	2932	28	787	2313(28)
GH52 (β -xylosidases)	0	0	1	0	2	0(0)
Total	586	475	9524	126	3065	10857(73)
Autres domaines associés aux GH						
Cohésines	0		80	0	52	51(0)
Dockérines	8		188	2	92	516(0)
SusC	9		3110	4	1122	NR
SusD	11		1889	3	685	NR
Taille des métagénomés	0,024Gb	0,027 Gb	268Gb	0,28Gb	0,30Gb	9,4Gb (0,3Gb)

(1) Brulc *et al.*, 2009 : séquençage métagénomique shotgun(2) Hess *et al.*, 2011 : séquençage métagénomique shotgun(3) Wang *et al.*, 2013 : séquençage de clones métagénomiques fosmidés sélectionnés pour leur activité(4) Pope *et al.*, 2012 : séquençage métagénomique shotgun(5) Dai *et al.*, 2012 : séquençage de clones métagénomiques BAC sélectionnés pour leur activité

* Les chiffres hors des parenthèses correspondent aux données obtenues par séquençage shotgun. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux données obtenues par séquençage de la librairie BAC et sont dérépliquées.

Toutefois une étude « simplifiée » a été réalisée sur des ARN eucaryotes issus de rumen de bœuf musqué (Qi *et al.*, 2011) et a permis de s'intéresser en particulier aux équipements enzymatiques des champignons et des protozoaires ruminiaux, rarement retrouvés dans les métagénomés du fait de leur faible abondance. Cette étude a montré que les champignons et les protozoaires les plus actifs/abondants appartenaient d'une part aux genres *Piromyces*, *Neocallimastix* et *Orpinomyces*, et d'autre part aux genres *Epidinium* et *Entodinium*. Les cellulases ont été principalement retrouvées dans les familles GH5, 6, 9, 45 et 48, et les enzymes hémicellulolytiques principalement dans les familles GH10 et 11 mais aussi GH8, 26 et 53. Les carbohydre estérases ont été essentiellement assignées aux familles CE4 et CE1. De toutes les cellulases et xylanases, les familles GH6, 11, 45 et 48 sont les plus exprimées et pourraient par conséquent avoir un rôle prépondérant dans la dégradation des fibres végétales par les microorganismes eucaryotes.

III.2.6. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES DES ENZYMES FIBROLYTIQUES

Des régulations dans l'expression des gènes codant les systèmes fibrolytiques sont fréquemment retrouvées chez les microorganismes, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes, aérobies ou anaérobies, et quelle que soit leur niche écologique. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas encore très bien connus. Ils incluent en particulier des mécanismes d'induction et de répression catabolique. Trois types de systèmes de régulation spécifiques des PULs des Bacteroidetes ont été mis en évidence : des régulateurs SusR-like, des systèmes hybrides à 2 composants (HTCSs) et des facteurs sigma/anti-sigma de type ECF (ExtraCytoplasmic Function). La protéine SusR a été décrite pour la première fois dans les opérons *susA* et *susBCDEFG* de *Bacteroides thetaiotaomicron*. SusR est une protéine membranaire, composée d'un domaine senseur périplasmique et d'un domaine de fixation à l'ADN localisé dans le cytoplasme. En présence d'amidon, la protéine SusR se fixe au promoteur des gènes *sus* organisés en opéron et active leur expression (D'Elia et Salyers, 1996). Les HTCSs sont des protéines chimériques présentant toutes les caractéristiques classiques des systèmes à deux composants en un seul polypeptide. Ils sont composés d'un domaine transmembranaire histidine kinase senseur et d'un domaine de fixation à l'ADN régulateur de réponse, fusionnés à un domaine périplasmique senseur d'hydrates de carbone (Sonnenburg *et al.*, 2006). Le dernier système de régulation fait intervenir des facteurs sigma et anti-sigma présentant deux domaines connectés par un linker transmembranaire. Les

domaines périplasmiques des facteurs anti-sigma interagissent avec des porines SusC-like spécifiques d'hydrates de carbone tandis que les domaines cytoplasmiques interagissent avec des facteurs sigma ECF congruents. En présence de l'oligosaccharide correspondant, les facteurs de transcription sigma sont relargués et activent les opérons régulés (Martens *et al.*, 2009b). Les gènes codant tous ces régulateurs transcriptionnels sont toujours adjacents à des paralogues des gènes codant les protéines de fixation des hydrates de carbone SusC/D ou de GH (Martens *et al.*, 2009a). Ces trois systèmes de régulation partagent un même principe selon lequel ils s'étendent à travers la membrane cytoplasmique pour percevoir le contenu en oligosaccharides disponibles et leurs liaisons glycosidiques avant d'être totalement dégradés (Martens *et al.*, 2009a). Ces systèmes sophistiqués permettent ainsi à la bactérie d'élaborer une réponse transcriptionnelle spécifique à certains oligosaccharides en induisant l'expression des opérons correspondants. D'autres mécanismes de régulation sont impliqués chez les bactéries productrices de cellulosomes. Bien que la production de cellulosomes soit constitutive (Bayer *et al.*, 1985), il a été montré chez *Clostridium cellulolyticum* que leur composition en enzymes était adaptée au substrat disponible (Blouzard *et al.*, 2010). L'expression des gènes codant les sous-unités cellulosomales est soumise à plusieurs types de régulation. La répression catabolique de l'opéron *cip-cel* qui code pour des composants clés des cellulosomes (protéine d'échafaudage CipC et enzymes cellulolytiques) implique la combinaison de plusieurs régulateurs (Abdou *et al.*, 2008) et plusieurs systèmes à deux composants sont impliqués (Xu *et al.*, 2013). Il a également été montré que la maturation différentielle de l'ARNm primaire de *cip-cel* permettait l'expression fine et individuelle des gènes appartenant à cet opéron (Maamar *et al.*, 2006). Un système de « sensing » original a également été mis en évidence chez *C. thermocellum*. Ce sont des protéines transmembranaires portant des CBM extracellulaires « senseurs » de polysaccharides et un domaine anti-sigma cytoplasmique capable de lier des facteurs sigma alternatifs qui régulent l'expression de différents opérons cellulosomaux (Nataf *et al.*, 2010). En outre, la production d'inhibiteur de protéases permettrait la mise en place et le maintien de la structure des cellulosomes (Xu *et al.*, 2013). Un article récent intègre les différents niveaux de régulation cellulaire pour la dégradation de la cellulose chez *C. cellulolyticum* (Xu *et al.*, 2013), démontrant par cet exemple les multiples régulations qui permettent d'ajuster au mieux la production des enzymes aux substrats présents dans l'environnement bactérien.

Partie IV

FACTEURS MODULANT LA STRUCTURE DU MICROBIOTE RUMINAL ET LEUR ACTIVITE FIBROLYTIQUE

La composition et l'activité fibrolytique du microbiote digestif des bovins sont influencées par divers facteurs, qui ne sont pas forcément indépendants. Ils peuvent être d'ordre abiotique, c'est-à-dire liés aux conditions physico-chimiques du milieu digestif, du substrat ou à la présence de substances chimiques, ou d'ordre biotique, liés à l'animal lui-même ou aux interactions entre microorganismes au sein du microbiote (Tableau 9).

Tableau 9 – Facteurs biotiques et abiotiques influençant la structure des microbiotes digestifs et leur activité fibrolytique (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

<i>Facteurs abiotiques</i>	<i>Facteurs biotiques</i>
- Sécrétions digestives (salive, acides biliaires)	- Génétique de l'animal
- Nature de l'alimentation et structure chimico-physique des fibres	- Physiologie de l'animal (stade de croissance, gestation)
- Conditions physico-chimiques de l'environnement digestif (pH, potentiel redox)	- Physiologie des espèces microbiennes (affinité, préférences de substrat...)
- Antibiotiques	- Interaction entre espèces autochtones (synergie, compétition...)
- Additifs alimentaires, méthanorépresseurs	- Interaction entre espèces autochtones et microorganismes allochtones (probiotiques)

Afin d'illustrer l'effet de ces facteurs sur le microbiote digestif, nous présenterons ici l'exemple d'un facteur abiotique, le régime alimentaire, et d'un facteur biotique, l'apport de levures probiotiques à la ration.

IV.1. FACTEURS ABIOTIQUES : EXEMPLE DU REGIME ALIMENTAIRE

Le régime alimentaire, qui régit la quantité de substrat disponible dans les compartiments digestifs, module la structure et l'activité des microbiotes digestifs à travers de complexes

interactions substrat-microorganismes et microorganismes-microorganismes pouvant aboutir à une modification des conditions physico-chimiques du milieu digestif.

Ainsi, chez le bovin, l'effet du passage d'une ration riche en fourrage à une ration riche en concentré, c'est-à-dire en substrats rapidement fermentescibles comme l'amidon, est particulièrement bien caractérisé du fait des répercussions néfastes sur la santé de l'animal (Plaizier *et al.*, 2008). Les rations riches en amidon sont connues pour créer une perturbation très marquée du microbiote ruminal. Khafipour *et al.* (2009) ont rapporté que la perturbation du microbiote ruminal était observable au niveau du phylum, avec une augmentation du ratio Firmicutes/Bacteroidetes attribuée à une diminution de l'abondance d'espèces du genre *Prevotella* (phylum des Bacteroidetes). Plusieurs études ont également montré une augmentation de l'abondance des bactéries amylolytiques et saccharolytiques productrices de lactate, comme *Streptococcus bovis* et les Lactobacilles, et des bactéries utilisatrices de lactate (*Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*) (Khafipour *et al.*, 2009 ; Nagaraja et Titgemeyer, 2007). L'activité accrue des bactéries productrices de lactate peut conduire à une diminution marquée du pH, à des valeurs non physiologiques qui caractérisent l'acidose ruminale. La population des bactéries cellulolytiques, très sensibles aux pH bas, est ainsi diminuée en condition d'acidose latente et avérée (Tajima *et al.*, 2001 ; Khafipour *et al.*, 2009 ; Mosoni *et al.*, 2007). L'activité cellulolytique est également diminuée (Martin *et al.*, 2001), selon hypothétiquement deux causes : la baisse de l'abondance des bactéries impliquées et la sensibilité des enzymes cellulolytiques aux pH bas conduisant ainsi à une diminution de la vitesse de dégradation des polysaccharides pariétaux. Les modifications de la communauté bactérienne s'accompagnent d'altérations de la population des protozoaires. L'abondance de protozoaires ciliés, qui sont pour la plupart amylolytiques, est augmentée lors de l'apport modéré de concentré (Dennis *et al.*, 1983), mais lorsque la proportion de concentré augmente et que le pH devient inférieur à 5,5, leur population peut fortement diminuer (Khafipour *et al.*, 2009), pouvant aller jusqu'à une défaunation totale (Towne *et al.*, 1990). En effet, les protozoaires, comme les bactéries fibrolytiques, sont très sensibles aux variations de pH (Nagaraja et Titgemeyer, 2007). Le propionate, dont la concentration peut augmenter au cours de l'acidose latente, aurait également un effet toxique sur les protozoaires. Enfin, il a également été observé une diminution de l'abondance voire une disparition transitoire des champignons ruminiaux chez des animaux recevant une ration induisant un pH ruminal bas (Grenet *et al.*, 1989). S'il est clair que le ratio fourrage/concentré a un impact significatif sur la structure du microbiote ruminal, la nature même du fourrage peut également avoir une influence sur celle-ci. Ainsi le microbiote ruminal de vaches ayant reçu des rations contenant

un ratio fourrage/concentré de 45/55, dont seule l'origine des fourrages changeait, présentait plus de *Prevotella* et de *Selenomonas* avec une ration à base de luzerne par rapport à des rations à base de tige de maïs ou d'une herbacée (Zhang *et al.*, 2013). Ceci pourrait être attribué aux différences dans la teneur en polysaccharides pariétaux et leur structure au sein des plantes utilisées. Dans ce sens, selon leur composition en polysaccharides pariétaux, les rations riches en fourrage stimuleraient différenciellement la croissance des microorganismes fibrolytiques, en accord avec leur préférence de substrats. Les champignons ont été retrouvés plus abondants avec des fourrages riches en lignocellulose comme la paille de céréales qu'avec des fourrages verts, généralement moins riches en cellulose et en lignine (Grenet *et al.*, 1989). *Fibrobacter succinogenes*, particulièrement active sur la cellulose cristalline, serait également favorisée par des régimes riches en paille de céréales tandis que *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* le seraient sur des régimes plus riches en cellulose amorphe (Fonty *et al.*, 1995).

Notons que d'autres composants de la ration, comme les additifs alimentaires à base d'huile, sont responsables d'altérations dans la structure du microbiote ruminal qui est observable par une modification des profils fermentaires (Yang *et al.*, 2009 ; Shingfield *et al.*, 2008). Pour exemple, la supplémentation en huile de soja ou en huile de graines de lin, incluses à 4% de la ration, a induit une diminution de l'abondance des bactéries cellulolytiques, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*, et des protozoaires (Yang *et al.*, 2009) qui est généralement associée à une diminution de la digestibilité totale de la ration (Martin *et al.*, 2008). Ceci est attribué à un effet toxique des acides gras polyinsaturés sur ces populations (Martin *et al.*, 2010), utilisés dans le but de réduire la production de H₂ par les protozoaires et en conséquence, la production de méthane par les archées méthanogènes.

IV.2. FACTEURS BIOTIQUES : EXEMPLE DES LEVURES PROBIOTIQUES

IV.2.1. PROBIOTIQUES EN NUTRITION ANIMALE : DEFINITION ET INTERET

En Europe, la réduction drastique du niveau d'incorporation d'oligo-éléments tels que le zinc et le cuivre (règlement CE n° 1334/2003) dans la ration des animaux et l'interdiction en 2006 des promoteurs de croissance antibiotiques (IP/05/1687) ont obligé à rechercher de nouvelles alternatives permettant de garantir la santé animale tout en promouvant les performances

animales et en respectant les contraintes environnementales. Depuis cette date, l'emploi des probiotiques s'est donc considérablement développé et ceux-ci apparaissent aujourd'hui, comme une alternative efficace. Un « probiotique » est défini comme un microorganisme vivant qui, administré en quantité adéquate, exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte (FAO/WHO, 2006). Les probiotiques entrant en alimentation animale sont enregistrés comme additifs zootechniques pouvant « influencer favorablement les performances des animaux en bonne santé » et peuvent être rattachés plus spécifiquement aux groupes fonctionnels : améliorateurs de digestibilité et stabilisateurs de la flore intestinale (règlement CE n°1831/2003).

Chez les animaux de rente, les probiotiques utilisés sont des bactéries, pour la plupart lactiques et souvent présentes dans le tube digestif de l'espèce animale supplémentée, des levures (*Saccharomyces cerevisiae* et *S. boulardii*) et des spores de *Bacillus*. D'une manière générale, l'apport des probiotiques est particulièrement conseillé dans des situations de stress (périodes de sevrage et de post-sevrage, transition alimentaire d'un régime riche en fibres à un régime riche en glucides rapidement fermentescibles, début de lactation, gestation, transport...) qui peuvent conduire à un déséquilibre de la flore digestive et avoir un impact néfaste sur la santé et les performances animales. L'emploi des probiotiques vise à donc rééquilibrer ou maintenir l'équilibre du microbiote digestif dans le sens le plus favorable à l'animal hôte.

IV.2.2. EFFETS ZOOTECHNIQUES D'UNE SUPPLEMENTATION EN PROBIOTIQUES CHEZ LE RUMINANT

De nombreux travaux ont pu mettre en évidence les effets bénéfiques d'une supplémentation en probiotique sur la santé et la production animales, et son intérêt se situe à différents niveaux selon le stade de développement de l'animal et la production à laquelle il est destiné (Tableau 10).

Chez le ruminant adulte, le site d'action visé des probiotiques est le rumen, lieu principal de la digestion microbienne, et chez le jeune ruminant, dont le rumen est encore peu développé, l'effet des probiotiques est également recherché au niveau intestinal. Les effets d'une supplémentation en probiotiques sur la réponse zootechnique sont généralement assez variables selon les expérimentations, allant d'effets positifs à aucun effet. La souche probiotique (Newbold *et al.*, 1995), la dose (Brossard *et al.*, 2007), la durée de la

supplémentation, les conditions sanitaires et le régime alimentaire dispensés sont souvent des paramètres expérimentaux mis en cause.

Tableau 10 – Effets zootechniques visés lors d’une supplémentation en probiotiques en production bovine (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010).

Jeunes ruminants	<ul style="list-style-type: none"> - Favoriser la maturation du microbiote ruminal - Améliorer la sécurité digestive au sevrage - Réduire le risque de colonisation par les pathogènes
Vaches laitières	<ul style="list-style-type: none"> - Augmenter la production et la qualité du lait - Améliorer l’efficacité alimentaire - Améliorer l’état sanitaire (limiter le risque d’acidose ruminale)
Bovins viande	<ul style="list-style-type: none"> - Augmenter le gain de poids - Améliorer l’efficacité alimentaire - Améliorer l’état sanitaire (limiter le risque d’acidose ruminale) - Limiter le portage de pathogènes pour l’homme

IV.2.2.1. Effets chez le jeune bovin

Chez le jeune animal, les probiotiques sont employés dans l’objectif de réduire les problèmes de santé, souvent liés à des infections gastro-intestinales ou respiratoires, premières causes de mortalité et de retard de croissance dans les premiers mois de vie (Windeyer *et al.*, 2013). Plusieurs études ont montré que la supplémentation en bactéries lactiques (*Lactobacillus ssp.*, *Bifidobacterium ssp.*) ou en *S. cerevisiae* permet de diminuer l’incidence des diarrhées et des infections respiratoires chez le jeune bovin (Abe *et al.*, 1995 ; Abu-Tarboush *et al.*, 1996 ; Timmerman *et al.*, 2005 ; Galvão *et al.*, 2005). Des effets positifs sur le gain de poids (Frizzo *et al.*, 2011 ; Galvão *et al.*, 2005) ont également été rapportés.

IV.2.2.2. Effets chez le bovin adulte

Les levures vivantes *Saccharomyces cerevisiae* sont les souches microbiennes les plus largement utilisées chez le bovin adulte. Chez la vache laitière, une méta-analyse réalisée à partir de 14 publications portant sur plus de 1500 vaches ayant reçu une même souche de levure (de Ondarza *et al.*, 2010) a montré que la supplémentation en levures vivantes augmente la production de lait de 1,15 kg/jour. Dans une autre méta-analyse qui s’appuie sur 157 expérimentations portant sur une supplémentation en *S. cerevisiae* (levures vivantes et cultures de levures) chez plusieurs espèces de ruminants laitiers, Desnoyers *et al.* (2009) ont

montré une augmentation de 1,2 g/kg de poids vif, soit 0,75 kg pour une vache de 650 kg. La composition du lait (matière grasse et protéines) est généralement peu ou pas modifiée (de Ondarza *et al.*, 2010 ; Desnoyers *et al.*, 2009). L'ingestion de matière sèche peut être augmentée (Desnoyers *et al.*, 2009) ou non affectée par l'apport de *S. cerevisiae* (de Ondarza *et al.*, 2010). Dans ce dernier cas, il est supposé que la supplémentation en levures vivantes augmente l'efficacité alimentaire comme le suggère l'augmentation de la digestibilité de la matière organique. Chez le bovin à viande, des effets positifs sur le gain de poids quotidien sans augmentation de l'ingestion ont également été observés (Ettle et Schwartz, 2002 ; Erasmus *et al.*, 2009), supportant également l'hypothèse d'une augmentation de l'efficacité alimentaire. D'autres études n'ont cependant pas montré d'effet sur les paramètres de croissance (Mir et Mir, 1994 ; Castillo *et al.*, 2006). L'effet des levures apparaît être le plus marqué dans des conditions à risque, notamment lors de l'ingestion de rations acidogènes, à l'origine de perturbations marquées du microbiote ruminal (Desnoyers *et al.*, 2009).

IV.2.3. MODES D'ACTION DES LEVURES PROBIOTIQUES

Les mécanismes d'action des probiotiques (bactéries et levures) à l'origine des effets positifs sur l'animal ne sont encore que partiellement connus. Toutefois, divers modes d'action ont été proposés (Figure 27). Ils peuvent se superposer et être spécifiques à chaque souche probiotique.

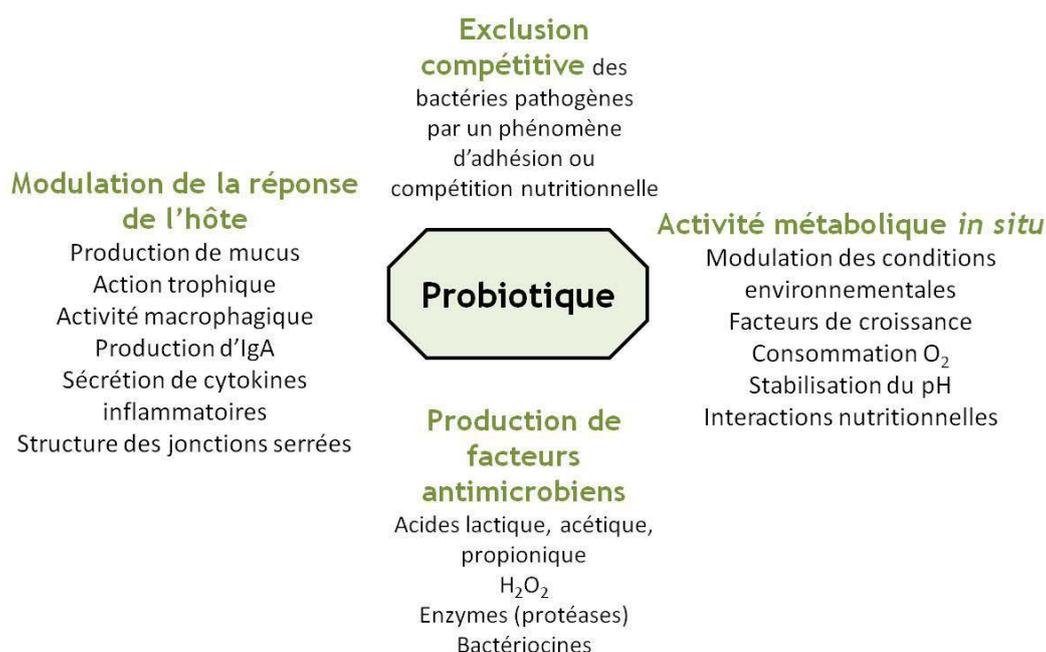


Figure 27 – Les différents modes d'action proposés des probiotiques.

La modulation de la réponse immune de l'hôte (Delcenserie *et al.*, 2008), le maintien de la barrière épithéliale (Caballero-Franco *et al.*, 2007 ; Mennigen *et al.*, 2009), l'exclusion compétitive et la production de facteurs antimicrobiens (Alakomi *et al.*, 2000 ; Servin, 2004 ; Gillor *et al.*, 2008 ; Cotter *et al.*, 2013) sont souvent des modes d'action associés à un effet protecteur contre les pathogènes. De surcroît, les probiotiques, qui par définition sont des microorganismes vivants, présentent une activité métabolique qui est considérée comme primordiale dans l'efficacité de ces additifs alimentaires.

Concernant les levures probiotiques utilisées chez le ruminant, les études menées *in vitro* ont essentiellement porté sur des souches de *S. cerevisiae*. L'activité métabolique des souches testées est le mode d'action majeur mis en évidence. En effet, plusieurs études ont montré que cette activité métabolique permettait de moduler la croissance de microorganismes autochtones du rumen. Les levures probiotiques sont ainsi capables d'entrer en compétition pour l'utilisation de sucres avec des microorganismes souvent identifiés comme indésirables. Pour exemple, en co-culture et en présence de glucose, *S. cerevisiae* est capable de limiter le développement de *Streptococcus bovis*, une bactérie productrice de lactate impliquée dans le développement de l'acidose, grâce à une plus grande affinité pour les sucres (Chaucheyras *et al.*, 1996). L'activité protéolytique et peptidasique de souches de *Prevotella albensis*, *Streptococcus bovis* et *Butyrivibrio fibrisolvens* a aussi été diminuée en co-culture avec *S. cerevisiae* (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2005). Par ailleurs, différentes études *in vitro* ont montré que *S. cerevisiae* stimulait la croissance de bactéries utilisatrices de lactate *Megasphaera elsdenii* (Chaucheyras *et al.*, 1996) et *Selenomonas ruminantium* (Nisbet et Martin, 1991), de bactéries acétogènes (Chaucheyras *et al.*, 1995), des bactéries fibrolytiques *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* 7, *Ruminococcus flavefaciens* FDI et *Butyrivibrio fibrisolvens* DI (Girard et Dawson, 1994) ainsi que des champignons ruminiaux (Chaucheyras *et al.*, 1995b). Cette stimulation serait due à la fourniture de facteurs de croissance par la levure, sous forme d'acides aminés, peptides, vitamines et acides organiques. L'incapacité d'une souche mutée pour la fonction respiratoire à stimuler l'activité des bactéries de jus de rumen incubé en fermenteur, en comparaison avec la souche sauvage, semble également indiquer que l'utilisation des traces d'oxygène présentes dans le milieu ruminal est un mécanisme d'action complémentaire des levures (Newbold *et al.*, 1996). Par ailleurs, d'autres modes d'action des levures ont été mis en évidence et permettent de lutter contre l'implantation de microorganismes pathogènes ou de neutraliser des substances chimiques nocives. En effet, l'adhésion de pathogènes comme *E. coli* et *Salmonella*, réalisée

grâce à des récepteurs de type lectines spécifiques de résidus mannose présents à la surface de la muqueuse intestinale, peut être inhibée par les levures. Les mannanes présents sur leurs parois servent dans ce cas de leurres pour ces récepteurs et permettent l'agglutination des pathogènes autour de la levure, ce qui empêche leur implantation (Ganner *et al.*, 2013). Les levures sont également capables de fixer les mycotoxines provenant de l'alimentation, les rendant ainsi inoffensives (Shetty et Jespersen, 2006).

IV.2.4. EFFETS *IN VIVO* DES LEVURES PROBIOTIQUES SUR LE MICROBIOTE RUMINAL

IV.2.4.1. Chez le jeune animal : maturation précoce du microbiote ruminal

Bien que l'effet soit principalement recherché au niveau intestinal, l'utilisation de levures probiotiques chez le jeune ruminant permettrait une maturation plus rapide du microbiote ruminal. En effet, deux études menées sur des agneaux supplémentés avec une souche de *S. cerevisiae* ont montré une implantation plus précoce et une stabilisation des populations de bactéries cellulolytiques (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2001 ; Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002) et des protozoaires entodiniomorphes. Chez les animaux recevant la levure, le profil fermentaire a été modifié et le potentiel redox était plus bas, sous-entendant une activité fermentaire accrue (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2002). L'effet observé pourrait en partie être attribué à la capacité des levures à consommer l'oxygène, favorisant ainsi les microorganismes anaérobies. Le développement de la muqueuse ruminale pourrait également être stimulé, accroissant ainsi les capacités d'absorption des métabolites fermentaires (Lesmeister *et al.*, 2004).

IV.2.4.2. Chez l'animal adulte : optimisation du fonctionnement du compartiment ruminal

L'effet des levures vivantes est le mieux étudié en condition d'acidose, souvent observée en élevage du fait de l'apport de fortes proportions de glucides rapidement fermentescibles dans la ration, nécessaires pour garantir un haut niveau de production. Une étude récente alliant des techniques d'empreinte moléculaire et de séquençage a montré que la supplémentation en levure probiotique chez des vaches recevant une ration riche en concentré (inductrice d'acidose) pouvait conduire à des modifications de la structure du microbiote ruminal sans affecter sa diversité (Pinloche *et al.*, 2013). L'effet de la levure vivante a par ailleurs été

différent selon que la communauté bactérienne de la phase solide ou de la phase liquide a été considérée. Plus finement, les effets de *S. cerevisiae* sur certaines populations microbiennes ruminales observés *in vitro* ont été retrouvés *in vivo*. L'abondance de la bactérie *Streptococcus bovis*, productrice de lactate, a été diminuée tandis que l'abondance des bactéries utilisatrices de lactate, *Selenomonas ruminantium* et *Megasphaera elsdenii* a été augmentée, corrélant avec une baisse de la concentration ruminale en lactate (Pinloche *et al.*, 2013). Par ce mécanisme, les levures permettraient ainsi de limiter la baisse du pH ruminal lors de l'ingestion de rations acidogènes (Bach *et al.*, 2007 ; Silberberg *et al.*, 2013 ; Marden *et al.*, 2008). Les levures vivantes ont également pu augmenter l'abondance des bactéries fibrolytiques *F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens*, mesurée par qPCR (Mosoni *et al.*, 2007), ou appréhendée par séquençage haut-débit de l'ADNr 16S (Pinloche *et al.*, 2013). En acidose de type butyrique, *S. cerevisiae* serait également capable de favoriser la croissance de la population de protozoaires (Brossard *et al.*, 2007). Bien que les effets des levures soient les plus marqués en condition acidogène, des effets ont également été mis en évidence en condition non acidotique. Une souche de *S. cerevisiae* a ainsi favorisé la colonisation des fibres végétales par les champignons et augmenté l'abondance de la bactérie fibrolytique *Butyrivibrio fibrisolvens* (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010a). La stabilisation du pH et la diminution du potentiel d'oxydo-réduction du milieu ruminal (Pinloche *et al.*, 2013 ; Marden *et al.*, 2008) par les levures seraient en partie responsables de la stimulation de la croissance des bactéries fibrolytiques qui sont connues pour leur haute sensibilité à l'oxygène et aux baisses de pH. Pouvant être associée à une augmentation des activités polysaccharidases (Chaucheyras-Durand et Fonty, 2001 ; Jouany *et al.*, 1998), une amélioration de la dégradation des polysaccharides pariétaux peut ainsi être observée en présence de *S. cerevisiae* (Guedes *et al.*, 2008 ; Marden *et al.*, 2008 ; Chaucheyras-Durand et Fonty, 2001 ; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010a). L'étude par séquençage haut-débit de l'ADNr 16S de Pinloche *et al.* (2013) a par ailleurs montré que d'autres groupes bactériens pouvaient être affectés par l'administration de *S. cerevisiae* en condition d'acidose. L'abondance des genres *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Catenibacter* et *Sporobacter* a ainsi été augmentée tandis que celle des genres *Prevotella*, *Syntrophococcus* et *Mitsuokella* a été diminuée. Il avait été précédemment observé que l'abondance des genres *Prevotella* et *Mitsuokella* étaient diminuées au cours de l'acidose (Khafipour *et al.*, 2009 ; Fernando *et al.*, 2010). *S. cerevisiae* serait donc capable dans une certaine mesure d'inverser l'effet de l'acidose. Les modifications d'abondance ont par ailleurs été nettement plus marquées lorsque les vaches ont été supplémentées avec 5 g de levures probiotiques qu'avec 0,5 g, confirmant que l'effet des

levures est dose-dépendant comme cela avait déjà été rapporté (Brossard *et al.*, 2007 ; Desnoyers *et al.*, 2009).

IV.2.5. VERS D'AUTRES APPLICATIONS DES PROBIOTIQUES

D'abord utilisés pour l'amélioration de la santé et des performances animales, l'utilisation des probiotiques est aujourd'hui envisagée pour répondre à des questions environnementales et de santé publique. Une autre application des probiotiques en devenir est la limitation du portage de pathogènes humains par les animaux d'élevage, en particulier les *Escherichia coli* pathogènes, *Campylobacter*, *Salmonella* et *Listeria*, qui font l'objet d'une préoccupation internationale (Newell *et al.*, 2010). Une réduction de l'ordre de 30 % des EHEC (Enterohémorragic *Escherichia coli*) du sérotype O157:H7 (Peterson *et al.*, 2007 ; Tabe *et al.*, 2008) a été observé chez des bœufs recevant des bactéries lactiques. *In vitro*, du contenu de rumen de moutons ayant reçu une supplémentation en *S. cerevisiae* est capable d'inhiber la survie de souches de STEC (Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*) (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010b). L'utilisation de probiotiques pour réduire la production de méthane entérique est également testée. En effet, avec l'engagement de l'Union européenne pour une réduction de l'ordre de 20% des émissions de méthane à l'horizon 2020, des solutions sont activement recherchées chez les ruminants (Doreau *et al.*, 2011a). La supplémentation en *S. cerevisiae* a montré des résultats variables, allant d'aucun effet à une diminution de la production de méthane de 7% (Chung *et al.*, 2011). Pour autant, aucune souche n'a été sélectionnée dans ce but précis, ce qui pourrait expliquer les effets modestes observés. Toutefois, l'utilisation de probiotiques dans ce domaine est prometteuse, comme l'illustre l'association de souches de *Propionibacterium jensenii* et de *Lactobacillus spp.* qui a permis une diminution de 20 à 25% de la production de méthane chez des vaches recevant une ration inductrice d'acidose (propionique ou butyrique) sans compromettre les performances animales (Lettat *et al.*, 2012a). Les probiotiques pourraient ainsi être utilisés pour dévier les voies de production ou d'utilisation de l'hydrogène (Jeyanathan *et al.*, 2013), par exemple, en limitant la production d'H₂ en inhibant les protozoaires, ou en favorisant la croissance de bactéries cellulolytiques non productrices d'H₂ comme *F. succinogenes* (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010c). Une autre stratégie serait de stimuler les microorganismes en compétition avec les méthanogènes pour l'utilisation de l'hydrogène, tels que les bactéries productrices de propionate et d'acétate.

Partie V

APPROCHES POUR L'ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DU MICROBIOTE RUMINAL

V.1. METHODES CULTURALES

Depuis l'isolation en 1885 de « *Bacterium coli commune* » (Escherich, 1885) rebaptisée plus tard *Escherichia coli*, une attention particulière a été portée pour l'isolement et l'étude de la fonction des bactéries du tube digestif. Bien que Pasteur décrivit en 1860 des bactéries capables de vivre sans air, ce n'est que dans les années 1950 que des milieux et techniques d'isolement et de culture, spécifiques des bactéries anaérobies, ont pu être mis au point (Hungate, 1969 ; Hobson, 1969). Ces travaux précurseurs ont conduit le rumen à être le premier écosystème digestif le mieux caractérisé. Depuis lors, des milieux permettant d'isoler et cultiver les archées (Balch *et al.*, 1979), les champignons (Joblin, 1981 ; Lowe *et al.*, 1985) et les protozoaires ruminiaux ont également été proposés (Coleman, 1978). Les techniques culturales ont ainsi permis de mieux caractériser la diversité et la fonction des microorganismes constituant les microbiotes digestifs et sont encore aujourd'hui largement utilisées pour isoler de nouveaux microorganismes et évaluer leurs capacités fermentaires en présence de différents substrats. Toutefois, il est accepté que les techniques culturales ne permettent d'appréhender qu'une faible proportion de la diversité des microorganismes d'un environnement donné (Hugenholtz, 2002). Ainsi, il est estimé que moins de 15% des bactéries ruminales peuvent être cultivées dans les conditions de culture standard (Morgavi *et al.*, 2012). De ce fait, de nouveaux milieux sont régulièrement développés pour répondre aux exigences nutritionnelles de microorganismes non encore cultivés (Kenters *et al.*, 2011 ; Nyonyo *et al.*, 2013) mais ceci peut représenter un travail colossal (Pfleiderer *et al.*, 2013). De plus, les techniques culturales ne permettent pas toujours de clairement identifier le microorganisme isolé et nécessitent souvent des approches complémentaires pour découvrir ses capacités métaboliques. Ainsi, malgré l'utilité évidente des méthodes culturales pour progresser dans les connaissances de la physiologie et du métabolisme des microorganismes

et des interactions pouvant avoir lieu entre eux, les techniques moléculaires sont aujourd'hui majoritairement utilisées pour étudier les communautés microbiennes du tube digestif.

V.2. TECHNIQUES D'ÉCOLOGIE MOLECULAIRE

L'un des avantages inhérents des méthodes moléculaires est l'affranchissement de l'étape de culture. En se basant sur l'analyse des acides nucléiques (ADN et ARN), elles permettent ainsi d'appréhender la complexité structurale et/ou fonctionnelle des microbiotes digestifs dans leur totalité. Ceci est rendu possible grâce à la disponibilité d'un nombre croissant de séquences nucléiques et de génomes dans les bases de données qui servent de référence pour l'identification des microorganismes et de leurs gènes. L'objectif ici est de présenter succinctement les techniques les plus courantes en écologie digestive et de mettre en avant les informations obtenues grâce à elles et leurs limites. La technologie des biopuces ADN, plus particulièrement utilisée au cours de ce travail de thèse, sera présentée plus en détails.

V.2.1. LES MARQUEURS GENETIQUES CIBLES

V.2.1.1. Les marqueurs phylogénétiques

Les gènes exprimant l'ARNr 16S et l'ARNr 18S sont retrouvés de façon ubiquitaire chez les procaryotes et les eucaryotes respectivement. Ils sont constitués de régions conservées facilitant leur isolement, retrouvées quelle que soit la lignée phylogénétique de l'organisme étudié, et de régions variables voire hypervariables dont la séquence est propre à chaque taxon (du domaine à l'espèce) (Mizrahi-Man *et al.*, 2013). Ces gènes sont donc considérés comme de très bons marqueurs phylogénétiques (peu ou pas de transferts latéraux et de recombinaison) et sont aujourd'hui utilisés en routine du fait de l'abondance des données pour identifier les espèces isolées ou faisant partie d'une communauté complexe. Les techniques basées sur l'amplification de ce gène et l'analyse de son polymorphisme sont ainsi devenues des standards dans l'étude des écosystèmes digestifs. Chez les champignons ruminiaux, les régions ITS (Internal Transcribed Spacer), présentes entre le gène des ADNr 18S et 28S, sont plus largement ciblées car elles permettent une meilleure discrimination des espèces fongiques entre elles (Tuckwell *et al.*, 2005). Des gènes fonctionnels présentant des caractéristiques phylogénétiques communes avec le gène de l'ADNr 16S sont parfois utilisés,

comme le gène codant pour la sous-unité A de la méthyl-coenzyme M réductase (*mcrA*) des archées méthanogènes (Luton *et al.*, 2002).

V.2.1.2. Les marqueurs métaboliques

Suivant l'intérêt porté à une fonction particulière des microorganismes au sein du microbiote digestif, des gènes codant des enzymes impliquées dans un métabolisme donné peuvent être ciblés. Ces gènes peuvent être détectés et/ou quantifiés par PCR quantitative, séquençage ou biopuce ADN. Leur polymorphisme peut également être analysé par séquençage ou empreinte moléculaire.

V.2.2. TECHNIQUES D'ÉCOLOGIE MOLECULAIRE

V.2.2.1. Les techniques d'empreintes moléculaires

Les techniques d'empreintes moléculaires reposent sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'une portion d'un gène, le plus souvent de l'ADNr, à partir d'ADN métagénomique ou d'ARN métagénomique rétro-transcrit en ADNc (ADN complémentaire). La séparation des amplicons selon différentes caractéristiques (contenus en GC, longueur, sites de coupure d'enzymes de restriction...) permet de générer un profil ou empreinte mettant en évidence la diversité des séquences obtenues, chaque bande ou pic correspondant à une population ou un groupe de populations dont l'abondance est plus ou moins importante en fonction de leur intensité (Dorigo *et al.*, 2005). Les techniques d'empreintes moléculaires sont essentiellement utilisées pour analyser la diversité taxonomique des communautés microbiennes digestives, suivre leur dynamique au cours du temps ou en fonction de facteurs externes. Elles représentent des approches de choix pour comparer la diversité de plusieurs échantillons. La **DGGE** (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), la **TTGE** (*Temporal Temperature Gel Electrophoresis*), la **SSCP** (*Single Strand Conformation Polymorphism*), l'**ARISA** (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) et la **T-RFLP** (*Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism*) sont des exemples de techniques utilisées dans l'investigation du microbiote ruminal (Sirohi *et al.*, 2012). Il est à noter que bien que ces techniques permettent d'appréhender rapidement la diversité des communautés microbiennes, elles ne permettent pas d'identifier aisément les populations présentes, le clonage-séquençage des amplicons présents dans les bandes apparaissant fastidieux (Kušar et Avguštin, 2012). Par

ailleurs, ces techniques sont souvent associées à un manque de sensibilité. Pour exemple, la DGGE ne permet pas de détecter les populations dont l'abondance est inférieure à 1% de la communauté bactérienne totale (Zoetendal *et al.*, 2004). De plus, la résolution des empreintes est limitante car seuls 30 à 40 pics ou bandes (Loisel *et al.*, 2006) peuvent être détectés. Il a aussi été montré que l'amplification de l'ADNr 16S de souches pures peut conduire à la production de plusieurs bandes en DGGE, menant à une surestimation de la diversité (Neilson *et al.*, 2013). Les techniques d'empreinte moléculaire peuvent donc apporter une vision biaisée, sous-estimée ou surestimée, de la diversité des microbiotes souvent sans information qualitative.

V.2.2.2. La technique FISH

La technique FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridisation) est utilisée pour déterminer l'abondance relative de microorganismes cibles par rapport à la population microbienne totale. Cette technique repose sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques fluorescentes ciblant le gène de l'ADNr. Pour ceci, la membrane des cellules est préalablement rendue perméable pour permettre le passage des sondes à l'intérieur des cellules. Plusieurs groupes microbiens peuvent être détectés simultanément en utilisant différents fluorochromes. Le dénombrement des microorganismes ciblés est alors réalisé par microscopie à épifluorescence ou parfois cytométrie de flux. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de détecter des microorganismes directement dans leur habitat naturel. Cette technique a ainsi permis de localiser et dénombrer des bactéries cellulolytiques ruminales attachées aux fibres végétales (Shinkai et Kobayashi, 2007) et a également été utilisée pour quantifier différents phyla bactériens ou archéens à partir d'échantillons de rumen (Kong *et al.*, 2010, 2012). Des variantes de cette technique, le CARD-FISH (*C*Alyzed *R*eporter *D*eposition-*F*ISH) et le MAR-FISH (*M*icro-*A*uto*R*adiographie-*F*ISH), ont également été utilisés pour la détection des archées méthanogènes (Kumar *et al.*, 2011). L'inconvénient majeur de la technique FISH est la nécessité de connaître les séquences de l'ADNr des microorganismes ciblés afin de déterminer les sondes. On ne peut donc pas cibler des microorganismes inconnus. Il faut également un nombre relativement important de copies du gène cible pour qu'il soit détecté (Zoetendal *et al.*, 2004).

V.2.2.3. Les techniques de PCR quantitatives

Les techniques de PCR quantitatives permettent de cibler spécifiquement n'importe quel gène présent dans un mélange d'acides nucléiques. Elles sont principalement employées pour détecter et quantifier des groupes de microorganismes (du règne jusqu'à l'espèce voire la souche) en ciblant des marqueurs phylogénétiques. Elles sont également utilisées pour quantifier des gènes fonctionnels et déterminer leur niveau d'expression en utilisant des ARN rétro-transcrits en ADNc. La limitation principale de ces techniques est la disponibilité des séquences nucléiques des microorganismes ciblés afin de concevoir des amorces spécifiques. Deux techniques de PCR quantitatives peuvent être distinguées. La **PCR en temps réel** permet la quantification absolue du nombre de copies d'un gène grâce à l'utilisation d'une gamme étalon contenant un nombre connu de copies du gène dilué de manière sériée. La quantification peut également être relative à un autre gène, et dans ce cas il n'y pas de gamme étalon. Cette technologie repose sur la détection de fluorescence (sonde Taqman ou SYBR Green), proportionnelle à la quantité de copies présentes initialement. Du fait de sa mise en place facile, d'une bonne sensibilité et d'une bonne reproductibilité, cette technique de PCR est la plus largement utilisée en écologie digestive pour la quantification de microorganismes (Mosoni *et al.*, 2007) ou de gènes fonctionnels (Béra-Maillet *et al.*, 2009). La **PCR compétitive**, pourtant considérée comme la plus précise de toutes les méthodes de quantification par PCR (Zentilin et Giacca, 2010), est plus rarement utilisée. Elle implique la co-amplification d'un gène à partir d'ADN métagénomique additionné d'une quantité connue d'un ADN compétiteur présentant une région identique au gène à amplifier. La PCR compétitive a été utilisée pour la quantification absolue d'espèces bactériennes fibrolytiques, protéolytiques et de champignons ruminiaux (Koike et Kobayashi, 2001 ; Reilly *et al.*, 2002 ; Sekhavati *et al.*, 2009).

V.2.2.4. Le clonage-séquençage

La diversité des communautés microbiennes digestives a été particulièrement étudiée par clonage/séquençage (Leser *et al.*, 2002 ; Sirohi *et al.*, 2012) car cette technique permet d'avoir une information qualitative et quantitative de la diversité. Dans un premier temps, un marqueur phylogénétique est amplifié par PCR puis les amplicons résultants sont clonés. Après une sélection aléatoire, les clones sont finalement séquencés. L'analyse phylogénétique des séquences obtenues, par comparaison avec des banques de séquences d'ADNr comme

RDP (Ribosomal Database Project, Cole *et al.*, 2009), Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) et SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), permet ainsi de déterminer l'affiliation taxonomique de chaque séquence et l'abondance des taxons uniques, appelés OTUs (Operational Taxonomic Unit), dans chaque échantillon. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique est la nécessité d'analyser un grand nombre de clones afin d'avoir une vision représentative de la diversité. D'autre part, deux banques de clones à partir d'un même échantillon peuvent offrir une vision de la diversité significativement différente (Leser *et al.*, 2002b). De ce fait, on peut supposer que les banques de clones ne représentent pas forcément la diversité réelle présente dans l'échantillon à analyser.

V.2.2.5. Les approches par séquençage haut-débit et métagénomique fonctionnelle

Toutes les techniques précédemment évoquées se sont révélées très utiles en écologie digestive et ont permis de progresser dans les connaissances de la diversité des microbiotes. Toutefois, elles n'offrent qu'une vision partielle de la structure de ces communautés et ne permettent pas de pleinement investiguer la fonction des microorganismes. Ainsi les progrès fulgurants réalisés dans le développement des nouvelles technologies de séquençage et le traitement bioinformatique des données ont révolutionné le monde de l'écologie microbienne en permettant d'accéder à un niveau d'information encore jamais atteint.

La description et les avantages/inconvénients des différentes technologies de séquençage ne seront pas discutés ici et pourront être retrouvés dans la revue de Metzker (2010). Nous nous focaliserons ici sur l'intérêt et les limites de ce type d'approches.

V.2.2.5.1. Séquençage haut-débit d'amplicons

Le séquençage haut-débit d'amplicons provenant de l'amplification de portions de marqueurs phylogénétiques permet d'analyser la diversité taxonomique des microbiotes digestifs sans étape de clonage. Cette approche ciblée a, par exemple, permis d'analyser simultanément la diversité des bactéries, archées, protozoaires et champignons d'échantillons ruminiaux (Kittelmann *et al.*, 2013). La génération de milliers de séquences qui permet d'estimer assez précisément la diversité des populations ciblées, la mise en place facile et l'analyse bioinformatique relativement bien maîtrisée (Caporaso *et al.*, 2012 ; Schloss *et al.*, 2009) ont rendu cette approche populaire, notamment dans l'étude des modifications des communautés

microbiennes sous l'influence de différents facteurs (Li *et al.*, 2012 ; Pinloche *et al.*, 2013 ; Zened *et al.*, 2013 ; Thoetkiattikul *et al.*, 2013). Toutefois, il faut savoir que ces méthodes peuvent présenter des biais liés à la technique de PCR en amont du séquençage et biais valables d'ailleurs pour les techniques précédemment évoquées. En effet, la spécificité des amorces PCR utilisées peut conduire à une surreprésentation ou sous-représentation de certains taxons (Wang et Qian, 2009 ; Klindworth *et al.*, 2012). Le choix de la région hypervariable amplifiée peut également influencer la représentativité et la discrimination des microorganismes au sein de la communauté microbienne étudiée (Kim *et al.*, 2011b ; Guo *et al.*, 2013b). De plus, il faut être conscient que la représentativité de la communauté est nécessairement altérée par le nombre de copies différents des gènes de l'ADNr chez les microorganismes (Větrovský et Baldrian, 2013).

V.2.2.5.2. Métagénomique et métatranscriptomique

L'utilisation d'approches haut-débit dites de méta-omiques, basées sur le séquençage massif, sans *a priori*, d'ADN métagénomique (métagénomique) ou d'ARN métagénomique (métatranscriptomique), permettent aujourd'hui d'appréhender simultanément la composition taxonomique et les capacités métaboliques de communautés environnementales dans leur totalité en s'affranchissant des étapes de PCR. Le microbiome (communauté microbienne) et le virome (communauté virale) des écosystèmes digestifs des ruminants (vache, yak, renne), d'animaux monogastriques comme le porc et de l'homme ont ainsi été explorés par métagénomique (Brulc *et al.*, 2009 ; Pope *et al.*, 2012 ; Dai *et al.*, 2012 ; Berg Miller *et al.*, 2012 ; Lamendella *et al.*, 2011 ; Looft *et al.*, 2012 ; Shan *et al.*, 2011 ; Qin *et al.*, 2010) et ont permis d'étudier la diversité taxonomique par analyse de marqueurs phylogénétiques et d'effectuer un inventaire des gènes fonctionnels de ces microbiotes. Toutefois, la métatranscriptomique est considérée comme plus informative en révélant les communautés microbiennes actives qui ne sont pas forcément les communautés dominantes (Torsvik et Øvreås, 2002), les ARNm et les ARNr étant vus comme des indicateurs des microorganismes métaboliquement actifs. Chez le ruminant, deux études métatranscriptomiques ont été réalisées, l'une sur la communauté eucaryote du rumen du bœuf musqué (Qi *et al.*, 2011) et l'autre sur la communauté totale du rumen de vache (Poulsen *et al.*, 2013). Cette dernière a été effectuée par séquençage des ARN totaux et a conduit à la détection de seulement 3% d'ARNm (380000 à 485000 séquences), ce qui limite forcément les capacités de détection des ARN des communautés les moins abondantes et le traitement statistique des données au vu de

la diversité du microbiote ruminal. Dans ce type d'étude, l'enrichissement en ARNm qui permet de soustraire les ARNr est une étape critique, car les ARNm qui reflètent l'activité métabolique des microorganismes ne représentent que quelques pourcents des ARN totaux. Cependant, du fait de la diversité énorme des microorganismes des écosystèmes digestifs, en particulier ceux du rumen, l'efficacité des méthodes commerciales reste limitée (Poroyko *et al.*, 2010 ; Edwards *et al.*, 2011). Qi *et al.* (2011) ont ciblé les ARNm eucaryotes polyadénylés qui sont de ce fait facilement isolables par capture à l'aide de billes polydT. Leur approche a été utilisée dans l'objectif d'enrichir les bases de données en séquences d'eucaryotes ruminiaux, peu retrouvées dans les métagénomes, du fait de leur faible abondance dans le microbiote ruminal. Ceci souligne que, malgré l'immense quantité de données générées, l'accession à l'ensemble des génomes contenus dans un échantillon reste encore difficile. Avec la complexité des écosystèmes digestifs, les efforts de séquençage doivent ainsi être poussés afin de couvrir au maximum la diversité microbienne. En 2008, Quince *et al.* ont ainsi estimé qu'il serait nécessaire de multiplier par 10000 les efforts de séquençage pour couvrir 90% de la diversité microbienne d'écosystèmes complexes. Par ailleurs, le manque de génomes de référence reste un facteur limitant dans l'analyse des données obtenues. Dans l'étude métatranscriptomique des eucaryotes ruminiaux, 48% des séquences n'ont pas trouvé de similarité avec des séquences de bases de données. L'établissement d'un catalogue de génomes ruminiaux de référence, analogue à celui utilisé pour l'analyse des métagénomes/métatranscriptomes de l'homme (Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium *et al.*, 2010), a donc été lancé avec le projet Hungate 1000 (www.hungate1000.org.nz) qui vise le séquençage de 1000 souches microbiennes ruminales. La disponibilité de ces génomes de référence permettra sans nul doute de faciliter l'analyse des séquences obtenues et de mieux investir les différentes fonctions du microbiote ruminal. Malgré tout, il est possible de reconstruire des génomes sans génome de référence, mais l'efficacité des logiciels disponibles reste encore à démontrer pour des communautés microbiennes aussi complexes que les microbiotes digestifs (Morgavi *et al.*, 2012). De plus, la taille relativement courte des séquences obtenues peut compliquer l'assemblage et la reconstruction de génomes complets. La perspective de l'utilisation du séquençage « single-cell » (Lasken, 2012), offrant la possibilité de séquencer le génome d'une seule cellule, est prometteuse et devrait permettre d'enrichir le nombre de génome de référence en particulier provenant de microorganismes non cultivés. Il est aussi essentiel de pouvoir progresser dans l'annotation des génomes afin d'identifier au mieux les capacités métaboliques des communautés microbiennes étudiées (Gilbert *et al.*, 2008). Pour ceci, il est parfois nécessaire

de passer par le criblage fonctionnel de banques métagénomiques (métagénomique fonctionnelle) qui permet d'assigner une fonction non équivoque aux gènes (Moore *et al.*, 2011). Cette approche est ainsi largement utilisée pour identifier de nouveaux gènes ayant une fonction dans la fibrolyse chez le ruminant (Zhao *et al.*, 2010). Notons que la reconstruction de génomes, même partielle, et donc l'identification des capacités métaboliques potentielles de microorganismes non cultivés peut également permettre de concevoir des milieux répondant aux besoins spécifiques de ceux-ci. Grâce à cette approche, Pope *et al.* (2011) ont ainsi pu isoler la bactérie ruminale *Succinivibrionaceae* WG-1 qui pourrait être impliquée dans la faible production de méthane observée chez le Tammar wallaby.

V.2.2.6. Les biopuces ADN

Les biopuces ADN ou DNA microarrays (micro réseaux d'ADN) ont été développées à partir des années 1990 (Schena *et al.*, 1995) pour répondre à des enjeux de miniaturisation, de haut débit et de sensibilité. Elles sont constituées d'un support solide de quelques centimètres carrés, le plus souvent une lame de verre, sur lequel sont immobilisés des fragments d'ADN appelés sondes. Leur fonctionnement repose sur le principe de l'hybridation inverse : des cibles marquées (produits PCR, ADNg, ARN) présentes dans un mélange complexe sont mises en contact avec les sondes (ADNg, produits PCR, ADNc ou oligonucléotides) fixées sur le support afin que les séquences complémentaires sondes / cibles puissent s'apparier. Les duplex sondes / cibles fluorescentes formés sont ensuite détectés à l'aide d'un scanner (Figure 28).

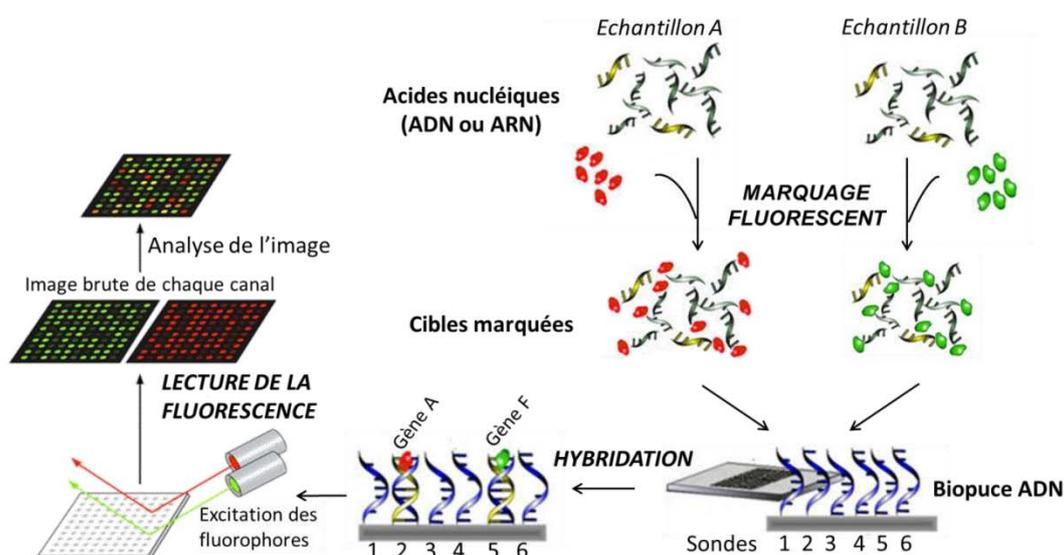


Figure 28 – Principe des biopuces ADN.

Les sondes oligonucléotidiques sont aujourd'hui favorisées du fait de leur synthèse aisée et de leur coût réduit (Relógio *et al.*, 2002). Deux technologies de fabrication de biopuces sont actuellement disponibles, et on distingue les biopuces *ex situ*, qui nécessitent la synthèse préalable des sondes avant leur greffage sur la lame, et les biopuces *in situ* pour lesquelles la synthèse des sondes est directement réalisée sur la lame. Cette dernière technologie est privilégiée par les principaux fabricants de biopuces commerciales car elle permet la production de biopuces à haute densité (jusqu'à 1 et 2,6 millions de sondes sur une seule biopuce chez Agilent et Affymetrix respectivement). La haute densité des sondes permet également de disposer de plusieurs micro-réseaux identiques sur une même lame, ce qui permet d'hybrider jusqu'à plusieurs dizaines d'échantillons simultanément. La synthèse *in situ* offre également une meilleure reproductibilité et permet une répartition aléatoire des sondes qui limite les effets de position des sondes.

V.2.2.6.1. Avantages des biopuces ADN pour l'étude de communautés microbiennes complexes

Les biopuces ADN ont trouvé de nombreuses applications en écologie microbienne car elles présentent un certain nombre d'avantages vis-à-vis des autres techniques d'écologie moléculaire. Ces outils haut-débit permettent de détecter la présence ou l'expression de plusieurs milliers voire plusieurs dizaines de milliers de gènes en une seule expérience. Ils offrent ainsi la possibilité d'avoir une vision globale de la diversité des gènes présents et de réaliser leur identification par l'utilisation de sondes spécifiques de chacun d'entre eux. En plus de cet aspect qualitatif, il a été montré que, pour des sondes oligonucléotidiques de 50 mers (nucléotide), il existait une relation linéaire entre l'intensité de fluorescence et la quantité de cibles allant de 8 à 1000 ng d'ADN (Tiquia *et al.*, 2004) ou 50 à 100 ng d'ARN (Gao *et al.*, 2007), suggérant qu'une analyse semi-quantitative des gènes identifiés peut être réalisée (Dugat-Bony *et al.*, 2011 ; Kang *et al.*, 2013). Les biopuces ADN ont par ailleurs montré une très bonne sensibilité en permettant de détecter des gènes présents à 10^3 copies/ng d'ARN (Dugat-Bony *et al.*, 2011). Les biopuces ADN représentent donc une intéressante alternative aux techniques de qPCR et de séquençage haut-débit, avec lesquelles elles présentent généralement une bonne corrélation (Feng *et al.*, 2010 ; van den Bogert *et al.*, 2011 ; Tottey *et al.*, 2013). La flexibilité des biopuces ADN présente également un intérêt particulier en écologie microbienne, puisque leur composition en sondes peut être totalement adaptée à la problématique de recherche. Il est ainsi possible d'avoir une approche ciblée sur

une fonction métabolique ou un groupe de microorganismes d'intérêt, ce qui facilite le traitement des données vis-à-vis des approches –omiques réalisées sans *a priori*. De plus, les formats de biopuce ADN proposés aujourd'hui permettent d'hybrider simultanément plusieurs échantillons qui peuvent alors être comparés facilement. Ceci est d'autant plus aisé que les résultats montrent une bonne reproductibilité intra plateforme (Shi *et al.*, 2006). Une fois l'approche biopuce mise en place, les résultats peuvent ainsi être obtenus très rapidement et ne nécessitent pas un savoir-faire en bioinformatique.

V.2.2.6.2. Applications des biopuces ADN en écologie microbienne

(i) Les biopuces phylogénétiques

Les biopuces ADN phylogénétiques (POA, Phylogenetic Oligonucleotide Array) ont été développées pour obtenir une vue d'ensemble des microorganismes présents dans un écosystème donné. Elles sont principalement élaborées pour les procaryotes sur la base des séquences du gène biomarqueur exprimant l'ARNr 16S (Gentry *et al.*, 2006). Les sondes sont alors déterminées dans des régions hautement conservées pour cibler des niveaux taxonomiques élevés (famille, ordre, classe) ou dans des régions hypervariables pour discriminer des microorganismes au niveau du genre ou de l'espèce (Huyghe *et al.*, 2008). Les POA ont trouvé de nombreuses applications en écologie microbienne environnementale (Gentry *et al.*, 2006) et ont également été utilisées pour investir la diversité du microbiote fécal de l'homme (Tottey *et al.*, 2013 ; Rajilić-Stojanović *et al.*, 2009 ; Rigsbee *et al.*, 2011) et du porc (Leser *et al.*, 2002b) ou du rumen des ruminants (Kang *et al.*, 2013 ; Kim *et al.*, 2011c ; Godoy-Vitorino *et al.*, 2012). La biopuce PhyloChip est sans doute la plus généraliste et comporte 500000 sondes permettant d'identifier 8743 espèces de bactéries et archées (Brodie *et al.*, 2006). La PhyloChip permet ainsi de détecter la quasi-totalité des séquences présentes dans les bases de données. Cette biopuce ADN a été largement appliquée pour l'analyse de communautés microbiennes de l'environnement (Weinert *et al.*, 2011 ; Rastogi *et al.*, 2010) mais aussi du tube digestif (Godoy-Vitorino *et al.*, 2012). Toutefois, des biopuces dédiées aux écosystèmes digestifs ont également été développées à partir des séquences d'ADNr retrouvées dans les échantillons digestifs. Citons pour l'homme, la HITChip composée de 4800 sondes ciblant 1140 phylotypes bactériens du colon (Rajilić-Stojanović *et al.*, 2009) et la HUGChip contenant ~4400 sondes (spécifiques et exploratoires) ciblant 66 familles bactériennes coliques (Tottey *et al.*, 2013) ; pour le porc, une biopuce prototype ciblant

quelques phylotypes identifiés dans le colon par clonage-séquençage (Leser *et al.*, 2002b) ; pour le rumen, la RumenArray contenant des sondes GoArrays ciblant ~1600 OTUs du rumen (Kim *et al.*, 2011c). Une biopuce ciblant ~500 espèces bactériennes et archéennes du tube digestif de l'homme et des animaux (Kang *et al.*, 2010) a également été utilisée pour étudier la communauté microbienne active du rumen (Kang *et al.*, 2013).

Bien qu'elles fournissent des images détaillées de la structure de la communauté microbienne d'un écosystème complexe, les POA fournissent généralement peu d'informations sur les fonctions des microorganismes qui la composent. Ceci peut être limitant du fait qu'un groupe microbien puisse présenter différentes activités métaboliques. Ainsi, ces dernières années, des efforts importants ont porté sur le développement de puces métaboliques permettant l'étude de gènes fonctionnels.

(ii) Les biopuces ADN fonctionnelles

Les biopuces ADN fonctionnelles (FGA, Functional Gene Array) sont élaborées à partir des séquences de gènes codant le plus souvent pour des enzymes impliquées dans un métabolisme d'intérêt. Grâce à ces outils, il est possible en une seule expérience d'explorer les potentialités métaboliques d'un écosystème complexe (en ciblant l'ADN) ou leur expression (en ciblant l'ARN). Ces outils se sont révélés très puissants pour l'analyse de nombreux gènes fonctionnels notamment ceux codant les enzymes clés impliquées dans les cycles des nutriments des microorganismes et dans la dégradation de contaminants (Rhee *et al.*, 2004 ; Tiquia *et al.*, 2004). Actuellement, la FGA la plus complète est la GeoChip (He *et al.*, 2007, 2010a). La version 4.0 de cette biopuce ADN comporte ~84000 sondes ciblant 410 familles de gènes impliqués dans les cycles du carbone, de l'azote et du soufre, la dégradation des contaminants, la résistance aux métaux et leur réduction (Bai *et al.*, 2013). Actuellement, seule une FGA a été appliquée en écologie digestive. Cette biopuce cible des gènes codant des enzymes actives sur les hydrates de carbone (glycoside hydrolases et pectine lyases) des bactéries du tube digestif de l'homme (El Kaoutari *et al.*, 2013). Six mille cinq cents gènes provenant de 174 génomes de référence sont ciblés. L'hybridation d'ADN extraits de fèces a permis d'identifier 46 familles de glycoside hydrolases présentes dans tous les échantillons étudiés, suggérant une stabilité fonctionnelle du microbiote digestif malgré de grandes variations taxonomiques entre individus. L'outil développé a montré une très bonne sensibilité en permettant de détecter une famille de gènes qui n'avait encore jamais été

détectée dans les études métagénomiques. Il n'a cependant pas été utilisé avec des échantillons d'ARN.

V.2.2.6.3. **Précautions et limites pour l'étude de communautés microbiennes complexes**

Initialement développées pour l'étude du transcriptome d'un seul organisme (Lashkari *et al.*, 1997), les biopuces ADN sont aujourd'hui considérées comme des outils de choix pour l'étude de communautés microbiennes complexes. Toutefois, leur utilisation dans ce cadre fait émerger certains challenges techniques qui sont avant tout liés aux caractéristiques des sondes (Wagner *et al.*, 2007). La conception des sondes pour l'étude de communautés microbiennes complexes doit en effet être réalisée avec précaution et, pour ceci, de nombreux logiciels dédiés ont été développés au cours de ces dernières années (Lemoine *et al.*, 2009 ; Dugat-Bony *et al.*, 2012b). La spécificité des sondes est ici essentielle à l'obtention de résultats de qualité. Du fait de la diversité des microorganismes présents dans les écosystèmes environnementaux, il est nécessaire de comparer les séquences des sondes déterminées aux séquences des bases de données afin de s'assurer qu'elles ciblent uniquement la ou les séquences cibles. Pour ceci, des bases de données dédiées, les plus complètes possibles, ont vu le jour. Citons les bases de séquences d'ADNr, RDP (Cole *et al.*, 2009), Greengenes (DeSantis *et al.*, 2006) et SILVA (Pruesse *et al.*, 2007) et, la base EnvExBase, implémentée dans le logiciel HiSpOD (Dugat-Bony *et al.*, 2011), contenant tous les cds (coding sequences) environnementaux connus. La prédiction des hybridations croisées potentielles est usuellement réalisée selon les critères de Kane *et al.* qui consistent à sélectionner des sondes présentant moins de 75% à 85% d'identité ou moins de 15 nucléotides consécutifs identiques avec une séquence non ciblée pour éviter le risque d'hybridations aspécifiques (Kane *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2005). Actuellement, tous les paramètres thermodynamiques influençant les hybridations d'acides nucléiques sur biopuce ADN ne sont pas connus. Dans ce contexte, la phase de validation des biopuces ADN est donc d'un intérêt particulier pour s'assurer de l'efficacité des sondes et il est recommandé de déterminer plusieurs sondes ciblant un même gène assurant ainsi la fiabilité des résultats. Les études menées jusqu'à présent ont montré que la spécificité et la sensibilité étaient intimement liées à la longueur de la sonde (Relógio *et al.*, 2002). Ainsi, il apparaît que les sondes longues offrent une meilleure sensibilité comparée aux sondes courtes, mais, en contrepartie, présentent une moindre spécificité (Chou *et al.*, 2004).

Pour exemple, les sondes de 25 mers peuvent avoir une sensibilité 8 fois inférieure à des sondes de 60 mers (Chou *et al.*, 2004) mais ont permis de détecter la mutation d'une seule base (Relógio *et al.*, 2002) quand les sondes longues ne permettent pas de discriminer des séquences présentant plus de 75 à 80 % d'identité. Les POA sont généralement constituées de sondes courtes, de l'ordre de 25 mers, qui permettent de discriminer plus facilement des séquences proches. Pour la conception de FGA, des sondes oligonucléotidiques courtes (15 à 30 mers) (Bodrossy *et al.*, 2003 ; Stralis-Pavese *et al.*, 2004) et longues (40 à 70 mers) (Kane *et al.*, 2000 ; Relógio *et al.*, 2002 ; He *et al.*, 2007 ; Dugat-Bony *et al.*, 2012a) ont pu être utilisées. Le choix de la longueur des sondes doit en fait être le plus adapté à la problématique de recherche, incluant la complexité de l'échantillon, la diversité nucléotidique et l'abondance des gènes ciblés. La stratégie GoArrays (Rimour *et al.*, 2005), alliant les avantages des sondes longues et des sondes courtes, constitue une alternative intéressante. Cette stratégie permet de créer des sondes longues par concaténation de deux oligonucléotides courts distants d'au moins 10 nucléotides sur le gène ciblé, à l'aide d'un espaceur court (4 à 6 nucléotides) (Figure 29). De cette manière, ces sondes hybrides présentent une très bonne spécificité du fait des sondes courtes les constituant, tout en gardant une très bonne sensibilité du fait de la taille des sondes produites. Cette stratégie a ainsi permis d'améliorer l'efficacité de biopuces ADN (Kang *et al.*, 2010 ; Aguirre de Cárcer *et al.*, 2011).

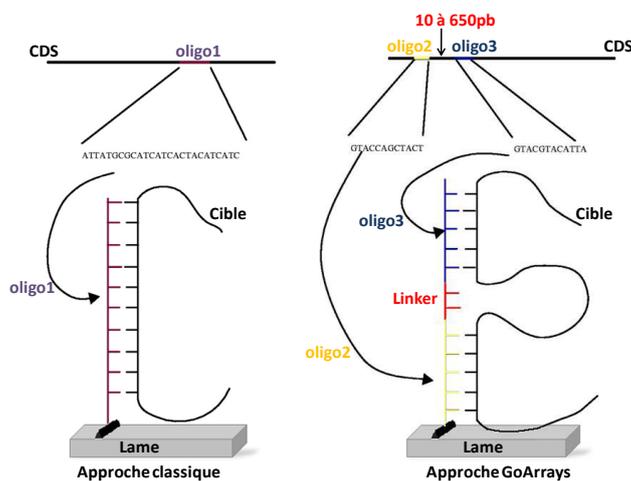


Figure 29 - Schéma de la stratégie GoArrays comparée à celle utilisée classiquement pour la détermination de sondes oligonucléotidiques (Rimour *et al.*, 2005).

Enfin, il est à noter que les biopuces ADN ne permettent qu'un suivi des microorganismes dont les gènes ont été séquencés. Ces outils sont donc limités par la quantité d'informations

disponibles dans les bases de données de séquences internationales, ce qui peut représenter un obstacle en écologie microbienne environnementale étant donné que la majorité des séquences restent encore inconnues. De ce fait, de nouvelles approches dites «exploratoires» ont récemment été développées (Militon *et al.*, 2007 ; Terrat *et al.*, 2010 ; Dugat-Bony *et al.*, 2011 ; Parisot *et al.*, 2012) pour l'étude taxonomique et fonctionnelle de communautés microbiennes complexes et reposent sur la conception de sondes dégénérées à partir des séquences disponibles. Bien qu'elles ne permettent pas l'identification réelle de nouveaux gènes, elles permettent de détecter les séquences présentes dans les bases de données et leurs variants potentiels qui n'ont pas encore été décrits (Dugat-Bony *et al.*, 2012b).

OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'évolution structurale et fonctionnelle de microbiotes digestifs sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques. Pour répondre à la question fonctionnelle ciblée sur la fibrolyse, une biopuce ADN fonctionnelle a été développée dans le but d'analyser l'effet des facteurs étudiés sur l'expression, par le microbiote digestif, de gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation des xylanes et de la cellulose, polysaccharides pariétaux majeurs de l'alimentation des animaux d'élevage. L'application de cet outil a été prévue pour des expérimentations bovines et porcines, toutefois, seuls les résultats obtenus sur le bovin seront présentés dans ce manuscrit.

Au cours de ce travail, toutes les étapes nécessaires à la mise en place de cette approche de métatranscriptomique dirigée ont été considérées et sont présentées selon un fil conducteur chronologique (Figure 30).

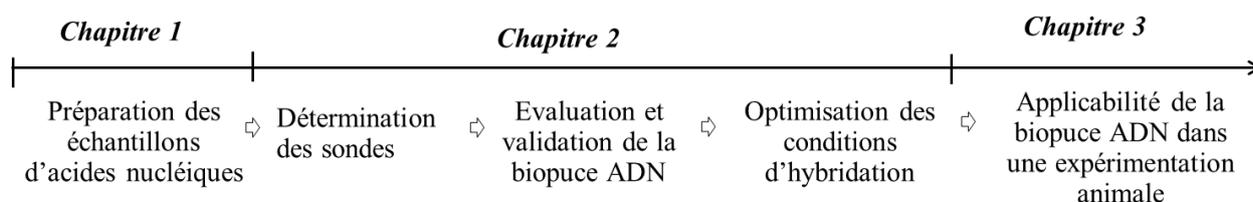


Figure 30 – Chronologie de la mise en place de l'approche de biopuce ADN fonctionnelle.

La première partie de ce travail a été consacrée au **développement d'une méthode originale d'enrichissement en ARNm dédiée aux échantillons ruminiaux**, qui représentait une étape indispensable pour atteindre les meilleurs niveaux de sensibilité de la biopuce ADN et ainsi développer un outil diagnostique à la fois sensible et spécifique nécessaire à notre projet. Au préalable, une **méthode de co-extraction d'ADN et d'ARN** a été optimisée pour les échantillons dont nous disposons, afin de s'assurer de la meilleure qualité et quantité d'acides nucléiques, représentatifs de la diversité microbienne de l'échantillon.

La deuxième partie de ce travail a porté sur le **développement de la biopuce et sa validation**. Pour cela, il a fallu déterminer des sondes oligonucléotidiques spécifiques et sensibles ciblant les gènes de familles de glycoside hydrolase et de carbohydre estérases les plus pertinentes dans le contexte de la fibrolyse chez les espèces animales ciblées. Ensuite, la validation de la biopuce ADN a été réalisée avec des échantillons d'acides nucléiques de différentes complexités (produits de PCR, ADNg et ARN de souches pures). Ces étapes assurent l'évaluation des critères essentiels définissant une biopuce ADN de qualité à savoir son

pouvoir discriminant (spécificité), son seuil de détection (sensibilité), sa capacité exploratoire et son caractère quantitatif. Enfin, les conditions d'hybridation ont été optimisées pour l'application de la biopuce à des échantillons d'ARN issus de contenu ruminal. Cette phase de validation a également été l'occasion d'étudier le transcriptome d'une souche de *Fibrobacter succinogenes*, espèce fibrolytique majeure du rumen, et utilisée comme modèle au laboratoire depuis de nombreuses années, cultivée dans deux milieux de composition différente en glucides.

La troisième partie de ce travail a été dédiée, au travers d'une **expérimentation animale bovine**, à la recherche d'effets d'additifs alimentaires (levures vivantes et huile de cameline) sur les fonctions fibrolytiques ruminales des communautés microbiennes. Ainsi, notre objectif était ici de tester l'application de la biopuce ADN à des échantillons biologiques complexes dans le contexte d'une étude nutritionnelle *in vivo*. Des modifications au niveau supérieur de la chaîne trophique (fibrolyse) peuvent en effet entraîner des modulations de composition et de niveaux de production des produits terminaux de la fermentation. Dans ce cadre, nous avons évalué la capacité des additifs à permettre des réductions d'émissions de méthane. Enfin, une analyse de la structure du microbiote a été réalisée par des approches de qPCR et de séquençage haut-débit d'amplicons d'ADNr16S des communautés bactériennes et archéennes, avec une attention particulière sur les communautés microbiennes fibrolytiques devant permettre une meilleure compréhension du fonctionnement de cet écosystème microbien.

RESULTATS

CHAPITRE 1

**Optimisation d'une méthode d'extraction d'ARN et
développement d'une méthode originale
d'enrichissement en ARNm**

I. INTRODUCTION

L'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) constitue la première étape pour l'étude des communautés microbiennes par des techniques d'écologie moléculaire. La qualité et la quantité des acides nucléiques extraits est un élément critique à prendre en compte afin d'obtenir les résultats les plus informatifs possibles. Par ailleurs, les microorganismes du rumen sont très divers et la résistance de leurs parois à la lyse peut varier. De ce fait, toutes les méthodes d'extraction ne sont pas équivalentes et peuvent significativement affecter la représentation des communautés microbiennes digestives (Henderson *et al.*, 2013). De nombreux protocoles d'extraction d'ADN ou d'ARN (Yu et Morrison, 2004 ; Kang *et al.*, 2009 ; Béra-Maillet *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2011a) ou de co-extraction des ADN et des ARN (Popova *et al.*, 2010) à partir de contenus ruminiaux ont été publiés et des kits commerciaux sont également disponibles. Toutefois, chaque méthode apparaît être optimisée pour les échantillons de l'étude où elle est appliquée ; une méthode apparaissant très efficace dans une étude peut ainsi apparaître décevante dans une autre. Aussi, il semble que la nature des échantillons, se différenciant essentiellement par l'origine des fibres (paille, foin, ensilage, herbe) et le niveau de digestion de ces fibres, influence directement la quantité et la qualité des acides nucléiques extraits. Dans notre problématique, la co-extraction d'ARN et d'ADN nous semblait particulièrement intéressante afin de limiter la variabilité. Aussi, une méthode d'extraction d'ARN développée au laboratoire (Béra-Maillet *et al.*, 2009) a été adaptée pour permettre la co-extraction des ADN et des ARN à partir d'échantillons ruminiaux destinés à être analysés par biopuce ADN. L'optimisation a essentiellement porté sur les conditions de lyse dans l'objectif d'utiliser des échantillons d'ADN et d'ARN les plus représentatifs des communautés microbiennes ruminales, et de la meilleure qualité et quantité.

Par ailleurs, l'étude du métatranscriptome par puces à ADN fonctionnelles et RNA-Seq représente une approche de choix pour l'investigation des fonctions microbiennes dans le rumen et plus largement dans les écosystèmes complexes. Cependant, dans ce type d'étude, la détection des transcrits peu abondants peut être limitée par la présence d'ARN ribosomiques (ARNr) représentant jusqu'à 85% des ARNs totaux (Poulsen *et al.*, 2013). L'enrichissement en ARN messagers (ARNm) par soustraction des ARNr apparaît donc comme une étape nécessaire et importante afin d'augmenter la sensibilité des puces à ADN et **limiter la profondeur de séquençage nécessaire dans les approches de séquençage de nouvelle génération**. Deux grands principes de soustraction des ARNm, exploités commercialement,

sont les plus couramment utilisés. Ils font appel à des exoenzymes capables de dégrader spécifiquement les ARNr (kit mRNA-ONLY Prokaryotic mRNA isolation, Epicentre) ou à la capture des ARNr à l'aide de sondes spécifiques (kit MicrobExpress, Ambion, et Ribozero, Epicentre). L'hybridation soustractive est généralement privilégiée car plus spécifique et performante que la méthode enzymatique (He *et al.*, 2010b). Cependant l'efficacité des kits commerciaux reposant sur ce principe, pourtant développés pour être généralistes, varie en fonction des microorganismes présents dans les communautés microbiennes étudiées (He *et al.*, 2010b ; Stewart *et al.*, 2010) et semble donc dépendre de la couverture taxonomique des sondes. Par ailleurs, ces kits sont généralement uniquement destinés à la soustraction des ARNr de bactéries. Aussi, le but de ce travail a été de développer une méthode efficace dédiée à des échantillons ruminiaux pour la soustraction des ARNr à partir d'ARN totaux. Cette méthode a été basée sur le dessin et l'emploi de sondes capables de capturer de façon spécifique des ARNr des divers microorganismes du rumen (bactéries, archées, champignons et protozoaires). La détermination des sondes de capture a été réalisée de manière à en limiter le nombre, réduisant ainsi le coût tout en gardant une efficacité optimale. Les conditions de capture ont été optimisées afin de s'assurer de la meilleure efficacité de capture des ARNr et de préserver les ARN polyadénylés. Finalement, l'efficacité de la méthode a été évaluée par RT-PCR quantitative.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. CO-EXTRACTION D'ADN ET D'ARN A PARTIR DE CONTENUS RUMINAUX

I.1.1. Echantillons de contenu ruminal

Les échantillons de rumen ont été prélevés sur des vaches canulées pendant l'expérimentation bovine (voir Chapitre 3). Brièvement, les échantillons de digesta, prélevés à quatre endroits différents au sein du rumen, ont été mélangés et un sous-échantillon de 50 g a été additionné à 100 mL d'une solution de RNAlater (Fisher Scientific), puis aliquoté. La solution de RNAlater permet ici de stabiliser les ARN et d'éviter leur dégradation au cours des étapes suivantes. Les échantillons ont d'abord été stockés à 4°C pendant 12 h puis mis à -80°C jusqu'à l'extraction des acides nucléiques.

I.1.2. Extraction des acides nucléiques

Avant l'extraction des acides nucléiques, toutes les solutions pouvant contenir des RNases et DNases ont été traitées avec 0,1% de DEPC (diéthyl pyrocarbonate). Seuls des consommables certifiés sans RNase et DNase ont été utilisés. L'extraction des acides nucléiques a été réalisée sur 400 mg de contenu ruminal. La solution de RNAlater a été éliminée après centrifugation pendant 15 min à 6000 g et à 4°C, puis l'échantillon a été lavé avec une solution de tampon phosphate (PBS) afin d'enlever les résidus de RNAlater.

Les échantillons ont été lysés mécaniquement par une étape de bead-beating et chimiquement en utilisant une solution de Trizol (Invitrogen, Chomczynski, 1993). Après ajout de chloroforme et séparation des phases organique et aqueuse, la phase organique a été utilisée pour la précipitation des ARN tandis que la phase aqueuse a servi à l'isolement des ADN. Les ADN contenus dans la phase organique ont été resolubilisés avec une solution BEB (Back Extraction Buffer ; guanidine thiocyanate 4 M, sodium citrate 50 mM, Tris 1 M, pH 8,0), puis après centrifugation, la phase aqueuse obtenue a été utilisée pour précipiter les ADN. Les ARN et les ADN ont été précipités par ajout d'isopropanol pur et d'une solution saline (NaCl 1,2 M, disodium citrate 0,8 M) permettant de limiter la co-précipitation des polysaccharides végétaux (Béra-Maillet *et al.*, 2009). Finalement, les solutions d'ADN et d'ARN obtenues ont été traitées à la RNase et la DNase, respectivement

Ce protocole d'extraction est décrit dans le détail en annexe 1.

II. ENRICHISSEMENT EN ARNm

II.1. Détermination des sondes de capture

Une étude bibliographique exhaustive a été réalisée afin d'établir un inventaire de tous les microorganismes ruminants identifiés au niveau du genre. Les séquences d'ADNr 16S, 18S, 23S et 28S de bonne qualité de chaque genre ont été extraites à partir de la base de données SILVA (Pruesse *et al.*, 2007), choisie pour la qualité des séquences qu'elle fournit. Pour la détermination des sondes, des alignements itératifs des séquences d'ADNr ont été effectués pour chaque groupe d'ADNr (Figure 31). Tout d'abord, les séquences appartenant à un même genre ont été alignées avec l'algorithme Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) en utilisant le logiciel MEGA (version 5, Tamura *et al.*, 2011). Chaque alignement a été vérifié et corrigé de manière à obtenir un alignement le plus homogène possible. Dans un second temps, en

utilisant le logiciel Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007), les alignements de genres ont été alignés successivement un à un en tenant compte de la position phylogénétique de chaque genre.

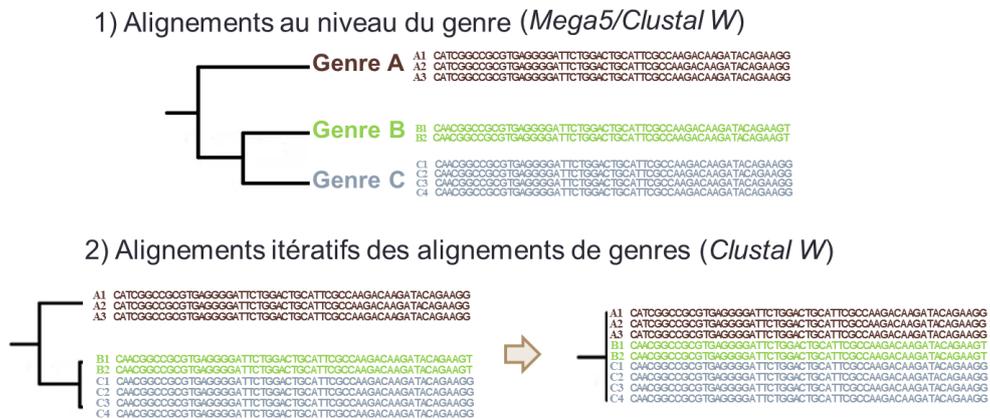


Figure 31 – Principe des alignements itératifs utilisés pour la détermination des sondes de capture.

Cette stratégie a permis d’obtenir des « masters » alignements présentant des régions conservées dans lesquelles les sondes de capture ont été déterminées. Pour aider au choix des sondes de capture, ces séquences conservées ont été traitées par le logiciel HiSpOD (Dugat-Bony *et al.*, 2011). Pour ceci, des oligonucléotides de 24 bases ont été déterminés et leur spécificité a été testée contre une base de données de séquences codantes dédiée aux écosystèmes environnementaux, propre à HiSpOD. Les oligonucléotides présentant le moins d’hybridations croisées avec des séquences codantes et pas d’hybridation avec des séquences codantes de microorganismes ruminants ont été sélectionnés. Finalement, les oligonucléotides sélectionnés ont été reverse complémentés et un homopolymère de 17 adénines a été rajouté en position 5’ des oligonucléotides.

II.2. Procédure d’enrichissement en ARNm

Toutes les solutions ont été traitées avec 0,1% de DEPC. Seuls des consommables certifiés sans RNase et DNase ont été utilisés. L’enrichissement a été réalisé à partir de 10 µg d’ARN totaux issus de contenu ruminal. La procédure d’enrichissement est résumée dans la Figure 32. Afin d’éviter la capture simultanée des ARN polyadénylés (ARN eucaryotes et de certains ARN procaryotes) et des ARNr, les ARN polyadénylés ont été isolés par capture avec des billes Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (1). Les ARN soustraits des ARN polyadénylés ont été mis en présence des sondes de capture, permettant ainsi aux sondes de s’hybrider avec leurs cibles

(2). Puis les complexes sondes-ADNr ont été capturés avec les billes Dynabeads Oligo(dT)₂₅ et éliminés (3). Finalement, les fractions des ARN polyadénylés et des ARN procaryotes enrichis en ARNm ont été poolées et précipitées à l'éthanol pur (4).

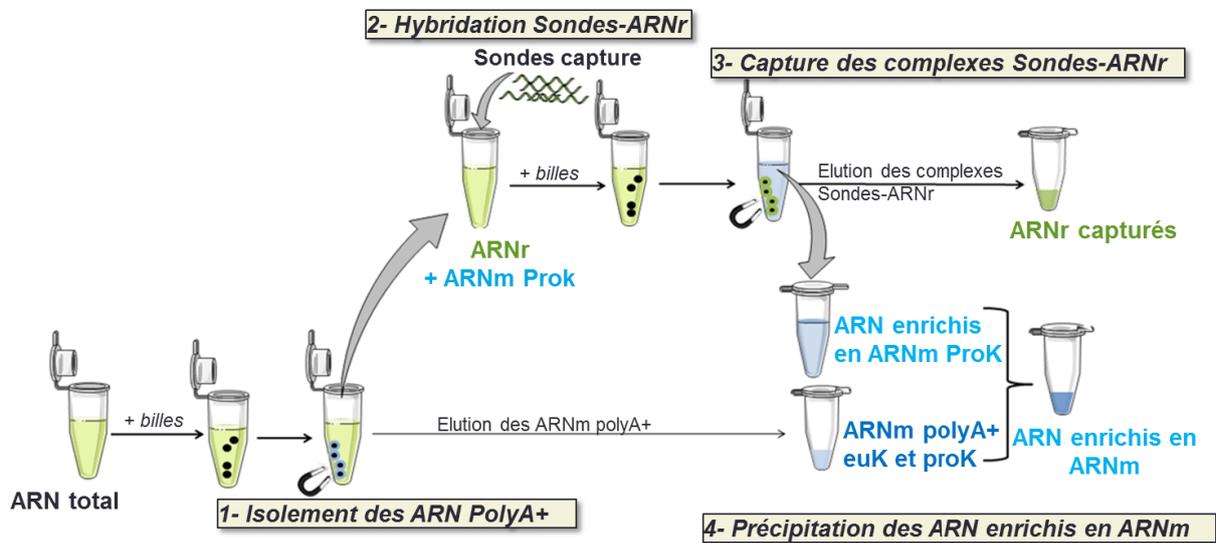


Figure 32 – Procédure simplifiée pour l'enrichissement en ARNm à partir d'ARN totaux de contenu ruminal. ProK, procaryotes ; Euk, eucaryotes ; PolyA+, ARNm polyadénylés.

Chaque sonde a été ajoutée dans les quantités présentées dans le Tableau 11.

Tableau 11 – Quantité ajoutée pour chacune des sondes déterminées.

	Sondes ciblant l'ADNr 16S/18S	Sondes ciblant l'ADNr 23S/28S
Bactéries	20 pmol	24 pmol
Archées	1 pmol	1,2 pmol
Protozoaires	0,25 pmol	0,3 pmol
Champignons	0,25 pmol	0,3 pmol

Un aliquot de l'échantillon d'ARN destiné à l'enrichissement subissant toute la procédure d'enrichissement mais sans capture des ARNr (échantillon contrôle) a été utilisé à chaque fois de manière à s'assurer qu'aucune dégradation ne se produisait.

Les détails de la procédure d'enrichissement sont donnés dans l'annexe 2.

II.3. Enrichissement en ARNm par le kit MicrobExpress

La procédure d'enrichissement en ARNm avec le kit MicrobExpress (Ambion) a été réalisée selon les recommandations du fournisseur.

II.4. VERIFICATION DE LA QUANTITE ET DE LA QUALITE DES ACIDES NUCLEIQUES

La quantité et la qualité des ADN et des ARN ont été évaluées au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). L'intégrité des ARN a été vérifiée à l'aide du kit RNA 6000 (Agilent technologies) et du BioAnalyzer Agilent 2100 (Agilent technologies) selon les recommandations du fournisseur.

II.5. QUANTIFICATION DE GROUPES MICROBIENS RUMINAUX PAR PCR ET RT-PCR QUANTITATIVES

Pour la validation de la co-extraction des ADN et des ARN, les bactéries totales et les champignons ont été quantifiés par PCR quantitative à partir de l'ADN co-extrait tandis que l'efficacité de l'enrichissement en ARNm a été évaluée par RT-qPCR en quantifiant les quatre groupes microbiens ruminiaux (bactéries, archées, champignons et protozoaires). Pour ceci, 100 ng d'ARN ont été rétrotranscrits en ADNc avec la reverse transcriptase SuperScript II (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les groupes microbiens ruminiaux ont été quantifiés par PCR quantitative (qPCR) en ciblant le gène codant l'ARNr 16S pour les bactéries et les archées méthanogènes, le gène codant l'ARNr 18S pour les protozoaires et la région ITS1 pour les champignons. Pour cette dernière cible, nous avons donc quantifié le pré-ARNr et non l'ARNr. Les réactions de qPCR ont été réalisées en utilisant la chimie SYBR-green et le thermocycleur MasterCycler epRealplex (Eppendorf). Les couples d'amorces et les conditions de PCR sont celles décrites dans la littérature pour les archées méthanogènes (Ohene-Adjei *et al.*, 2007), les protozoaires (Sylvester *et al.*, 2005) et les champignons (Denman and McSweeney, 2006). Les bactéries totales ont été quantifiées en utilisant les amorces 520F et 799R2 (Edwards *et al.*, 2007, 2008) (Tableau 12). Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un volume total de 20 µL, contenant 10 µL de 2X Takara SYBR Premix Ex Taq (Lonza), 40 ng d'échantillon d'ADN ou 1 ng d'ADNc et 0,5 µM de chacune des amorces.

Tableau 12 – Amorces utilisées pour la PCR et la RT-PCR quantitative.

Groupes microbiens	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du fragment
Bactéries totales	AGCAGCCGCGGTAAT CAGGGTATCTAATCCTGTT	280 pb
Archées méthanogènes	GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA ACGGGCGGTGTGTGCAAG	233 pb
Champignons	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	120 pb
Protozoaires	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT CTTGCCCTCYAATCGTWCT	223 pb

Des réactions qPCR avec 1 ng d'ARN non rétrotranscrits ont également été réalisées pour chacune des cibles afin d'évaluer la contamination des ARN en ADN. Pour chaque duplicat d'extraction, la réaction a été effectuée en triplicat dans des plaques 96 puits (Biorad) assurant ainsi des résultats de quantification fiables. Des gammes étalons ont été utilisées afin de déterminer l'abondance absolue des groupes microbiens ciblés, exprimée en log de copies d'ADN par μg d'ADN. Pour les bactéries totales, les bactéries cellulolytiques et les archées méthanogènes, les gammes ont été réalisées comme décrit précédemment (Mosoni *et al.*, 2011). La gamme étalon a été réalisée avec des produits de PCR (d'environ 1485 pb) en mélange équimolaire provenant de l'amplification de l'ADNr 16S de 11 souches bactériennes représentatives de la diversité du rumen, *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC19169), *Ruminococcus flavefaciens* c94 (ATCC19208), *Ruminococcus albus* 7 (ATCC27210), *Butyrivibrio fibrisolvens* (DSM3071), *Eubacterium limosum* (ATCC80489), *Prevotella bryantii* B14 (DSM11371), *Peptostreptococcus* sp. D1 (isolée au laboratoire), *Megasphaera elsdenii* (DSM20460), *Selenomonas ruminantium* (DSM2872) et *Streptococcus bovis* (DSM20480). Les souches utilisées pour l'amplification de la gamme étalon des bactéries cellulolytiques sont *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC19169) et *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, pour la gamme étalon des archées méthanogènes, *Methanobrevibacter smithii* 861. Pour les protozoaires, des plasmides pSC-A-amp/kan (Strataclone PCR cloning kit, Agilent Technologies) contenant la quasi-totalité du gène codant l'ARNr 18S de *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* et *Ostracodinium dentatum* ont été mélangés en quantités égales. Les plasmides ont été fournis par F. Ossa (Institut Rosell/Lallemand, Montréal, Canada). Pour les champignons, un fragment de la région ITS1 d'une souche *Piromyces* sp. isolée au laboratoire a été amplifié en utilisant les amorces qPCR,

comme décrit par Lwin *et al.* (2011), et clonés en utilisant le kit pCR2.1 Topo TA Cloning kit (Invitrogen, Life technologies) selon les instructions du fournisseur. Le nombre de copies de gène présent dans chaque solution de plasmides a été calculé en utilisant la concentration d'ADN plasmidique et la masse moléculaire du vecteur et de l'insert. Pour chaque cible, une gamme étalon a été préparée de 10^2 à 10^9 copies par dilution sériée.

III. RESULTATS

III.1. CO-EXTRACTION D'ADN ET D'ARN A PARTIR DE CONTENUS RUMINAUX

La méthode de Béra-Maillet *et al.* (2009), précédemment développée au laboratoire, basée sur une procédure acide guanidinium–phénol–chloroforme et une précipitation saline, a été adaptée à l'utilisation du Trizol (Invitrogen), solution proche de celle utilisée par Béra-Maillet *et al.* et permettant de faire aisément la co-extraction des ADN, ARN et protéines à partir d'un même échantillon. Pour ceci, la solution RNA-E a été remplacée par le Trizol et les volumes de solution ont été réduits proportionnellement afin de permettre de réaliser l'extraction en petit volume et de rendre la procédure moins lourde. L'optimisation a ensuite porté sur les conditions de lyse des cellules. Les aliquots d'un même échantillon ont subi différents temps d'homogénéisation au FastPrep (2 fois 30 sec, 2 fois 40 sec, 2 fois 60 sec), accompagnés ou non d'un choc thermique de 2 fois 2 min à 60°C. L'intégrité et la quantité des ARN ainsi que la quantité des ADN extraits ont été comparées afin de déterminer la meilleure condition de lyse (Tableau 13). Les rendements et la qualité des acides nucléiques apparaissent assez variables entre les duplicats d'extraction. La durée de lyse mécanique de 2 x 60 sec a permis d'obtenir le meilleur rendement d'ADN et d'ARN tout en conservant une bonne qualité d'ARN. A durée de lyse mécanique égale, les chocs thermiques ont toujours conduit à une diminution des valeurs de l'intégrité des ARN (RIN : RNA Integrity Number), indiquant un niveau de dégradation plus élevé, mais aussi à un meilleur rendement. Il est généralement admis qu'une valeur de RIN supérieure à 8 est acceptable pour des échantillons environnementaux mais ici pour que l'enrichissement en ARNm et que leur hybridation sur la biopuce ADN soient les plus efficaces, l'intégrité des ARN doit être préservée le plus possible. Aussi, les chocs thermiques n'ont pas été retenus afin de privilégier la qualité des ARN.

Tableau 13 – Quantité et qualité des ADN et des ARN obtenus pour chaque duplicat d'extraction en fonction des conditions de lyse. RIN, RNA Integrity Number. CT, choc thermique.

Conditions de lyse	ADN		ARN			
	Quantité (µg/g de contenu)		Quantité (µg/g de contenu)		Intégrité (RIN)	
	Sans CT	Avec CT	Avec CT	Avec CT	Sans CT	Avec CT
FastPrep 2 x 30 sec	15,8	25,2	28,4	35,2	8,3	8,1
	59,3	65,4	86,8	60,3	8,4	8,0
FastPrep 2 x 40 sec	40,5	42,5	65,2	77,7	9,6	8,2
	65,1	75,3	80,3	89,2	8,5	8,0
FastPrep 2 x 60 sec	54,3	78,3	68,2	95,4	8,5	8,2
	75,3	65,7	103,5	90,3	8,5	8,1
FastPrep 2 x 90 sec	77,4	79,2	92,7	93,2	8,4	7,4
	60,2	85,4	65,8	107,6	7,8	7,9

Afin de s'assurer que les différents microorganismes du rumen ont été extraits correctement, les bactéries et les champignons, dont la paroi est particulièrement résistante à la lyse, ont été quantifiés par RT-qPCR à partir des ARN extraits avec les différentes conditions de lyse. Aucune différence significative de l'abondance des microorganismes cibles n'a pu être observée (données non montrées), démontrant que l'extraction des ARN était efficace quelle que soit la durée de lyse. De ce fait, la durée de lyse de 2 fois 60 sec, sans choc thermique, a été sélectionnée parce qu'elle permettait de conserver une bonne intégrité des ARN tout en offrant le meilleur rendement d'acides nucléiques. Les échantillons d'ARN extraits dans ces conditions ont ensuite été utilisés pour l'enrichissement en ARNm.

III.2. ENRICHISSEMENT DES ARN EN ARNm

Afin de s'assurer la meilleure sensibilité de la biopuce ADN fonctionnelle, une stratégie d'enrichissement des ARNm par capture des ARNr a été optimisée pour son application à des ARN extraits de contenus ruminiaux. Des sondes de capture présentant des régions complémentaires aux ARNr 16S et 23S des bactéries et des archées, et 18S et 28S des protozoaires et champignons ont été déterminées.

III.2.1. Détermination des sondes de capture

Un inventaire exhaustif des genres microbiens ruminiaux a permis de créer une base de séquences d'ADNr dédiée contenant près de 23000 séquences ciblant 204 genres ruminiaux de bactéries, archées, protozoaires et champignons (Tableau 14). Le niveau taxonomique du genre a été choisi de manière à prendre en compte une large diversité des séquences. Toutefois, le nombre de séquences présentes dans la base dédiée est dépendant des séquences disponibles dans la base de données SILVA, ce pourquoi relativement peu de séquences de protozoaires et de champignons ont été utilisées. Toutefois, la plupart des genres identifiés dans la littérature ont pu être intégrés dans la base de séquences dédiée.

Tableau 14 – Nombre de séquences utilisées pour construire la base de séquences dédiée à l'écosystème ruminal et nombre de genres ciblés.

		Nombres de séquences d'ADNr		Nombre de genres
		16S/18S	23S/28S	
Procaryotes	Bactéries	18000	4800	179
	Archées	142	34	10
Eucaryotes	Protozoaires	36	3	10
	Champignons	22	27	5

La stratégie d'alignements itératifs des séquences d'ADNr a conduit à la réalisation de près de 200 alignements qui ont permis de déterminer 9 « master » alignements (deux pour l'ADNr 16S bactérien et un pour chacune des autres cibles) dans lesquels 18 sondes ciblant toutes les séquences d'ADNr 16S et 23S des bactéries et des archées, et d'ADNr 18S et 28S des champignons et des protozoaires ont été sélectionnées (Tableau 15). Les sondes ont été sélectionnées de manière à cibler différentes régions de l'ADNr afin de rendre l'enrichissement plus efficace.

Tableau 15 – Séquences des sondes de soustraction, ciblant l'ADNr 16S et 23S des bactéries et des archées, et l'ADNr 18S et 28S des champignons et des protozoaires.

Groupe microbien	ADNr	Sonde	Séquence 5'-3'
Bactéries	16S	16Sbact514	HCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG
		16Sbact900	GCTTGTGCGGGYCCCCGTCAATTCC
		16Sbact780	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
	23S	23Sbact1050	TGGCTGCTTCYAAGCCAACATCCT
		23Sbact1920	GACAAGGAATTCGCTACCTTAGGA
		23Sbact2240	GGAGGCGACCYCCCCAGTCAAAC
Archées	16S	16Sarch830	CCCCGCCAATTCCTTTAAGTTTCA
		16Sarch1004	TCGCTCGTTGCCTGACTTAACAGGA
	23S	23Sarch1907	TACCTTAAGAGGGTYATAGTTACCC
		23Sarch2572	CACGACGGTCTAAACCCAGCTCACG
Protozoaires	18S	18Sprot522	CTATTAGAGCTGGAATTACCGCGGC
		18Sprot1146	CCACCAACTAAGAACGGCCATGCAC
	28S	28Sprot481	CCAATCACACCCTAACCGGCTAAGC
		28Sprot178	CACACGCTATACGAGGCTTGACTC
Champignons	18S	18Sfung789	CATTACTTCGGTCTAGAAACCAAC
		18Sfung1060	AGCCTTGCGACCATACTCCCCCGG
	28S	28Sfung638	CTGCAGACCTCAATCTCTCCGATTG
		28sfung1941	GGACCGTTAGGAACGCACCGGACAT

III.2.2. Evaluation de l'efficacité de la soustraction des ARNr

Le protocole d'enrichissement proposé a été optimisé en jouant sur la quantité de sondes et de billes utilisées, et les temps d'hybridation sondes-ARNr. A chaque test, le profil de Bioanalyzer Agilent a été utilisé pour évaluer l'efficacité de soustraction des ARNr. Les résultats présentés ne portent que sur les conditions de capture optimisées.

Afin de vérifier que le protocole de soustraction n'entraîne pas de dégradation des ARN, nous avons utilisé un échantillon de contenu de rumen ayant subi toutes les étapes mais sans élimination des ARNr (échantillon contrôle). Les profils de Bioanalyzer (Figure 33) montrent que la procédure d'enrichissement en ARNm n'a pas entraîné de dégradation des ARN, étant donné que le RIN, reflétant l'intégrité des ARN, est pratiquement inchangé. L'échantillon contrôle permet par ailleurs d'évaluer le taux de perte des ARN pendant leur précipitation, estimé ici à 20%.

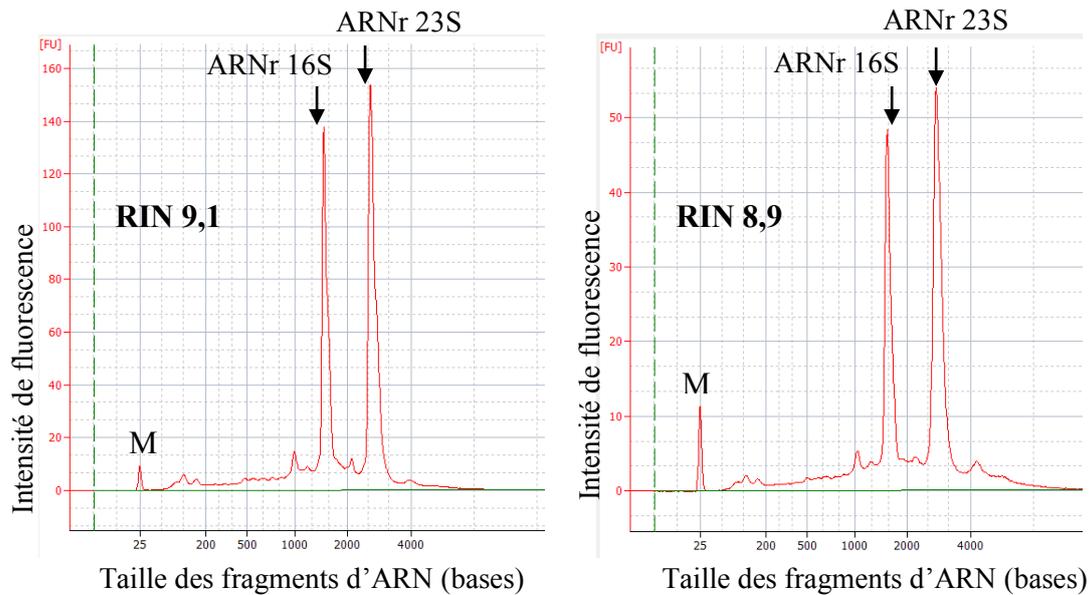


Figure 33 – Profils de Bioanalyzer Agilent de l'échantillon d'ARN total de départ (à gauche) et du même échantillon ayant subi toute la procédure d'enrichissement sans capture des ARNr (contrôle). Les pics majoritaires d'ARNr 16S et 23S sont indiqués par des flèches. M, marqueur.

La procédure d'enrichissement des ARNm a alors été mise en place en comparant l'efficacité du kit MicrobExpress (uniquement destiné à la soustraction des ARNr 16S et 23S bactériens) et de notre stratégie (Figure 34).

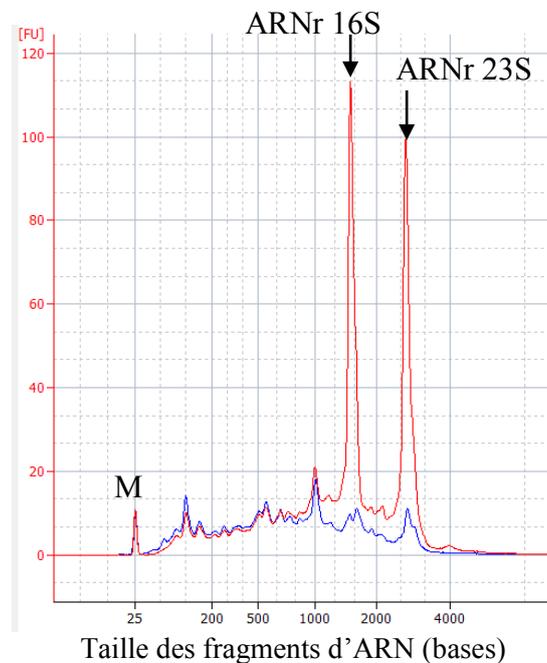


Figure 34 – Profils de Bioanalyzer Agilent des ARN enrichis avec le kit MicrobExpress (en rouge) et la méthode d'enrichissement développée (en bleu). Les pics majoritaires d'ARNr 16S et 23S sont indiqués par des flèches. M, marqueur.

Il apparaît clairement que la soustraction des ARNr avec le kit commercial n'est pas adaptée pour les échantillons de rumen car les pics des ARNr restent à des niveaux très élevés. A l'inverse, notre méthode montre une très bonne efficacité avec une disparition quasi complète des pics d'ARNr.

Afin de mesurer l'efficacité de la soustraction, les ARNr 16S et 18S de chacun des groupes microbiens (bactéries, archées et protozoaires) ont été quantifiés par RT-qPCR sur des triplicats d'enrichissement réalisés sur 2 échantillons différents d'ARN issus de contenus ruminiaux (Tableau 16). Pour les champignons, le précurseur des ARNr a été quantifié en ciblant la région ITS1.

Tableau 16 – Quantification du nombre de copies d'ADNr avant et après enrichissement en ARNm évaluée par RT-qPCR et pourcentage d'élimination des ARNr observée dans les fractions d'ARN enrichies en ARNm comparée aux ARN totaux.

Cibles ARNr	Réplicats techniques	Nombre de copies/ μg d'ARN				Pourcentage d'élimination des ARNr ⁽¹⁾	
		ARN1		ARN2		ARN1	ARN2
		Avant	Après	Avant	Après		
ARNr 16S Bactéries totales	1		1,83.10 ⁹		2,27.10 ⁹	- 92,93%	- 92,59%
	2	2,58.10 ¹⁰	2,56.10 ⁹	3,07.10 ¹⁰	5,47.10 ⁹	- 90,08%	- 82,17%
	3		2,20.10 ⁹		5,09.10 ⁹	- 91,47%	- 83,41%
ARNr 16S Archées	1		4,18.10 ⁸		1,20.10 ⁸	+ 82,71%	- 47,60%
	2	2,29.10 ⁸	3,78.10 ⁸	2,29.10 ⁸	1,51.10 ⁸	+ 65,21%	- 34,06%
	3		2,50.10 ⁸		1,84.10 ⁸	+ 9,19%	- 19,65%
ARNr 18S Protozoaires	1		1,44.10 ⁷		1,67.10 ⁷	- 78,06%	- 89,59%
	2	6,54.10 ⁷	1,29.10 ⁷	1,60.10 ⁸	3,72.10 ⁷	- 80,35%	- 76,78%
	3		1,03.10 ⁷		3,75.10 ⁷	- 84,32%	- 76,56%
Précurseur ARNr Champignons	1		7,99.10 ⁵		2,53.10 ⁵	- 23,25%	- 79,13%
	2	1,04.10 ⁶	5,18.10 ⁵	1,21.10 ⁶	4,11.10 ⁵	- 50,29%	- 66,03%
	3		5,19.10 ⁵		4,85.10 ⁵	- 50,14%	- 59,92%

⁽¹⁾ Le pourcentage d'élimination des ARNr a été calculé en réalisant le rapport du nombre de copies d'ARNr/ μg d'ARNr après enrichissement sur le nombre de copies d'ARNr/ μg d'ARNr avant enrichissement, multiplié par 100.

Les témoins négatifs de reverse transcription ont permis de vérifier qu'il n'y avait pas de contamination d'ADN (données non montrées) car aucune fluorescence n'a pu être mesurée pour ces échantillons. La soustraction des ARNr 16S bactériens et des ARNr 18S de

protozoaires a été la plus efficace et a conduit en moyenne à 88,8% et 81% d'ARNr en moins, respectivement. Elles sont également les plus répétables. La soustraction des ARNr 16S des archées n'a pas fonctionné du tout sur l'échantillon 1. On observe par ailleurs leur enrichissement. Il est possible que les sondes de capture archées aient été omises par erreur dans cet échantillon. Pour l'échantillon 2, en moyenne 33,8% des ARNr ont été retirés. La soustraction des ARNr 18S des champignons semblent être la moins répétable avec en moyenne 41,4 et 68,3% des ARNr soustraits.

IV. DISCUSSION

Un intérêt particulier a été porté à la préparation des échantillons d'acides nucléiques qui seront hybridés sur la biopuce ADN ou utilisés pour des analyses complémentaires (quantification des microorganismes par qPCR par exemple). L'objectif ici était de proposer une procédure, adaptée aux échantillons de contenus ruminiaux disponibles, qui permette de disposer des ARN présentant les caractéristiques les plus adéquates à l'approche de biopuce ADN : une bonne représentativité des microorganismes ruminiaux ainsi qu'une bonne qualité et quantité des acides nucléiques, et un enrichissement du pool d'ARNm, molécules ciblées par la biopuce, offrant une sensibilité accrue de la biopuce ADN.

IV.1. CO-EXTRACTION D'ADN ET D'ARN A PARTIR DE CONTENUS RUMINAUX

Dans le but d'obtenir des acides nucléiques de qualité et en quantité suffisante, la co-extraction d'ADN et d'ARN pour les échantillons de contenus ruminiaux dont nous disposions a été optimisée à partir du protocole de Béra-Maillet *et al.* (2009) dont l'efficacité a été montrée dans notre laboratoire. Différentes conditions de lyse (mécanique ou thermique) ont été évaluées. Une variabilité du rendement et de la qualité des ARN entre les répliquats techniques a pu être observée quelle que soit la condition de lyse, allant jusqu'à un facteur 3. Ces variabilités d'extraction sont par ailleurs fréquemment observées au laboratoire (Mosoni *et al.*, 2007) et pourraient être attribuées à l'hétérogénéité de l'échantillon. Une pré-étape de broyage grossier des échantillons de contenu de rumen avant leur aliquotage et leur stockage aurait ainsi pu être rajoutée à la procédure mise en place, afin de rendre l'échantillon plus homogène comme cela a déjà été proposé (Popova *et al.*, 2010). Cependant, dans les

conditions de lyse testées, l'efficacité d'extraction des ADN des bactéries et des champignons ruminants, mesurée par qPCR, n'a pas été affectée significativement. Ceci démontre, qu'avec la procédure au Trizol utilisée ici, quel que soit le rendement d'extraction, la représentativité des microorganismes est conservée. La lyse mécanique d'une durée de deux fois 60 sec a été retenue pour ces échantillons. Cependant, il est possible que ce temps de lyse doive être adapté pour des échantillons provenant d'animaux avec une alimentation différente, par exemple.

IV.2. ENRICHISSEMENT EN ARNm

Une méthode d'enrichissement en ARNm, reposant sur le principe de soustraction des ARNr par capture, a été développée pour les échantillons d'ARN extraits avec la méthode optimisée. La détermination des sondes de capture a été réalisée de manière à cibler l'ensemble des ARNr 16S, 18S, 23S et 28S contenus dans les ARN extraits en se basant sur l'état des connaissances de la diversité du microbiote ruminal. La stratégie d'alignements itératifs utilisée a permis de déterminer un minimum de sondes couvrant le maximum de diversité microbienne, ce qui réduit considérablement la complexité des sondes et potentialise l'efficacité de capture des ARNr. Pour chaque ARNr, deux régions ont été ciblées de manière à pallier à un problème d'accessibilité de la région cible (Weeks, 2010). Une comparaison avec le kit MicrobExpress (Ambion), reposant sur le même principe et conçu pour être généraliste, a mis en évidence que les sondes déterminées offraient une meilleure efficacité de capture des ARNr. La couverture taxonomique des sondes semblent ici être le point crucial dans l'efficacité de ce type d'approche. En effet, il a été auparavant observé que suivant la composition taxonomique de communautés artificielles, la soustraction des ARNr pouvait être plus ou moins efficace (He *et al.*, 2010b ; Stewart *et al.*, 2010 ; Giannoukos *et al.*, 2012). Stewart *et al.* (2010) avait dans ce sens proposé une méthode de capture des ARNr spécifique à des échantillons de communautés planctoniques marines, en synthétisant des sondes biotinyllées par reverse-transcription des ARNr. Cette approche a permis de réduire de 40 à 58% le nombre de séquences d'ARNr retrouvées par séquençage mais apparaît particulièrement lourde et coûteuse, en comparaison de celle optimisée dans ce travail. Par ailleurs, étant donné que la méthode repose sur l'utilisation de billes polydT permettant la capture de sondes polyadényllées, les étapes de la procédure d'enrichissement ont été organisées de manière à préserver les ARNm polyadényllés. En effet, les ARN eucaryotes présentent une queue polyA qui pourrait causer leur capture accidentelle et compromettre

l'analyse de l'expression génique des champignons et des protozoaires. De plus, il est aujourd'hui établi que le processus de polyadénylation des ARNm intervient aussi dans la régulation post-transcriptionnelle chez les procaryotes (Rorbach *et al.*, 2014). Cet élément n'a semble-t-il pas été pris en compte par les utilisateurs du kit MicroExpress. Dans notre procédure, la première étape d'isolement des ARNm polyadénylés est donc indispensable. Toutefois, l'utilisation de sondes biotinylées permettrait de supprimer cette étape d'isolement des ARN eucaryotes mais représenterait un coût supplémentaire.

L'efficacité de soustraction des ARNr, mesurée par quantification des ARNr 16S et 18S, a été inégale en fonction des différentes cibles. La capture des ARNr 16S bactériens et 18S des protozoaires est la plus efficace et reproductible entre réplicats et échantillons. Du fait que les bactéries représentent jusqu'à 99% de la population microbienne, il est particulièrement intéressant de noter que la soustraction des ARNr 16S soit la plus efficace de toutes, avec en moyenne 88% des ARNr soustraits sur tous les réplicats. La capture des ARNr 16S d'archées est la moins efficace avec 33,6% de molécules soustraites. Cependant, étant donné que celle-ci n'a pas fonctionné sur l'un des deux échantillons d'ARN (certainement par omission des sondes), il est difficile de conclure sur la reproductibilité de la soustraction des ARNr 16S pour les archées. Toutefois, il est important de noter que les archées sont le deuxième groupe microbien ruminal et représentent environ 1% de la population microbienne totale. Le manque d'efficacité observé au moins sur un échantillon, en comparaison avec les autres ARNr ciblés, montre qu'il serait nécessaire de déterminer de nouvelles sondes dans le but d'améliorer la soustraction des ARNr. Enfin, la soustraction des ARNr 18S des champignons a été évaluée par quantification des précurseurs d'ARNr puisque les régions intergéniques (ITS) étaient ciblées par la qPCR. Entre 41 et 68% des pré-ARNr ont été éliminés. Toutefois, du fait de leur longueur, leur capture peut avoir été moins efficace que pour les ARNr 18S et nous sous-estimons peut-être l'efficacité de soustraction de ces derniers. Une quantification spécifique des ARNr 18S des champignons nous permettra de confirmer le taux de soustraction de ces ARN.

V. CONCLUSION

La méthode d'enrichissement en ARNm développée spécifiquement pour son application à des échantillons d'ARN issus de contenus ruminiaux a montré une très bonne efficacité en comparaison du kit commercial MicroExpress (Ambion). L'approche dédiée apparaît ainsi la

plus appropriée pour nos échantillons. La méthode développée pourrait cependant encore être améliorée en optimisant le jeu de sondes de capture mais elle apparaît déjà très efficace et permet sa mise en œuvre dans le cadre de nos études.

CHAPITRE 2

**Développement d'une biopuce ADN ciblant les gènes
codant des enzymes impliquées dans la dégradation de
la cellulose et des xylanes**

I. INTRODUCTION

La cellulose et les hémicelluloses, principaux polysaccharides des parois végétales, constituent une fraction importante de la ration des bovins. Pourtant, ce sont les glucides complexes alimentaires les moins bien dégradés (Van Soest, 1982) et leur digestibilité peut dépendre de la nature et de l'origine des fibres végétales, mais aussi de l'abondance et de l'activité des microorganismes fibrolytiques eux-mêmes sous la dépendance des conditions écologiques du milieu digestif (voir Synthèse bibliographique, §IV.1). La dégradation complète de la cellulose et des xylanes requiert de nombreuses activités enzymatiques capables d'agir en synergie. De ce fait, les microorganismes fibrolytiques des écosystèmes digestifs comportent un vaste répertoire de gènes codant des enzymes impliquées dans ce processus. De plus, les études transcriptomiques sur souches pures montrent que ces microorganismes élaborent une réponse transcriptionnelle complexe dépendante du type de substrat disponible (voir Synthèse bibliographique, §III.2.5.1.2.). Aussi, afin d'étudier et comprendre l'effet de facteurs biotiques ou abiotiques sur l'activité de la population fibrolytique des écosystèmes digestifs, une approche de métatranscriptomique haut-débit ciblée utilisant les biopuces ADN s'avère être l'approche la mieux adaptée. En effet, le traitement des données de séquençage haut-débit d'ARN (RNA-Seq) de communautés microbiennes complexes reste encore difficilement accessible du fait de limitations dans les ressources bioinformatiques et du manque de génomes de référence (en particulier pour l'écosystème rumen), mais aussi du coût des analyses permettant d'obtenir des profondeurs de séquençage suffisantes pour caractériser les expressions des gènes de la fibrolyse (voir Synthèse bibliographique, §V.2.2.5.2.). De plus, l'analyse de plusieurs dizaines d'échantillons, généralement générés lors d'expérimentations animales, du fait du nombre élevé d'animaux souvent nécessaire, et/ou d'études cinétiques, apparaît de fait particulièrement coûteuse. En conséquence, les biopuces ADN fonctionnelles demeurent des approches transcriptomiques de choix et ont été appliquées avec succès pour différentes applications en écologie environnementale (voir Synthèse bibliographique, §V.2.2.6.2.). L'approche biopuce ADN fonctionnelle développée ici cible des gènes codant des familles de glycoside hydrolases (GH) et de carbohydate estérases (CE), portés par les microorganismes fibrolytiques du rumen et du colon, principalement, qui présentent un intérêt particulier dans la dégradation de la cellulose et des xylanes dans les écosystèmes digestifs. Huit familles de gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes,

principaux polysaccharides pariétaux de l'alimentation du bovin et du porcin, sont ciblées par cette approche de biopuce ADN. Il s'agit des familles de glycoside hydrolases GH5, 9, 10, 11, 43 et 48 et des familles de carbohydrate estérases CE1 et CE6. Ces familles ont été sélectionnées d'après les informations mécanistiques connues pour ces enzymes et les données de génomique permettant d'identifier le répertoire enzymatique des microorganismes fibrolytiques (voir Synthèse bibliographique, Partie III). Ainsi, certaines familles ont été sélectionnées du fait de leur fréquence au sein du génome des microorganismes fibrolytiques, ce qui suggère leur rôle important dans le mécanisme de fibrolyse. Les familles GH5, GH9 et GH43 sont ainsi présentes en grand nombre de copies dans le génome des bactéries et la famille GH48 dans celui des champignons. En outre, les cellulases GH9 et GH48 sont des enzymes clés des cellulosomes des Ruminocoques et des champignons. Les GH9 qui sont pour la plupart des endoglucanases, et pour certaines processives, ont potentiellement un rôle important dans la dégradation de la cellulose cristalline. Les familles GH5 et GH48 sont en particulier associées à des endoglucanases et cellobiohydrolases, dont l'activité synergique a pu être démontrée. Ces trois familles de cellulases GH5, GH9 et GH48 ont ainsi été sélectionnées pour cibler l'activité cellulolytique des microorganismes des écosystèmes digestifs. Concernant la dégradation des xylanes, les familles GH5, GH10, GH11 et GH43 contiennent des endoxylanases, enzymes clés de ce processus, qui coupent à l'intérieur des chaînes principales de xylanes. Les familles GH10 et GH11 sont particulièrement pertinentes du fait qu'elles sont constituées presque exclusivement d'endoxylanases. Elles ont également été identifiées dans les systèmes Xus de *Bacteroidetes* xylanolytiques, systèmes qui permettent une optimisation de l'utilisation des produits de dégradation des xylanes. La famille GH5, quant à elle, contient peu d'endoxylanases mais leur présence au sein de systèmes Xus suggère également un rôle important dans la dégradation des xylanes. La famille GH43, présente en grand nombre de copies dans le génome des bactéries fibrolytiques, est par contre polyspécifique. Bien que quelques xylanases soient présentes dans cette famille, elle contient principalement des xylosidases et des enzymes débranchantes comme les arabinofuranosidases. Enfin deux familles de féruloylestérases (CE1) et d'acétylxylane estérases (CE1 et CE6) sont aussi ciblées par la biopuce. Les féruloylestérases, du fait de leur capacité à dissocier la lignine des hémicelluloses, ont un rôle très important dans la dégradation des xylanes en permettant de rendre ces polysaccharides accessibles aux autres enzymes. La famille CE1, dont un nombre important de copies est présent au sein des génomes des bactéries et des champignons, est composée essentiellement d'acétyl-, de

féruloyl- et de cinnamoyl-estérase, mais d'autres enzymes telles que des carboxylestérase, qui ne sont pas impliquées dans la dégradation des fibres végétales, sont également retrouvées dans cette famille. La famille CE6 est pour sa part exclusivement constituée d'acétyl estérase qui débranchent les groupements acétyl présents sur les chaînes de xylose. Leur activité est également nécessaire pour permettre aux enzymes xylanolytiques d'accéder à leur substrat. Les familles choisies présentent ainsi des activités complémentaires permettant de dégrader en grande partie la cellulose et les xylanes (Figure 35).

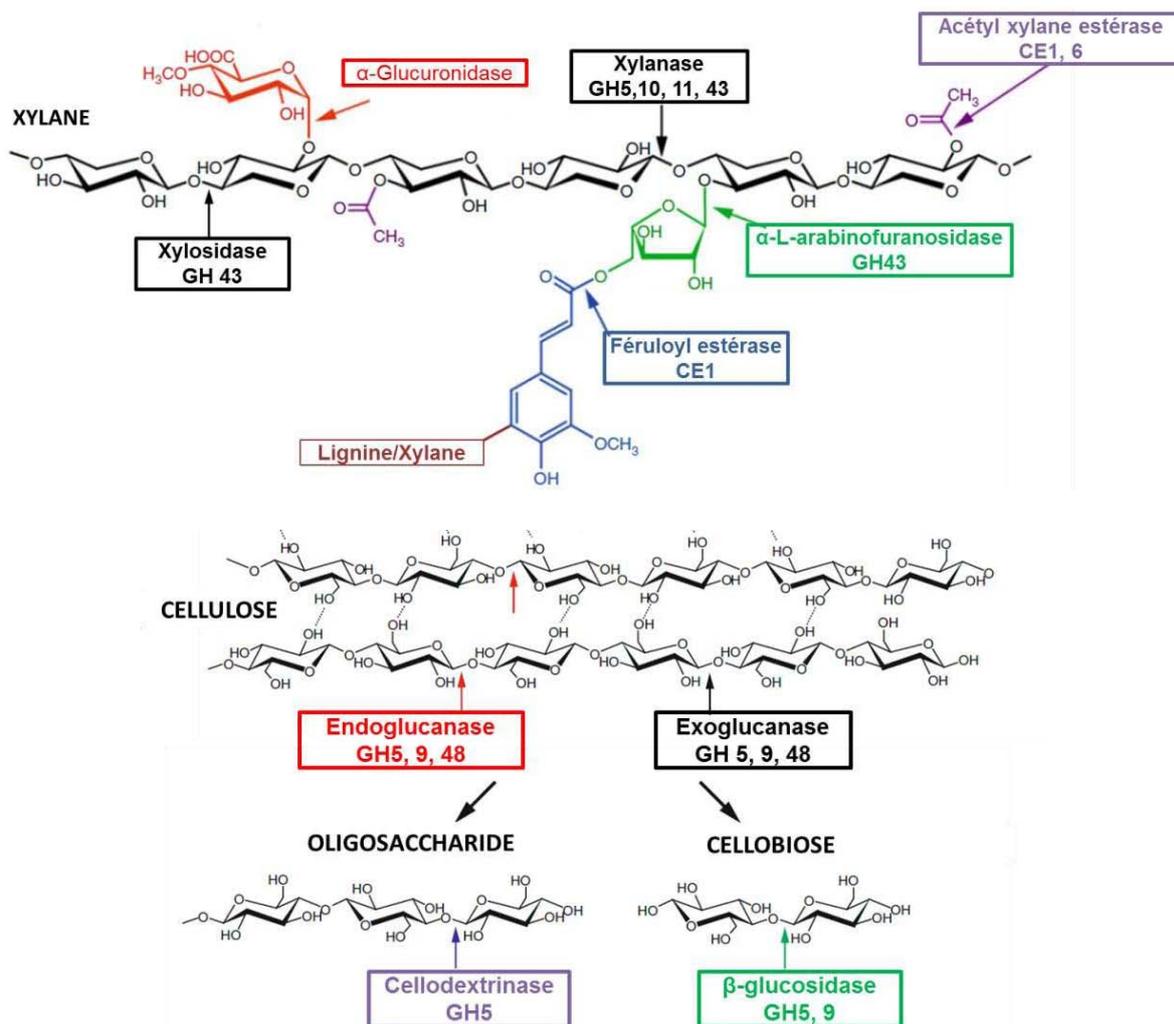


Figure 35 – Familles d’enzymes ciblées par la biopuce ADN et activités enzymatiques associées, impliquées dans la dégradation des xylanes et de la cellulose. GH, Glycoside Hydrolase ; CE, Carbohydate Estérase.

La conception de la biopuce et les différentes étapes de sa validation sont présentées dans ce chapitre.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. SELECTION DES GENES CODANT DES GLYCOSIDE HYDROLASES ET DES CARBOHYDRATE ESTERASES

L'ensemble des microorganismes du rumen et du colon identifiés dans la littérature pour leur capacité à dégrader la cellulose et les xylanes ou des oligosaccharides (oligomannanes..) ont été recensés. Pour chaque microorganisme identifié, les séquences nucléiques de gènes appartenant aux familles de glycoside hydrolases GH5, 9, 10, 11, 43 et 48 et aux familles de carbohydrate estérases CE1 et CE6, disponibles dans la base de données CAZY (<http://www.cazy.org/>), ont été extraites en mars 2010.

II.2. DETERMINATION DES SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel d'alignements multiples ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007 ; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) et les séquences consensus ont été déduites. Les séquences ainsi obtenues ont ensuite servi à la détermination des sondes oligonucléotidiques dont la stratégie globale est résumée dans la Figure 36. La détermination des sondes oligonucléotidiques sens, spécifiques pour chaque séquence, a été réalisée à l'aide du logiciel HiSpOD (Dugat-Bony *et al.*, 2011). Dans le cas particulier des séquences consensus, les sondes ont été élaborées à partir des régions conservées et ciblent donc un ensemble de gènes. Les caractéristiques demandées pour les oligonucléotides étaient : une longueur de 25 mers, une température de fusion comprise entre 46 et 64°C, et un nombre maximal de 10 bases identiques consécutives. La spécificité des oligonucléotides a été testée par un BLASTn (e-value de 1000) contre la base EnvExBase de HiSpOD regroupant toutes les séquences transcrites extraites des bases ENV (environnement), PRO (procaryotes) et FUN (champignons) de l'EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>). En suivant les critères de Kane *et al.* (Kane *et al.*, 2000) et He *et al.* (He *et al.*, 2005), les séquences non cibles présentant plus de 85% d'identité et plus de 15 bases consécutives avec les sondes ont été considérées comme des séquences pouvant créer des hybridations croisées. A ce stade, seules les sondes montrant des hybridations croisées avec des séquences codantes portées par des microorganismes du tube digestif ou se développant en anaérobiose ont été éliminées. Les sondes sélectionnées ont alors été testées pour les hybridations croisées potentielles avec les séquences d'ADNr de la base de données non redondante du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) en réalisant un BLASTn (paramètres par défaut).

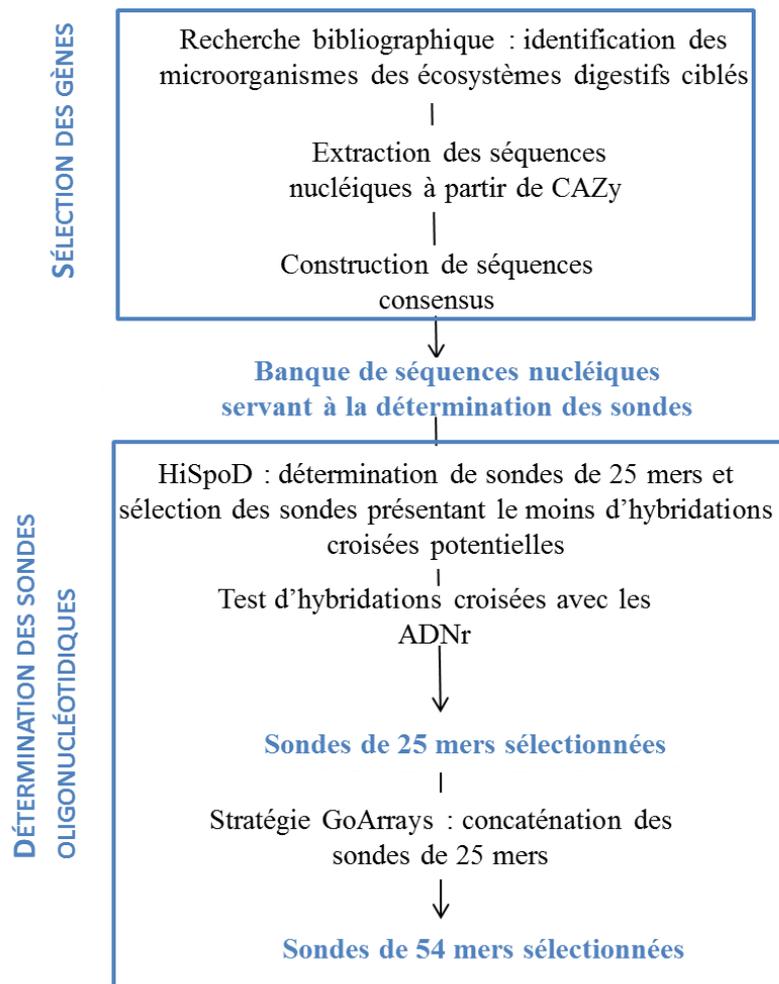


Figure 36 - Stratégie de détermination des sondes oligonucléotides pour la biopuce ADN fonctionnelle.

Lorsque moins de cinq sondes ont pu être sélectionnées de cette manière par gène ciblé, le paramètre « stretch » de HiSpOD, autorisant un nombre n de nucléotides consécutifs identiques entre la sonde et une séquence de la base de données, a été augmenté jusqu'à 20 bases. Les oligonucléotides ont également été choisis de manière à être répartis sur toute la longueur de la séquence cible. La stratégie GoArrays (Rimour *et al.*, 2005) a aussi été utilisée afin de générer des sondes longues de 54 mers, constituées de deux oligonucléotides de 25 mers (distants de plus de 10 bases et de moins de 650 bases sur la séquence cible), reliés par un espaceur de 4 nucléotides.

II.3. FORMAT DE LA BIOPUCE ADN

Les sondes déterminées, d'une longueur de 25 mers et de 54 mers, ont été synthétisées par Agilent Technologies (Agilent Technologies) sur une biopuce ADN de format 8x15K (8 micro-réseaux indépendants accueillant chacun 15000 sondes) permettant d'analyser simultanément 16 échantillons biologiques. Ce format est donc particulièrement adapté à notre problématique qui nécessite souvent de nombreux échantillons. Les oligonucléotides ont été synthétisés *in situ* en triplicat et selon une distribution aléatoire afin de limiter l'effet position des sondes. Enfin 382 sondes contrôle internes Agilent sont présentes et sont représentées par des contrôles positifs, des contrôles négatifs (pas de signal après hybridation) et des sondes de contrôle qualité de la biopuce.

II.4. PREPARATION DES CIBLES

II.4.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC 19169), *Ruminococcus albus* 20 (ATCC 27211), *Bacteroides xylanisolvens* XB1A (DSM 18836T, isolat du laboratoire) ont été cultivées en anaérobiose stricte (Hungate, 1950) dans un milieu complexe contenant 20% de jus de rumen clarifié (Béra-Maillet *et al.*, 2000) et 0,2 g de cellobiose (Sigma-Aldrich), à 39°C pour les deux premières et à 37°C pour la troisième, pendant 15h. La souche *Escherichia coli* K12 (ATCC 10798) a été cultivée en milieu Luria-Bertani (LB) à 37°C sous une agitation de 150 rpm (TH30, Edmund Bühler) pendant 15h. Ces cultures ont servi à l'extraction d'ADN génomique.

F. succinogenes a également été cultivée avec 0,5 g de paille de blé comme substrat, et dans ce cas, la culture a été agitée à 50 rpm (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific). Les bactéries ont été repiquées plusieurs fois sur le même substrat, avant que les cultures ne soient arrêtées à 50 h pour le substrat « paille de blé » et 6 h pour le substrat « cellobiose ». Ces cultures ont servi à l'extraction d'ARN.

II.4.2. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique de *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC 19169), *Ruminococcus albus* 20 (ATCC 27211), *Bacteroides xylanisolvens* XB1A (DSM 18836T) et *Escherichia coli* K12 (ATCC 10798) a été extrait à partir de 10 mL d'une culture bactérienne de 15 h. Les cultures

ont été centrifugées 20 min à 10000 g et le culot bactérien a été lavé 3 fois dans 2 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline). L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du kit EasyDNA (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant, avec une étape supplémentaire de broyage par bead-beating. Brièvement, le culot bactérien a été incubé 5 min dans 200 μ L de PBS et 1 μ L de protéinase K (20mg/mL, Invitrogen). Puis les bactéries ont été broyées 3 min au BeadBeater (MM2000, Retsch) avec une amplitude maximale, en présence de \sim 100 mg de billes de zirconium de diamètre 0,1 mm (BioSpec Products). La concentration et la qualité des ADN extraits ont été contrôlées au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Leur intégrité a été vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant 0,4 μ g/mL de bromure d'éthidium et visualisation sous UV avec le système Gel Doc 2000 (BIO-RAD). Les ADNg extraits ont été conservés à -20°C.

II.4.3. Clonage de gènes codant des enzymes fibrolytiques

Des gènes codant des enzymes fibrolytiques de *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC 19169), *Ruminococcus albus* 7 (ATCC 27210) et *Piromyces* M4 (isolat fongique du laboratoire) ont été amplifiés puis clonés. Les ADNg de *Piromyces* M4 et de *Ruminococcus albus* 7 ont été fournis par Y. Ribot et P. Mosoni, respectivement. L'amplification des gènes a été réalisée par PCR, selon les recommandations du fournisseur, à partir de 200 ng d'ADNg avec le kit Pfx50 DNA Polymerase (Invitrogen) contenant une ADN polymérase haute-fidélité. Le protocole d'amplification utilisé est le suivant : 2 min de dénaturation initiale à 94°C, 30 cycles comprenant 15 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à la température indiquée et 40 sec/kb d'élongation à 68°C, puis une élongation finale de 7 min à 68°C. Les produits d'amplification ont été vérifiés sur gel d'agarose comme précédemment décrit. Les fragments d'ADN de taille attendue ont été purifiés à partir d'un gel d'agarose 0,7% avec le kit QIAquick PCR purification (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Après quantification au spectrophotomètre Nanodrop, les produits de PCR purifiés ont été clonés dans le vecteur PCRII-TOPO (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. La présence de l'insert de taille attendue a été vérifiée par PCR sur colonie. Les réactions de PCR ont été effectuées avec le kit Q-BioTaq DNA Polymerase (Qbiogene) selon les recommandations du fournisseur. Les étapes de PCR sont les suivantes : dénaturation initiale de 2 min à 95°C, 25 cycles comprenant : une dénaturation de 30 sec à 95°C, une étape d'hybridation de 1 min 30 sec et une élongation de 1 min/kb à 72°C, suivis d'une élongation

finale de 7 min à 72°C. La présence d’amplicons a été vérifiée sur gel d’agarose comme décrit précédemment.

Tableau 17– Gènes ciblés et amorces utilisées pour leurs amplifications par PCR dans le cadre de la validation de la biopuce ADN fibrolytique. Les gènes en gras ont été clonés au cours de ce travail de thèse. Les autres étaient déjà disponibles au laboratoire.

Gène/N° d'accèsion protéique Microorganismes	Vecteur de clonage	Amorces	Séquences 5'-3'	Température d'hybridation	Longueur attendue du produit de PCR
BACTERIES					
CE1 <i>xynB</i> / BAB39493 <i>R. albus</i> 7	PCRII-TOPO	Ra7_CE1_xynB_WF Ra7_CE1_xynB_WR	GCAGTTCAAGAAAGCTCCCGG TTACTGTCTTCATGGAAAGAAAG	57°C	811 pb
CE6 <i>axe6B</i> / ACX75360 <i>F. succinogenes</i> S85	PCRII-TOPO	S85_axe6B_WF S85_axe6B_WR	GCTCCGAACCCGAACCTCCATATCTACATTCG TTATTCATGTATCACCCACCTTTTTGTTAGAG	62°C	1572 pb
GH5 <i>Cel5G</i> / AAA24893 <i>F. succinogenes</i> S85	PCRII-TOPO	S85_cel5G_WF S85_cel5G_WR	CATAAAACCCGACCCCAAAAT ATTGCGCCATTCCTGTTACT	55°C	2156 pb
GH9 <i>Cel9</i> / CAS03458 B <i>R. albus</i> 20	pASK	Seq-SacI-HBA33-F1 Seq-SmaI-HBA33-R1	CAAAAATCTAGATAACGAGGGC CTGAGACCATGGTCCCC	55°C	3044 pb
GH10 <i>Xyn10A</i> / CBH32823 <i>B. xyliarisolvens</i> XB1A	pASK	Seq-XhoI-HBA33-F2 Seq-NcoI-HBA33-R2	CCCGAATTCGAGCTCGG GATGGTGATCGGATCCTC	56°C	1230 pb
GH11 <i>xynA</i> / AAA85198 <i>R. albus</i> 7	PCRII-TOPO	Sp6 T7	ATTTAGGTGACACTATAG TAATACGACTCACTATAGGG	40°C	2043 pb
GH43 <i>BT_2895</i> / AAO78001 <i>B. thetaiotaomicron</i> VPI 5482	PCRII-TOPO	Sp6 T7	ATTTAGGTGACACTATAG TAATACGACTCACTATAGGG	40°C	993 pb
GH48 <i>Cel48A</i> / CAS03459 <i>R. albus</i> 20	pASK	Seq-XhoI-HBA33-F2 Seq-NcoI-HBA33-R2	CCCGAATTCGAGCTCGG GATGGTGATCGGATCCTC	56°C	2646 pb
PROTOZOAIRES					
GH10 <i>XynB</i> / CAB65753 <i>P. multivesiculatum</i>	pBluescript	seqPolymulti_xynB_WF seqPolymulti_xynB_WR	ATGAAAAAGTCTACTATAGCATTCCTTATTAATC CGTTGTCAACAATAGAAATAAAAGC	51°C	1602 pb
GH11 <i>XynA</i> / CAA08859 <i>P. multivesiculatum</i>	pBluescript	seqPolymulti_xynA_WF seqPolymulti_xynA_WR	GAAGAAGTTACTGCCTTCTAAATAGC TCATAAAATAAATATTTTCATCCAAAATGGATGAAAT	55°C	708 pb
CHAMPIGNONS					
GH9 <i>Cel9</i> / non enregistré <i>Piromyces</i> M4	PCRII-TOPO	cel9Y Q7b	GAAGCTGGTCAATGGG GGAGCGTGCCATCCGTC	45°C	1440 pb
GH48 <i>Cel48</i> / non enregistré <i>Piromyces</i> M4	PCRII-TOPO	cel48AbisF cel48R	CTCTTGCTCTTCTCGGTGCT GGTGGGTTACCTCCGTTAAG	51°C	1867 pb

Les plasmides recombinants ont ensuite été extraits à l'aide du kit QIAprep MiniPrep (Qiagen) à partir de 5 mL d'une culture de 15 h selon les instructions du fournisseur. Les cellules recombinantes ont été cultivées dans du LB liquide contenant 100 µg/mL d'ampicilline, à 37°C sous une agitation de 150 rpm pendant 15 h, mises en conservation dans 1 mL de LB additionné de 10% de glycérol et stockées à -80°C.

II.4.4. Séquençage

Le séquençage des clones recombinants a été réalisé par la société GATC Biotech (<http://www.gatc-biotech.com/>) à partir des plasmides recombinants. Les amorces utilisées pour le séquençage figurent en annexe 3. L'assemblage des séquences a été réalisé avec le package Staden (<http://staden.sourceforge.net/>). Les contigs ont ensuite été alignés à l'aide de l'outil ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007 ; www.ebi.ac.uk/clustalw/) avec les séquences nucléiques correspondant aux gènes étudiés afin de vérifier le pourcentage d'identité des deux séquences.

II.4.5. Cibles amplicons

Les 5 gènes clonés au cours de cette étude et 7 autres gènes précédemment clonés au laboratoire ont été amplifiés par PCR avec la polymérase haute fidélité Pfx50 (Invitrogen) à partir des plasmides extraits, comme précédemment décrit. Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 17. Les produits de PCR ont été purifiés sur gel d'agarose avec le kit QIAquick PCR purification (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque gène, plusieurs PCR ont été réalisées afin d'obtenir 2 µg de produits de PCR pour chacun d'entre eux. Les produits de PCR ainsi obtenus seront utilisés après marquage avec des fluorochromes pour hybrider les biopuces ADN.

II.4.6. Extraction d'ARN

Les ARN de la souche *Fibrobacter succinogenes* S85 ont été extraits à partir de cultures bactériennes (10 mL) sur des milieux contenant du cellobiose (6 h de croissance) ou de la paille de blé (50 h de croissance) et arrêtées en fin de phase exponentielle (Béra-Maillet *et al.*, 2000 ; Nouaille *et al.*, 2009). L'extraction a été réalisée en duplicat pour chaque condition de culture en utilisant du Trizol (Life Technologies) et quelques modifications du protocole du

fournisseur. Les cultures ont été centrifugées 15 min à 12000 g à 4°C dans des tubes Corex 30 mL préalablement traités avec 0,1% de DEPC. Le culot bactérien a été repris dans 10 mL de Trizol et vortexé vigoureusement. Chaque échantillon a été aliquoté par volumes de 1,6 mL en microtubes contenant ~100 mg de billes de zirconium de diamètre 0,1 mm (BioSpec Products). Les échantillons ont été lysés mécaniquement à l'aide de l'homogénéiseur FastPrep (MP Biomedicals), réglé à une amplitude de 6,5, pendant 4 cycles de 30 sec entrecoupés par 5 min d'incubation dans la glace. Finalement, les aliquots broyés ont été transférés dans un nouveau tube Corex 30 mL et l'extraction a été poursuivie selon le protocole de Life Technologies, adapté au volume de Trizol initial. Les ARN d'un contenu ruminal (issu de l'expérimentation bovine du Chapitre 3) ont été extraits selon le protocole mis au point au cours de ce travail de thèse et décrit dans le Chapitre 1. La quantité et la qualité des ARN ont été évaluées au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Leur intégrité a été vérifiée à l'aide du kit RNA 6000 (Agilent technologies) et du BioAnalyzer Agilent 2100 (Agilent technologies). Les ARN extraits ont été conservés à -80°C jusqu'à leur analyse.

II.4.7. Enrichissement en ARNm

Pour chaque extrait d'ARN, 10 µg d'ARN totaux ont été soumis à une procédure d'enrichissement de la fraction d'ARNm selon le protocole mis au point au cours de ce travail de thèse (voir Chapitre 1). Pour l'enrichissement en ARNm des ARN de la souche *F. succinogenes* S85, seules les sondes ciblant les ARNr bactériens ont été utilisées.

II.5. MARQUAGE DES CIBLES

II.5.1. Marquage de l'ADNg

Deux microgrammes d'ADNg des souches *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus* 20, *Bacteroides xylanisolvens* XB1A et *Escherichia coli* K12, dans un volume de 200 µL d'eau milliQ, ont été fragmentés par sonication (Vibra Cell VC300) pendant 10 sec et avec une amplitude de 40%. La fragmentation des ADNg a été vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant 0,4 µg/mL de bromure d'éthidium. La majorité des fragments a une taille comprise entre 500 pb et 1500 pb. Les ADNg fragmentés ont été marqués individuellement à l'aide du kit Bioprime Total Genomic Labelling (Invitrogen). Les ADNg (2µg) ont été dénaturés 5 min à 95°C avec 25 µL de mix 2X Alexa Fluor 3 ou Alexa Fluor 5.

Après ajout de 3 µl d'enzyme Exo-Klenow Fragment, le mélange a été incubé 2 h à 37°C à l'abri de la lumière puis purifié selon les recommandations du fournisseur. La qualité du marquage a été évaluée avec le spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) en mesurant la densité optique à 260 nm (A260) pour l'ADN, 550 nm (A550) pour le fluorochrome Alexa Fluor 3, 650 nm (A650) pour le fluorochrome Alexa Fluor 5, et à 320 (A320) et 750 nm (A750) pour les corrections d'artefact. Le degré de marquage, correspondant au nombre de bases marquées par rapport au nombre de bases totales, a été calculé selon les formules suivantes. Pour le fluorochrome Alexa Fluor 3 : $((A260 - A320) - ((A555 - A650) \times 0.04)) \times 150000 / ((A555 - A650) \times 6600)$. Pour le fluorochrome Alexa Fluor 5 : $((A260 - A320) - ((A650 - A750) \times 0)) \times 239000 / ((A650 - A750) \times 6600)$. A des valeurs supérieures ou égales à 0,7, pour les échantillons marqués à l'Alexa Fluor 3 et à 1,2 pour l'Alexa Fluor 5, le degré de marquage a été considéré acceptable, comme recommandé par le fournisseur.

II.5.2. Marquage des produits de PCR

Pour chaque gène amplifié, les produits de PCR ont été marqués à l'aide du kit ULS aRNA Labeling (Kreatech Diagnostics). Deux microgrammes de produits de PCR ont été incubés 15 min à 85°C avec 2 µL de cyanine Cy3 ou Cy5, et 2 µL de tampon de marquage. Les produits de PCR marqués ont été purifiés selon les recommandations du fournisseur. La qualité du marquage a été évaluée au spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) en mesurant la densité optique à 260 nm pour l'ADN, 550 nm pour la cyanine Cy3 et 650 nm pour la cyanine Cy5. Le degré de marquage a été calculé selon la formule suivante : $\frac{340 \times \text{Concentration molaire de cyanine (pmol / } \mu\text{l})}{\text{Concentration d'ADN (ng / } \mu\text{l)} \times 1000} \times 100$. Pour des valeurs comprises entre 1,0 et 2,5%, le degré de marquage a été considéré acceptable, comme recommandé par le fournisseur.

II.5.3. Marquage des ARN

Chaque fraction d'ARN enrichie en ARNm a été traitée en utilisant le kit MessageAmp II-Bacteria RNA Amplification (Ambion). Brièvement, 200 ng d'ARN ont été polyadénylés, rétrotranscrits en ADNc simple brin puis le deuxième brin d'ADNc a été synthétisé. Les ADNc double brin, sur lesquels un promoteur T7 a été incorporé en 5', ont été purifiés puis

transcrits *in vitro* à 37°C pendant 14 h selon un protocole modifié permettant l'incorporation d' aminoallyl UTP (Dugat-Bony *et al.*, 2012a). L'utilisation de ces nucléotides modifiés offre la possibilité de réaliser un marquage découplé de la synthèse des ARN qui permet ainsi d'éviter les biais d'incorporation de nucléotides marqués. Le mix de transcription *in vitro* était constitué de ~14 µL d'ADNc double brin, 12 µL d'un mélange d'ATP, CTP et GTP (25 mM chacun) (Ambion), 3 µL d'UTP (75 mM) (Ambion), 3 µL d' aminoallyl UTP (50 mM) (Ambion), 4 µL de tampon de réaction 10X et 4 µL d'enzyme T7 (Ambion). Les ARN amplifiés (ARNa) ont été purifiés avec le kit MessageAmp II-Bacteria RNA Amplification (Ambion) en suivant les instructions du fournisseur. Finalement, pour chaque échantillon, 10 µg d'ARNa ont été évaporés et marqués avec des cyanines Cy3 ou Cy5 (Pack Amersham CyDye Post-Labeling Reactive Dye, GE Healthcare), en suivant les instructions du fournisseur. Les ARNa ont été resuspendus dans 20 µL de tampon bicarbonate 0,1M (pH 8,7) et soigneusement mélangés avec 40 nM de cyanine, dissoute dans 20 µL de DMSO (DiMethyl SulfOxide). Le mélange a été incubé 90 min à température ambiante dans l'obscurité. Les cyanines non incorporées ont été bloquées par ajout de 15 µL d'une solution d'hydroxylamine 4 M et incubation pendant 15 min dans l'obscurité à température ambiante. Les ARNa marqués ont finalement été purifiés avec le kit NucleoSpin RNA Clean-Up (Macherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. La quantité et l'intégrité des ARNa ont été évaluées comme précédemment décrit pour les ARN. La densité de marquage, définie par le fournisseur comme le nombre de nucléotides marqués pour 1000 nucléotides, a été évaluée

selon la formule :
$$\frac{\text{Concentration d'ARNa (ng/}\mu\text{l)} \times 1000}{324,5 \times \text{Concentration molaire de cyanine (pmol /}\mu\text{l)}}$$

Pour des valeurs comprises entre 30 et 60, la densité de marquage a été considérée acceptable, comme recommandé par le fournisseur.

II.6. HYBRIDATION ET LECTURE DE LA BIOPUCE ADN

L'hybridation des ADN (1 µg pour chaque ADNg et 50 ng pour chaque produit de PCR) a été réalisée à 65°C pendant 24 h en suivant le protocole d'hybridation OligoCGH d'Agilent (Agilent Technologies). L'hybridation des ARN (1 µg pour la souche *Fibrobacter succinogenes* S85 et 1 à 5 µg pour l'échantillon de contenu ruminal) a été réalisée à 55, 60 ou 65°C pendant 17 h en suivant le protocole d'hybridation Two-Color Microarray-Based Gene Expression d'Agilent (Agilent Technologies) ou avec quelques modifications pour l'incorporation d'un agent bloquant (Kreablock, Kreatech Diagnostics). Dans ce dernier cas,

la fragmentation des ARN a été réalisée à 60°C pendant 30 min dans un mélange composé de 12,5 µL de tampon Kreablock (Kreatech Diagnostics), 6,5 µL d'ARN, 5µL de tampon 10X Gene Expression Blocking Agent (Agilent) et 1 µL de tampon de fragmentation 25X (Agilent). Les étapes suivantes ont été suivies selon le protocole d'Agilent. Les lames ont été lavées selon les recommandations d'Agilent puis scannées à l'aide du Scanner Agilent G2505B avec une résolution de 5 µm, en mode XDR (Extended Dynamic Range) configuré avec un PMT (Photo Multiplier Tube) minimum de 10% et maximum de 100%. En mode XDR, l'appareil capture deux images de la lame, l'une avec un PMT élevé offrant un maximum de sensibilité ce qui permet de détecter les sondes les moins fluorescentes mais induit souvent une saturation du signal pour les sondes les plus fluorescentes ; l'autre image est réalisée avec une faible sensibilité (PMT 10%) ce qui permet d'éliminer la saturation du signal et d'estimer correctement l'intensité des sondes les plus fluorescentes. Les intensités de fluorescence ont été extraites avec le logiciel Feature Extraction V11.0 (Agilent Technologies) à partir des 2 images XDR combinées.

II.7. ANALYSES DES DONNEES DE BIOPUCE ADN

Les données ont été traitées de manière automatique à l'aide de scripts spécifiques, basés sur les langages C++ et Delphi, développés par F. Jaziri (EA 4678 CIDAM). Pour chaque sonde, la valeur médiane des intensités des 3 réplicats a été conservée et utilisée comme valeur du signal pour cette sonde. Le SNR (Signal-to-Noise Ratio) ou seuil de détection de réponse, correspondant à l'intensité du signal généré par la sonde divisée par l'intensité du bruit de fond local, a ensuite été calculé pour chacune des sondes. Une sonde a été considérée comme positive lorsque son SNR était supérieur à une valeur n (déterminée selon les conditions d'hybridation), c'est-à-dire lorsque son signal était n fois supérieur au bruit de fond. Pour considérer la détection d'un gène, les sondes 25 mers et 54 mers ont été traitées séparément. Un gène a été considéré comme détecté lorsque plus de 65% des sondes 25 mers ou 54 mers ciblant ce gène étaient positives. Ce seuil a été choisi de manière à satisfaire toutes les possibilités de nombre de sondes par gène. Pour exemple, dans le cas de 3 sondes ciblant un même gène, il sera nécessaire que 2 sondes sur 3 soient positives. Dans le cas de 5 sondes, il en faudra 4 sur 5. La valeur de SNR d'un gène détecté a été attribuée en calculant la moyenne des SNR de toutes les sondes 25 mers ou 54 mers ciblant ce gène, ayant répondu ou non.

II.8. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE GENES DE *FIBROBACTER SUCCINOGENES S85* PAR RT-QPCR

Cent nanogrammes d'ARN de la souche *Fibrobacter succinogenes S85* ont été rétrotranscrits avec la reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque échantillon d'ARN, un contrôle négatif (sans addition de reverse transcriptase) a été utilisé de manière à évaluer la contamination en ADN. Les ADNc ont été utilisés comme matrice pour quantifier par PCR quantitative l'expression des gènes *cel9B* et *axe6B* codant respectivement une GH9 (numéro d'accèsion de la séquence protéique ACX75451) et une CE6 (ACX75360) de *Fibrobacter succinogenes S85*. Pour *cel9B*, le couple d'amorces et les conditions de PCR utilisées sont celles décrites par Béra-Maillet *et al.* (2009). Pour *axe6B*, les amorces ont été fournies par P. Mosoni (communication personnelle). Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un volume total de 20 µL, contenant 10 µL de 2X Takara SYBR Premix Ex Taq (Lonza), 1 ng d'échantillon d'ADNc et 0,5 µM de chacune des amorces. Chaque réaction a été effectuée en duplicat dans des plaques 96 puits (Biorad). Des gammes étalons pour chaque gène ont été utilisées afin de déterminer le nombre absolu de copies exprimées comme décrit par Béra-Maillet *et al.* (2009).

II.9. VERIFICATION DE LA SPECIFICITE DES SONDES CIBLANT UN GENE CODANT UNE GH11 DE *PIROMYCES COMMUNIS*

Cent quatre-vingts nanogrammes d'ARN enrichis en ARNm issu de contenu ruminal ont été rétrotranscrits en ADNc avec la polymérase M-MLV RT RNase H Minus DNA (Euromedex) selon les recommandations du fournisseur et un mélange d'amorces déduites des séquences des sondes ciblant le gène codant une GH11 de *Piromyces communis* (numéro d'accèsion de la séquence protéique AAG18439). Les amorces ont ensuite été éliminées par purification sur colonne avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen) et un dixième de la réaction de rétrotranscription a été utilisé comme matrice pour réaliser une PCR primaire. Une seconde PCR nichée a ensuite été réalisée avec 1,5 µL de la première réaction de PCR comme matrice. Les PCR ont été réalisées avec la polymérase GoTaq G2 DNA (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Le protocole d'amplification utilisé est le suivant : 2min de dénaturation initiale à 94°C, 35 cycles comprenant 30 sec de dénaturation à 95°C, 30 sec d'hybridation à 50°C et 60 sec à 72°C, puis une élongation finale de 5 min à 72°C. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 18. Plusieurs réactions de PCR secondaires

ont été effectuées afin d’obtenir assez de quantité pour le séquençage. Les produits de PCR ont été purifiés sur gel avec le kit QIAquick Gel extraction (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Finalement, les produits de PCR purifiés ont été concentrés en utilisant le kit MinElute PCR Purification (Qiagen) et séquencés par réaction de Sanger par la société MWG en utilisant les amorces de la PCR secondaire.

Tableau 18 – Amorces utilisées pour la rétrotranscription et l’amplification par PCR réalisées sur des ARN de contenu ruminal afin de vérifier la spécificité de sondes ciblant le gène codant une GH11 de *Piromyces communis* (AAG18439).

		Amorce	Séquence 5’-3’
Rétrotranscription		AAG18439 192-216R	GGGTTTGAGTACTATCGAAG
		AAG18439 221-245R	GCATATATGTGACCAATTT
		AAG18439 347-371R	GGACGGTATTGACTGAGCC
		AAG18439 429-453R	TTACGAAAACACTCGTTACGGTCCA
PCR nichée	PCR primaire	AAG18439 13-37F	AAGAACGCCTCTCACAGTGG
		AAG18439 429-453R	TTACGAAAACACTCGTTACGGTCCA
	PCR secondaire	AAG18439 13-37F	AAGAACGCCTCTCACAGTGG
		AAG18439 221-245R	GCATATATGTGACCAATTT

III. RESULTATS

III.1. DEVELOPPEMENT DE LA BIOPUCE FONCTIONNELLE « FIBROLYSE »

Après identification au travers de la littérature des microorganismes cellulolytiques et xylanolytiques du rumen et du colon de l’homme et des animaux monogastriques, les séquences codant les gènes des huit familles ciblées ont été recherchées dans la base de données CAZy (www.cazy.org). Ainsi, 436 séquences nucléiques ont pu être recensées et extraites de la base de données CAZy. Parmi celles-ci, 374 codent des GH et 62 des CE, et proviennent de 44 espèces bactériennes, 1 espèce d’archée, 4 espèces de protozoaires ruminants et 9 espèces de champignons ruminants (Tableau 19). Les principales espèces bactériennes fibrolytiques ciblées appartiennent aux genres *Fibrobacter*, *Ruminococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Butyrivibrio* et *Cellulosilyticum*. D’autres microorganismes des microbiotes digestifs ciblés, porteurs de certains de ces gènes, et connus pour dégrader des oligosaccharides ou des polysaccharides solubles, tels que les *Bifidobacterium* ont également été pris en compte.

Tableau 19 - Nombre de sondes déterminées pour chaque famille d'enzymes portée par les microorganismes sélectionnés. Pour chaque espèce et chaque famille d'enzymes, le premier chiffre correspond au nombre de séquences nucléiques ciblées. Entre parenthèses, le premier chiffre indique le nombre de sondes de 25mers conçues, le deuxième, le nombre de sondes «GoArrays» obtenues après concaténation des sondes courtes. Les astérisques indiquent les microorganismes cellulolytiques et xylanolytiques.

	Microorganismes	GH 5	GH 9	GH 10	GH 11	GH 43	GH 48	CE1	CE6
Bactéries	<i>Bacteroides cellulosolvens*</i>						1 (6-7)		
	<i>Bacteroides fragilis*</i>	1 (6-14)				16 (52-93)			
	<i>Bacteroides ovatus*</i>					6 (39-70)			
	<i>Bacteroides sp.*</i>			2 (14-18)		1 (8-8)			
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron*</i>						24 (164-254)		
	<i>Bacteroides vulgatus</i>	1 (6-12)							
	<i>Bacteroides xylanisolvens*</i>			2 (10-10)		20 (137-252)			
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2 (6-7)					5 (27-54)		
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	4 (5-10)					10 (17-30)		
	<i>Bifidobacterium longum</i>	7 (14-28)					11 (26-34)		
	<i>Butyrivibrio fibrisolvens*</i>	2 (10-18)	1 (5-5)	16 (63-65)		2 (11-9)			
	<i>Butyrivibrio hungatei*</i>				1 (5-10)				
	<i>Cellulomonas fimi*</i>			3 (9-9)	1 (3-2)		2 (6-6)		
	<i>Cellulomonas flavigena*</i>			1 (3-2)	4 (11-14)				
	<i>Cellulosilyticum ruminicola*</i>	5 (25-51)	3 (15-25)	6 (34-50)	2 (11-20)	5 (21-18)	1 (5-6)	2 (10-20)	
	<i>Clostridium acetobutylicum*</i>							1 (6-13)	2 (2-1)
	<i>Clostridium beijerinckii</i>								1 (2)
	<i>Clostridium botulinum</i>							1 (3-3)	
	<i>Clostridium cellulolyticum*</i>						2 (5-6)	5 (23-41)	1 (2-1)
	<i>Clostridium cellulovorans*</i>						1 (6-7)		
	<i>Clostridium clariflavum</i>						1 (4-4)		
	<i>Clostridium difficile</i>					2 (4-3)			1 (1)
	<i>Clostridium kluyveri</i>							1 (3-3)	
	<i>Clostridium thermocellum*</i>							5 (19-38)	
	<i>Enterobacter sp.</i>						3 (17-25)		
	<i>Enterococcus faecium</i>						2 (12-26)		
	<i>Eubacterium cellulosolvens*</i>	2 (5-4)	3 (17-24)						
	<i>Eubacterium eligens*</i>	1 (5-9)					3 (12-11)		
	<i>Eubacterium rectale*</i>	1 (5-9)					2 (9-10)		
	<i>Fibrobacter intestinalis*</i>	1 (5-9)			2 (14-18)				
	<i>Fibrobacter succinogenes*</i>	19 (67-148)	19 (71-114)	7 (25-41)	5 (14-18)				6 (16-16)
	<i>Lactobacillus brevis</i>						3 (20-34)		
	<i>Lactobacillus casei</i>							4 (11-25)	
<i>Lactobacillus plantarum</i>							6 (12-31)		
<i>Lactobacillus fermentum</i>						1 (7-11)			
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i>						3 (13-24)	4 (5-9)		
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>						8 (37-40)	5 (10-18)		
<i>Prevotella bryantii*</i>	2 (5-10)		1 (6-12)			3 (9-9)			
<i>Prevotella ruminicola*</i>	2 (10-20)		4 (22-34)			1 (5-10)			
<i>Pseudobutyrvibrio xylanivorans*</i>				3 (4-5)					
<i>Roseburia intestinalis*</i>			1 (7-5)			8(35-41)			
<i>Ruminococcus albus*</i>	10 (4-83)	4 (20-23)		3 (22-33)		2 (6-6)	1 (5-10)		
<i>Ruminococcus flavefaciens*</i>	4 (10-20)	1 (4-6)	1 (5-8)	5 (55-23)			1 (6-13)		
<i>Ruminococcus sp.*</i>			2 (11-15)			1 (8-11)	1 (5-10)		
Archées	<i>Methanobrevibacter smithii</i>							1 (5-6)	
Protozoaires	<i>Epidinium caudatum*</i>	4 (16-25)							
	<i>Epidinium ecaudatum*</i>	7 (35-65)	2 (6-11)	1 (5-7)	1 (5-7)				
	<i>Eudiplodinium maggii*</i>			1 (5-7)					
	<i>Polyplastron multivesiculatum*</i>	4 (14-23)		3 (11-14)	3 (10-19)				
Champignons	<i>Neocallimastix frontalis*</i>	1 (2-1)		3 (11-13)	1 (10-37)				
	<i>Neocallimastix patriciarum*</i>	2 (7-10)		1 (5-6)	2 (16-25)		1 (5-9)	1 (2)	
	<i>Neocallimastix sp.*</i>				2 (10-37)		1 (6-8)		
	<i>Orpinomyces joyonii*</i>	3 (8-11)							
	<i>Orpinomyces sp.*</i>	2 (4-5)		1 (5-10)	3 (14-43)		2 (8-13)	1 (6-14)	
	<i>Piromyces communis*</i>				1 (5-6)				
	<i>Piromyces equii*</i>	1 (5-9)					1 (6-10)	3 (4-6)	
	<i>Piromyces rhizinflata*</i>	1 (4-6)							
<i>Piromyces sp.*</i>		4 (16-28)				1 (14/18)	1 (4-6)		

De plus, des microorganismes anaérobies fibrolytiques appartenant aux genres *Clostridium* et *Cellulomonas* ont également été inclus car ils sont susceptibles d'être présents dans les écosystèmes digestifs ciblés, même s'ils ne sont pas considérés comme des microorganismes essentiels pour la dégradation des parois végétales dans ces écosystèmes (Li *et al.*, 2013 ; Ziemer, 2013). Des microorganismes eucaryotes fibrolytiques du rumen sont également ciblés et appartiennent aux genres *Piromyces*, *Neocallimastix* et *Orpinomyces* pour les champignons, et aux genres *Epidinium*, *Eudiplodinium* et *Polyplastron* pour les protozoaires. Les séquences répertoriées ont ensuite servi à la détermination de sondes spécifiques de chacune d'entre elles. Du fait de la structure modulaire des enzymes ciblées, les séquences correspondant uniquement aux domaines catalytiques (cellulolytique, xylanolytique et estérasique), codant l'activité de dégradation des polysaccharides, ont été conservées lorsque cela était possible. Des regroupements de séquences très similaires ont été réalisés pour la détermination des sondes assurant la reconnaissance de l'ensemble de ces séquences. De ce fait, 51 séquences consensus dégénérées ont été construites à partir de 2 à 5 séquences présentant plus de 96% de similarité. Les séquences d'un même groupe sont généralement portées par la même espèce microbienne et appartiennent à la même famille d'enzymes. L'utilisation du logiciel HiSpOD a permis la détermination de 1742 sondes 25 mers, assurant ainsi la reconnaissance spécifique de 263 séquences uniques et 85 groupes de séquences. La stratégie GoArrays a ensuite permis de constituer 2765 sondes composites de 54 mers. Ainsi un total de 4507 sondes a été utilisé pour concevoir la biopuce ADN.

III.2. ÉVALUATION ET VALIDATION DE LA BIOPUCE FONCTIONNELLE

Avant toute application pour l'étude d'environnements complexes, la biopuce ADN élaborée doit être validée à l'aide de cibles simples à savoir des séquences nucléiques connues. Il s'agit généralement de produits de PCR correspondant aux gènes ciblés mais aussi d'ADNg extraits de cultures pures d'espèces microbiennes impliquées dans le processus métabolique d'intérêt. Ceci permet de vérifier les conditions d'hybridation et de préparation des cibles mais aussi d'évaluer la sensibilité et la spécificité des sondes déterminées. Au cours de notre approche, étant donné le nombre de sondes sélectionnées, le format de puce choisi est celui proposé par la société Agilent et qui comprend 8 réseaux indépendants identiques (plexes) de 15000 sondes. Ce format offre donc la possibilité d'hybrider simultanément 16 échantillons grâce à l'utilisation de deux fluorochromes différents.

III.2.1. Hybridation de cibles ADN connues

III.2.1.1 Hybridation de produits de PCR

Un gène de chaque famille d'enzymes et de chaque groupe microbien (bactéries, champignons, protozoaires) a été choisi. Les gènes ont d'abord été clonés afin de s'assurer qu'une unique séquence serait hybridée. Neufs gènes clonés étaient disponibles dans le laboratoire. Cinq autres gènes appartenant aux familles non représentées par les clones disponibles, ont été clonés chez *E. coli* au cours de ce travail (Tableau 17). Il s'agit des gènes *cel5G* (GH5) et *axe6B* (CE6) de *Fibrobacter succinogenes* S85, du gène *xynB* (CE1) de *Ruminococcus albus* 7 et des gènes *cel9* (GH9) et *cel48* (GH48) d'une souche de champignon isolée au laboratoire et affiliée au genre *Piromyces*. Dans la suite de cette partie, les gènes seront dénommés par les familles de GH ou de CE pour lesquelles ils codent suivi du nom de la souche, par exemple le gène *cel48* de *Piromyces sp. M4* sera intitulé GH48 *Piromyces sp. M4*. Le séquençage des gènes clonés a confirmé que leur séquence était 100% identique aux gènes utilisés pour la détermination des sondes, à l'exception du gène GH48 *Piromyces sp. M4*. Pour ce gène, il a été observé une étonnante diversité de séquence des 6 clones obtenus et les séquences présentaient entre 91 et 95% d'identité avec celle utilisée pour la conception des sondes (Tableau 20). Du fait de la longueur du fragment cloné, seules 5 sondes sur 7 ont été localisées. Le clone 6, présentant le plus d'identité globale avec la séquence ayant servi à la détermination des sondes, a été choisi pour la validation.

Tableau 20 – Comparaison des séquences clonées du gène *cel48* de *Piromyces sp. M4* et des sondes déterminées pour cibler ce gène. Les nucléotides en rouge correspondent à des mésappariements entre les séquences clonées et celles des sondes.

Sondes GH48	Clone1	Clone3	Clone4
TCTTTACGACGTTATGACTGGTAAC	TCTTTACGACGTTATGACTGGTAAC	TC ACTACA ACATTATGACTGGTAAT	TC ACTACA ACATTATGACTGGTAAT
TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC	TTAACAC CT TTCCAACGTGGT CA TC	TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC	TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC
TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA	TACTT CT TTGACCGTCAATTAGAA	TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA	TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA
TACGCTCAACCAGATAGTGACGTTA	TACG AA CAACCA CT AGTGATGTCA	TACGG TGA ACCAGACAGTGACGTTA	TACGG TGA ACCAGACAGTGACGTTA
AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA	AAACTACTCGTGTTA CT GGTGGT GA	AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA	AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA
AGCGACGCTGGTGGTAATCCACCTA	/	/	/
CCCAGTTTACTACAGATGCAGAT	/	/	/
Sondes GH48	Clone5	Clone6	Clone7
TCTTTACGACGTTATGACTGGTAAC	TC ACTACA ACATTATGACTGGTAAT	TC ACTACA ACATTATGACTGGTAAT	TC ACTACA ACATTATGACTGGTAAT
TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC	TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC	TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC	TTAACACTTTCCAACGTGGTGCTTC
TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA	TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA	TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA	TACTTCCATGGACCGTCAATTAGAA
TACGCTCAACCAGATAGTGACGTTA	TACGG TGA ACCAGACAGTGACGTTA	TACGG TGA ACCAGACAGTGACGTTA	TACGG TGA ACCAGACAGTGACGTT G
AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA	AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA	AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA	AAACTACTCGTGTTAACGGTGGTCA
AGCGACGCTGGTGGTAATCCACCTA	/	/	/
CCCAGTTTACTACAGATGCAGAT	/	/	/

L'analyse des résultats d'hybridation des produits de PCR des gènes sélectionnés a été réalisée séparément pour les sondes 25 mers et 54 mers. Le SNR de chaque sonde puis de chaque gène a été calculé. Le seuil de SNR au-delà duquel une sonde est considérée positive a été déterminé de manière à optimiser l'analyse en fonction de la longueur des sondes, en tenant compte de la possibilité de former plus facilement des hybridations non spécifiques pour les sondes longues. Ce seuil a ainsi été fixé à 3 et 6 pour les sondes 25 mers et 54 mers, respectivement.

D'une manière générale, les sondes GoArrays ont présenté une meilleure sensibilité que les sondes courtes, conduisant à des valeurs de SNR des gènes au moins dix fois supérieures (Tableau 21). Certains gènes (GH43 *B. thetaiotaomicron* VPI5482, CE1 *R. albus* 7, CE6 *F. succinogenes* S85, GH11 *P. multivesiculatum*) n'ont été que faiblement détectés du fait d'un degré de marquage inférieur aux recommandations du fournisseur, bien que le marquage ait été tenté plusieurs fois. Ces gènes mis à part, on observe que les SNR des gènes détectés avec les sondes GoArrays présentent peu de variabilité (avec un facteur 2 maximum). Les sondes GoArrays ont répondu de façon similaire et le SNR des gènes semble donc ici proportionnel à la quantité de cible quel que soit le gène ciblé, indiquant un aspect quantitatif potentiel de ces sondes. Ceci apparaît moins évident pour les sondes 25 mers pour lesquels les SNR des gènes varient jusqu'à un facteur 4. Par ailleurs, la proportionnalité entre les SNR d'un même gène, obtenue avec les deux types de sondes, n'est pas totalement conservée entre les différentes cibles. Pour exemple, le SNR de GH9 *R. albus* 20 est 5 fois supérieur avec les sondes GoArrays et 17 fois supérieur pour GH10 *P. multivesiculatum*.

Tableau 21 – Nombre de sondes 25 mers et GoArrays détectées positives après hybridation des produits de PCR et SNR associé du gène cible.

Gène	Sondes 25 mers		Sondes GoArrays	
	Sondes positives	SNR du gène	Sondes positives	SNR du gène
GH5 <i>F. succinogenes</i> S85	5/5	312	9/9	3225
GH9 <i>R. albus</i> 20	6/6	474	8/8	2403
GH10 <i>B. xylanisolvens</i> XB1A	4/4	157	4/4	2166
GH11 <i>R. albus</i> 7	11/11	166	11/11	2860
GH43 <i>B. thetaiotaomicron</i> VPI5482	5/7	8	13/13	76
GH48 <i>R. albus</i> 20	6/6	175	6/6	1939
CE1 <i>R. albus</i> 7	4/4	7	10/10	33
CE6 <i>F. succinogenes</i> S85	3/3	14	1/1	172
GH10 <i>P. multivesiculatum</i>	6/6	152	8/8	2573
GH11 <i>P. multivesiculatum</i>	1/5	/	6/9	30
GH9 <i>Piromyces</i> sp. M4	6/6	272	14/14	2433
GH48 <i>Piromyces</i> sp. M4	3/7	52	6/8	1750

Pour le gène GH48 *Piromyces sp.* M4, les sondes 25 mers ayant une identité parfaite (sondes 2, 3 et 5) avec la cible ont permis la détection et montrent une variabilité de SNR limitée (facteur 2), alors que les sondes présentant des mésappariements (sondes 1 et 4) n'ont permis aucune hybridation (Tableau 22). Les sondes 6 et 7 ciblant des régions absentes des produits de PCR, comme la sonde GoArrays constituée de ces deux sondes, n'ont également pas entraîné d'hybridation. En ce qui concerne les sondes GoArrays, les sondes 2_3 et 3_5, constituées de deux sondes d'hybridation parfaite, ont donné le SNR le plus fort, indiquant leur capacité à mieux hybrider tandis que la sonde GoArrays constituée des deux sondes 25 mers avec mésappariements n'a pas permis d'hybridation. Notons cependant que les sondes GoArrays, composées d'une sonde d'hybridation parfaite et d'une sonde comportant des mésappariements avec la séquence cible, ont permis des détections. La nature même de ces sondes permet ainsi de stabiliser l'hybridation et de permettre l'interaction entre deux séquences (sonde et cible) contenant de 3 à 5 mésappariements, ce qui suggère que les sondes GoArrays pourraient permettre de détecter des variants de séquences. Ces sondes GoArrays, présentent par contre une variabilité de SNR pouvant aller jusqu'à un facteur de 230, indépendante des sondes présentes. Pour exemple, les sondes GoArrays composées de la sonde 25 mers n°4 ont des SNR allant de 13,3 à 3061,9. L'association des sondes 25 mers au sein des sondes GoArrays influence donc l'efficacité d'hybridation. La distance variable (de 100 à 300 pb) entre les régions ciblées par les sondes 25 mers composant les sondes GoArrays pourrait en être la cause.

Tableau 22 – SNR des sondes 25 mers et des sondes GoArrays ciblant le gène GH48 *Piromyces sp.* M4. Les sondes considérées comme positives (présentant un SNR supérieur au seuil fixé) sont indiquées par un signe +. Les sondes négatives sont signalées par un signe -. Les sondes colorées en vert correspondent aux sondes d'hybridation parfaite. Le nombre de mésappariements (MA) pour les autres sondes est indiqué entre parenthèse.

Sondes 25 mers			Sondes GoArrays		
N° sonde	SNR	Réponse	N° sonde	SNR	Réponse
1 (5 MA)	1,4	-	1_2	62,7	+
2	43,3	+	1_4	4,2	-
3	21,2	+	2_3	5141,2	+
4 (3MA)	1,2	-	2_4	3061,9	+
5	39,4	+	3_4	137,7	+
6	1,2	-	3_5	4677,3	+
7	1,2	-	5_6	3822,4	+
			6_7	1,1	-

Pour l'ensemble des produits de PCR testés, aucun autre gène n'a été détecté sauf dans le cas de GH48 *Piromyces sp.* M4. L'hybridation du produit de PCR de ce gène a en effet conduit à la détection par les sondes GoArrays d'un gène GH48 d'une autre souche de *Piromyces* (AAN76734), avec un SNR très proche de celui des sondes GoArrays ciblant le gène hybridé (1305 vs 1738). Les 9 sondes GoArrays sur les 11 présentes, comportant spécifiquement 3 sondes 25 mers, ont en effet toutes été hybridées. Par ailleurs, ces 3 sondes sur les 7 sondes 25 mers présentes ont également été hybridées. Deux de ces sondes ne présentent aucun mésappariement, il est donc logique qu'elles se soient hybridées. La troisième présente 2 mésappariements en position 5' par rapport au gène hybridé. La position du mésappariement semble ici avoir une importance sur l'efficacité d'hybridation et la spécificité de la sonde puisque d'autres sondes présentant également 2 mésappariements n'ont pas permis de détection. Letowski *et al.* (2004) avaient montré que les oligonucléotides présentant des mésappariements à leurs extrémités étaient moins spécifiques que lorsque les mésappariements étaient répartis sur toute la longueur de la sonde. Il est toutefois difficile de prévoir la capacité d'hybridation des sondes GoArrays, puisque celles-ci ont permis l'hybridation de séquences présentant 3 à 5 mésappariements répartis sur la longueur de la séquence pour les sondes ciblant GH48 *Piromyces sp.* M4. Il est tout de même important de remarquer que ces hybridations n'ont lieu que lorsqu'une sonde d'identité parfaite est présente dans la sonde GoArrays.

Aussi, la détection de cette autre GH48, bien que sa cible parfaite n'ait pas été hybridée et que les deux séquences présentent 88% d'identité sur la longueur, suggère que les sondes GoArrays permettraient la détection de variants de séquences. L'approche biopuces ADN permet donc de révéler des variants proches d'une même famille de gènes. L'aspect exploratoire de la biopuce apparaît ici particulièrement intéressant, spécialement pour les gènes GH48 des champignons qui sont présents en grand nombre de copies dans le génome de ces microorganismes et qui, comme suggéré plus haut peuvent présenter des séquences nucléotidiques très proches.

III.2.1.2 Hybridation d'ADN génomique de souches pures

Les ADNg de 4 souches bactériennes ont également été utilisés pour valider la biopuce ADN. Parmi celles-ci, 3 espèces sont fibrolytiques, isolées du rumen (*Fibrobacter succinogenes* S85 et *Ruminococcus albus* 20) ou du côlon humain (*Bacteroides xylanisolvens* XB1A) et présentent des gènes ciblés par la biopuce. Par ailleurs, ces 3 souches ont été largement

étudiées au laboratoire, en particulier pour ce qui concerne leur système fibrolytique (Béra-Maillet *et al.*, 2000, 2004 ; Rakotoarivonina *et al.*, 2009 ; Mirande *et al.*, 2010b). La souche *Escherichia coli* K12 a servi de témoin négatif car elle ne porte aucun gène ciblé dans cette étude. Les résultats des hybridations sont donnés dans le Tableau 23.

Tableau 23–Nombre de gènes détectés, d’hybridations croisées observés après hybridation des ADNg de 4 souches bactériennes. Le type de sondes ayant généré des hybridations croisées est indiqué entre parenthèses. Les autres gènes détectés sont également indiqués.

Souches	Gènes détectés		Hybridations croisées	Autres gènes détectés
	Sondes 25 mers	Sondes GoArrays		
<i>F. succinogenes</i> S85	30/34	34/34	14 (GoArrays)	/
<i>R. albus</i> 20	2/2	2/2	33 (GoArrays)	GH5 et GH11 <i>R. albus</i> 8
<i>B. xylanisolvens</i> XB1A	11/22	22/22	7 (GoArrays)	/
<i>E. coli</i> K12	0/0	0/0	20 (GoArrays)	/

(i) Détection des gènes à partir de l’ADNg des souches bactériennes

➤ ***Fibrobacter succinogenes* S85**

Trente-quatre des 35 gènes ciblés ont été détectés avec les sondes GoArrays (100% des sondes ciblant les 34 gènes étaient positives) contre 30 avec les sondes courtes (85% étaient positives). Pour le gène non détecté (GH5, AAC06197), aucune sonde n’a répondu. Une recherche de similarité de séquence (BLASTn) réalisé avec la séquence de ce gène contre le génome complet de *Fibrobacter succinogenes* S85 (numéro d’accession NC_013410) a mis en évidence que la séquence n’était pas présente dans le génome de cette souche. Cette séquence présente par contre une identité de 93% avec un gène codant une GH5 de *Bifidobacterium thermophilum* RBL67. Ce gène issu d’une banque de clones recombinants criblés sur carboxyméthylcellulose et xylane (Cho *et al.*, 2000) pourrait dans ce cas être une contamination. Les sondes ciblant ce gène devraient donc être supprimées de la biopuce. Concernant les hybridations croisées, 14 sondes GoArrays ciblant des gènes d’autres microorganismes ont été hybridées. Les sondes 25 mers composant les sondes GoArrays hybridées présentent pourtant au maximum 12 bases consécutives en commun avec des gènes de *F. succinogenes* S85, qui de surcroît ne codent pas des glycoside hydrolases. Les recherches de similarité de la séquence entière des sondes GoArrays avec Genbank n’ont par ailleurs pas donné de résultats. Cependant, étant donné que ces sondes ciblent différents gènes

à chaque fois, aucun gène faux positif n'a été détecté. La stratégie consistant à déterminer plusieurs sondes pour un même gène apparaît donc efficace pour éviter la détection de gènes faussement positifs.

➤ ***Ruminococcus albus* 20**

Les 2 gènes ciblés ont été détectés par les deux types de sondes et toutes les sondes étaient positives. Les sondes ciblant 2 gènes codant une GH5 (AAT48117) et une GH11 (AAT48119) d'une autre souche de *Ruminococcus albus*, *R. albus* 8, ont également été allumées, conduisant à la détection de ces 2 gènes. La souche *R. albus* 20 n'étant pas séquencée, il n'est pas possible d'identifier les gènes de *R. albus* 20 qui ont pu hybrider avec les sondes de *R. albus* 8. Toutefois, il est très probable que la souche *R. albus* 20 porte des gènes très proches de ceux de la souche *R. albus* 8 qui ont été détectés (Rakotoarivonina *et al.*, 2005).

➤ ***Bacteroides xylanisolvens* XB1A**

Les 22 gènes ciblés ont été détectés avec les sondes GoArrays (100% positives) et seulement 11 avec les sondes 25 mers. Le faible degré de marquage de l'ADNg pourrait en outre expliquer le manque de sensibilité des sondes courtes. Sept sondes GoArrays correspondant à des gènes autres que ceux de la souche ont été allumées, cependant aucun gène faux positif n'a été détecté.

➤ ***Escherichia coli* K12**

L'hybridation d'ADNg de la souche *Escherichia coli* K12 a permis de vérifier la spécificité des sondes étant donné qu'aucun gène de cette souche n'était ciblé par la biopuce. Seulement 20 sondes GoArrays sur les 4507 sondes de la biopuce, soit 0,004% de toutes les sondes et 0,007% des sondes GoArrays, ont été hybridées mais aucun gène n'a été détecté du fait de notre stratégie basée sur l'analyse d'un groupe de sondes pour chaque gène et non d'une seule sonde.

(ii) *Analyse des SNR des gènes détectés*

Chaque gène ciblé est probablement présent en une seule copie dans le génome des bactéries fibrolytiques pour lesquelles l'hybridation a été réalisée. Aussi lors de l'hybridation des ADNg, un même nombre de copies de chaque gène a été ajouté au mélange d'hybridation. De

ce fait, théoriquement, les SNR des gènes d'un même microorganisme doivent être très proches. Afin d'évaluer ceci, les SNR minimum et maximum, moyen et médian de l'ensemble des gènes des 3 souches bactériennes ont été rapportés dans le Tableau 24. Les SNR médian et moyen des gènes d'une même souche présentent des valeurs très proches, ce qui indique qu'il y a dans l'ensemble peu de variabilité dans la réponse des sondes. Toutefois, il existe un facteur compris entre 1,4 et 15 pour les gènes détectés avec les sondes 25 mers, et entre 1,4 et 39 pour les sondes GoArrays, entre la valeur de SNR la plus basse et la valeur la plus haute pour les gènes d'un même microorganisme. Les valeurs extrêmes observées proviennent chaque fois de gènes qui ne sont ciblés que par un nombre relativement restreint de sondes. Pour exemple, pour *F. succinogenes* S85, les valeurs minimales et maximales de SNR sont attribuées à deux gènes ciblés chacun par deux et trois sondes 25 mers, et une seule sonde GoArrays. Il n'avait pas été possible de déterminer plus de sondes pour ces gènes et il serait donc nécessaire de prendre en compte cette observation si l'on souhaite réaliser une semi-quantification des gènes dans un même échantillon.

Tableau 24 – SNR des gènes détectés avec les sondes 25 mers ou les sondes GoArrays après hybridations des ADNg de 3 souches fibrolytiques. Le SNR minimum (Min), maximum (Max), moyen et médian de l'ensemble des gènes de chaque souche sont indiqués.

	SNR sondes 25 mers				SNR sondes GoArrays			
	Min	Max	Moyen	Médian	Min	Max	Moyen	Médian
<i>F. succinogenes</i> S85	7	110	37	36	11	430	210	205
<i>B. xylanisolvens</i> XB1A	8	40	25	20	38	160	91	90
<i>R. albus</i> 20	23	33	/	/	81	113	/	/

III.2.2. Hybridation d'ARN de la souche *Fibrobacter succinogenes* S85

Dans l'objectif de vérifier que la biopuce permet de détecter l'expression différentielle des gènes, la souche *Fibrobacter succinogenes* S85 a été cultivée dans deux milieux différant par leur source de carbone. Le milieu à base de cellobiose contenait uniquement ce sucre simple tandis que le milieu à base de paille de blé a permis de fournir à la bactérie des polysaccharides pariétaux, pouvant induire l'expression de gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes. Bien que la composition exacte de la paille de blé utilisée ici ne soit pas connue, des données de la littérature nous permettent d'estimer son contenu en glucides et en lignine. Selon Sun *et al.* (1995, 1998), la paille de blé

est constituée de 14-15% de lignine, 35-40% de cellulose et 30-35% d'hémicelluloses. Les hémicelluloses sont essentiellement des xylanes substitués par des acides α -glucuroniques et des groupements de L-arabinofuranoses et de xyloses (Sun, 1996). La cellulose est quant à elle peu cristalline (Liu *et al.*, 2005 ; Matulova *et al.*, 2005). Les cultures ont été arrêtées en fin de phase exponentielle de croissance, les ARN ont été extraits et enrichis selon la méthode décrite au chapitre 1. Les ARN enrichis en ARNm ont ensuite été hybridés sur la biopuce. Comme précédemment, les sondes courtes et les sondes longues ont été traitées séparément avec un seuil de SNR de 3 et 4, respectivement.

En condition « cellobiose », 19 gènes de *F. succinogenes* S85 ont été détectés avec les sondes GoArrays et seulement 4 avec les sondes 25 mers. Parmi ceux-ci, 2 codent des CE6 (AAG36766, ACX76120), 2 des GH10 (AAG02560, ACX75384), 2 des GH11 (ACX7394, ACX7394, en tandem), 9 des GH5 (AA24893, AAA50210, AAB38548, ABU45500, ACX74396, ACX74827, ACX75120, ACX76513, ACX76661) et 3 des GH9 (AAC44386, ABU45488, ACX75948). En condition « paille de blé », 28 et 9 gènes de *F. succinogenes* S85 ont été détectés par les sondes GoArrays et les sondes 25 mers respectivement. Dans les deux conditions, les gènes détectés avec les sondes courtes ont également été détectés avec les sondes GoArrays. Toutefois, l'ordre des gènes classés par intensités croissantes, en considérant les sondes 25 mers et GoArrays séparément, n'était pas le même (Tableau 25). Le profil d'expression apparaît donc différent selon le type de sonde considéré. Les gènes ici détectés sont pourtant ciblés par un minimum de 5 sondes chacun.

Tableau 25 – SNR des gènes détectés simultanément par les sondes 25 mers et les sondes GoArrays en condition « paille de blé ». Les gènes détectés sont dénommés par le numéro d'accension de la séquence protéique des gènes. Le nombre de sondes 25 mers et GoArrays ciblant chacun des gènes est indiqué entre parenthèses.

Gènes détectés	SNR des gènes	
	Sondes 25 mers	Sondes GoArrays
ACX75384 (6/8)	5,3	26,5
AAA24893 (5/9)	6,0	12,3
ACX76513 (5/10)	6,1	40,5
ACX76661 (6/14)	7,5	29,1
ACX74338 (6/11)	9,4	92,7
AAA68129 (6/11)	11,6	83,2
AAA50210 (5/9)	19,2	138,7
ACX75120 (5/8)	21,1	77,2
ABU45488 (5/9)	37,2	84,3

Il apparaît ainsi difficile de conclure sur le taux d'expression des gènes à l'intérieur d'un même échantillon. Il serait ainsi nécessaire de quantifier ces gènes par une approche de PCR quantitative afin de déterminer quel type de sonde est le plus approprié. Toutefois, cela ne représente pas d'obstacle si l'on souhaite comparer l'expression génique entre deux échantillons.

Nous avons ainsi comparé les profils d'expression des gènes détectés par les sondes GoArrays, qui sont les sondes ayant présenté le plus de sensibilité, dans les 2 conditions de culture (Figure 37).

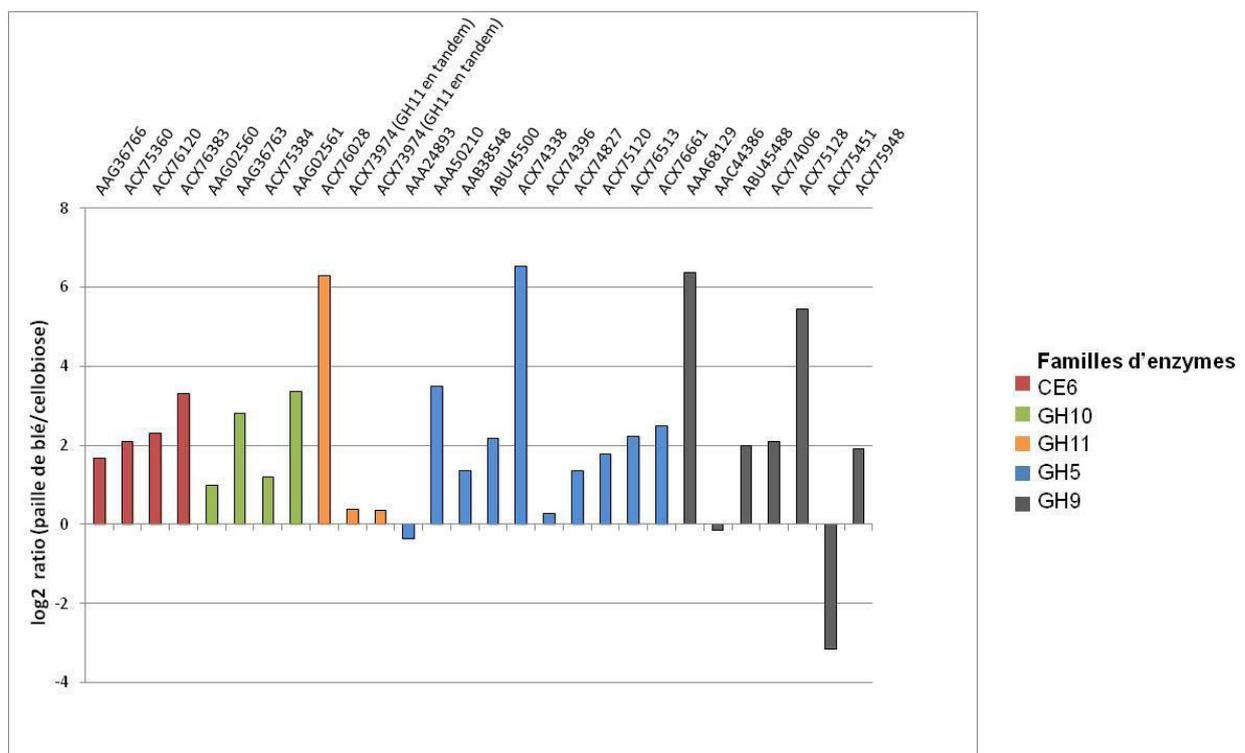


Figure 37 – Expression différentielle des gènes de *Fibrobacter succinogenes* S85 en condition de culture « paille de blé » versus « cellobiose ». Le numéro d'accèsion de la séquence protéique des gènes est indiqué au dessus de chaque histogramme.

Pour ceci, le log2 ratio des SNR obtenus en condition de culture « paille de blé » versus « cellobiose » ont été calculés et un gène a été considéré comme surexprimé en condition « paille de blé » pour une valeur supérieure à 2 et sous-exprimé pour une valeur inférieure à -2. Dans la condition « paille de blé » comparée à la condition « cellobiose », 14 gènes ont été surexprimés et 1 gène a été sous-exprimé. L'expression de 13 gènes ne semble pas ou peu modifiée. Les gènes qui sont les plus fortement induits en condition « paille de blé » (log2 ratio > 3 correspondant à une augmentation du SNR de 20 fois) codent, par ordre décroissant,

pour une mannane endo- β -1,4-mannosidase putative GH5 (ACX74338), une endo- β -1,4-glucanase GH9 (AAA68129), une endo- β -1,4-xylanase GH11 (ACX76028), une cellulase GH9 (ACX75128), une cellodextrinase GH5 (AAA50210), une xylanase GH10 (AAG02561) et une acétyl xylane estérase putative CE6 (ACX76383). Il est également important de noter que le gène codant une endoglucanase GH9 (ACX75451) a été fortement sous-exprimé en condition « paille de blé » (\log_2 ratio < -3). Afin de s'assurer que la biopuce reflète bien l'expression génique de la souche bactérienne, une RT-qPCR a été réalisée pour quantifier les transcrits de deux gènes, *cel9B* (ACX75451) et *axe6B* (ACX75360), l'un détecté comme sous-exprimé et l'autre comme surexprimé, respectivement. Pour les conditions « paille de blé » et « cellobiose » respectivement, les transcrits de *cel9B* ont été quantifiés à $7,4 \cdot 10^4 \pm 1,0 \cdot 10^4$ et $1,4 \cdot 10^5 \pm 2,8 \cdot 10^3$ copies/ng d'ARN, signifiant une expression réduite d'un facteur 2 dans la condition « paille de blé ». Les transcrits de *axe6B* ont quant à eux été quantifiés à $7,3 \cdot 10^4 \pm 5,4 \cdot 10^3$ copies/ng d'ARN en condition « paille de blé » et à $5,8 \cdot 10^3 \pm 5,2 \cdot 10^1$ copies/ng d'ARN en condition « cellobiose ». Le gène *axe6B* est donc 10 fois plus exprimé en condition « paille de blé ». Les données de RT-qPCR viennent ainsi confirmer les résultats obtenus avec la biopuce ADN. La biopuce ADN présente donc un aspect semi-quantitatif. Enfin, ces résultats confortent les études précédentes montrant que la bactérie *Fibrobacter succinogenes* S85 régule l'expression de gènes codant des hydrolases et des carbohydate estérases en fonction de la nature glucidique du substrat disponible.

III.3. HYBRIDATION D'ARN ISSUS DE CONTENUS RUMINAUX ET OPTIMISATIONS

Après validation de la biopuce avec des cibles connues, la validation de la biopuce a été poursuivie avec un échantillon biologique complexe. Les ARN d'un échantillon de contenu ruminal issu de l'expérimentation bovine du chapitre 3 ont été extraits puis enrichis en ARNm et hybridés sur la biopuce ADN. Les premiers tests d'hybridation réalisés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les ARN de *Fibrobacter succinogenes* S85, avec de 500 ng à 8 μ g d'ARN, n'ont pas permis de détecter des gènes exprimés. Toutes les sondes (25 mers comme GoArrays) présentaient des intensités brutes homogènes, proches du bruit de fond, suggérant que les cibles n'avaient pas été capturées par les sondes. De plus, l'intensité brute du bruit de fond était très forte (supérieure à 100), au-delà des recommandations d'Agilent. Deux hypothèses ont alors été formulées : (1) le marquage n'était pas suffisant et (2) les conditions d'hybridations n'étaient pas optimales. Pour tenter de résoudre ces

problèmes, plusieurs conditions d'hybridation ont été testées et sont détaillées dans la Figure 38. Le même échantillon d'ARN enrichi et amplifié a été utilisé pour tous les tests réalisés, afin d'éviter tout biais dû à la préparation des échantillons et pouvoir comparer les différents résultats.

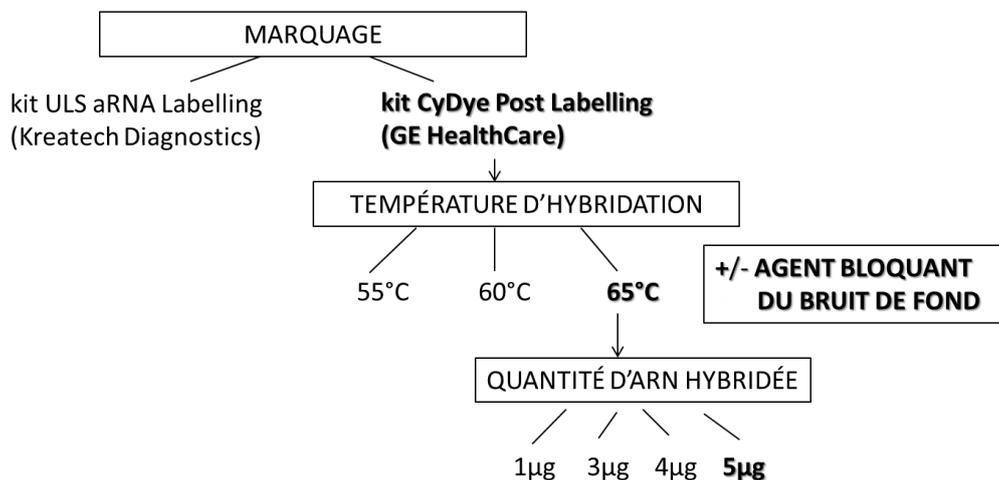


Figure 38 – Conditions testées pour l'hybridation d'ARN issus de contenu ruminal.
Les paramètres conservés sont indiqués en surgras.

III.3.1. Optimisation des conditions d'hybridation

III.3.1.1 Effet du type de marquage

Conditions testées et design de l'hybridation

Deux kits reposant sur un principe de marquage indirect, c'est-à-dire par greffage chimique de fluorochromes (cyanines) sur les ARN, ont été testés. Ce principe de marquage avait été choisi car il permet d'éviter les biais d'incorporation des cyanines Cy5 observés lors de l'incorporation de nucléotides marqués (Do et Choi, 2007). Le kit ULS aRNA Labelling (Kreatech Diagnostics) avait déjà été utilisé avec succès pour les produits de PCR et permet le marquage des guanines directement à partir des ARN. Le kit CyDye Post Labelling (GE Healthcare), utilisé pour les ARN de la souche pure, nécessite, quant à lui, la présence de nucléotides aminoallyl modifiés préalablement incorporés dans des ADNc ou des ARN amplifiés. Il est alors possible de réaliser un marquage indirect du nucléotide que l'on souhaite. Dans le but d'obtenir un taux de marquage plus élevé pour les cibles eucaryotes (champignons et protozoaires) qui possèdent des génomes riches en AT (Adénine/Thymine),

le marquage a été réalisé sur les nucléotides UTP. En moyenne, les gènes eucaryotes ciblés par notre étude présentent en effet un pourcentage AT de 65% pour les champignons et de 70% pour les protozoaires. Cette stratégie de marquage a été choisie afin d'augmenter le seuil de détection de ces gènes dont les microorganismes porteurs ne représentent qu'une faible proportion de la population microbienne ruminale, en particulier les champignons. Deux quantités d'ARN, différant d'un facteur 10, ont également été utilisées pour s'assurer qu'il n'y avait pas de phénomène de saturation dû à une trop grande quantité d'ARN.

L'hybridation a été réalisée à 65°C, comme recommandé par Agilent, avec 500 ng ou 5 µg d'ARN issu de contenu ruminal, marqué avec l'un des deux kits. Les ARN de *F. succinogenes* S85, également marqués avec les deux kits, ont été hybridés simultanément afin de servir de témoins positifs.

Résultats

Un seuil de SNR de 3 et 4 a été appliqué aux sondes GoArrays et 25 mers, respectivement. Seuls les résultats d'hybridation pour l'ARN de la souche pure marqué avec le kit CyDye Post Labelling ont pu être analysés. Tous les autres, y compris les ARN de *F. succinogenes* S85 marqués avec le kit ULS aRNA Labelling, n'ont pas pu être analysés pour les raisons précédemment décrites. Les profils d'expression génique de *F. succinogenes* S85, observés dans les deux conditions de culture, ont été conservés entre l'hybridation montrée plus haut (§III.2.2.) et celle-ci. Les résultats obtenus avec la biopuce ADN sont donc reproductibles. Le marquage CyDye Post Labelling est par ailleurs plus adapté et a été conservé pour les autres tests d'hybridation.

III.3.1.2 Effet de la température d'hybridation et d'un agent bloquant du bruit de fond

Conditions testées et design de l'hybridation

Afin de s'assurer qu'il n'y avait pas un manque de sensibilité globale de la biopuce, les échantillons ont été hybridés à 55 et 60°C, de ce fait à des températures inférieures de 10 et 5°C à celle recommandée par Agilent. Ces températures, moins stringentes, devaient permettre aux cibles de s'hybrider plus facilement avec les sondes. Parallèlement, l'utilisation d'un agent bloquant (Kreablock, Kreatech Diagnostics) permettant de diminuer le bruit de fond a été testée. De plus, 1 µg d'ARN de *F. succinogenes* S85 a été utilisé comme témoin

« spike-in » et ajouté à 2 ou 4 µg d'ARN de contenu de rumen. Il a par ailleurs été choisi de n'hybrider qu'un seul échantillon par plex. Cela permettait de s'assurer que les quantités d'ARN utilisées pour les contenus de rumen n'étaient pas saturantes. Les conditions testées sont récapitulées dans la Figure 39.

Plex 1 5 µg CR Cy3	Plex 3 1µg S85 Cellobiose Cy5 Paille de blé Cy3 Avec Kreablock	Plex 5 1µg S85 Cellobiose + 4µg CR Cy3	Plex 7 1µg S85 Paille de blé + 2µg CR Cy3
Plex 2 5µg CR Cy3 Avec Kreablock	Plex 4 1µg S85 Cellobiose Cy5 Paille de blé Cy3	Plex 6 1µg S85 Cellobiose + 4µg CR Cy5 1µg S85 Paille de blé + 4µg CR Cy3	Plex 8 3µg CR Cy3

Figure 39- Conditions testées pour les hybridations à 55 et 60°C. Fs S85, *Fibrobacter succinogenes* S85 ; CR, contenu de rumen ; Cy3 et Cy5, cyanines 3 et 5.

Résultats

Les seuils de SNR appliqués aux deux types de sondes restent les mêmes que précédemment. L'analyse des deux plexes (2 et 3) contenant les ARN avec ajout d'agent bloquant a été possible et a confirmé que les cibles s'étaient bien hybridées. Cet ajout au mélange d'hybridation est donc essentiel pour diminuer le bruit de fond technique et permettre de révéler les hybridations spécifiques puisqu'aucun des autres plexes n'a pu être analysé.

➤ ARN de contenu de rumen

Concernant le plex 2, sur lequel 5 µg d'ARN de contenu de rumen ont été hybridés, à 55°C, 228 et 21 gènes ou groupes de gènes ont été détectés avec les sondes GoArrays et 25 mers respectivement tandis qu'à 60°C, 199 et 16 gènes ou groupes de gènes ont été détectés. Tous les gènes détectés avec les sondes courtes ont également été détectés avec les sondes GoArrays. Le bruit de fond de la biopuce est faible, compris entre 50 et 60. Si l'on s'intéresse en particulier au SNR des gènes, leur valeur a en moyenne diminué de 30% entre l'hybridation à 55°C et à 60°C. Le profil d'expression diffère également entre les deux conditions d'hybridation puisque certaines sondes à la limite du seuil de SNR à 55°C sont considérées positives et deviennent négatives à 60°C, entraînant la détection des gènes ciblés à 55°C et l'absence de leur détection à 60°C.

➤ ARN de *Fibrobacter succinogenes* S85

L'analyse du plex contenant uniquement des ARN de *F. succinogenes* S85 montre qu'aux températures de 55 et 60°C, la spécificité des sondes 25 mers diminue et entraîne la détection, dans la condition « paille de blé », de 24 et 15 gènes respectivement (Tableau 26), provenant d'espèces éloignées de *F. succinogenes* qui appartiennent, entre autres, aux genres *Ruminococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides* et *Orpinomyces* (faux positif). Il était ici impossible d'augmenter le seuil de SNR sans perdre de l'information sur les gènes exprimés par la souche ciblée. Les hybridations à 55°C et 60°C, comparées à celle réalisée à 65°C, n'ont pas permis de détecter plus de gènes de *F. succinogenes* S85, suggérant que la température de 65°C n'était pas le paramètre en cause dans la mauvaise détection des transcrits. Les gènes précédemment détectés par les sondes GoArrays présentaient cependant des SNR supérieurs (entre 15 et 35%) à ceux de l'hybridation à 65°C. On peut noter qu'à 55 et 60°C, les sondes 25 mers ont mieux répondu du fait d'une température d'hybridation basse, mais toutefois elles n'ont pas permis de détecter autant de gènes de *F. succinogenes* S85 que les sondes GoArrays, et ont créé quasiment autant d'hybridations croisées. Les températures d'hybridation de 55 et 60°C ne sont donc pas adaptées pour assurer le maximum de spécificité des sondes.

Tableau 26 – Nombre de gènes détectés et nombre de faux positifs détectés avec les sondes 25 mers et les sondes GoArrays, aux trois températures d'hybridation testées.

	Sondes 25 mers			Sondes GoArrays		
	55°C	60°C	65°C	55°C	60°C	65°C
Nombre de gènes détectés	9	9	9	28	28	28
Nombre de faux positifs	24	15	0	35	22	0

Les différents tests d'hybridation ont ainsi permis de déterminer les conditions d'hybridation optimales pour les échantillons d'ARN de contenu ruminal (Figure 38), à savoir :

- Marquage : kit CyDye Post Labeling (GE HealthCare)
- Température d'hybridation : 65°C
- Ajout d'un agent bloquant du bruit de fond au mélange d'hybridation

III.3.1.3 Effet de la quantité d'ARN

Conditions testées et design de l'hybridation

Plusieurs quantités d'ARN de contenu de rumen (1, 3, 4 et 5 µg) ont été hybridées afin d'identifier la quantité optimale d'ARN nécessaire.

Résultats

Une très bonne corrélation ($R^2 = 0,99$) des moyennes des SNR a été seulement observée avec 3, 4 et 5 µg, suggérant qu'il existe une relation linéaire des intensités en fonction de la quantité d'ARN hybridée à partir de 3µg d'ARN. Pour l'analyse des résultats d'hybridation, seuls les réseaux hybridés avec 3, 4 ou 5 µg d'ARN ont ainsi été conservés. Différents seuils de SNR de 2, 3 et 4 ont été utilisés à la fois pour les sondes 25 mers et les sondes GoArrays. Quel que soit le seuil de SNR utilisé, plus la quantité d'ARN est importante plus le nombre de gènes détectés par les deux types de sondes augmente (Tableau 27). Il apparaît donc intéressant de pouvoir utiliser le maximum d'ARN pour augmenter la sensibilité de la biopuce.

Tableau 27 – Nombre de gènes ou de groupe de gènes détectés en fonction de la quantité d'ARN de contenu ruminal hybridé et du seuil de SNR appliqué.

	3 µg		4 µg		5 µg	
	25 mers	GoArrays	25 mers	GoArrays	25 mers	GoArrays
SNR ≥ 2	10	249	15	254	38	295
SNR ≥ 3	1	46	1	48	2	56
SNR ≥ 4	0	16	0	20	1	22

III.3.2. Stratégie de détermination du seuil de SNR

Jusqu'alors, la détermination du seuil de SNR, au-delà duquel une sonde est considérée positive, a été facile puisque l'on connaissait les cibles hybridées. Mais ici, nous n'avons aucune référence. Aussi, le seuil de SNR le plus approprié a été recherché.

L'analyse des résultats d'hybridation a été poursuivie avec le plex ayant reçu 5 µg d'ARN de contenu ruminal. Etant donné que les sondes Agilent « contrôle négatif » présentaient des SNR inférieurs à 2 (1,5 en moyenne) et que l'on a pu précédemment montrer que les sondes

25 mers étaient spécifiques à 65°C, le seuil de SNR de 2 a été conservé pour analyser les sondes 25 mers et un seuil de 3 a été appliqué pour les sondes GoArrays. En utilisant ces seuils, il a été observé que la plupart des gènes détectés avec les sondes 25 mers n'étaient pas retrouvés avec les sondes GoArrays, contrairement à ce qui avait été observé avec les ARN de la souche pure. Etant donné que les sondes courtes ont toujours montré une très bonne spécificité, le seuil de SNR déterminé pour les sondes GoArrays a été abaissé à 2 afin de s'assurer de détecter les mêmes gènes avec les deux types de sondes. Il a été choisi de ne pas baisser le pourcentage de sondes positives (65%) nécessaires à la détection pour ne pas augmenter le risque de détection de faux positifs. Il serait ici nécessaire de s'assurer de l'expression de certains gènes par RT-qPCR.

Les résultats d'hybridation du contenu ruminal seront présentés plus en détails et analysés dans le chapitre 3 qui fait suite.

III.3.3. Vérification de la spécificité des sondes GoArrays

Le gène codant une GH11 de *Piromyces communis* (AAG18439), ciblé par 6 sondes GoArrays, a été détecté avec le SNR le plus fort de tous les gènes ciblés par la biopuce ADN, à une valeur de SNR de 308 contre 280 maximum pour les gènes de bactéries. Etant donné la faible proportion des champignons au sein du rumen (Joblin, 1981), ce résultat était inattendu. Afin de vérifier que la biopuce avait bien détecté l'expression du gène ciblé, une RT-PCR a été réalisée à partir d'ARN du contenu ruminal avec des amorces déduites des sondes ciblant ce gène. Le produit de PCR de 230 pb a été séquencé, et une recherche de similarité par BLASTn contre Genbank a été réalisée. La séquence présentait le meilleur pourcentage d'identité (92%) avec le gène codant la GH11 de *P. communis* ciblé par la biopuce. La détection d'un variant du gène codant la GH11 de *Piromyces communis* par la biopuce ADN était donc bien validée par RT-PCR ce qui confirme son expression au niveau du contenu ruminal. La biopuce ADN confirme donc ses capacités exploratoires. Il serait toutefois nécessaire de quantifier l'expression de ce gène pour confirmer son taux d'expression élevé *in vivo*.

IV. DISCUSSION

IV.1. PERTINENCE DU CHOIX DES FAMILLES CIBLEES

Alors qu'une approche biopuce ADN ciblant l'ensemble des glycoside hydrolases (GH) et des carbohydre estérases (CE) identifiées dans le génome des microorganismes, fibrolytiques ou non, des écosystèmes digestifs aurait pu être mise en place comme cela a été fait par El Kaoutari *et al.* (2013) pour le colon humain, nous avons ici choisi de cibler un nombre restreint de familles d'enzymes. En effet, cette biopuce ADN a été développée dans le but de servir d'outil "diagnostic" de l'activité cellulolytique et xylanolytique des microbiotes digestifs sous l'influence de facteurs biotiques et abiotiques. Nous nous sommes en effet focalisés sur des familles de GH et de CE, portées par des microorganismes connus pour leur activité fibrolytique, qui d'après les données de littérature (essentiellement mécanistiques et génomiques) pouvaient présenter un rôle prépondérant dans la dégradation de la cellulose et des xylanes. Au moment du développement de la biopuce fonctionnelle peu de données de transcriptomique sur souches pures, de métagénomique et de métatranscriptomique sur les microbiotes digestifs étaient disponibles. Aujourd'hui, l'utilisation de ces approches s'est développée. Cinq études de métagénomique portant sur le microbiote ruminal de vaches (Brulc *et al.*, 2009 ; Hess *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2013) mais aussi de yak (Dai *et al.*, 2012) et de renne (Pope *et al.*, 2012) ont été publiées depuis 2009. Comme cela a pu être présenté dans la synthèse bibliographique (§ III.2.5.4.), les familles les plus abondamment identifiées sont pour les cellulases, les familles GH5 et les GH9, et pour les xylanases, les familles GH10, GH11 et GH8. Dans l'étude de Hess *et al.* (2011), la famille GH43 est la plus abondante de toutes les familles de GH. Ces études montrent que les familles de GH sélectionnées pour notre étude sont les plus abondantes dans le métagénome du microbiote ruminal. Toutefois, dans l'analyse du microbiote colique par biopuce fonctionnelle de El Kaoutari *et al.* (2013), seule la famille GH43 ciblée dans notre étude apparaît réellement abondante. Notons cependant qu'aucune famille de cellulase et de xylanase ne ressort de cette étude. Notre biopuce fonctionnelle cible donc bien le potentiel cellulolytique et xylanolytique des microbiotes digestifs. Les études récentes de transcriptomique et métatranscriptomique permettront de faire évoluer la biopuce en intégrant de nouvelles familles de GH. Le transcriptome de souches fibrolytiques comme *Prevotella bryantii* Pb14 (Dodd *et al.*, 2010), *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 (Berg Miller *et al.*, 2009) et *Orpinomyces sp.* C1A (Youssef *et al.*, 2013) a été analysé afin d'étudier l'expression génique de ces souches en fonction du substrat glucidique disponible. Outre que ces travaux ont montré qu'il existait une régulation

des gènes dépendante du substrat, ils ont également identifié des gènes codant des familles de GH induits par la présence de polysaccharides pariétaux. En milieu cellulose, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 et le champignon *Orpinomyces sp.* C1A surexpriment principalement des gènes codant des cellulases GH5, GH9 et GH48, et des xylanases GH10 et GH11. *Prevotella bryantii* Pb14 surexprime des gènes codant des GH10, des GH3 et des GH43 lorsqu'elle est cultivée en présence de xylane. L'induction de ces gènes suggère ainsi leur réelle implication dans le processus de dégradation de ces polysaccharides. Comme discuté dans notre synthèse bibliographique, la régulation transcriptionnelle de ces trois souches est différente mais on peut noter que la plupart des familles de GH ciblées par notre approche a été retrouvée surexprimées dans ces études. Enfin, dans une étude métatranscriptomique des eucaryotes ruminants (Qi *et al.*, 2011), les cellulases ont été retrouvées dans les familles GH5, 6, 9, 45 et 48, et les enzymes hémicellulolytiques principalement dans les familles GH10 et 11 mais aussi GH8, 26 et 53. Les carbohydre estérases ont été essentiellement assignées aux familles CE4 et CE1. De toutes les cellulases et xylanases, les familles GH6, 11, 45 et 48 sont les plus exprimées. Par conséquent, les familles de GH ciblées par notre approche biopuce semblent être de bons marqueurs de l'activité fibrolytique des microorganismes ruminants. Si l'on souhaite élargir les familles ciblées par la biopuce afin de mieux représenter les activités des microorganismes eucaryotes, les familles GH3, GH6, GH8, GH26, GH53, GH45 et CE4, pourraient ainsi être intégrées.

IV.2. DETERMINATION DES SONDÉS

Lors de la conception d'une biopuce ADN, l'étape de sélection des sondes est cruciale. Elle conditionne la réussite de l'expérimentation et la stratégie de sélection doit permettre d'éviter au mieux les hybridations croisées non spécifiques (conduisant à la détection de gènes faux positifs) et l'absence d'hybridation dues à une sonde peu sensible (faux négatifs). La détermination des sondes doit donc permettre d'obtenir des oligonucléotides offrant simultanément spécificité et sensibilité. Pour cette approche de biopuce, des sondes spécifiques de gènes codant des GH et des CE ont été déterminées dans le but primaire de permettre l'identification simultanée du gène exprimé et du microorganisme qui le porte. De plus, afin de s'assurer une spécificité optimale, des sondes d'une longueur de 25 mers, plus spécifiques au regard des sondes plus longues (Chou *et al.*, 2004), ont été sélectionnées. Pour la détermination des sondes, nous avons choisi dans un premier temps de limiter au maximum les hybridations croisées potentielles en éliminant les sondes présentant une séquence

identique sur plus de 15 bases consécutives avec une séquence non ciblée, respectant ainsi les critères de Kane *et al.* (Kane *et al.*, 2000) et He *et al.* (He *et al.*, 2005). Cependant, le nombre de sondes répondant à ces critères pour chaque cible n'étant pas toujours suffisant, il a été nécessaire pour certains gènes d'augmenter ce seuil (de 15 à 20 bases) de manière à cibler la séquence sur toute sa longueur. Les sondes ciblant un même gène ont dans ce cas de figure été choisies de manière à éviter qu'elles présentent les mêmes hybridations croisées. Ainsi, notre stratégie consistant à déterminer plusieurs sondes pour un même gène a été effectuée dans le but de détecter l'expression des gènes avec la plus grande certitude possible. A l'inverse de la spécificité, les sondes courtes montrent une moins bonne sensibilité que les sondes longues. Aussi, la stratégie «GoArrays» (Rimour *et al.*, 2005) a été employée afin de s'assurer d'une meilleure sensibilité afin de permettre la détection de cette sous-population des microbiotes digestifs. Cette stratégie, développée au sein de l'équipe de P. Peyret, a déjà été utilisée avec succès pour étudier par biopuce le transcriptome du parasite intracellulaire *Encephalitozoon cuniculi* (Rimour *et al.*, 2005) et la composition taxonomique de microbiotes digestifs (Kang *et al.*, 2010 ; Aguirre de Cárcer *et al.*, 2011).

IV.3. EVALUATION ET VALIDATION DE LA BIOPUCE ADN

La validation des biopuces ADN appliquées en écologie environnementale est une étape nécessaire et importante afin de s'assurer des résultats les plus informatifs possibles. Elle permet entre autres de tester la qualité et la pertinence des sondes sélectionnées. Notre approche de validation a donc été réalisée en utilisant des cibles de plus en plus complexes, en commençant par l'hybridation de produits de PCR, et en poursuivant avec des ADNg de souches pures et des ARN d'une souche pure. Les différentes étapes de validation ont permis d'estimer le niveau de confiance que l'on pouvait avoir dans nos résultats de biopuce et de déterminer les meilleures conditions d'hybridation pour des échantillons d'ARN issus de contenu ruminal.

IV.3.1. Sensibilité et spécificité des sondes

L'hybridation de produits de PCR et d'ADNg a permis de confirmer que les sondes déterminées permettaient de détecter les gènes ciblés. L'hybridation d'ADNg de *Fibrobacter succinogenes* S85 a également permis d'écarter des sondes ciblant un gène codant une GH5

(numéro d'accèsion protéique AAC06197) qui après vérification a été retrouvé absent du génome de la souche et semble provenir de la contamination d'une banque de clones.

Les sondes GoArrays (sondes longues), comme cela avait été précédemment montré (Rimour *et al.*, 2005), ont présenté une meilleure sensibilité que les sondes 25 mers. Contrairement aux sondes 25 mers, elles ont en effet permis la détection de tous les gènes hybridés en produits de PCR ou ADNg. Les sondes GoArrays semblent ainsi les plus adaptées pour l'analyse d'ARN d'échantillons complexes. La sensibilité des sondes est un point crucial pour l'étude de communautés microbiennes environnementales, au sein desquelles les microorganismes d'intérêt peuvent être peu abondants. Dans les écosystèmes digestifs, les bactéries fibrolytiques représentent 1 à 5 % de la population bactérienne totale (Weimer *et al.*, 1999 ; Michalet-Doreau *et al.*, 2002) et s'assurer de la sensibilité de la biopuce ADN est donc essentiel. En général, les biopuces ADN présentent une limite de détection basse. Dugat-Bony *et al.* (2011) avaient déterminé un seuil de détection de 559 ± 87 copies/ng d'ARN issus d'échantillons de nappe phréatique pour des sondes de 50 mers. Dans notre approche, les sondes GoArrays ont ici aussi montré une très bonne sensibilité en permettant de détecter les transcrits de *axe6B* présents à $5,8.10^3 \pm 5,2.10^1$ copies/ng d'ARN.

La spécificité des sondes est également un point primordial à prendre dans l'étude d'un écosystème complexe. Ici, l'hybridation d'ADNg de la souche *Escherichia coli* K12, dont aucun gène n'est ciblé par la biopuce, a montré que les sondes conçues présentaient une très bonne spécificité. Aucune sonde courte n'a créé d'hybridations croisées et seulement 0,007% des sondes GoArrays ont conduit à des hybridations aspécifiques, sans conduire à la détection de gènes faux positifs. L'hybridation de l'ADNg de *Fibrobacter succinogenes* S85 a également conduit à l'hybridation de sondes GoArrays ciblant à chaque fois différents gènes de microorganismes éloignés mais aucun de ces gènes n'a été détecté. La détermination de plusieurs sondes ciblant un même gène prend donc ici tout son intérêt et permet d'éviter la détection de gènes faussement positifs. Cette stratégie permet ainsi d'assurer la spécificité de détection des gènes et d'avoir le plus de certitude dans les résultats d'expression.

IV.3.2. Caractère exploratoire des sondes

Les approches de biopuces dites « exploratoires » présentant le potentiel de détecter les séquences présentes dans les bases de données et leurs variants potentiels qui n'ont pas encore été décrits (Dugat-Bony *et al.*, 2012b) apparaissent aujourd'hui comme une nouvelle application des biopuces ADN (Milton *et al.*, 2007 ; Terrat *et al.*, 2010 ; Dugat-Bony *et al.*,

2011). Le clonage/séquençage d'un gène codant une GH48 de *Piromyces sp.* M4 laisse suggérer que cette souche présente plusieurs copies de ce gène, a priori conservées en montrant 91 à 95% d'identité entre elles, qui sont autant de variants de séquences. Des clonages précédemment réalisés au laboratoire sur cette même souche avaient déjà mis en évidence cette diversité de séquences. Une étude transcriptomique et protéomique récente a également montré que, contrairement à la plupart des bactéries fibrolytiques qui portent une seule copie de gène codant une GH48, les *Neocallimastigomycota* comportaient plus d'une dizaine de gènes codant des GH48 (Wang *et al.*, 2011b). Au cours de la validation de cette biopuce fonctionnelle, l'hybridation du produit de PCR d'un variant de la séquence de GH48 *Piromyces sp.* M4 utilisée pour la détermination des sondes a permis sa détection avec les sondes GoArrays. Des gènes appartenant à la même famille de GH portés par des microorganismes proches, appartenant à la même espèce (GH5 et GH11 *Ruminococcus albus* 8), ont été également détectés malgré l'absence de séquences ciblées par ces sondes dans le mélange d'hybridation. Par ailleurs, l'amplification d'un variant de séquence d'un gène codant une GH11 de *Piromyces communis* à partir d'ARN de contenu ruminal a démontré que les sondes GoArrays permettent de détecter des séquences proches de celles qui ont servi à la conception des sondes. Dans chacun des cas, l'association au sein d'une sonde GoArrays d'une sonde 25 mers d'identité parfaite et d'une sonde 25 mers contenant des mésappariements a permis la détection. Les sondes GoArrays ne permettraient donc pas de détecter un seul et unique gène mais permettraient de détecter des variants de séquences appartenant aux mêmes espèces. Etant donné que les sondes déterminées ne prennent pas en compte toute la diversité des séquences codant des glycoside hydrolases connues aujourd'hui grâce aux métagénomes du rumen et de l'homme (Brulc *et al.*, 2009 ; Hess *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2013 ; Dai *et al.*, 2012 ; Pope *et al.*, 2012 ; Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium *et al.*, 2010) ou qui restent encore inconnues, le caractère exploratoire de la biopuce présente un intérêt certain.

IV.3.3. Aspect quantitatif de la biopuce

Les capacités de quantification de la biopuce ADN ont également été évaluées. En effet, l'objectif de cette biopuce est de deux ordres : (1) comparer l'expression des gènes ciblés par la biopuce entre deux échantillons afin d'évaluer l'effet de différents facteurs sur l'activité fibrolytique de microbiotes digestifs, (2) évaluer le taux d'expression relatif des gènes dans un même échantillon afin d'identifier les gènes contribuant le plus/le moins à l'activité

fibrolytique. Ces capacités de quantification avaient déjà été montrées dans l'équipe de P. Peyret avec d'autres applications de biopuces fonctionnelles (Dugat-Bony *et al.*, 2011, 2012a ; Terrat *et al.*, 2010).

L'hybridation d'ARN de la souche *Fibrobacter succinogenes* S85 cultivée dans deux milieux différant par leur contenu en glucides (sucre simple versus parois végétales) a été réalisée. Le profil d'expression de deux gènes a été vérifié par RT-qPCR pour valider l'objectif (1). Les données obtenues par les deux approches ont été concordantes, la répression d'un gène et l'induction d'un autre gène détectés avec la biopuce ont pu être confirmées par RT-qPCR. La biopuce ADN est donc semi-quantitative et permettra de comparer l'expression des gènes de glycoside hydrolases et de carbohydate estérases dans différents échantillons biologiques.

Les résultats d'hybridation des produits de PCR et d'ADNg ont été utilisés pour vérifier si l'objectif (2) était possible. Pour une cible donnée, dans chacun des cas, un même nombre de copies a été ajouté au mélange d'hybridation et, doit théoriquement induire un même SNR moyen du fait qu'il y ait plusieurs sondes. Les SNR des gènes obtenus ont en général présenté peu de variabilité indiquant qu'ils sont représentatifs de la quantité de cible présente. Toutefois, des SNR extrêmes ont été observés pour certains gènes ciblés par seulement 1 à 3 sondes, et laissent penser que cet aspect quantitatif est limité par ces gènes. Il serait donc nécessaire d'écarter ces gènes pour une analyse quantitative intra-échantillon.

IV.3.4. Hybridation d'ARN issus de contenu ruminal et optimisations

Les conditions d'hybridation utilisées pour les ARN de *Fibrobacter succinogenes* S85 n'ont pas permis d'obtenir des données analysables lors de l'hybridation d'ARN de contenu ruminal. Aussi, différents paramètres (marquage, température d'hybridation, agent de blocage du bruit de fond et quantité d'ARN) ont été testés afin d'optimiser l'hybridation de ces cibles ARN. Les différentes étapes ont permis de sélectionner les paramètres optimaux qui consistent en un marquage avec le kit CyDye Post Labelling (GE Healthcare), l'ajout d'un agent bloquant du bruit de fond, une température d'hybridation de 65°C et une quantité de 5 µg d'ARN issus de contenu ruminal. Enfin, une stratégie de détermination du seuil de SNR au-delà duquel une sonde GoArrays est considérée comme positive a été proposée et prend en compte la complémentarité des sondes 25 mers et des sondes GoArrays. Toutefois, il serait nécessaire de confirmer la pertinence de ce seuil par une quantification de gènes présentant des SNR proches de celui-ci.

IV.3.5. Application de la biopuce à l'étude ciblée du transcriptome de *Fibrobacter succinogenes* S85

Fibrobacter succinogenes est une bactérie fibrolytique majeure du rumen. Elle se caractérise par son excellente efficacité à dégrader la cellulose cristalline, en comparaison des autres bactéries ruminales fibrolytiques majeures, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (Matulova *et al.*, 2008). Elle est également capable de dégrader les xylanes mais ne peut pas utiliser le xylose (voir Synthèse bibliographique, §III.1.1). La souche *Fibrobacter succinogenes* S85 comporte un répertoire enzymatique de plus d'une centaine de CAZymes et son système enzymatique a été étudié à travers de nombreux travaux au sein de l'Unité de Microbiologie (Béra-Maillet *et al.*, 2000, 2004, 2009 ; Nouaille *et al.*, 2009 ; Matulova *et al.*, 2005). Aussi, cette souche a semblé être particulièrement appropriée pour valider la biopuce développée. Ces résultats d'hybridation sont également l'occasion d'étudier l'expression des gènes de *Fibrobacter succinogenes* S85 ciblés en fonction d'un substrat glucidique simple (cellobiose) et d'un substrat glucidique complexe (paille de blé).

Sur les 34 gènes ciblés, 19 gènes (sondes GoArrays) ont été détectés en condition « cellobiose » ainsi qu'en condition « paille de blé », ce qui suggère qu'ils sont exprimés dans les deux conditions. Toutefois, l'induction ($\log_2\text{ratio} > 2$) de 14 gènes et la répression d'un gène ($\log_2\text{ratio} < -2$) en condition « paille de blé », suggère que l'expression de certains des gènes ciblés est régulée par la présence de polysaccharides complexes, comme déjà suggéré par différents auteurs (Béra-Maillet *et al.*, 2000, et Synthèse bibliographique, III.2.6.). Les protéines dont les gènes ont été significativement sur- et sous-exprimés en condition paille de blé par rapport à la condition cellobiose sont rapportés dans le Tableau 28. Les gènes induits en présence de paille de blé appartiennent aussi bien à des familles de cellulases (GH5, GH9), que d'enzymes xylanolytiques (GH10, GH11, CE6) (Tableau 28) dont les activités étaient attendues pour dégrader le substrat paille de blé. L'activité des enzymes codées par ces gènes n'a été démontrée que pour la moitié d'entre-elles (Tableau 28). Le séquençage du génome de *Fibrobacter succinogenes* S85 (Lucas *et al.*, 2009) a permis d'identifier un grand nombre de GH et de CE par bioinformatique (Lucas *et al.*, 2009), mais un travail de caractérisation biochimique sur différents substrats serait nécessaire pour confirmer les activités enzymatiques prédites, en particulier pour les enzymes dont les gènes ont été fortement exprimés dans notre travail.

Tableau 28 – Protéines des gènes induits (\log_2 ratio > 2) ou réprimés (\log_2 ratio < -2) en condition « paille de blé » comparée à la condition « cellobiose ». Les protéines qui apparaissent en gras correspondent aux gènes les plus induits ou réprimés (\log_2 ratio >3 ou < -3). Les signes + et – indiquent que le gène a été surexprimé ou sous-exprimé respectivement.

	Accession	Famille CAZY	Protéine	Activité démontrée	Références
+	ACX75360	CE6	Axe6B	Acétylxylane estérase	Yoshida <i>et al.</i> (2010) ; Kam <i>et al.</i> (2005)
+	ACX76120	CE6	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	ACX76383	CE6	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	AAG36763	GH10	Xyn10B	xylanase	Jun <i>et al.</i> , 2003
+	AAG02561	GH10	Xyn10E (Xyn10M)	xylanase	Jun <i>et al.</i> , 2003 Shaw <i>et al.</i> , 2000
+	ACX76028	GH11	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	ABU45500	GH5	Cel5H	endoglucanase	Qi <i>et al.</i> , 2007
+	AAA50210	GH5	CedA (Cel5C)	cellodextrinase	Iyo et Forsberg, 1994
+	ACX74338	GH5	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	ACX76513	GH5	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	ACX76661	GH5	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	AAA68129	GH9	EGB (cel9G)	endoglucanase	Broussolle <i>et al.</i> , 1994
+	ACX75128	GH9	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
+	ACX74006	GH9	-	non	Génome : Lucas <i>et al.</i> , 2009
-	ACX75451	GH9	Cel9B (CelE/End1)	endoglucanase	Qi <i>et al.</i> , 2007

Xyn10B et Xyn10E sont des xylanases codées par des gènes organisés en un opéron *xyn10DEB* comprenant également le gène *xyn10D* (AAG02560) ciblé aussi par la biopuce fonctionnelle (Jun *et al.*, 2003). Ces gènes co-transcrits avaient été retrouvés plus exprimés lorsque la bactérie était cultivée en milieu « cellulose » comparé en milieu « cellobiose » (Jun *et al.*, 2003). La biopuce a également permis de détecter une augmentation du nombre de transcrits de ces trois gènes en condition « paille de blé ». Cependant, bien que les taux d'induction de *xyn10B* (AAG36763) et *xyn10E* (AAG02561) soient proches, le gène *xyn10D* (AAG02560) n'apparaît pas induit (\log_2 ratio < 2). Il semble peu probable qu'un problème de sensibilité de la biopuce soit à l'origine de ce résultat car ce gène est ciblé par 8 sondes GoArrays. Une régulation post-transcriptionnelle permettant l'expression individuelle des gènes présents dans l'opéron peut également avoir lieu pour ce gène, comme cela a été mis en évidence pour l'opéron *cip-cel* de *Clostridium cellulolyticum* (Maamar *et al.*, 2006). Des approches de RT-qPCR permettraient de vérifier cela. Parmi les cellulases dont les gènes sont

les plus induits, les protéines Cel5H, CedA et EGB ont été caractérisées. Cel5H est une endoglucanase qui présente une activité maximale sur cellulose non cristalline (CMC) (Qi *et al.*, 2007). CedA est une cellodextrinase qui présente une activité basse sur la cellulose amorphe et limitée sur la cellulose cristalline. Elle clive les cellodextrines pour relarguer du cellobiose (Huang et Forsberg, 1987). Enfin, EGB est une endoglucanase très active sur β -glucanes d'orge, lichenane et CMC. Ses produits d'hydrolyse du CMC sont du cellobiose et du cellotriose (Broussolle *et al.*, 1994 ; Forano *et al.*, 1994). La forte induction des gènes codant *cedA* et EGB suggère que ces enzymes ont un rôle prépondérant dans la dégradation des polysaccharides de la paille de blé.

Dans une étude transcriptomique par northern blot, Béra-Maillet *et al.* (2000) avaient observé, en condition « cellulose de papier filtre » comparée à la condition « cellobiose », une augmentation d'un facteur de 6 à 14 des transcrits de six endoglucanases appartenant aux familles GH5 (Cel3, CelG, CedA) et GH9 (EndB, CelE, CelD), et d'une xylanase GH11 (XynC). Ces gènes, également ciblés par l'approche biopuce, ont été détectés en condition « paille de blé » et ont été mesurés avec un niveau d'expression non modifié (*celD*, *cel3*, *celG*, *xynC*), augmenté (*endB* et *cedA*, d'un facteur 83 et 11 respectivement) ou diminué (*celE*, d'un facteur 9) par rapport à la condition « cellobiose ». La composition glucidique des substrats utilisés est sans doute la cause de ces différences. De plus, les cultures n'ont pas été arrêtées au même stade de croissance dans ce travail et dans les travaux antérieurs de Béra-Maillet *et al.* (2000). Toutefois, la répression de *celE* (*cel9B*) constitue le point le plus discutable. Cel9B (ACX75451) est une cellulase majeure produite par *F. succinogenes* S85, responsable de 32% de l'activité endoglucanase de la bactérie (McGavin et Forsberg, 1988). Cette enzyme présente une haute activité sur cellulose non cristalline et ne se fixe pas à la cellulose cristalline (McGavin et Forsberg, 1988). Un mode d'action processif a été proposé (Qi *et al.*, 2007). De tous les gènes ciblés dans notre approche, *cel9B* est le seul gène à avoir été détecté comme réprimé et les données de RT-qPCR ont pu confirmer cette observation. Il est possible que l'expression de ce gène soit fortement régulée en fonction du stade de croissance bactérien, ou bien qu'un des composés présents dans la paille de blé soit répresseur de ce gène. Des études complémentaires seraient nécessaires pour élucider la régulation de *celE*. Enfin, la surexpression de gènes de carbohydate estérases CE6, dont un (ACX76383) a été très induit, est en accord avec une forte acétylation des xylanes de la paroi lignocellulosique de la paille de blé. La famille CE6 ne contient en effet que des acétyl xylane estérases dont l'activité consiste à débrancher les groupements acétyl présents sur les chaînes

de xylose qui peuvent limiter l'accès des enzymes à leur substrat. Cette activité est donc essentielle à l'efficacité de dégradation des xylanes. Matulova *et al.* (2005) qui ont étudié la dégradation de la paille de blé par *Fibrobacter succinogenes* S85 par une technique de RMN n'ont pas retrouvé de xylooligosaccharides acétylés dans les produits d'hydrolyse, suggérant une forte activité des acétyl xylane estérases. L'absence d'induction de gènes appartenant à la famille CE1 est, par contre, inattendue car elle contient des cinnamoyl et féruloyl estérases impliquées dans la dissociation de la lignine et des hémicelluloses. Or, la paille de blé est riche en lignine. De même, l'absence de détection de gènes appartenant à la famille GH43, contenant entre autres des enzymes débranchantes comme des arabinofuranosidases dont une est caractérisée (ACX75362), est également inattendue. Il avait été précédemment observé une forte activité des α -arabinofuranosidases (Matulova *et al.*, 2005). Toutefois, comme déjà signalé ci-dessus, l'expression des gènes qui codent pour des enzymes fibrolytiques évolue en fonction de la phase de croissance de la bactérie (Béra-Maillet *et al.*, 2000) et il est possible qu'en fin de phase exponentielle, ces gènes ne soient plus exprimés. Une étude cinétique plus fine de l'expression des gènes de *F. succinogenes* ciblés par la biopuce pourrait permettre de confirmer ou non cette hypothèse. De plus, les microorganismes fibrolytiques possèdent un répertoire d'enzymes fibrolytiques pouvant avoir des spécificités très variées. *Fibrobacter succinogenes* S85 ne nécessite donc pas forcément le recrutement des enzymes dont les gènes sont ciblés sur la biopuce pour dégrader la paille de blé. Une étude globale RNA-Seq serait nécessaire si l'on souhaite identifier l'ensemble des enzymes impliquées dans la dégradation de la paille par cette bactérie.

V. CONCLUSION

Ce travail a porté sur le développement et la validation d'une biopuce ADN fonctionnelle ciblant des gènes codant des enzymes clés de la dégradation de la cellulose et des xylanes dans les écosystèmes digestifs. La biopuce ADN cible 6 familles de glycoside hydrolases (GH5, 9, 10, 11, 43 et 48) et 2 familles de carbohydate estérases (CE1 et 6), présentant un rôle prépondérant dans ces processus. L'outil est composé de 4507 sondes, 1742 sondes 25 mers et 2765 sondes longues conçues selon la stratégie GoArrays, ciblant 436 séquences nucléiques codant essentiellement les domaines catalytiques. La validation et l'optimisation des conditions d'hybridation de la biopuce ont permis d'utiliser cet outil à la fois à partir de

cibles amplicons, ADNg et ARN offrant ainsi de nombreuses applications. La biopuce ADN a ainsi montré son potentiel pour l'étude ciblée du transcriptome de la souche *Fibrobacter succinogenes* S85. Présentant une excellente spécificité et sensibilité tout en étant exploratoire, elle représente un outil d'intérêt pour l'étude de l'activité fibrolytique des microbiotes digestifs.

CHAPITRE 3

**Structure et fonction du microbiote ruminal sous
l'effet de facteurs biotiques et abiotiques -
Application de la biopuce ADN fonctionnelle**

I. INTRODUCTION

Dans l'objectif de valider la biopuce fonctionnelle dans le cadre d'une expérimentation animale, des échantillons biologiques pour lesquels des différences marquées seraient attendues en terme de composition taxonomique et de niveau d'expression des gènes de fibrolyse constituent des cibles de choix. Dans ce cadre, une expérimentation bovine conduite par la société Lallemand Animal Nutrition, en collaboration avec le MTT Agrifood Research (Jokioinen, Finlande) et portant sur la mise en place de stratégies de réduction des GES (Gaz à Effet de Serre) par maîtrise des équilibres du microbiote ruminal, semblait particulièrement d'intérêt du fait des variations potentiellement mesurables sur la population microbienne fibrolytique.

Contexte et objectifs de l'expérimentation bovine

Le secteur agricole engendre 10 à 12% des émissions totales des GES d'origine anthropique (Smith *et al.*, 2007) et sa contribution pourrait encore augmenter de 60 % d'ici 2030 (US-EPA, 2006). A l'échelle des élevages, le méthane (CH₄) constitue 40 à 60 % des émissions de GES (Ogino *et al.*, 2007) dont 80% sont d'origine entérique, le reste provenant des effluents d'élevage (Gill *et al.*, 2010). Les bovins participent majoritairement à la production de CH₄ entérique, qui provient de l'activité métabolique d'archées méthanogènes au sein du rumen (Doreau *et al.*, 2011b). Il est estimé par ailleurs que la méthanogénèse conduit à une perte représentant jusqu'à 12% de l'énergie ingérée par les bovins (Johnson et Johnson, 1995). Aussi la limitation des émissions de méthane par les bovins pourrait présenter un intérêt à la fois nutritionnel et environnemental. De nombreuses stratégies nutritionnelles ont ainsi été proposées (Popova *et al.*, 2012 ; Jeyanathan *et al.*, 2013) et le potentiel d'additifs alimentaires, en particulier d'acides gras saturés à chaîne moyenne (Jordan *et al.*, 2006 ; Machmüller, 2006 ; Hristov *et al.*, 2009) et d'huiles issues de plantes (McGinn *et al.*, 2004 ; Beauchemin et McGinn, 2006 ; Martin *et al.*, 2008), à diminuer la méthanogénèse chez des vaches laitières et des bovins à viande a été montré *in vitro* et dans certaines conditions *in vivo*. Cependant, la diminution de CH₄ entérique observée lors de la supplémentation en lipides à forte dose (≥ 50 g/kg de matière sèche) est généralement accompagnée d'une diminution des performances animales (Jordan *et al.*, 2006 ; Beauchemin et McGinn, 2006 ; Martin *et al.*, 2008). Les levures vivantes, distribuées comme additifs alimentaires chez les ruminants, sont utilisées afin d'améliorer les performances et garantir la santé animale. *In*

vivo, elles ont montré, et ce particulièrement en situation d'acidose latente, leur efficacité en modulant la composition du microbiote ruminal à travers différents mécanismes (voir Synthèse bibliographique, §IV.2), mais ces effets sont variables car ils dépendent de la souche de levure considérée, des modalités de distribution, des conditions physiologiques de l'animal, et de la composition du régime alimentaire (Desnoyers *et al.*, 2009). La capacité de certaines souches de levures vivantes pour diminuer la production de méthane par les bovins a été évaluée et l'hétérogénéité des résultats, (réduction de 0 à 7%) (Chung *et al.*, 2011 ; McGinn *et al.*, 2004), montre qu'il est nécessaire de sélectionner des souches spécifiques et de mieux comprendre les mécanismes d'action impliqués. Ainsi, la société Lallemand Animal Nutrition recherche de nouvelles souches microbiennes capables de limiter la production de méthane par les bovins tout en maintenant les performances et la santé de ceux-ci.

L'expérimentation, réalisée en carré latin 4 × 4, a porté sur des vaches laitières et deux types d'additifs alimentaires ont été utilisés : une huile de cameline riche en acides gras polyinsaturés et des levures probiotiques *Saccharomyces cerevisiae*. L'huile a été choisie comme témoin « positif » tandis que deux souches de levure, dont le mode d'action pourrait être différent, ont été testées pour leur efficacité à limiter la production entérique de méthane.

Intérêt de l'étude pour notre application

Le mode d'action supposé des additifs testés pour leur capacité à diminuer la production de méthane est en lien direct avec des effets potentiellement attendus sur la communauté fibrolytique ruminale. En effet, les acides gras polyinsaturés qui composent notamment l'huile de cameline pourraient avoir un effet méthano-répresseur à travers un effet inhibiteur démontré *in vitro* (Nagaraja *et al.*, 1997 ; Doreau et Ferlay, 1995) et observé *in vivo* (Yang *et al.*, 2009 ; Mao *et al.*, 2010) sur les bactéries cellulolytiques et les protozoaires qui sont de forts producteurs d'hydrogène. Ainsi, l'inhibition de ces microorganismes permettrait de diminuer la quantité d'hydrogène disponible pour la méthanogénèse. *In vivo*, la supplémentation en lipides conduit généralement à une diminution de la digestibilité totale de la ration (Martin *et al.*, 2008) qui suggère une activité fibrolytique réduite du microbiote ruminal. L'une des souches de levure *Saccharomyces cerevisiae* évaluée dans cette étude bovine (levure A), dont la capacité à améliorer la fibrolyse a été montrée dans plusieurs études (Guedes *et al.*, 2008 ; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010a ; Mosoni *et al.*, 2007), pourrait diminuer la méthanogénèse en augmentant l'efficacité alimentaire (de Ondarza *et al.*, 2010). Il a en effet été montré que les animaux présentant une haute efficacité alimentaire

produisaient moins de CH₄ ruminal par unité de produit (lait ou viande) (Nkrumah *et al.*, 2006 ; Hegarty *et al.*, 2007). Enfin, l'autre souche de levure probiotique (levure B) a montré un effet très stimulateur de la croissance de *Fibrobacter succinogenes* S85 dans le cadre d'un screening *in vitro* de plusieurs dizaines de souches et sur la dégradation des fibres (luzerne et paille de blé) dans du contenu de rumen filtré (Lallemand, données non publiées). *Fibrobacter succinogenes* est une des espèces fibrolytiques majeures du rumen et présente l'intérêt de ne pas produire d'hydrogène. La stimulation de cette espèce au détriment des autres espèces fibrolytiques productrices d'hydrogène permettrait ainsi de réduire la quantité d'hydrogène disponible pour la méthanogénèse tout en maintenant l'efficacité alimentaire (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010c). Ces trois additifs alimentaires présentaient donc un intérêt particulier pour la validation de la biopuce ADN développée, l'huile de cameline ayant probablement un effet répresseur sur les microorganismes fibrolytiques, et les deux levures ayant potentiellement un effet stimulateur plus ou moins ciblé sur cette communauté.

La structure du microbiote, ainsi que l'abondance des principales communautés et en particulier de microorganismes fibrolytiques, ont été étudiées par des approches de qPCR et de séquençage haut-débit de l'ADNr16S, pour répondre d'une part à l'objectif premier de l'étude, c'est-à-dire caractériser l'effet des additifs alimentaires testés sur la structure du microbiote ruminal, et d'autre part pour évaluer l'intérêt des échantillons pour la validation de la biopuce ADN. En parallèle, les paramètres fermentaires, digestifs, et de production ont été mesurés et leur analyse a été prise en charge par le MTT. Par manque de temps, tous les échantillons n'ont pas pu être analysés avec la biopuce ADN et le résultat d'un seul échantillon sera présenté afin d'illustrer la capacité de la biopuce ADN à détecter les gènes de fibrolyse exprimés par le microbiote ruminal.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. ANIMAUX ET PLAN EXPERIMENTAL

L'essai a été réalisé au MTT Agrifood Research (Finlande). Toutes les procédures expérimentales ont été validées par le Comité national d'éthique de Finlande en accord avec la directive 86/609/EEC du Conseil de l'Union Européenne. L'expérimentation a porté sur 4 vaches laitières multipares, de race Finnish Ayrshire, appareillées avec une canule ruminale. Au début de l'expérimentation, les animaux présentaient un poids (711 ± 23 kg) et une

production laitière journalière ($33.8 \pm 3,4$ kg lait/jour) similaires. L’essai a été réalisé en carré latin 4×4 , comportant 4 périodes de 42 jours et permettant ainsi d’allouer à chaque vache successivement et dans un ordre aléatoire 4 régimes alimentaires différents (Tableau 29).

Tableau 29- Plan expérimental et allocation des régimes alimentaires.

Traitements : NC, régime contrôle (contrôle négatif) ; P1, régime supplémenté en levure probiotique A ; P2, régime supplémenté en levure probiotique B ; CO, régime supplémenté en huile enrichie en acides gras 18:3 n-3 (contrôle positif).

Période	Animal			
	1	2	3	4
1	NC	P1	P2	CO
2	P1	P2	CO	NC
3	CO	NC	P1	P2
4	P2	CO	NC	P1

Chaque période comprenait 23 jours d’adaptation, 5 jours d’échantillonnage suivis de 14 jours de « washout ». Durant la période de « washout », les vaches ont reçu le régime contrôle de manière à limiter les effets du régime alimentaire reçu pendant la période n sur la période $n+1$.

II.2. ALIMENTATION

Durant l’expérimentation, les vaches ont été logées individuellement et avaient librement accès à de l’eau de bonne qualité. Le régime contrôle était composé à 50% de fourrage (ensilage d’herbe) et 50% de concentré (**traitement NC**). Les autres traitements étaient composés du régime contrôle, supplémenté avec 0,5 g/jour (10^{10} UFC/jour) d’une souche de levure vivante (*Saccharomyces cerevisiae*, Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, France) A (**traitement P1**) ou B (**traitement P2**), ou 60 g d’huile de cameline (Raisio Feed Ltd., Raisio, Finland)/kg de matière sèche (**traitement CO**). Les levures ont été administrées quotidiennement à 06 h 00, directement dans le rumen via la canule tandis que l’huile remplaçait une partie des ingrédients du concentré (Tableau 30).

Tableau 30 – Formulation et composition chimique des régimes alimentaires expérimentaux. MS, matière sèche ; CP, protéines brutes ; NDF, neutral detergent fibre (~paroi sans pectine) ; pdNDF, NDF potentiellement digestibles; ADF, acid detergent fibre (~lignocellulose); WSC, sucres solubles dans l'eau ; EC, énergie de croissance.

	Traitement			
	Contrôle	P1	P2	CO
Ingrédients (g/kg MS)				
Ensilage d'herbe	500	500	500	500
Orge aplatie	225	225	225	197
Pulpe de betterave	120	120	120	105
Tourteau de colza	140	140	140	123
Huile de cameline	-	-	-	60
Prémélange de vitamines et de minéraux ¹	15,0	15,0	15,0	15,0
Composition chimique (g/kg MS, sauf mention spéciale)				
MS (g/kg)	327	327	327	328
Matière organique	913	913	913	917
CP	163	163	163	152
NDF	401	401	401	387
pdNDF	325	325	325	313
ADF	228	228	228	221
WSC	32,7	32,7	32,7	29,0
Amidon	120	120	120	106
Acides gras	21,6	21,6	21,6	70,6
EC (MJ/kg MS)	18,7	18,7	18,7	20,0

¹Supplément en vitamines et minéraux (3, Onni, Melica Finland Ltd., Vaasa, Finlande) contenant (g/kg) calcium (205), magnésium (72), sodium (85), phosphore (27), zinc (1,46), manganèse (0,35), cuivre (0,27); (mg/kg), iode (39), cobalt (27), sélénium (20); (IU/g) acétate de rétinol (120), cholécalciférol (25) et acétate de di- α tocophérol (0,34).

L'alimentation a été offerte *ad libitum*, sous forme de ration totale mélangée pour éviter la sélection des composants alimentaires et pour maintenir le ratio fourrage/concentré. Les rations ont été formulées de manière à répondre aux besoins en énergie et en protéines métabolisables selon les tables d'alimentation et recommandations alimentaires finlandaises.

II.3. PARAMETRES FERMENTAIRES RUMINAUX, GAZ RUMINAUX ET DIGESTIBILITE TOTALE DE LA RATION

Les paramètres fermentaires ruminiaux (pH, AGV), et la digestibilité totale de la ration ont été mesurés et analysés selon les méthodes classiques décrites dans Bayat *et al.* (2014). Les gaz ruminiaux (CO₂ et CH₄ émis) ont été mesurés selon la technique utilisant l'hexafluorure de soufre (SF₆) comme gaz traceur (Boadi *et al.*, 2002).

II.4. PRELEVEMENT DE CONTENUS RUMINAUX POUR L'ANALYSE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES

Les échantillons de contenu ruminal ont été collectés via la canule dans quatre sites différents du rumen, de manière à obtenir un échantillon représentatif. Les prélèvements ont été réalisés à 06 h 00, avant repas, et à 10 h 00, après repas, le jour 28 de chaque période. Les échantillons de digesta, issus des quatre sites ruminiaux, ont été mélangés et un sous-échantillon de 50 g a été mélangé à 100 mL d'une solution de stabilisation des ARN (RNAlater, Fisher Scientific), puis aliquoté. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'extraction des acides nucléiques.

II.5. ETUDE STRUCTURALE DU MICROBIOTE RUMINAL

II.5.1. Extraction d'ADN génomique à partir des contenus de rumen

Les échantillons de rumen ont été décongelés, mélangés, puis centrifugés 10 min à 12000 g (4°C) afin d'éliminer le RNAlater. L'extraction d'ADN a été réalisée à partir du culot de contenu de rumen, en quadruplicat, en utilisant le kit Nucleospin for Soil (Macherey-Nagel) avec quelques modifications mineures. Brièvement, 250 mg de contenu de rumen centrifugé ont été lysés mécaniquement en utilisant l'homogénéiseur FastPrep-24 (MP Biomedicals) en présence des billes de céramique de diamètre ~0,3 mm fournies par le kit, 700 µL de tampon de lyse SL1 (Macherey-Nagel) et 15 µL de tampon Enhancer SX (Macherey-Nagel). Toutes les autres étapes ont été suivies selon les recommandations du fournisseur. La quantité et la pureté des ADNg extraits ont été vérifiées avec le spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). Leur intégrité a été vérifiée par une électrophorèse en gel d'agarose 1% contenant 0,4 µg/mL de bromure d'éthidium et visualisation sous UV avec le système Gel Doc 2000 (BIO-RAD). Les échantillons d'ADNg ont été conservés à -20°C.

II.5.2. Quantification de groupes microbiens et de bactéries cellulolytiques par PCR quantitative

Au cours de cette étude, les bactéries totales, les archées méthanogènes, les champignons, les protozoaires et deux espèces de bactéries fibrolytiques ont été quantifiées par PCR quantitative (qPCR), pour leur implication dans le métabolisme des gaz ou la fibrolyse. En effet, les protozoaires (pour la majorité), les champignons et *Ruminococcus flavefaciens* sont

des microorganismes fibrolytiques et producteurs d'hydrogène (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010c ; Hegarty, 1999). Les protozoaires sont en particulier forts producteurs d'hydrogène et ont un rôle prépondérant dans les transferts d'hydrogène au sein du rumen et la production de méthane (Hegarty, 1999). *Fibrobacter succinogenes* est une espèce fibrolytique qui présente la particularité de ne pas produire d'hydrogène (Miller, 1978 ; Stewart et Flint, 1989 ; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010c). L'évaluation de leur abondance permettra entre autres d'estimer l'effet des traitements sur le processus de fibrolyse. Les archées méthanogènes, quant à elles, utilisent l'hydrogène pour produire du méthane (Doreau *et al.*, 2011b). Tous les groupes microbiens et les 2 bactéries ont été quantifiés à partir des échantillons préprandiaux, à l'exception des protozoaires qui ont été quantifiés à partir des prélèvements pré- et post-prandiaux.

Les réactions de qPCR ont été réalisées en utilisant la chimie SYBR-green et le thermocycleur MasterCycler ep Realplex (Eppendorf). Les couples d'amorces (Tableau 31) et les conditions de PCR sont celles décrites dans la littérature pour les archées méthanogènes (Ohene-Adjei *et al.*, 2007), les protozoaires (Sylvester *et al.*, 2005), les espèces bactériennes cellulolytiques *Ruminococcus flavefaciens* et *Fibrobacter succinogenes*, et les champignons (Denman and McSweeney, 2006). Les bactéries totales ont été quantifiées en utilisant les amorces 520F et 799R2 (Edwards *et al.*, 2007, 2008).

Tableau 31 - Amorces utilisées pour la PCR quantitative.

Groupes microbiens	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du fragment
Bactéries totales	AGCAGCCGCGGTAAT CAGGGTATCTAATCCTGTT	280 pb
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA CGCCTGCCCTGAACTATC	121 pb
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC	132 pb
Archées méthanogènes	GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA ACGGGCGGTGTGTGCAAG	233 pb
Champignons	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	120 pb
Protozoaires	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT CTTGCCCTCYAATCGTWCT	223 pb

Les réactions de qPCR ont été réalisées dans un volume total de 20 μL , contenant 10 μL de 2X Takara SYBR Premix Ex Taq (Lonza), 40 ng d'échantillon d'ADN et 0,5 μM de chacune des amorces. Pour chaque quadruplicat d'extraction, la réaction a été effectuée en triplicat dans des plaques 96 puits (Biorad) assurant ainsi des résultats de quantification fiables. Des gammes étalons ont été utilisées afin de déterminer l'abondance absolue des groupes microbiens ciblés, exprimée en log de copies d'ADN par μg d'ADN. Pour les bactéries totales, les bactéries cellulolytiques et les archées méthanogènes, les gammes ont été réalisées comme décrit précédemment (Mosoni *et al.*, 2011). La gamme étalon a été réalisée avec des produits de PCR (d'environ 1485 pb) en mélange équimolaire provenant de l'amplification de l'ADNr 16S de 11 souches bactériennes représentatives de la diversité du rumen, *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC19169), *Ruminococcus flavefaciens* c94 (ATCC19208), *Ruminococcus albus* 7 (ATCC27210), *Butyrivibrio fibrisolvens* (DSM3071), *Eubacterium limosum* (ATCC80489), *Prevotella bryantii* B14 (DSM11371), *Peptostreptococcus sp.* D1 (isolée au laboratoire), *Megasphaera elsdenii* (DSM20460), *Selenomonas ruminantium* (DSM2872) et *Streptococcus bovis* (DSM20480). Les souches utilisées pour l'amplification de la gamme étalon des bactéries cellulolytiques sont *Fibrobacter succinogenes* S85 (ATCC19169) et *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, pour la gamme étalon des archées méthanogènes, *Methanobrevibacter smithii* 861. Pour les protozoaires, des plasmides pSC-A-amp/kan (Strataclone PCR cloning kit, Agilent Technologies) contenant la quasi-totalité du gène codant l'ARNr 18S de *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* et *Ostracodinium dentatum* ont été mélangés en quantités égales. Les plasmides ont été fournis par F. Ossa (Institut Rosell/Lallemand, Montréal, Canada). Pour les champignons, un fragment de la région ITS1 d'une souche *Piromyces sp.* isolée au laboratoire a été amplifié en utilisant les amorces qPCR, comme décrit par Lwin *et al.* (2011), et clonés en utilisant le kit pCR2.1 Topo TA Cloning kit (Invitrogen, Life technologies) selon les instructions du fournisseur. Le nombre de copies de gène présent dans chaque solution de plasmides a été calculé en utilisant la concentration d'ADN plasmidique et la masse moléculaire du vecteur et de l'insert. Pour chaque cible, une gamme étalon a été préparée de 10^2 à 10^9 copies par dilution sériée.

II.5.3. Analyse du microbiote ruminal par séquençage d'amplicons 16S

II.5.3.1 Séquençage haut-débit de la région V4 de l'ADNr 16S

La région hypervariable V4 de l'ADNr 16S, présentant une longueur appropriée à la technologie Illumina MiSeq et permettant une classification optimale des séquences (Caporaso *et al.*, 2012 ; Mizrahi-Man *et al.*, 2013), a été séquencée. L'obtention des banques d'amplicons et le séquençage ont été réalisés par le laboratoire MR DNA (www.mrdnalab.com, Shallowater, USA). Brièvement, la région V4 (région 533-786 de *Escherichia coli* 83972) de l'ADNr 16S des bactéries et des archées a été amplifiée en utilisant les amorces 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') et 816R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso *et al.*, 2010), et le kit HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen). Les conditions de PCR étaient les suivantes : une dénaturation initiale de 3 min à 94°C, 28 cycles comprenant 30 sec de dénaturation à 94°C, 40 sec d'hybridation à 53°C et 1 min d'élongation à 72°C, suivis d'une élongation finale de 72°C pendant 5 minutes. Les amorces utilisées contenaient la séquence de l'adaptateur Illumina et une « étiquette » de 6 bases, propre à chaque échantillon, permettant ainsi de multiplexer les échantillons. Les produits de PCR de chaque échantillon ont ensuite été poolés. Le séquençage a été réalisé en paired-end 2 x 250 pb (séquençage de 250 pb à partir des 2 extrémités des fragments d'ADN) sur un séquenceur Illumina MiSeq (Illumina) en suivant les recommandations du fournisseur.

II.5.3.2 Analyse des séquences

Les séquences brutes ont été traitées avec le logiciel Mothur (Schloss *et al.*, 2009). Brièvement, les séquences des deux extrémités ont été assemblées puis attribuées à chacun des 16 échantillons en utilisant les séquences étiquettes (une base différente autorisée au maximum). Les séquences des amorces (2 bases différentes autorisées au maximum) et des étiquettes ont été éliminées. Les séquences présentant plus de 2 bases différentes pour les amorces ont été éliminées. Finalement, seules les séquences ne présentant aucune base ambiguë, moins de 6 homopolymères et d'une longueur minimale de 200 pb ont été conservées pour la suite des analyses. Afin de préparer les séquences pour la détection des chimères, les séquences ainsi traitées ont été alignées en utilisant les alignements des séquences de référence de la base de données SILVA (alignements SEED, SSURef v102), décrits comme plus fiables par Schloss (2009) et disponibles sur le site web de Mothur (www.mothur.org/wiki/SILVA_reference_files). Les alignements SEED de 14956 séquences

de référence bactéries et 2297 séquences de référence archées ont été utilisés conjointement afin de prendre en compte la présence simultanée de séquences d'archées et de bactéries dans notre jeu de données. La région V4 ciblée (position 11894 à 25319 de l'alignement) a été amplifiée *in silico* avec la commande `pcr.seqs` à partir des alignements SEED avec l'objectif d'optimiser le temps d'alignement. La recherche de chimères a ensuite été effectuée avec `chimera.uchime` en utilisant les séquences les plus abondantes comme base de référence. Dans cette approche, les séquences les plus abondantes sont utilisées comme base de référence, selon l'hypothèse où une séquence chimère doit être moins abondante que les deux séquences qui la constituent. Les séquences identifiées comme chimères ont été éliminées tandis que les séquences restantes présentant au moins 97% d'identité (cutoff de 0,03 correspondant au niveau taxonomique espèce) ont été regroupées en cluster ou OTU (Operational Taxonomic Unit) par comparaison par paires des distances des alignements. L'assignation taxonomique des OTUs bactériennes et archéennes a été réalisée avec les bases de données de référence RDP (Cole *et al.*, 2009) et SILVA (Pruesse *et al.*, 2007) qui ont chacune donné le meilleur pourcentage d'assignation des séquences. Pour ceci, un cutoff de 50% a été appliqué comme suggéré par Claesson *et al.* (2009). Etant donné que le nombre de séquences par échantillon peut biaiser la diversité taxonomique observée (Roesch *et al.*, 2007), un sous-échantillonnage aléatoire des séquences a été réalisé de manière à avoir le même nombre de séquences pour chaque échantillon. Les analyses de diversité (courbe de raréfaction, indices Chao1, Shannon et Simpson) ont été réalisées avec le logiciel Mothur. Seuls les taxa présentant une abondance relative supérieure à 0,1% ont été considérés pour les analyses statistiques (Zened *et al.*, 2013).

II.6. ETUDE FONCTIONNELLE DU MICROBIOTE RUMINAL PAR BIOPUCE ADN

II.6.1. Préparation de l'échantillon d'ARN

L'échantillon de contenu ruminal de l'animal ayant reçu la ration « contrôle » au cours de la période 1 a été choisi pour réaliser une description des gènes exprimés par le microbiote ruminal en condition normale. Les ARN ont été extraits et enrichis comme décrits dans le Chapitre 1.

II.6.2. Marquage, hybridation et lecture de la biopuce ADN, et analyse des résultats d'hybridation

Les conditions d'hybridation de l'échantillon d'ARN sont celles déterminées comme optimales et décrites dans le Chapitre 2. Brièvement, les ARN enrichis ont été amplifiés et marqués avec le kit CyDye Post-Labeling Reactive Dye (GE Healthcare). Cinq microgrammes d'ARN, additionnés de 12,5 μ L de tampon Kreablock (Kreatech Diagnostics), ont été hybridés à 65°C. La lecture de la lame et l'analyse des résultats d'hybridation ont été réalisées comme décrit précédemment. Le seuil de SNR appliqué aux sondes 25 mers et GoArrays, au-delà duquel une sonde est considérée positive, est de 2 comme déterminé dans le Chapitre 2.

II.7. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Les données de PCR quantitatives ont été transformées en logarithme et analysées par une ANOVA pour carré latin 4×4 en utilisant la procédure mixte du logiciel SAS (version 9.2, SAS institute) et un modèle incluant les effets fixes de la période et du traitement et l'effet aléatoire des animaux. Les données de séquençage ont été analysées en utilisant le logiciel R (R 2, R development Core Team, 2013), avec un modèle à mesures répétées, incluant les effets fixes des traitements et des périodes, et l'effet aléatoire des animaux. Un test post-hoc HSDTukey a été réalisé afin d'identifier les différences entre les échantillons. Seules les p-value comparant le régime contrôle aux autres traitements sont rapportées. Les moyennes des moindres carrés \pm SEM (Standard Error of the Mean) sont rapportées et les effets des traitements ont été déclarés significatifs à une p-value $P < 0,05$, tandis qu'une tendance a été déclarée pour des probabilités $\leq 0,1$ et $\geq 0,05$.

III. RESULTATS

III.1. FERMENTATIONS RUMINALES ET DIGESTIBILITE DE LA RATION

Comparée au contrôle et au groupe levure A, l'huile de cameline a eu tendance ($P = 0,06$) à diminuer le pH ruminal, et aucun des traitements ($P > 0,05$) n'a eu d'effet sur la concentration des AGV totaux (Tableau 32). La digestibilité apparente totale des composants de la ration autres que l'amidon et l'énergie de croissance n'a pas été affectée par les traitements ($P >$

0,05). La digestion de l'amidon ($P = 0,05$) et de l'énergie totale ($P = 0,08$) tendent à être diminuées par l'huile de cameline comparée au contrôle et au groupe levure B (Tableau 32).

Tableau 32 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures (A ou B) ou d'huile de cameline (CO) sur les paramètres fermentaires et la digestibilité totale de la ration. AGV, acides gras volatils ; MO, matière organique ; PB, protéines brutes ; NDF, neutral detergent fibre (~paroi sans pectine); pdNDF, NDF potentiellement digestibles ; ADF, acid detergent fibre (~lignocellulose); EC, énergie brute ; SEM, erreur standard à la moyenne.

	Traitement				SEM	<i>P-value</i>
	Contrôle	Levure A	Levure B	CO		
Paramètres fermentaires						
pH	6,65 ^a	6,65 ^a	6,52 ^{ab}	6,40 ^b	0,065	0,06
AGV totaux (mmol/L)	98,6	97,2	103	100	3,60	0,67
Acétate	672	670	668	675	4,2	0,67
Propionate	189	192	192	198	4,0	0,22
Butyrate	86,9	88,6	89,4	80,7	3,45	0,21
Ratio molaire						
Acétate:propionate	3,58	3,52	3,47	3,41	0,081	0,45
Digestibilité apparente (g/kg)						
MO	724	716	724	693	8,5	0,13
PB	711	710	712	688	10,5	0,31
NDF	585	570	589	545	13,0	0,18
pdNDF	691	680	693	655	11,4	0,17
ADF	595	582	600	557	13,9	0,22
Amidon	982 ^a	981 ^{ab}	983 ^a	977 ^b	1,1	0,05
EC	709	700	709	675	8,3	0,08

a-b Dans une ligne, les valeurs avec deux exposants différents sont déclarées significativement différentes ($P < 0,05$)

III.2. PRODUCTION DE METHANE ET DE DIOXYDE DE CARBONE RUMINAUX

Comparées au contrôle, les deux souches de levures ont diminué les émissions de CH₄ ruminales journalières bien que cette diminution ne soit pas significative ($P < 0,05$), tandis que l'huile de cameline a réduit les émissions de CH₄ ($P < 0,05$) (Tableau 33). Toutefois, la production de méthane rapportée à la matière organique totale digérée ou au kg de lait n'était pas différente ($P > 0,05$).

Les deux levures vivantes A et B et l'huile de cameline ont diminué ($P < 0,05$) les émissions de CO₂, tandis que les émissions de CO₂ rapportées par unité de lait tendaient ($P = 0,09$) à être diminuées pour les traitements Levure A et CO comparés au contrôle (Tableau 33).

Tableau 33 - Effets de la supplémentation de deux souches de levures (A ou B) ou d'huile de cameline (CO) sur les émissions de méthane et de dioxyde de carbone entériques. MOD, matière organique totale digérée dans le tractus digestif, NDFD, NDF totaux digérés dans le tractus digestif ; SEM, erreur standard à la moyenne.

	Traitement				SEM	<i>P-value</i>
	Contrôle	Levure A	Levure B	CO		
Méthane ruminal						
g/j	407 ^a	365 ^a	372 ^a	287 ^b	22,3	< 0,05
g/kg MOD	32,7	30,4	29,6	27,9	2,12	0,51
g/kg NDFD	57,8	53,3	52,5	49,7	3,60	0,51
g/kg lait	15,6	13,8	15,0	13,1	1,33	0,27
Dioxyde de carbone ruminal						
g/j	3,493 ^a	3,006 ^b	3,172 ^b	2,295 ^b	226,4	< 0,05
g/kg OMD	281	251	252	220	16,8	0,18
g/kg NDFD	497	440	447	392	28,5	0,18
g/kg lait	133	114	127	104	10,4	0,09

a-b Dans une ligne les valeurs avec deux exposants différents sont déclarées significativement différentes ($P < 0,05$)

III.3. STRUCTURE DES COMMUNAUTES PROCARYOTES

La structure des communautés procaryotes (bactéries et archées) de la totalité des échantillons ruminiaux collectés (soit 16 échantillons) a été analysée par séquençage de la région V4 de l'ADNr 16S. Un total de 1953777 séquences a été obtenu, représentant une moyenne de 122111 ± 41745 et 6422 ± 2628 séquences (224 pb en moyenne) de bactéries et d'archées respectivement, par échantillon. Etant donné que le nombre de séquences pour chaque échantillon différait, un sous-échantillonnage aléatoire des séquences a été réalisé et l'analyse taxonomique des bactéries et des archées a été effectuée sur 86468 et 3179 séquences respectivement.

III.3.1. Analyse de la communauté bactérienne

III.3.1.1 Richesse et diversité des bactéries

A un niveau de similarité de 97%, 89896 OTUs (Operational Taxonomic Units) ont été obtenues sur l'ensemble des échantillons, avec en moyenne 10708 ± 499 OTUs pour chaque échantillon dont seules 1380 sont présentes à plus de 0,1% des séquences, suggérant un grand nombre d'OTUs rares.

L'indice de couverture de Good mesure la probabilité qu'une séquence sélectionnée aléatoirement à partir d'un échantillon ait déjà été séquencée et permet donc d'estimer le

degré de complétude du séquençage (Good, 1953). Une couverture moyenne de 91% (SEM \pm 0,005%) a été déterminée, indiquant un effort de séquençage satisfaisant qui permet de décrire la richesse des échantillons ruminiaux de façon robuste. Les courbes de raréfaction pour l'ensemble des échantillons sont présentées dans la Figure 40.

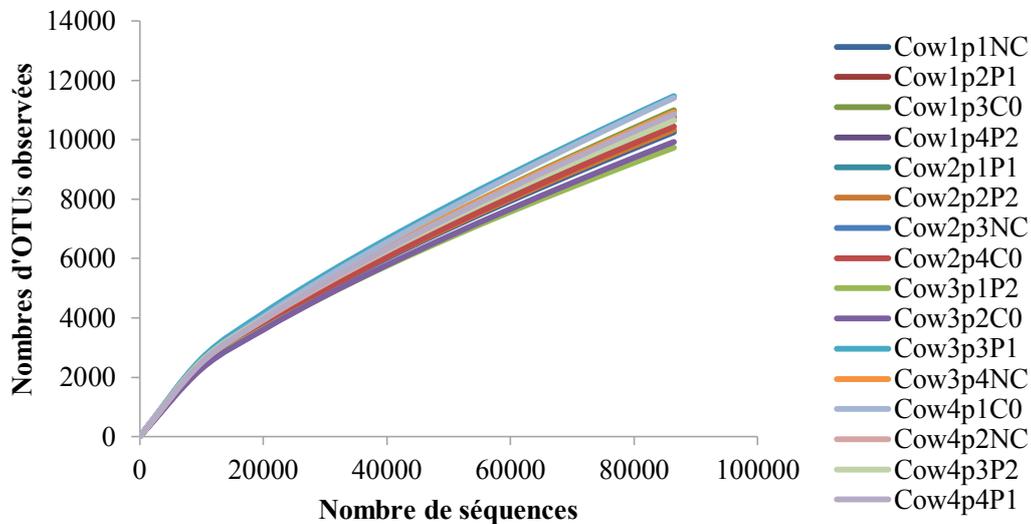


Figure 40 – Courbes de raréfaction obtenues avec les séquences de bactéries pour chacun des 16 échantillons. Les échantillons ont été désignés de la manière suivante : Cow n pm*Traitement* où Cow n correspond à la vache n (n , 1 à 4), pm à la période de l'expérimentation (m , 1 à 4) et *Traitement* au traitement reçu par l'animal (NC : contrôle négatif sans traitement, CO : huile de cameline, P1 : souche de levure A, P2 : souche de levure B).

Afin d'estimer le niveau de diversité du microbiote ruminal, les indices moyens de richesse Chao1 (39435 ± 3433) et de diversité α , Simpson ($0,0047 \pm 0,0007$) et Shannon ($6,9 \pm 0$), ont été déterminés pour l'ensemble des échantillons. L'indice de richesse Chao1 estime le nombre d'espèces totales présentes en évaluant le nombre d'espèces non observées à partir de celles observées 1 ou 2 fois (Chao, 1984). Les indices de diversité α permettent de prendre en compte simultanément la richesse spécifique et l'abondance des espèces (Simpson, 1949 ; Shannon, 1948). L'indice de Shannon donne plus de poids aux espèces rares et, est minimal lorsque la diversité est minimale. L'indice de Simpson donne, lui, plus de poids aux espèces abondantes qu'aux espèces rares. Il varie de 0 à 1 et se rapproche de 0 lorsque la diversité est maximale. Les valeurs de ces indices sont commentées dans les paragraphes ci-dessous décrivant l'effet des traitements.

III.3.1.2 Composition moyenne en bactéries

Les OTUs ont été assignées à 18 phyla dont 12 correspondent chacun à plus de 0,1% des séquences (Figure 41).

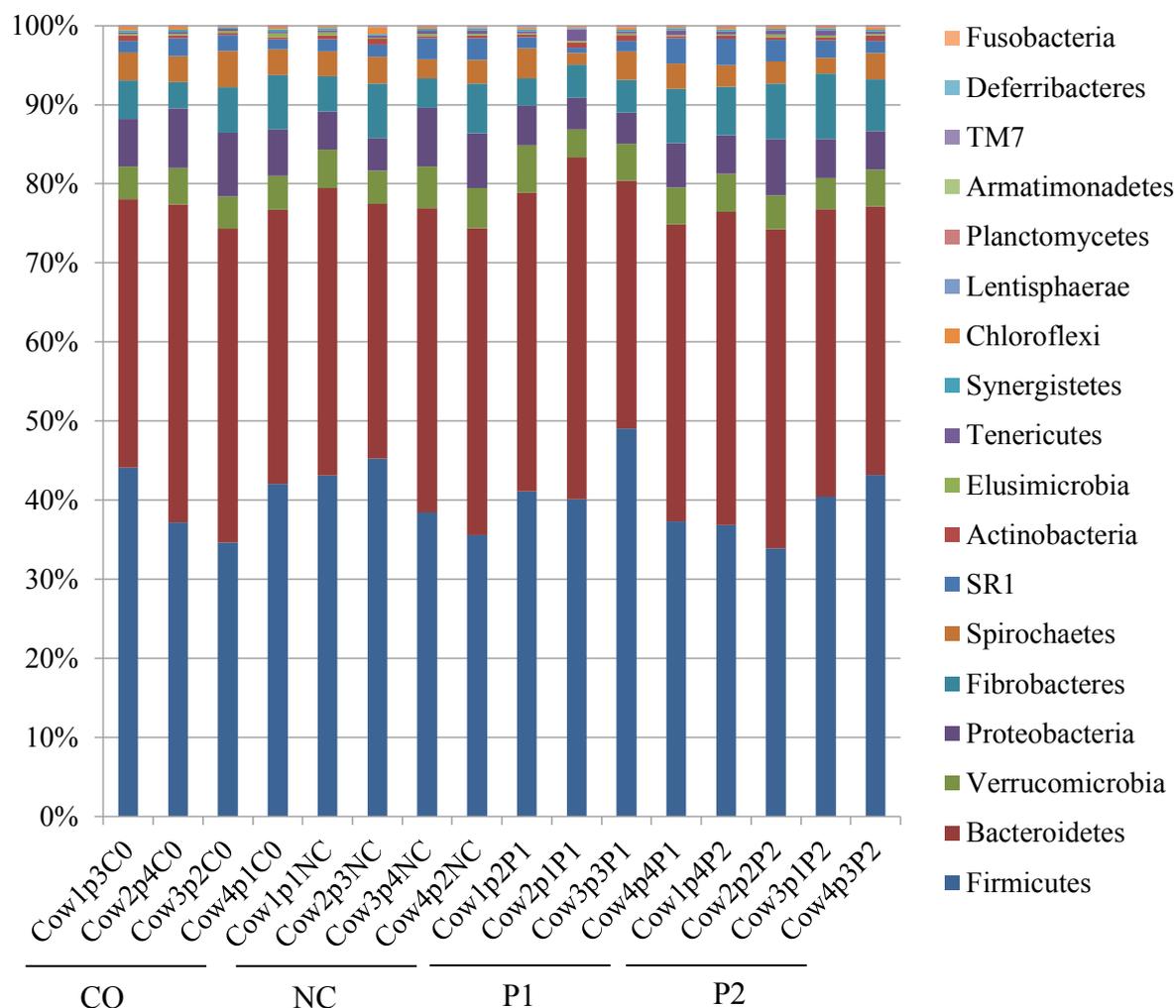


Figure 41 – Répartition des séquences assignées au niveau du phylum pour chaque échantillon. Les échantillons ont été désignés de la manière suivante : Cow n pm*Traitement* où Cow n correspond à la vache n (n , 1 à 4), pm à la période de l'expérimentation (m , 1 à 4) et *Traitement* au traitement reçu par l'animal.

Les phyla des Firmicutes et des Bacteroidetes sont dominants et représentent en moyenne 37,8 et 35,0% des séquences. Toutefois, leur abondance varie en fonction des échantillons, de 31,7 à 46,6%, et de 29,8 à 40,7%, respectivement. Les autres phyla sous-dominants sont les Proteobacteria (en moyenne 5,4% des séquences), les Fibrobacteres (5,2%), les Verrucomicrobia (4,3%), les Spirochaetes (2,9%), le groupe candidat SR1 (1,9%), les Actinobacteria (0,4%), les Chloroflexi (0,3%), les Synergistetes (0,2%) et les Elusimicrobia (0,2%). Enfin d'autres phyla, représentant moins de 0,1% des séquences, sont retrouvés dans tous les échantillons (Planctomycetes, *Lentisphaerae*, groupe candidat TM7) ou seulement

dans certains échantillons (Armatimonadetes, Fusobacteria, Deferribacteres). En moyenne, 5,9% des séquences n'ont pu être assignées à un phylum, en accord avec de précédents travaux (Claesson *et al.*, 2010). Ces séquences n'ont pas été considérées dans les analyses.

Si l'on s'intéresse à des niveaux taxonomiques plus fins, en utilisant un bootstrap minimal de 50%, 88,0% des séquences ont été assignées à une classe, 74% à une famille et seulement 48,7% à un genre (Figure 42).

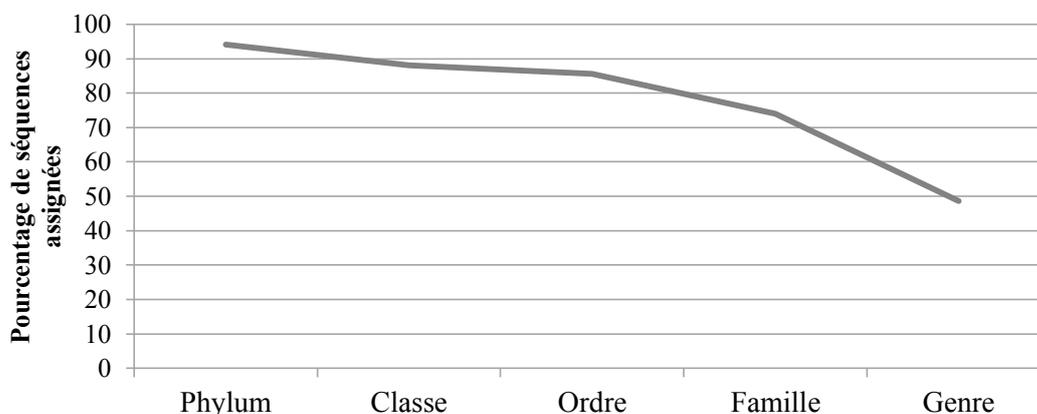


Figure 42 – Pourcentage de séquences assignées à un taxon en fonction de différents niveaux taxonomiques.

Au total, 38 classes et 77 ordres ont été identifiés. A l'échelle des classes, les Firmicutes sont dominés par les Clostridia (76% des séquences Firmicutes), et les Bacteroidetes par les Bacteroidia (65,5% des séquences Bacteroidetes). Sur les 136 familles identifiées, seules 39 sont présentes à plus de 0,1% des séquences. Pour les Bacteroidetes, les familles les plus abondantes sont les *Prevotellaceae* (16,4% des séquences totales) et les *Porphyromonadaceae* (2,9%) qui appartiennent à l'ordre des Bacteroidales, et les *Flavobacteriaceae* (3,5%, ordre des Flavobacteriales). Pour les Firmicutes, les familles des *Ruminococcaceae* (10,4%) et des *Lachnospiraceae* (9,9%) appartenant à l'ordre des Clostridiales, et les *Acidaminococcaceae* (5,2%, ordre des Selenomonadales) sont dominantes. Concernant les Proteobacteria, dominées par les Gammaproteobacteria (48% des séquences Proteobacteria), 77,4% des séquences n'ont pu être assignées à une famille et 7,9% ont été classées dans la famille des *Succinivibrionaceae* (ordre des Anaeromonadales).

Enfin, 229 genres ont été identifiés et 320 si l'on prend en compte les genres non classés. Parmi ceux-ci, le genre *Prevotella* est de loin le plus abondant et représente 13,4% des séquences totales. Les dix genres les plus abondants sont présentés dans le Tableau 34.

Tableau 34 – Abondance relative (% des séquences totales) des 10 genres les plus abondants classés par ordre décroissant. SEM, erreur standard à la moyenne.

Phylum	Famille	Genre	Abondance relative	SEM
Bacteroidetes	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Prevotella</i>	13,4	0,57
Fibrobacteres	<i>Fibrobacteraceae</i>	<i>Fibrobacter</i>	5,2	0,35
Firmicutes	<i>Acidaminococcaceae</i>	<i>Succiniclasticum</i>	4,4	0,18
Verrucomicrobia	Subdivision 5 <i>incertae sedis</i>	<i>Incertae sedis</i>	3,9	0,13
Spirochaetes	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Treponema</i>	2,8	0,17
SR1	<i>incertae sedis SR1</i>	SR1_genus_incertae_sedis	1,9	0,18
Firmicutes	<i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus</i>	1,8	0,15
Firmicutes	<i>Clostridiaceae</i>	<i>Saccharofermentans</i>	1,7	0,11
Bacteroidetes	<i>Prevotellaceae</i>	<i>Paraprevotella</i>	0,9	0,05
Firmicutes	<i>Lachnospiraceae</i>	Clostridium_XIVa	0,9	0,06

Tableau 35 – Abondance relative (% des séquences totales) des genres non classés présentant une abondance supérieure à 0,9%. SEM, erreur standard à la moyenne.

Phylum ; Classe ; Ordre ; Famille ; Genre	Abondance relative	SEM
Firmicutes ; Clostridia ; Clostridiales ; non classées	7,4	0,21
Bacteroidetes ; non classées	6,7	0,20
Firmicutes ; Clostridia ; Clostridiales ; <i>Lachnospiraceae</i> ; non classées	6,7	0,27
Firmicutes ; Clostridia ; Clostridiales ; <i>Ruminococcaceae</i> ; non classées	4,9	0,26
Bacteroidetes ; Bacteroidia ; Bacteroidales ; <i>Flavobacteriaceae</i> ; non classées	3,5	0,15
Firmicutes ; non classées	3,0	0,06
Bacteroidetes ; Bacteroidia ; Bacteroidales ; non classées	3,0	0,08
Bacteroidetes ; Bacteroidia ; Bacteroidales ; <i>Porphyromonadaceae</i> ; non classées	2,5	0,15
Proteobacteria ; Gammaproteobacteria ; non classées	2,1	0,29
Bacteroidetes ; Bacteroidia ; Bacteroidales ; <i>Prevotellaceae</i> ; non classées	1,62	0,06
Proteobacteria ; non classées	1,4	0,10
Bacteroidetes ; Shingobacteria ; Sphingobacteriales ; non classées	1,1	0,05

Il est à noter que les genres non classés constituent également une part importante du microbiote ruminal. Douze genres non classés présentent une abondance relative supérieure au dixième genre classé (Tableau 35).

III.3.2. Analyse de la communauté des archées

III.3.2.1 Richesse et diversité des archées

Au total, 936 OTUs ont été déterminées comme archées, dont seulement 7 sont présentes à plus de 0,1% des séquences, ce qui suggère une dominance nette de ces OTUs. En moyenne, 83 ± 10 OTUs par échantillon ont été obtenues. L'indice de richesse Chao1 est de 250 ± 83 et les indices de diversité Simpson et Shannon sont de $0,20 \pm 0,05$ et $2,01 \pm 0,18$ respectivement. Une couverture moyenne de 98% (SEM $\pm 0,002\%$) a été déterminée, indiquant que l'effort de séquençage était suffisant. Les courbes de raréfaction obtenues pour chacun des 16 échantillons sont reportées dans la Figure 43.

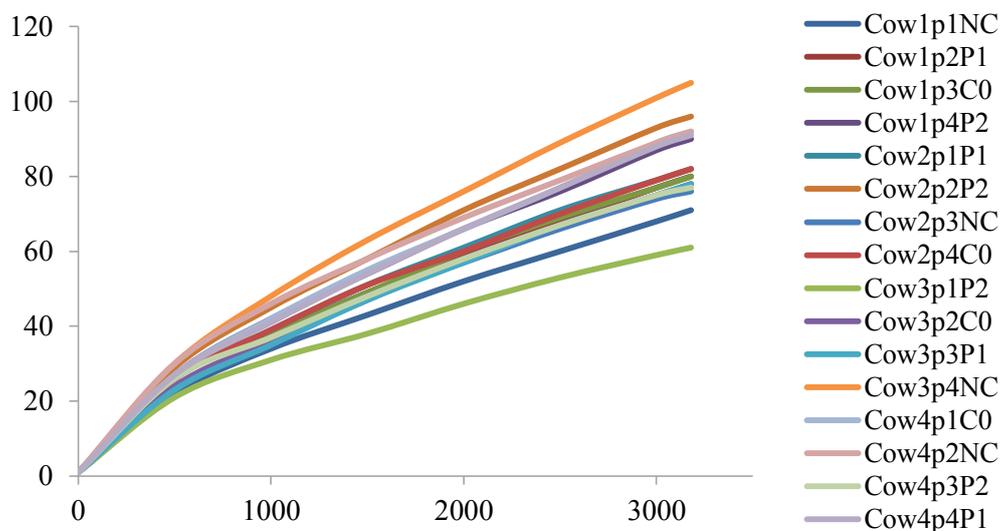


Figure 43 - Courbes de raréfaction obtenues avec les séquences d'archées pour chacun des 16 échantillons. Les échantillons ont été désignés de la manière suivante : *Cow_npm_{Traitement}* où *Cow_n* correspond à la vache *n* (*n*, 1 à 4), *pm* à la période de l'expérimentation (*m*, 1 à 4) et *Traitement* au traitement reçu par l'animal (NC : contrôle négatif sans traitement, CO : huile de caméline, P1 : souche de levure A, P2 : souche de levure B).

III.3.2.2 Composition moyenne des archées ruminales

Toutes les OTUs ont été assignées au phylum des Euryarcheota (Figure 44). La classe des Methanobacteria apparaît dominante (57,5% des séquences totales) et est représentée par les genres *Methanobrevibacter* (90,9% des séquences Methanobacteria) et *Methanosphaera* (9,0% des séquences Methanobacteria). Les *Methanomassiliicoccaceae* sont également

fortement représentées (35,9% des séquences totales) avec en particulier le groupe VadinCA11_gut. Des Thermoplasmatales non classés (6% des séquences totales) et le groupe Terrestrial_Miscellaneous_Euryarcheotal (0,4% des séquences Thermoplasmatales) sont également retrouvés. De manière sporadique, quelques séquences ont été assignées au genre *Methanimicrococcus* (classe des Methanomicrobia, ordre des Methanosarcinales). Enfin 0,03% des séquences n'ont pu être classées.

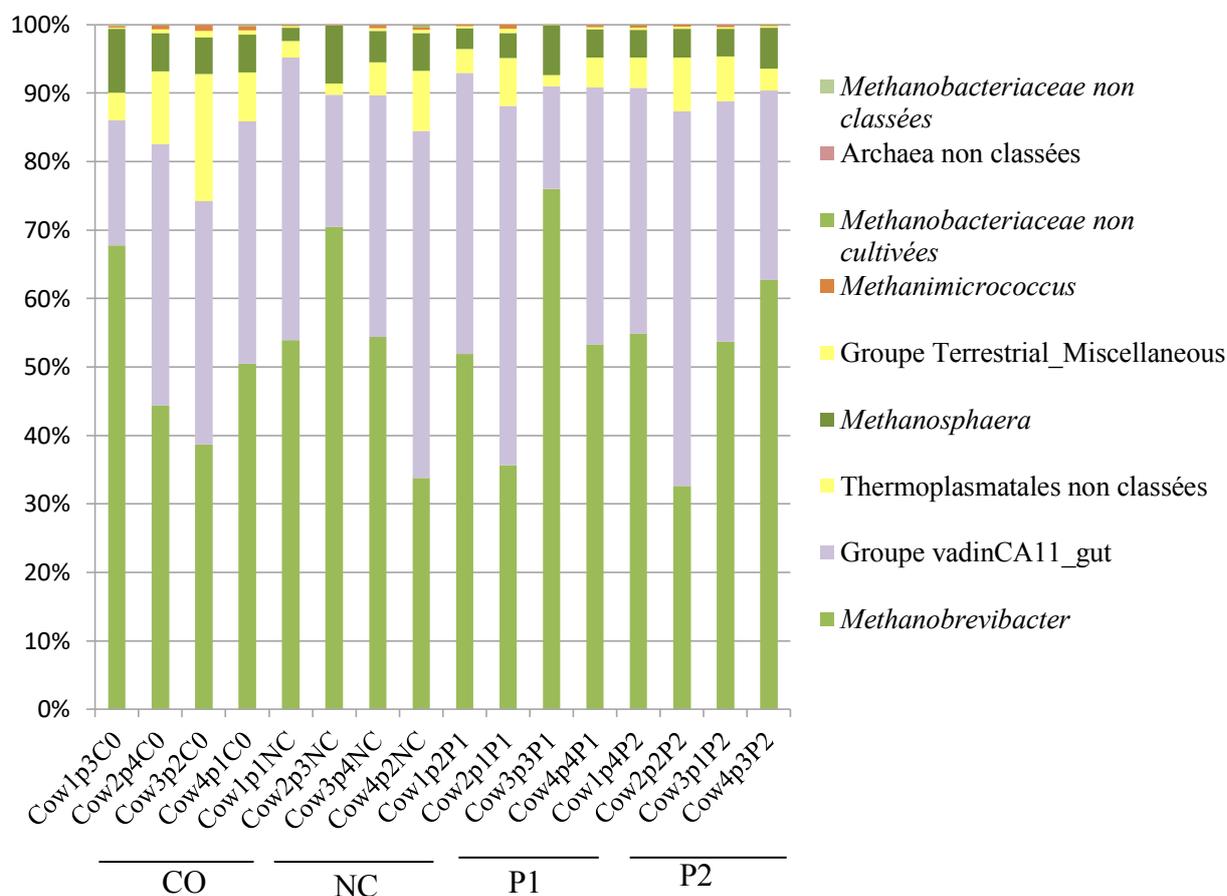


Figure 44 – Répartition taxonomique des archées. En vert, la classe des Methanobacteria ; en violet, la classe des *Methanomassiliicoccaceae* ; en jaune, la classe des Thermoplasmata ; en orange, la classe des Methanomicrobia.

III.4. EFFETS DES TRAITEMENTS SUR LES COMMUNAUTES RUMINALES

III.4.1. Effets des traitements sur l'abondance des grands groupes microbiens et de bactéries cellulolytiques

Les résultats de quantification des bactéries totales, archées méthanogènes, protozoaires, champignons et des espèces de bactéries cellulolytiques par qPCR indiquent que,

globalement, l'abondance de ces communautés n'a pas été significativement modifiée par les différents additifs (Tableau 36). L'abondance de *Ruminococcus flavefaciens* a néanmoins eu tendance à être augmentée en présence d'huile de cameline ($P < 0,1$).

Tableau 36 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures (A ou B) ou d'huile de cameline (CO) sur l'abondance des grands groupes microbiens ruminiaux (exprimée en log copies/μg d'ADN) et de bactéries fibrolytiques, déterminée par PCR quantitative. SEM, erreur standard à la moyenne ; ns, non significatif ($P > 0,05$) ; +, $P \leq 0,1$.

	Traitement				SEM	P-value
	Contrôle	Levure A	Levure B	CO		
Bactéries totales	10,08	10,13	10,16	10,13	0,032	ns
Archées méthanogènes	7,27	7,35	7,30	7,30	0,034	ns
Protozoaires (avant repas)	7,63	7,59	7,60	7,42	0,083	ns
Protozoaires (4 h après repas)	7,50	7,48	7,52	7,43	0,042	ns
Champignons	6,10	6,07	5,98	6,02	0,056	ns
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	7,64	7,58	7,77	7,61	0,071	ns
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	6,50	6,34	6,47	6,75	0,100	+ (NC vs CO)

III.4.2. Effets des traitements sur la diversité et l'abondance relative des bactéries

Les indices de diversité des bactéries varient peu en fonction des traitements appliqués aux animaux. La seule différence significative observée concerne l'indice de diversité de Simpson qui est augmenté en présence d'huile de cameline ($P < 0,05$) par rapport au contrôle (Figure 37), suggérant une légère perte de diversité en présence d'huile.

Tableau 37 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures ou d'huile de cameline sur la diversité des bactéries. CO, huile de cameline ; NC, contrôle. **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$; +, $P < 0,1$; ns, non significatif.

	Traitement				SEM	P-value		
	Contrôle	Levure A	Levure B	CO		NC vs CO	NC vs P1	NC vs P2
Nombre d'OTUs	10828	10938	10372	10696	124	ns	ns	ns
Chao1	39838	41608	36083	40214	858	ns	ns	ns
Shannon	6,93	6,90	6,85	6,81	0,02	ns	ns	ns
Simpson	0,0044	0,0046	0,0050	0,0056	0,0001	*	ns	ns

Peu de modifications des abondances relatives ont été observées avec les additifs alimentaires, ce qui corrèle avec l'analyse en composantes principales qui montre qu'il n'est pas possible de discriminer les échantillons en fonction des régimes (Figure 45).

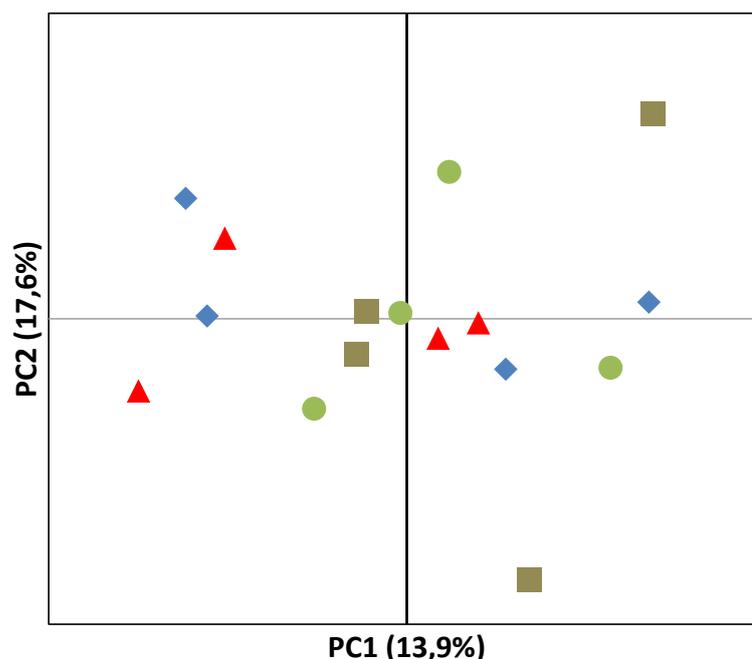


Figure 45 – Analyse en composantes principales des séquences de bactéries des 16 échantillons ruminants analysés. La couleur des formes fait référence aux traitements : contrôle (bleu), levure A (rouge), levure B (brun) et huile de cameline (vert).

Les différents traitements ont toujours été comparés au régime contrôle (Tableau 38). La supplémentation en levure A a conduit à une tendance à la diminution des Alphaproteobacteria ($P < 0,1$) tandis que la supplémentation en levure B a entraîné une tendance à l'augmentation des Fibrobactères ($P < 0,1$), constitués uniquement du genre *Fibrobacter* pour lequel la même tendance a été observée. L'huile de cameline a particulièrement influencé les bactéries du phylum des Proteobacteria. L'abondance relative des Deltaproteobacteria a été diminuée ($P < 0,01$) et est accompagnée d'une diminution de la famille des *Bdellovibrionaceae* ($P < 0,01$) et des Deltaproteobacteria non classées ($P < 0,1$). A l'inverse, les Gammaproteobacteria et les Gammaproteobacteria non classées ont été augmentées ($P < 0,05$). Toutefois, une tendance à la diminution des *Enterobacteriaceae* (classe des Gammaproteobacteria) a pu aussi être observée ($P < 0,1$). L'huile de cameline a également modifié l'abondance de bactéries appartenant aux phyla des Bacteroidetes et des Firmicutes, mais uniquement avec une tendance ($P < 0,1$). Au niveau du phylum des Bacteroidetes, les abondances relatives des Bacteroidetes non classées, des Sphingobacterales non classées et des *Porphyromonadaceae* non classées ont ainsi été diminuées tandis que celles des *Prevotellaceae* et du genre *Prevotella* ont été augmentées. Au niveau du phylum des Firmicutes, les *Ruminococcaceae* non classées ont été diminuées.

III.4.3. Effets des traitements sur la diversité et l'abondance relative des archées

Les indices de diversité des archées n'ont pas été modifiés ($P > 0,05$) par les différents additifs (Tableau 39).

Tableau 39 – Effets de la supplémentation de deux souches de levures ou d'huile de cameline sur la diversité des archées. CO, huile de cameline ; NC, contrôle. **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$; +, $P < 0,1$; ns, non significatif.

	Traitement				SEM	P-value		
	Contrôle	Levure A	Levure B	CO		NC vs CO	NC vs P1	NC vs P2
Nombre d'OTUs	86	82	81	83	3	ns	ns	ns
Chao1	255	237	236	272	21	ns	ns	ns
Shannon	0,20	0,23	0,19	0,19	0,01	ns	ns	ns
Simpson	2,02	1,93	2,04	2,06	0,05	ns	ns	ns

Par ailleurs, comme pour les bactéries, l'analyse en composantes principales n'a pas permis de discriminer les échantillons selon les régimes (données non montrées). Les levures n'ont pas influencé les abondances relatives des archées. L'huile de cameline a seulement eu tendance à augmenter l'abondance des Terrestrial Miscellaneous non classées (Thermoplasmatales) comparée au traitement contrôle (4,4% vs 10,20%, SEM \pm 1,07, $P < 0,1$).

Tableau 38 – Effets des traitements sur l’abondance des bactéries à différents niveaux taxonomiques. CO, huile de cameline ; NC, contrôle. **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$; +, $P < 0,1$; ns, non significatif ($P > 0,05$).

	Traitement				SEM	<i>P-value</i>		
	Contrôle	Levure A	Levure B	CO		NC vs CO	NC vs P1	NC vs P2
Phylum Proteobacteria								
Classe Deltaproteobacteria	0,66	0,57	0,60	0,44	0,03	**	ns	ns
Ordre Unclassified	0,18	0,16	0,17	0,12	0,02	+	ns	ns
Ordre Bdellovibrionales	0,16	0,11	0,14	0,05	0,02	**	ns	ns
Famille <i>Bdellovibrionaceae</i>	0,16	0,11	0,14	0,05	0,02	**	ns	ns
Classe Gammaproteobacteria	2,26	1,67	2,28	4,00	0,30	*	ns	ns
Ordre Unclassified	1,61	1,20	1,81	3,42	0,30	**	ns	ns
Ordre Enterobacteriales	0,15	0,12	0,10	0,09	0,01	+	ns	ns
Famille <i>Enterobacteriaceae</i>	0,15	0,12	0,10	0,09	0,01	+	ns	ns
Genre <i>Escherichia-Shigella</i>	0,15	0,12	0,10	0,08	0,01	+	ns	ns
Classe Alphaproteobacteria	0,61	0,43	0,51	0,52	0,04	ns	+	ns
Ordre Unclassified	0,50	0,35	0,44	0,42	0,03	ns	+	ns
Phylum des Fibrobacteres	4,66	4,38	6,57	4,91	0,36	ns	ns	+
Phylum des Bacteroidetes								
Unclassified	7,32	6,73	6,91	6,00	0,19	+	ns	ns
Classe des Bacteroidia								
<i>Prevotellaceae</i>	14,60	16,23	16,50	18,20	0,66	+	ns	ns
<i>Prevotella</i>	11,69	13,17	13,40	15,05	0,57	+	ns	ns
<i>Porphyromonadaceae</i>								
Unclassified	2,99	2,65	2,24	2,11	0,16	+	ns	ns
Classe des Sphingobacteria								
Sphingobacteriales	1,97	2,10	1,72	1,36	0,11	+	ns	ns
Unclassified	1,15	1,08	1,14	0,94	0,05	+	ns	ns
Phylum des Firmicutes								
Clostridia/Clostridiales/ <i>Ruminococcaceae</i> /Unclassified	5,70	5,50	4,37	4,32	0,27	+	ns	ns

III.5. ÉTUDE FONCTIONNELLE DU MICROBIOTE RUMINAL ET APPLICATION DE LA BIOPUCE ADN

Afin de s’assurer des potentialités de la biopuce ADN fonctionnelle pour son application à des expérimentations animales, les ARN du contenu ruminal de l’animal ayant reçu le régime « contrôle » en période 1 a été hybridé. Les conditions optimisées déterminées dans le Chapitre 2 ont été utilisées pour l’hybridation et l’analyse des données.

Les deux types de sondes ont permis de détecter l’expression des gènes des 8 familles d’enzymes ciblées (Tableau 38). Les familles GH43, GH5 et GH10 constituent les 2/3 des gènes exprimés détectés avec les sondes GoArrays tandis que la répartition des familles est homogène avec les sondes 25 mers. Les sondes GoArrays, comme précédemment observé, ont montré une meilleure sensibilité en permettant la détection de l’expression de 295 gènes ou groupes de gènes (correspondant à 85% des gènes ciblés) alors que les sondes 25 mers ont détecté l’expression de 38 gènes ou groupes de gènes (correspondant à 11% des gènes ciblés). Notons que les gènes exprimés identifiés avec les sondes 25 mers le sont aussi avec les sondes GoArrays.

Tableau 38 – Nombre de gènes exprimés détectés avec les sondes GoArrays et les sondes 25 mers et nombre de gènes ciblés par la biopuce pour chaque famille ciblée.

	Nombre de gènes ou groupes de gènes ciblés	Nombre de gènes détectés	
		Sondes GoArrays	Sondes 25 mers
CE1	29	28	7
CE6	11	7	3
GH5	70	65	4
GH9	28	27	3
GH10	64	40	6
GH11	23	20	3
GH43	111	97	10
GH48	12	11	2
Total	348	295	38

Etant donné que nous avons montré au cours de la validation de la biopuce ADN, la capacité des sondes GoArrays à détecter les variants de séquences de gènes de souches qui ont servi à la détermination des sondes, par la suite nous prendrons la précaution de parler d’espèce plutôt que de souche. De plus, des transferts horizontaux sont possibles entre

microorganismes (Aminov, 2011 ; Ricard *et al.*, 2006 ; Garcia-Vallvé *et al.*, 2000). Dans le doute, nous assimilerons une espèce à un groupe fonctionnel.

L'expression de 33 gènes de 19 espèces de bactéries, 2 de protozoaires et 3 de champignons a été détectée avec les sondes 25 mers. Les gènes reliés aux espèces bactériennes *Bacteroides thetaiotaomicron* (5), *Cellulomonas fimi* (4), *Bacteroides fragilis* (3) et *Cellulomonas flavigena* (3) sont les plus nombreux à avoir été détecté comme étant exprimé (Figure 46). L'expression de gènes des trois bactéries fibrolytiques ruminales les plus étudiées, *Fibrobacter succinogenes* (3), *Ruminococcus flavefaciens* (1) et *Ruminococcus albus* (1), a également été détectée. Concernant les champignons, des gènes de *Neocallimastix sp.*, *Piromyces sp.* et *Piromyces communis* ont été identifiés, comme des gènes des protozoaires *Epidinium ecaudatum* et *E. caudatum*.

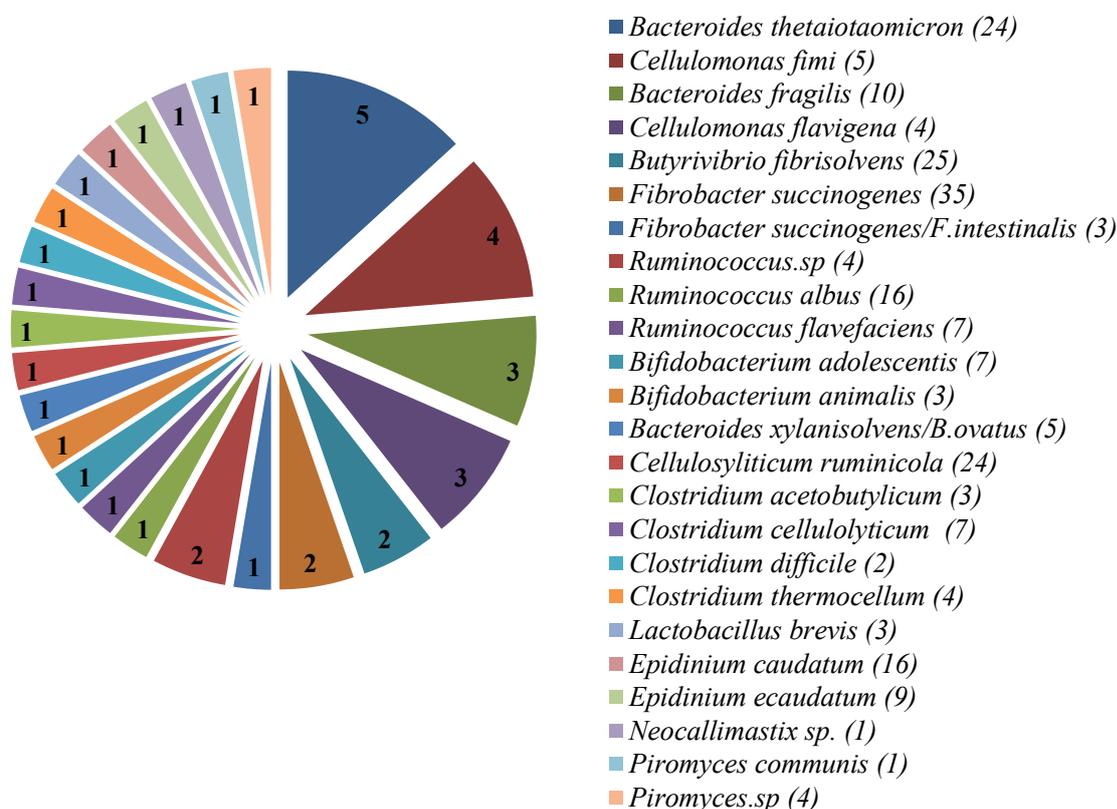


Figure 46 - Répartition des gènes exprimés détectés comme étant exprimés avec les sondes 25 mers à partir d'ARN de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement. Les chiffres dans les secteurs indiquent le nombre de gènes détectés pour chaque espèce de microorganismes. Le nombre de gènes ciblés pour chaque espèce apparaît entre parenthèse.

Pour les 2/3 des gènes, le SNR des sondes 25 mers est compris entre 2 et 3, et le 1/3 restant présente un SNR compris entre 3 et 8, à l'exception des gènes codant une GH43 (AAO78200)

de *Bacteroides thetaiotaomicron* et une CE1 (CAA90271) de *Ruminococcus sp.* détectés respectivement avec des SNR de 137 et 270.

Les sondes GoArrays ont quant à elles permis de détecter l'expression des gènes de la quasi-totalité des microorganismes ciblés (42/44 espèces bactériennes, 4/4 espèces de protozoaires, 9/9 espèces de champignons, 1/1 espèce d'archée). Pour les bactéries, *Fibrobacter succinogenes* (35), *Bacteroides thetaiotaomicron* (24), *Cellulosilyticum ruminicola* (24), *Bacteroides xylanisolvens* (17), *Butyrivibrio fibrisolvens* (25) et *Ruminococcus albus* (16) sont les espèces présentant le plus de gènes exprimés (Figure 47) et ont été détectés avec des valeurs de SNR de 2 à 235. Il faut toutefois noter que ce sont les espèces qui portaient le plus grand nombre de gènes ciblés par la biopuce ADN.

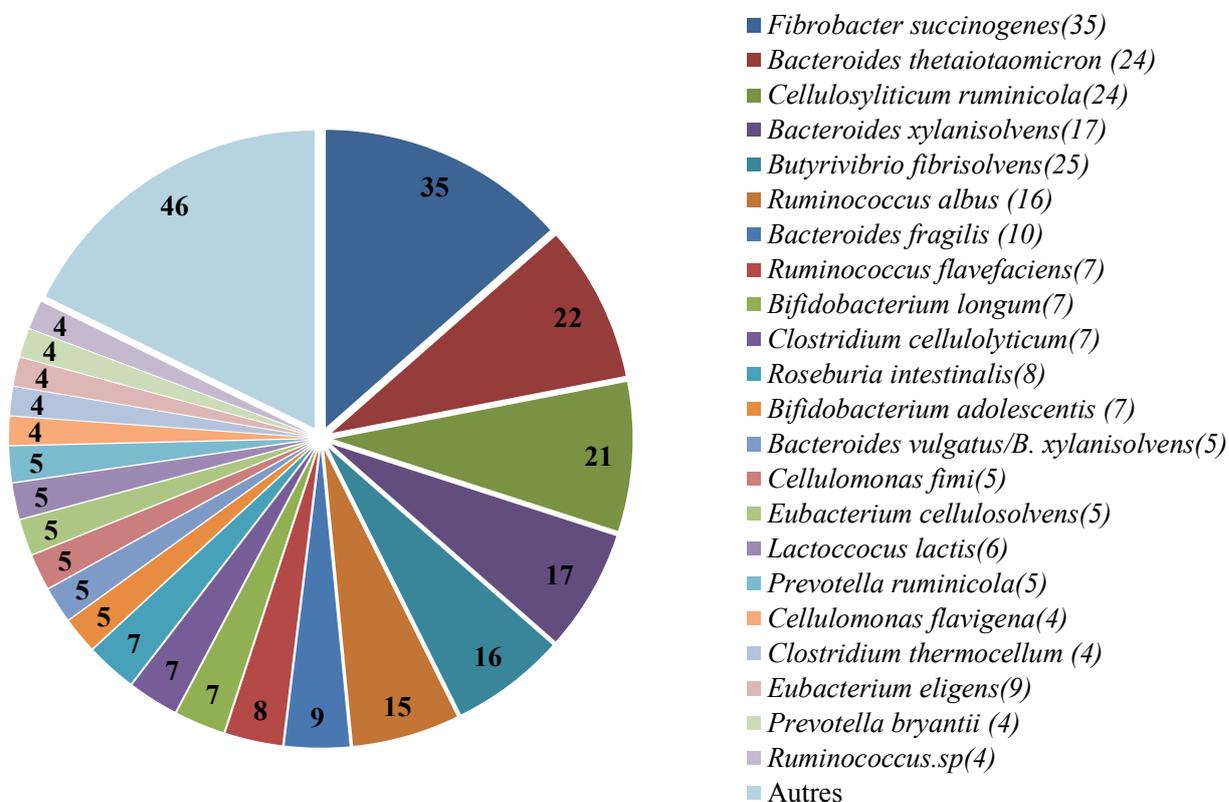


Figure 47 – Nombre de gènes de bactéries exprimés détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays à partir de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement. Les chiffres dans les secteurs indiquent le nombre de gènes détectés pour chaque espèce de microorganismes. Le nombre de gènes ciblés pour chaque espèce apparaît entre parenthèse.

Pour les champignons, les gènes exprimés reliés à *Piromyces sp.* (4), *Neocallimastix patriciarum* (2), *Piromyces equi* (2) et *Piromyces sp.* M4 (2) sont les plus nombreux à avoir été détectés (Figure 48), avec des valeurs de SNR des gènes s'étendant de 2 à 308. Ici encore,

ce nombre est à considérer en tenant compte du potentiel de détection de la biopuce ADN. En effet, ce sont ces espèces qui portent le plus grand nombre de gènes pouvant être détectés par la biopuce ADN.

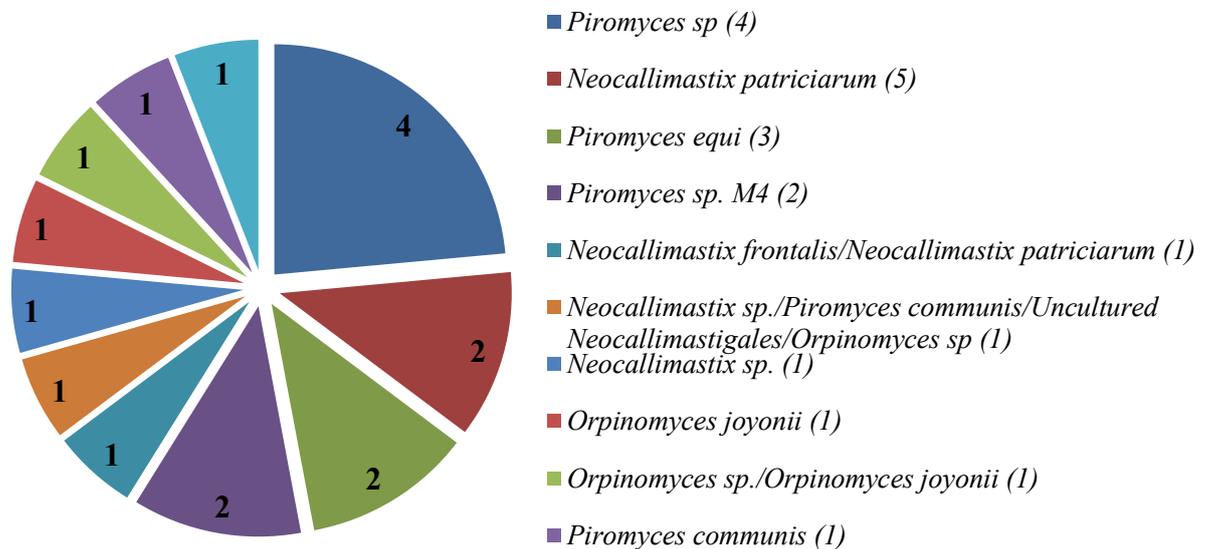


Figure 48 – Nombre de gènes de champignons détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays à partir de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement. Les chiffres dans les secteurs indiquent le nombre de gènes détectés pour chaque espèce de microorganismes. Le nombre de gènes ciblés pour chaque espèce apparaît entre parenthèse.

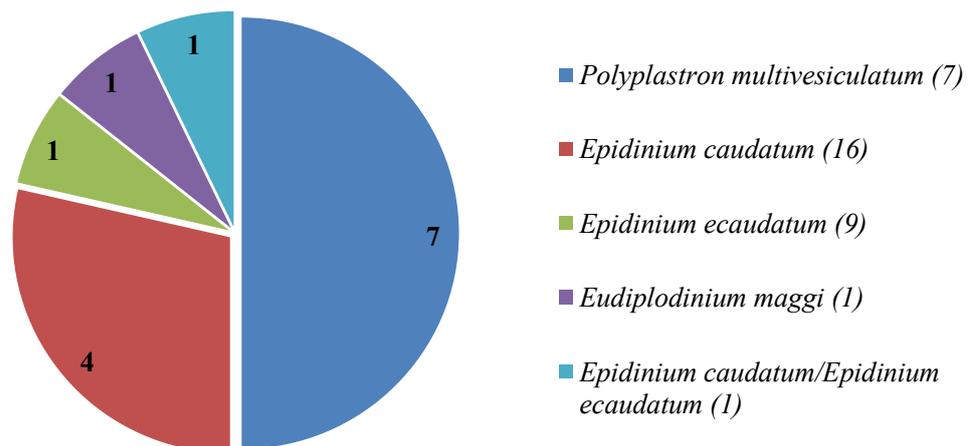


Figure 49 – Nombre de gènes de protozoaires détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays à partir de contenu ruminal en fonction des microorganismes qui les portent potentiellement. Les chiffres dans les secteurs indiquent le nombre de gènes détectés pour chaque espèce de microorganismes. Le nombre de gènes ciblés pour chaque espèce apparaît entre parenthèse.

Concernant les protozoaires, les gènes des espèces *Polyplastron multivesiculatum* (7) et *Epidinium caudatum* (4) sont les plus fréquents à avoir été détectés comme étant exprimés (Figure 49) avec des valeurs de SNR allant de 2 à 37.

Durant les étapes de validation, la valeur du SNR des sondes GoArrays était corrélée avec la quantité de cible hybridée (pour les gènes ciblés avec au moins 4 sondes), ce qui indiquait, qu'outre la détection qualitative de l'expression des gènes (présence/absence), la biopuce nous permet également d'avoir une information quantitative de cette expression (voir Chapitre 2). Les valeurs de SNR des gènes détectés comme étant exprimés varient de 2 à 308, et les 2/3 des gènes présentent un SNR compris entre 2 et 5 (Figure 50). Il semble donc que la plupart des transcrits des gènes ciblés soient présents en nombre de copies réduit et seuls quelques gènes semblent fortement exprimés dans les conditions de l'étude.

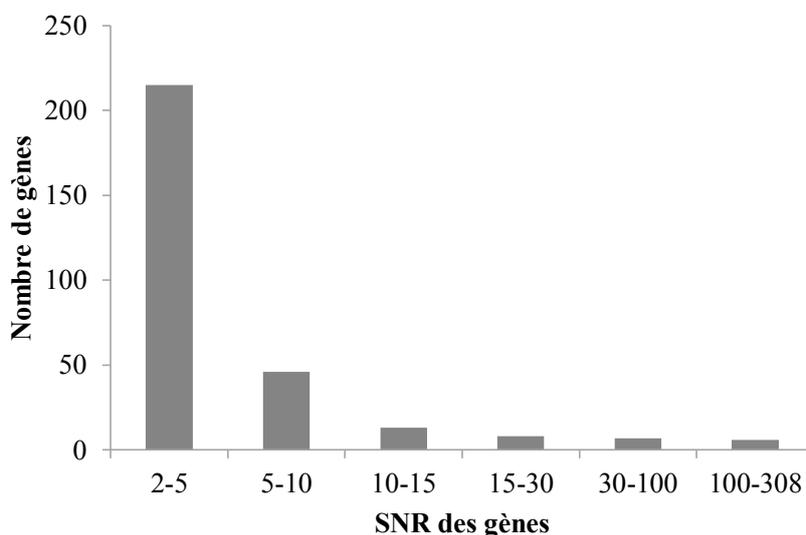


Figure 50 – Répartition des valeurs de SNR des gènes détectés comme étant exprimés avec les sondes GoArrays.

En ne considérant que les gènes plus exprimés ayant des SNR supérieurs à 20 et détectés par au moins 4 sondes, la biopuce ADN identifie 15 gènes fortement exprimés sur 348 pouvant être potentiellement détectés (Tableau 39). D'une manière générale, les gènes des eucaryotes (champignons et protozoaires) ont présenté des SNR élevés, ce qui n'était pas forcément attendu du fait de leur faible abondance dans le rumen par rapport aux bactéries. Le gène GH11 (AAG18439) de *Piromyces communis*, présentant le plus fort SNR, a d'ailleurs été recherché par RT-PCR et nous avons pu identifier un variant de séquences (voir Chapitre 2), confirmant la détection. Les gènes de champignons les plus exprimés codent des cellulases (GH5) et des enzymes xylanolytiques (GH10, GH11, CE1 et CE6) tandis qu'un seul gène de

protozoaires codant une cellulase GH5 a été détecté comme fortement exprimé avec un SNR supérieur à 20. Concernant les gènes fortement exprimés des bactéries, ils appartiennent aux familles CE1, GH10 et GH43 (enzymes xylanolytiques), et GH9 (cellulase). Ils sont portés par des bactéries fibrolytiques déjà décrites dans le rumen (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus sp.*, *Cellulosilyticum ruminicola*), des espèces fibrolytiques non encore décrites dans le rumen (*Bacteroides xylanisolvens*, *B. thetaiotaomicron*) et d'espèces capables de dégrader des oligosaccharides (*Lactococcus cremoris* et *Lactococcus lactis* ciblées conjointement, *Bifidobacterium animalis*).

Tableau 39 – Gènes exprimés détectés avec les SNR les plus élevés. Pour chaque gène, sont indiqués le microorganisme porteur du gène (C, champignon ; P, protozoaire ; B, bactérie), la famille CAZy correspondante, le numéro d'accèsion de la protéine, le nombre de sondes ayant répondu par rapport aux nombres de sondes ciblant ce gène.

Microorganismes	Famille CAZy	Numéro d'accèsion protéique	Sondes positives	SNR du gène
<i>Piromyces communis</i> (C)	GH11	AAG18439	6/6	308
<i>Orpinomyces sp.</i> (C)	CE6	AAC14690	11/14	280
<i>Ruminococcus sp.</i> (B)	CE1	CAA90271	10/10	275
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> (B)	GH10	CBH32823	4/4	235
<i>Piromyces rhizinflata</i> (C)	GH5	AAD43818	4/6	204
<i>Fibrobacter succinogenes</i> (B)	GH9	ACX75948	5/5	114
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (B)	GH43	AAO79257	11/11	71
<i>Piromyces sp.</i> (C)	CE1	AAP30751	6/6	56
<i>Lactococcus cremoris</i> / <i>Lactococcus lactis</i> (B)	CE1	AAM90699 CAL98521 ABJ73424 BAB69464 AAF02201	9/9	53
<i>Neocallimastix patriciarum</i> (C)	GH10	AAB30669	5/6	50
<i>Epidinium ecaudatum</i> (P)	GH5	CAL91971	7/10	37
<i>Bacteroides xylanisolvens</i> (B)	GH43		10/12	26
<i>Bacteroides fragilis</i> (B)	GH43	CR626927	10/11	23
<i>Cellulosilyticum ruminicola</i> (B)	CE1	ACZ98598	9/10	22
<i>Bifidobacterium animalis</i> (B)	GH43	ACL2933 ACS47462 ADC85545 ADG33085	11/11	22

Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux gènes des trois espèces étant considérées comme les espèces fibrolytiques majeures du rumen, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*, la biopuce révèle une expression de la quasi-totalité des gènes ciblés avec respectivement 35 sur 35, 15 sur 16 et 7 sur 8 gènes exprimés. Globalement, les gènes détectés présentent des SNR plutôt bas (Tableau 40 et Figure 50) témoignant d'une expression modérée. Notons que les gènes de l'espèce *Fibrobacter succinogenes* présentent des SNR en général supérieurs à ceux des deux autres espèces, pouvant indiquer que ces gènes sont davantage exprimés, notamment pour la GH9 (ACX75948) détectée avec un SNR de 114. Toutefois, il est nécessaire de rester prudent sur cette interprétation car les SNR des gènes sont proches les uns des autres, et il serait nécessaire de confirmer ce résultat par RT-qPCR.

Tableau 40 – Gènes de *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *R. albus* détectés comme étant exprimés avec le biopuce ADN. Les gènes sont classés par SNR décroissant et dénommés par le numéro d'accèsion de la protéine. Pour *F. succinogenes*, seuls les 11 premiers gènes sont indiqués. Les gènes indiqués en gras ont été rerouvés sur-exprimés en condition paille de blé dans notre étude *in vitro*.

<i>F. succinogenes</i>		<i>R. flavefaciens</i>		<i>R. albus</i>	
Gènes détectés	SNR	Gènes détectés	SNR	Gènes détectés	SNR
ACX75948 (GH9)	114,4	CAA77476 (GH10)	6,2	AAA26467 (GH5)	7,3
AAG02561 (GH10)	13,7	CAA77476 (GH10)	4,0	CAS03458 (GH9)	7,0
AAG36766 (CE6)	12,6	CAB93667 (CE1)	3,9	AAT48117 (GH5)	6,0
AAA92980 (GH5)	11,0	CAB05881 (GH5)	3,9	AAA26469 (GH5)	5,2
AAC44386 (GH9)	10,9	CAA36207 (GH5)	3,6	AAT48119 (GH11)	4,7
ACX76458 (GH9)	9,8	CAB93667 (GH11))	2,7	CAS03459 (GH48)	4,4
ABU45500 (GH5)	7,7	AAB26620 (GH11)	2,6	BAB39493 (CE1)	3,6
ACX75360 (CE6)	7,4	AAA17731 (GH9)	2,2	BAA92146 (GH5)	3,5
ACX74396 (GH5)	7,1			AAT48118 (GH9)	3,4
ACX74006 (GH9)	5,9			CAA38692 (GH5)	3,3
ACX74827 (GH5)	5,3			CAA38692 (GH5)	3,3

IV. DISCUSSION

IV.1. COMMUNAUTES MICROBIENNES DU RUMEN

IV.1.1. Groupes microbiens quantifiés par qPCR

Les grands groupes microbiens ruminiaux ont été quantifiés par qPCR. Sur l'ensemble des animaux, les bactéries totales et les archées méthanogènes ont été dénombrées à $1,4 \pm 0,3 \times 10^{10}$ et $2,1 \pm 0,8 \times 10^7$ copies/ μg d'ADN respectivement tandis que les abondances des eucaryotes, protozoaires et champignons, ont été déterminées à $3,9 \pm 1,7 \times 10^7$ et $1,2 \pm 0,5 \times 10^6$ copies/ μg d'ADN. Les bactéries cellulolytiques, *Fibrobacter succinogenes* et *Ruminococcus flavefaciens*, ont été retrouvées en moyenne à $4,8 \pm 1,7 \cdot 10^7$ et $3,8 \pm 0,2 \cdot 10^6$ copies/ μg d'ADN, et représentent ainsi 0,3% et 0,03% des bactéries totales estimées, correspondant à des proportions déjà retrouvées dans la littérature (Martin *et al.*, 2013).

IV.1.2. Diversité et structure du microbiote ruminal

IV.1.2.1 Richesse et diversité du microbiote ruminal

Le séquençage haut débit de l'ADNr 16S représente une approche de choix pour étudier la diversité de communautés microbiennes complexes en permettant d'accéder à des niveaux d'information plus fins que les méthodes d'écologie moléculaire classiques. Dans cette étude, la composition moyenne en bactéries et archées de 16 échantillons ruminiaux a été analysée. Un très grand nombre d'OTUs (définies comme un cluster de séquences présentant au moins 97% d'identité) ont été déterminées sur l'ensemble des échantillons, avec une moyenne de 10708 OTUs bactériennes et 83 OTUs archéennes par échantillon, qui témoigne d'une extrême diversité du microbiote ruminal. D'autres études ont pu identifier jusqu'à 2400 OTUs bactériennes par échantillon (Fouts *et al.*, 2012 ; Jami et Mizrahi, 2012) avec des profondeurs de séquençage allant de 5000 à 10000 séquences par échantillon. Fouts *et al.* (2012) ont identifié entre 21 et 40 OTUs archéennes avec 1000 séquences par échantillon. Ici, la profondeur de séquençage beaucoup plus poussée permet d'expliquer ce nombre élevé d'OTUs et montre que la diversité spécifique des communautés procaryotes du rumen n'est pas totalement appréhendée. En accord avec le nombre élevé d'OTUs retrouvés, l'indice de richesse atteint en moyenne 39435 espèces bactériennes et reste plus élevé que dans les études précédentes. Zened *et al.* (2013) ont rapporté la détection moyenne de 2297 OTUs avec 7000

séquences par échantillon de contenu ruminal et un indice de diversité de Shannon de 6,7 en moyenne, qui est ainsi proche de notre étude (6,9 en moyenne). L'indice de diversité de Shannon est relativement indépendant de l'échantillonnage et ceci montre que les espèces bactériennes détectées dans les 2 études sont présentes dans des abondances plutôt comparables et que la diversité bactérienne est importante.

IV.1.2.2 La communauté bactérienne

Les séquences bactériennes ont été assignées à 18 phyla bactériens qui ont également été retrouvés dans des études par clonage-séquençage (étude compilative, Kim *et al.*, 2011) ou pyroséquençage (Lee *et al.*, 2012) de l'ADNr 16S. Les Firmicutes et les Bacteroidetes constituent les phyla majeurs du microbiote ruminal comme cela est observé dans tous les écosystèmes digestifs des Mammifères (Ley *et al.*, 2008). Ces phyla sont retrouvés avec un ratio Firmicutes/Bacteroidetes de 1,08. La nature de la ration influence en grande partie ce ratio (Callaway *et al.*, 2010 ; Fernando *et al.*, 2010 ; Khafipour *et al.*, 2009) mais il peut y avoir aussi un facteur animal (Jami *et al.*, 2014). Fernando *et al.* (2010) ont trouvé par clonage-séquençage un ratio de 1,49 et 0,89 pour des animaux recevant une ration riche en foin et en concentré respectivement. Jami *et al.* ont trouvé par pyroséquençage de l'ADNr 16S des ratios allant de 0,20 à 2. Dans notre étude, les phyla des Firmicutes et des Bacteroidetes représentent en moyenne à eux deux 72,8% des séquences, ce qui apparaît relativement faible en regard de la plupart des études où ils constituent environ 90% des séquences (Zened *et al.*, 2013 ; Jami et Mizrahi, 2012). Le pourcentage des deux phyla majeurs est minoré entre autres par une contribution majorée de bactéries à Gram négatif appartenant aux phyla des Verrucomicrobia (4,3%) et des Spirochaetes (2,9%). Divers facteurs expérimentaux (site de prélèvement, méthode d'extraction des ADN, région de l'ADNr 16S ciblée, amorces de séquençage, stockage des échantillons, etc...) (Martin *et al.*, 1999 ; Fliegerova *et al.*, 2013 ; Soergel *et al.*, 2012 ; Ó Cuív *et al.*, 2011) autres que le facteur animal ou régime (Jami *et al.*, 2014 ; Khafipour *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2013) pourraient expliquer ces différences. Certaines bactéries, telles que les Bacteroidetes et plus généralement les bactéries à Gram négatif, apparaissent plus sensibles à la congélation et des modifications de la représentation des phyla bactériens après simple congélation d'échantillons de fèces ont été observées (Bahl *et al.*, 2012). Ce mode de conservation est le plus fréquemment utilisé dans les études taxonomiques du rumen. Nechvatal *et al.* (2008) ont détecté plus de *Bacteroides* dans des

échantillons d'ADN issus de fecès préservés en RNAlater en comparaison d'échantillons immédiatement congelés dans l'azote liquide, indiquant que cette solution de stabilisation des ARN pourrait avoir un effet protecteur sur ces bactéries. De plus, le RNAlater pourrait également avoir permis de récupérer les cellules les plus fragiles pendant l'étape de centrifugation préalable à l'extraction des ADN. Cependant, l'effet du RNAlater n'a pas été évalué sur d'autres phyla bactériens. Il serait nécessaire de faire une étude comparative d'échantillons congelés en absence ou en présence de RNAlater afin de confirmer cette hypothèse.

De manière comparable aux études de Zened *et al.* (2013) et Kittelmann *et al.* (2013), les *Prevotellaceae*, les *Ruminococcaceae*, les *Lachnospiraceae* et les Clostridiales non classées sont les familles identifiées comme prépondérantes dans cette étude.

Bien que la longueur des séquences n'ait pas permis d'aboutir à leur assignation au niveau de l'espèce, près de 320 genres ont pu être identifiés. La dominance du genre *Prevotella* et les abondances significatives des genres *Treponema*, *Succinivibrax* et *Ruminococcus* sont aussi généralement observées au sein de l'écosystème ruminal (Pitta *et al.*, 2010 ; de Menezes *et al.*, 2011 ; Fouts *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2012). Par contre, le genre *Rikenella*, qui a pu être retrouvé abondant dans les études de Pitta *et al.* (2010) et Zened *et al.* (2013) semble constituer un genre mineur dans notre étude. Enfin, près d'un tiers des genres sont des « non classés » dont certains constituent des genres prédominants.

Le genre *Fibrobacter* est constitué des espèces cultivées *F. succinogenes* et *F. intestinalis* dont tous les représentants isolés sont fibrolytiques (Béra-Maillet *et al.*, 2004 ; Ransom-Jones *et al.*, 2012). La prédominance de *Fibrobacter succinogenes* au sein des communautés bactériennes fibrolytiques du rumen, a été montrée dans de nombreuses études (Michalet-Doreau *et al.*, 2001 ; Mosoni *et al.*, 2011 ; Kobayashi *et al.*, 2008). *Fibrobacter* est ici le deuxième genre le plus abondant et représente 5,2% des séquences alors qu'il constitue un composant mineur du microbiote ruminal des études de Pitta *et al.* (2010) et Callaway *et al.* (2010) qui ont été réalisées sur la fraction liquide ruminale. Dans l'étude de Menezes *et al.* (2011), la part de *Fibrobacter* atteint 10% des séquences dans la fraction solide de contenus ruminiaux. La majorité des bactéries fibrolytiques sont retrouvées attachées aux fibres végétales (Koike *et al.*, 2003b). Ici, l'extraction d'ADN a été réalisée sur le contenu total, pouvant expliquer la valeur intermédiaire observée.

IV.1.2.3 La communauté archéenne

Les séquences archées représentent ici en moyenne 5% des séquences totales. La très bonne couverture observée pour les archées nous indique que notre stratégie de séquençage profond a permis d'obtenir assez de séquences archées, amplifiées simultanément avec celles des bactéries, pour analyser leur diversité. Dans notre approche qPCR, les archées ont été quantifiées en moyenne à 1,5% des bactéries détectées. Toutefois, les amorces qPCR ne ciblent que les archées méthanogènes appartenant aux genres *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* et *Methanobacterium* (Ohene-Adjei *et al.*, 2007) et implique qu'une partie de la diversité archéenne n'est probablement pas prise en compte avec ces amorces.

La communauté archéenne est composée uniquement d'Euryarcheota dominées par le genre *Methanobrevibacter* (classe des Methanobacteria) également prépondérant dans d'autres études basées sur le clonage-séquençage (Janssen et Kirs, 2008) ou le pyroséquençage (Kittelman *et al.*, 2013) de l'ADNr16S. Le deuxième taxon le plus abondant est le groupe VadinCA11_gut et représente 35,9% des séquences. Le groupe Vadin (vinasses anaerobic digester of Narbonne) a été pour la première fois identifié dans des digesteurs anaérobies (Godon *et al.*, 1997) et des séquences proches regroupées dans le sous-groupe VadinCA11_gut ont été retrouvées dans le tube digestif de Mammifères. Le groupe Vadin est proche phylogénétiquement du Rumen Cluster C (RCC) retrouvé dans le rumen, et sont tous deux rattachés au 7^{ème} ordre des archées, les Methanomassiliicoccales, proche des Thermoplasmatales (Paul *et al.*, 2012 ; Borrel *et al.*, 2013). Dans les études de Janssen et Kirs (2008) et Kittelman *et al.* (2013), le Rumen Cluster C (RCC) représentait 16 et 18% des séquences, respectivement. Dans d'autres études (Wright *et al.*, 2006, 2007), le groupe RCC a été retrouvée dominant. La base de données SILVA utilisée dans notre étude pour l'assignation taxonomique des séquences archées ne comprend pas le groupe RCC, ce qui explique qu'il n'ait pas été retrouvé. Kittelman *et al.* (2013) ont utilisé les séquences de Janssen et Kirs (2008) pour assigner les séquences archées tandis que Wright *et al.* (2006, 2007) ont utilisé diverses séquences issues de clonage-séquençage. Rey (2012) a également utilisé la base de données SILVA et a retrouvé le groupe VadinCA11_gut à hauteur de 7% des séquences archées chez le veau. L'assignation taxonomique des séquences dépend ainsi des séquences de référence disponibles. Enfin, *Methanosphaera*, le troisième genre prépondérant (9%) a été retrouvé dans les mêmes abondances relatives que précédemment rapporté (Kittelman *et al.*, 2013).

IV.2. EFFET DES TRAITEMENTS SUR LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES RUMINALES

L'abondance des bactéries, des archées méthanogènes, des champignons et des protozoaires, mesurée par qPCR n'a pas été significativement influencée par les différents additifs testés dans cette étude, exceptée une tendance à l'augmentation de l'abondance de *Ruminococcus flavefaciens* avec l'huile de cameline. Des effets également relativement limités sur la composition et la diversité des communautés bactérienne et archéenne ruminales ont été observés avec l'analyse par séquençage haut-débit de l'ADNr16S.

IV.2.1. Effets des levures vivantes sur les communautés microbiennes ruminales

Les deux souches de levures vivantes semblent avoir agi de façon différente sur le microbiote ruminal, mais avec seulement des tendances qui corrélaient avec une modification non significative de la concentration des AGV (-1,4 et +4,5% pour les levures A et B respectivement) et une diminution numérique mais non significative du CH₄ ruminal (10,3 et 8,6% pour les levures A et B respectivement). Toutefois, les levures ont conduit à une diminution significative du CO₂ ruminal ($P < 0,05$). Il a été montré que l'effet des levures sur les fermentations ruminales, reflétant la structure et/ou l'activité du microbiote, peut être souche-dépendant (Newbold *et al.*, 1995). Pour une même souche, les concentrations distribuées par jour peuvent également influencer la réponse du microbiote ruminal et de son activité fermentaire (Guedes *et al.*, 2008 ; Pinloche *et al.*, 2013), et le maintien de cellules de levures métaboliquement actives au sein de l'écosystème ruminal, est indispensable à l'expression de ses mécanismes d'action (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). Le maintien de la viabilité des cellules de levures dans le rumen n'a pas été vérifié au cours de cette expérimentation, mais plusieurs travaux (Chaucheyras-Durand *et al.* 1998 et données non publiées) indiquent que les deux souches ont une bonne capacité de survie dans le milieu ruminal pendant plusieurs heures, ce qui est compatible avec des effets biologiques. L'effet des levures peut également dépendre de la nature de la ration (Guedes *et al.*, 2008 ; Lettat *et al.*, 2012b ; Chaucheyras-Durand, 2012). Comparée au contrôle, la souche B a entraîné une tendance à l'augmentation de l'abondance du genre *Fibrobacter*, observée avec les deux méthodes moléculaires, ce qui est en accord avec les effets promoteurs de la croissance de *Fibrobacter succinogenes* S85 observés *in vitro* avec cette souche et qui avaient motivé le choix de celle-ci pour cette étude (Lallemand, données non publiées). Une augmentation de

l'abondance du genre *Fibrobacter* (Pinloche *et al.*, 2013) et de l'espèce *F. succinogenes* en particulier (Mosoni *et al.* 2007) a également été retrouvée chez des animaux soumis à un régime acidogène. *F. succinogenes* est une bactérie fibrolytique qui ne produit pas d'hydrogène. Chez des agneaux gnotobiotiques inoculés avec *F. succinogenes* S85, comme seul microorganisme fibrolytique, la production de méthane a été réduite en comparaison d'agneaux inoculés avec des microorganismes fibrolytiques producteurs d'hydrogène (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010c). La promotion de cette espèce pourrait ainsi permettre de réduire la quantité d'hydrogène disponible pour la méthanogénèse et ceci semble en accord avec la diminution numérique de 10% des émissions de méthane chez les vaches ayant reçu la levure B. Toutefois, les effets sur l'abondance de *Fibrobacter* ne sont que numériques et d'autres mécanismes expliquant la diminution de méthane auraient pu être mis en jeu. Néanmoins, les amorces utilisées pour la qPCR ne ciblent pas tous les groupes de *Fibrobacter succinogenes*, et auraient pu introduire un biais dans la quantification de cette espèce (Mosoni *et al.*, 2007). D'autres études seraient nécessaires afin de confirmer le mode d'action de la levure B. Guedes *et al.* (2008) ont montré que la dégradation de la fraction NDF d'ensilages de maïs était stimulée par la présence d'une souche de *S. cerevisiae*, avec un effet plus marqué pour les ensilages les plus difficiles à dégrader (Guedes *et al.*, 2008), suggérant une abondance ou une activité accrues des bactéries et des champignons cellulolytiques colonisant les particules végétales, ce qui a été démontré par ailleurs (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012). Dans la présente étude, ni la digestibilité totale, ni la digestibilité de la fraction NDF de la ration n'ont été significativement affectées par les deux souches de levures. La ration basée sur de l'ensilage d'herbe, très digestible et n'entraînant pas de risque acidogène (pH du rumen compris entre 6,40 et 6,65), peut être la raison des effets modestes observés. Par ailleurs, il n'est pas exclu que le plan expérimental en carré latin 4×4 , choisi pour donner plus de robustesse aux données, associé à un temps de période de washout de 14 jours relativement court, ait entraîné un effet rémanent des traitements d'une période sur l'autre, comme cela a déjà pu être suggéré (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012 ; Martin *et al.*, 2006 ; Beauchemin *et al.*, 2003 ; Weimer *et al.*, 2010).

IV.2.2. Effets de l'huile de cameline sur les communautés microbiennes ruminales

Comparée au contrôle, l'huile de cameline, riche en acides gras insaturés, a conduit à une augmentation significative de l'indice de diversité de Simpson pour les bactéries. Cet indice,

compris entre 0 et 1, prend en compte à la fois la richesse spécifique et l'équitabilité des espèces. Plus le nombre d'espèces augmente, plus l'indice se rapproche de 0. La hausse de cet indice comme observé dans cette étude suggère ainsi une diminution de la diversité de la population ruminale associée à un remaniement des abondances des espèces. Kim *et al.* (2008) ont aussi observé que la supplémentation en huile de poisson diminuait le nombre de bandes de profils DGGE, et ceci a été attribué à un effet inhibiteur des acides gras insaturés sur les bactéries ruminales (Maia *et al.*, 2007).

Du fait de leur toxicité pour l'écosystème ruminal, les acides gras insaturés sont rapidement hydrogénés pour produire des acides gras saturés (voir Synthèse bibliographique, §I.4.2.2.). Des espèces de *Butyrivibrio sp.* (*B. proteoclasticus*, *B. fibrisolvens*, *B. hungatei*) et de *Pseudobutyrvibrio sp.* sont considérées comme les principaux responsables de ce processus de biohydrogénation (Maia *et al.*, 2010). D'autres espèces pourraient être impliquées dans la biohydrogénation, incluant des *Prevotella* et des *Lachnospiraceae incertae sedis* non cultivées ainsi que des Bacteroidales, Clostridiales et *Ruminococcaceae* non classées (Huws *et al.*, 2011). Dans cette étude, nos données issues du séquençage du gène codant l'ARNr16S n'indiquent pas que le genre *Butyrivibrio* ait été affecté par la supplémentation en huile de cameline. Par ailleurs, les abondances relatives des *Ruminococcaceae* non classées et des *Prevotella* tendaient à être respectivement diminuée et augmentée. La supplémentation de vaches en huile de poisson a pu conduire à une modification du profil des acides gras du lait associé à la diminution des abondances d'espèce de *Butyrivibrio sp.* (Shingfield *et al.*, 2012). Les modifications mineures des abondances relatives des différents acteurs de la biohydrogénation observées ici concordent avec les profils d'acides gras du lait peu altérés (Bayat *et al.*, 2014) et suggèrent que ce processus n'est pas fondamentalement altéré par l'apport d'huile de cameline.

L'effet de l'huile a essentiellement été marqué sur l'abondance relative des Proteobacteria. L'abondance des Deltaproteobacteria, dont la plupart des représentants sont des bactéries sulfato-réductrices hydrogénotrophes (Castro *et al.*, 2000), a été diminuée ($P < 0,01$). Ce groupe fonctionnel est par ailleurs connu pour avoir des potentialités de compétition vis-à-vis des archées méthanogènes. L'abondance des Gammaproteobacteria a été à l'inverse augmentée ($P < 0,05$) et ceci se caractérise particulièrement par une augmentation des Gammaproteobacteria non classées ($P < 0,01$).

La supplémentation en huile de cameline a conduit à une diminution de 29,5 et 34,3% de CH₄ et de CO₂ ruminiaux, respectivement. Cependant, cette diminution a été associée à une diminution de l'ingestion (-12%, Bayat *et al.*, 2014) et de la digestibilité totale de la ration (-

4,1%). Ainsi, il semble que la diminution de production de CH₄ et CO₂ mesurées soient en grande partie dues à la diminution de la quantité d'aliment ingéré et digéré en présence d'huile de cameline, comme cela est souvent observé lors de l'addition d'huile à la ration (Martin et al, 2008). La diminution nette de la production de CH₄ par kg de matière organique ingérée n'est en fait que de l'ordre de 5%, et donc faible. L'abondance et la diversité globale des archées n'ont pas été affectées par l'huile de cameline, bien que la production de méthane au niveau du rumen ait été diminuée de 29,5%. Il est probable que l'huile de cameline agisse en modulant l'activité des archées méthanogènes, et non leur nombre, comme suggéré pour d'autres sources de lipides additionnés à la ration de vaches laitières (Popova *et al.*, 2011). Une autre hypothèse est que l'huile ait inhibé des populations d'archées non ciblées par les amorces utilisées pour le séquençage et la PCR quantitative. Par ailleurs, l'augmentation des Gammaproteobacteria, dont certains représentants sont méthanotrophes (Murrell et Radajewski, 2000), pourrait également expliquer cette diminution. Il est établi que les acides gras insaturés ont un effet toxique sur les protozoaires (Ivan *et al.*, 2001) et les bactéries cellulolytiques (Martin *et al.*, 2008), ce qui peut conduire à une inhibition des archées méthanogènes du fait d'une disponibilité réduite en hydrogène. Ici, nos données de qPCR ne témoignent pas d'une plus faible abondance des protozoaires même s'il faut souligner une diminution numérique de près de 40% en comparaison du contrôle, ni des bactéries cellulolytiques ciblées. Une tendance à l'augmentation de l'abondance de *Ruminococcus flavefaciens* a plutôt été mesurée par qPCR, mais une tendance à la diminution de l'abondance relative des *Ruminococcaceae* non classées a été observée par séquençage. Dans une étude chez des vaches laitières, l'apport d'huile de lin n'avait eu aucun effet sur ces populations ruminales analysées dans des échantillons ruminiaux prélevés avant repas (Mosoni *et al.*, 2008). Toutefois, lorsque les échantillons avaient été prélevés 3 heures après repas, les concentrations de protozoaires avaient été diminuées par l'huile de lin sans affecter les bactéries cellulolytiques. Le temps de prélèvement peut donc apparaître comme un facteur important permettant la mise en évidence ou non de modifications dans la composition du microbiote ruminal. Disposant également d'échantillons prélevés 4 heures après repas, les protozoaires ont été quantifiés par qPCR. Aucune différence significative n'a été retrouvée, assurant que l'huile de cameline n'a pas d'effet sur cette population ruminale.

IV.3. INTERET DES ECHANTILLONS POUR LA VALIDATION DE LA BIOPUCE ADN

Les genres, incluant entre autres *Prevotella*, *Ruminococcus* et *Fibrobacter*, pour lesquels une activité fibrolytique est connue (voir Synthèse bibliographique, III.1.1.), constituent une part non négligeable du microbiote ruminal des animaux étudiés, ce qui suggère un rôle fonctionnel important au sein du microbiote, par ailleurs bien établi. On pouvait donc s'attendre à détecter, grâce à la biopuce, des gènes de bactéries appartenant à ces genres. Toutefois, les trois additifs alimentaires n'ont pas eu les effets escomptés sur l'abondance des microorganismes fibrolytiques (protozoaires et bactéries fibrolytiques) et la digestibilité totale de la ration. Seules des tendances à l'augmentation du genre *Fibrobacter* et de l'espèce *Ruminococcus flavefaciens* avec la levure B et l'huile, respectivement et une diminution numérique de 40% des protozoaires avec l'huile ont été observées suite à l'analyse par metabarcoding. L'abondance n'étant pas toujours reliée à l'activité (Torsvik et Øvreås, 2002), une approche métatranscriptomique reste d'intérêt, notamment pour confirmer les résultats de la biopuce et éventuellement détecter d'autres gènes qui pourraient être modulés par la présence des additifs alimentaires testés. Toutefois, dans le cadre de la validation de la biopuce sur des échantillons biologiques, de nouveaux échantillons présentant des différences d'abondance plus marquées et/ou une digestibilité totale de la ration significativement modifiée seraient plus appropriés.

IV.4. ÉTUDE FONCTIONNELLE DU MICROBIOTE RUMINAL ET APPLICATION DE LA BIOPUCE

Un grand nombre de gènes ciblés par la biopuce ont été détectés, ce qui confirme la sensibilité de l'outil développé et la possibilité de l'appliquer sur des échantillons biologiques complexes. La détection des 8 familles de GH et CE ciblées indique par ailleurs que ces gènes sont exprimés par le microbiote ruminal. Les gènes détectés appartiennent notamment aux espèces bactériennes fibrolytiques majeures du rumen comme *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* pour lesquelles la détection des gènes était particulièrement attendue du fait de leur forte implication dans le processus de fibrolyse (Krause *et al.*, 2003). Bien que les profils d'expression des gènes de ces bactéries apparaissent modérés, il faut cependant noter une forte expression d'un gène codant une GH9 (ACX75948, non caractérisée) de *Fibrobacter succinogenes* qui présente le 3^{ème} SNR le plus fort des gènes de bactéries (Tableau 39). Ce résultat suggère un rôle important de cette GH dans le processus

de fibrolyse. Pour cette bactérie, des gènes codant une GH10 (AAG02561, Xyn10E, xylanase), une CE6 (AAG36766, Axe6A, acétyl xylane estérase), une GH5 (AAA92980, Cel3, endoglucanase) et une GH9 (AAC44386, Cel9C, endoglucanase) sont également exprimés (SNR compris entre 5 et 13) à des niveaux relativement plus élevés que les autres gènes ciblés chez cette espèce (SNR compris entre 2 et 5). Notons que les gènes détectés comme surexprimés en contenu de rumen (Tableau 28) ont été identifiés dans la culture de *F. succinogenes* S85 sur paille (Chapitre 2, Figure 37 et Tableau 28) comme : significativement surexprimés (AAG02561, Xyn10E, xylanase), exprimés avec un log2 ratio proche de 2 (GH9 ACX75948 et ACX74006 ; CE6 AAG36766 et ACX75360), ou seulement détectés (GH9 AAC44386, GH5 ACX74396 et ACX74827). Par ailleurs, dans la seule autre étude transcriptomique *in vivo* concernant *F. succinogenes*, Béra-Maillet *et al.* (2009) avaient quantifié par RT-qPCR, sur des échantillons de rumen de mouton, l'expression de gènes de GH5, GH9, GH10 et GH11 de la souche S85. Parmi les 8 gènes ciblés, le gène codant la xylanase XynD était le plus exprimé, suivi par le gène *cel3*, codant une GH5. L'expression du gène *cel3* est détectée ici par la biopuce avec un SNR=11 (AAA92980, Tableau 42), mais l'expression du gène *xynD* et des autres gènes quantifiés par Béra-Maillet *et al.* (2009) précédemment, ne présentent qu'un SNR=2 à 3, donc faible dans notre étude. Toutefois, l'espèce hôte étudiée et le régime alimentaire des animaux diffèrent entre les deux expérimentations, ce qui pourrait expliquer les différences observées. Par ailleurs, durant la validation de la biopuce nous avons pu montrer que les sondes GoArrays avaient un pouvoir exploratoire. De ce fait, il est possible que les sondes déterminées pour cibler les gènes de la souche *Fibrobacter succinogenes* S85 hybrident avec des gènes d'autres souches proches de *F. succinogenes* qui présenteraient des régulations différentes de leur système fibrolytique. L'approche de biopuce ADN développée dans ce travail apporte de nouvelles informations car elle a permis de cibler plus de gènes. La mise en évidence qu'au moins une autre cellulase de la famille GH9 pourrait avoir une forte implication dans le processus de fibrolyse du fait d'un SNR élevé constitue un nouveau marqueur d'intérêt. Les transcrits de *Fibrobacter succinogenes* ont par ailleurs été détectés avec un SNR moyen légèrement supérieur à ceux de *Ruminococcus flavefaciens* et *R. albus* (Tableau 40), qui pourrait être attribué au fait que cette bactérie soit plus abondante dans l'écosystème ruminal. En effet, dans cet échantillon, *F. succinogenes* a été quantifiée à $6,37 \times 10^7$ copies/ μg d'ADN et *Ruminococcus flavefaciens* à $4,47 \times 10^6$ copies/ μg d'ADN, et les données de séquençage indiquent également que les ruminocoques sont moins abondants que les *Fibrobacter* (4,2% vs 1,4% des séquences totales dans l'échantillon contrôle). Toutefois, le gène d'une CE1 (CAA90271) d'une espèce de

Ruminocoque différente de *R. albus* ou *R. flavefaciens* (*Ruminococcus* sp.) présente le plus fort SNR (275) de toutes les bactéries. Nous devons donc rester prudents sur l'interprétation des résultats et des validations par RT-qPCR seraient nécessaires afin de s'assurer de l'expression relative des gènes.

Des gènes de bactéries connues pour dégrader des oligosaccharides ou des polysaccharides solubles comme *Bifidobacterium* et *Lactococcus* ont également été détectés. Les gènes appartiennent essentiellement aux familles GH43 et CE1. L'expression d'un groupe de gènes de la famille CE1 des espèces *Lactococcus lactis* et *L. cremoris* a par ailleurs été détectée avec un SNR (53) parmi les plus forts. La famille CE1 comporte des estérases de diverses spécificités, incluant des féruloyl estérases, des acétyl estérases impliquées dans la dégradation des xylandes, mais aussi des carboxylestérases (www.cazy.org), dont font partie les gènes CE1 détectés pour les lactocoques. Aussi le rôle de cette CE1 dans la fibrolyse n'est pas confirmé. Il est aussi intéressant de noter que deux espèces de *Bacteroides* (*B. thetaiotaomicron* et *B. xylanisolvens*) pour lesquelles une forte expression a aussi été détectée, n'ont encore jamais été ni isolées du rumen ni identifiées par séquençage dans l'écosystème ruminal. Ces deux espèces sont par contre des bactéries majeures du côlon humain (Qin *et al.*, 2010). Les données de séquençage obtenues au cours de cette étude montrent, comme attendu, une forte proportion du phylum Bacteroidetes (35%) dans nos échantillons de contenus ruminiaux, mais le genre *Bacteroides* n'a été que peu détecté (0,4%). Il est néanmoins probable que ces deux espèces de *Bacteroides*, ou des espèces proches, soient présentes dans nos échantillons, et une quantification par qPCR nous permettrait de le confirmer. Par ailleurs, comme nous l'avons précédemment évoqué, des transferts de gènes ont été mis en évidence au sein des écosystèmes digestifs et il n'est pas exclu que les gènes détectés comme exprimés proviennent d'un autre microorganisme.

Les résultats d'hybridation ont également montré qu'il était possible de détecter l'expression de gènes d'eucaryotes pourtant présents à 0,00001% de la population microbienne ruminale. Ces gènes ont été souvent détectés avec des SNR très forts et nous avons pu confirmer que les sondes ciblant un gène codant une GH11 de *Piromyces communis* avaient permis de détecter de manière spécifique un variant de la séquence ciblée. Les fortes intensités de SNR suggèrent ainsi une transcription importante des gènes eucaryotes ciblés. A ce jour, aucune étude métatranscriptomique globale sur le microbiote ruminal n'a encore été réalisée. De ce fait, une abondance supérieure des transcrits de GH ou de CE des eucaryotes ruminiaux, relativement aux transcrits bactériens, n'a jamais été démontrée. Là encore, une quantification des transcrits par RT-qPCR permettrait de confirmer nos résultats, et peut-être de montrer, pour la

première fois, que la contribution des eucaryotes à la fibrolyse ruminale est plus importante que ce qui est admis aujourd'hui. Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que les champignons ruminiaux présentaient une plus forte activité fibrolytique que les bactéries (Lee *et al.*, 2000). De plus, le champignon environnemental *Trichoderma reesei* est connu pour produire de très grandes quantités de cellulases en bioréacteur (1 g de protéines solubles, essentiellement des cellulases, pour 15 g de poids sec de biomasse microbienne) (Ahamed et Vermette, 2008), ce qui démontre une grande capacité de sécrétion de ces enzymes par les champignons. Cependant, le marquage sur les adénines que nous avons appliqué dans cette étude a pu permettre une meilleure détection des transcrits eucaryotes, et donc induire un biais dans les résultats obtenus. En effet, les gènes eucaryotes ciblés sont riches en AT (65% pour les champignons et 70% pour les protozoaires) alors que la plupart des gènes de bactéries présente un pourcentage AT de l'ordre de 50-60% (voir Chapitre 2, III.3.1.1). Les études de métagénomique appliquées à l'écosystème ruminal n'avaient détecté qu'un faible nombre de gènes d'eucaryotes (Hess *et al.*, 2011), c'est la raison pour laquelle nous avons choisi cette méthode de marquage. Dans ce cas, il ne serait peut-être pas possible de comparer les taux d'expression entre les eucaryotes et les procaryotes. Toutefois, la biopuce ADN montre ici son intérêt en permettant de cibler à la fois l'expression des gènes des populations procaryotes et eucaryotes, avec une sensibilité suffisante. Dans la seule étude métatranscriptomique ciblant spécifiquement les eucaryotes du rumen (Qi *et al.* 2011), les transcrits des familles de cellulases GH5 (7,35% des séquences de GH), GH9 (5,10%) et GH48 (5,29%), et d'hémicellulases GH10 (6,96%) et GH11 (4,41%) ont été parmi les plus abondants. Des transcrits de CE1 ont également été détectés mais pas ceux de CE6. Dans notre étude, toutes ces familles ont été détectées et un gène codant une CE6 (AAC14690) d'*Orpinomyces sp.* a aussi été détecté avec le deuxième SNR (280) le plus fort de tous les gènes.

Une quantification par RT-qPCR de différents transcrits eucaryotes et bactériens dans nos échantillons semble donc nécessaire afin de confirmer les résultats de la biopuce.

V. CONCLUSION

Les trois additifs alimentaires testés ont eu des effets mineurs sur la structure du microbiote ruminal et les paramètres fermentaires mesurés, qui pourraient s'expliquer par le dispositif expérimental (carré latin, washout court) et des conditions non optimales pour les levures (digestibilité de l'ensilage élevée, conditions ruminales non perturbantes, dose et viabilité des

levures). La supplémentation en huile de cameline a entraîné des modifications de l'abondance des Deltaproteobacteria et des Gammaproteobacteria qui n'ont pas été observées avec la supplémentation d'autres lipides. L'absence d'effets sur la population des *Butyrivibrio* corrélant avec des modifications mineures du profil des acides gras du lait suggère un effet propre à l'huile de cameline. Les levures n'ont pas eu d'effets significatifs sur la composition et la diversité des communautés bactériennes et archéennes ruminales, corrélant avec des effets non significatifs sur les fermentations ruminales, la digestibilité totale de la ration et la production de CH₄ ruminal, même si sur ce dernier paramètre, une diminution de l'ordre de 10% a été observée. Une diminution de la production de CO₂ ruminal a été observée mais aucune donnée de diversité microbienne ne permet d'expliquer cette observation. Des investigations devraient être poursuivies avec des régimes moins digestibles pour évaluer l'effet stimulateur de la levure B sur *Fibrobacter succinogenes*, et d'autres souches pourraient être criblées pour leur plus grande efficacité à stimuler la fibrolyse microbienne ruminale. Les études en nutrition animale prennent souvent en compte les paramètres fermentaires et l'abondance de certains microorganismes et/ou la structure du microbiote, et très rarement la fonction des microbiotes. La biopuce ADN développée montre ici toutes ses potentialités pour son application à des échantillons biologiques et pourra permettre de mieux comprendre le mécanisme d'action des levures probiotiques ou d'autres facteurs biotiques ou abiotiques sur la fonction fibrolytique du microbiote ruminal.

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

La dégradation des fibres alimentaires est une fonction essentielle des microbiotes digestifs. Chez le bovin, elle est assurée par une communauté complexe de microorganismes (bactéries, champignons et protozoaires) produisant une très grande diversité d'enzymes capables d'agir en synergie pour dégrader les polymères végétaux. Ces microorganismes jouent ainsi un rôle majeur dans la digestion et la nutrition de leur hôte en permettant de tirer de la biomasse végétale une grande part de leur énergie. L'efficacité de dégradation de fibres végétales par les microorganismes fibrolytiques peut être modulée par divers facteurs (nature des fibres, conditions physiologiques ruminales, additifs alimentaires) à travers des effets sur leur abondance et/ou leur activité, et avoir une influence sur l'efficacité alimentaire de l'animal. De récentes études *in vivo* ont montré que les levures probiotiques pouvaient conduire à des effets positifs sur l'abondance d'espèces bactériennes fibrolytiques et fongiques, et sur la dégradation des parois végétales (Guedes *et al.*, 2008 ; Mosoni *et al.*, 2007 ; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010a). L'abondance des microorganismes n'étant pas toujours reliée à l'activité (Torsvik et Øvreås, 2002), les approches de métatranscriptomique apparaissent pertinentes pour approfondir les connaissances sur les effets des probiotiques, ou d'autres facteurs, sur l'activité fibrolytique des microbiotes digestifs. Cependant, les études de métatranscriptomique par RNA-Seq appliquées en écologie digestive, et plus généralement en écologie microbienne, nécessitent des efforts de séquençage importants et de ce fait très coûteux du fait de la grande diversité microbienne présente dans ces écosystèmes. Par ailleurs, le manque de génomes de référence pour le microbiote ruminal apparaît être un frein à l'utilisation de ces approches. Notons que le lancement du projet Hungate 1000 qui vise au séquençage de 1000 souches microbiennes ruminales se justifie ainsi pleinement dans ce contexte (www.hungate1000.org.nz). Dans le cadre d'expérimentations animales, de nombreux échantillons sont souvent collectés (plusieurs animaux, étude cinétique) et l'analyse de données de RNA-Seq apparaît dans ce cas très lourde et coûteuse pour une analyse ciblée d'une voie métabolique particulière. Aussi, les biopuces ADN ont trouvé de nombreuses applications en écologie environnementale ces dernières années, ainsi cette approche a semblé la plus adaptée à nos objectifs et son développement a été réalisé en considérant toutes les étapes indispensables à son efficacité. La biopuce ADN présentée au cours de ce travail constitue la première approche métatranscriptomique, dirigée, appliquée à l'étude de l'activité du microbiote ruminal dans sa totalité et plus largement, applicable aux microbiotes digestifs des animaux monogastriques.

La préparation des échantillons d'ARN, une étape clé de notre approche de métatranscriptomique

Au cours de ce travail, une attention particulière a été portée à l'étape première de cette approche transcriptomique, la préparation des échantillons des ARN, dans l'objectif de proposer une procédure adaptée au mieux à notre application. Ainsi, une méthode d'extraction des acides nucléiques a été optimisée pour les échantillons dont nous disposions. Il s'agissait d'extraire simultanément des ADN et des ARN de la meilleure qualité et quantité, représentatifs du microbiote ruminal, ce qui permettra à terme de comparer les échantillons avec des approches d'écologie moléculaire ciblant ces deux acides nucléiques. En métatranscriptomique, la faible représentation des ARNm au sein des ARN totaux, dominés par les ARNr, peut conduire à une limitation de la sensibilité de détection des transcrits. L'efficacité des kits commerciaux, développés pour être généralistes et ciblant principalement les ARNr des bactéries, est apparue insuffisante pour notre approche. Une méthode d'enrichissement en ARNm dédiée au microbiote ruminal a ainsi été développée afin d'assurer la sensibilité de la biopuce. La méthode basée sur le principe de l'hybridation soustractive repose sur l'utilisation de sondes de capture, ciblant l'ensemble des ARNr 16S et 23S des bactéries et des archées ainsi que les ARNr 18S et 28S des protozoaires et des champignons identifiés à ce jour dans l'écosystème ruminal. Notre méthode a montré une très bonne efficacité de soustraction mesurée par RT-qPCR et répond donc à une problématique essentielle des approches de métatranscriptomique. Cette méthode a ainsi été appliquée dans le cadre de la préparation des échantillons ruminiaux hybridés sur la biopuce ADN et a également montré son efficacité sur des échantillons d'ARN issus de fèces d'animal monogastrique (troupe). Toutefois, des améliorations pourraient encore être apportées afin de maximiser l'efficacité de soustraction des ARNr. De nouvelles sondes de capture pourraient en effet être déterminées pour mieux cibler les archées, et pour ceci, les données de séquençage d'ARNr 16S constituent une source d'informations pour déterminer les microorganismes non ciblés par l'approche de capture initiale. Une approche de RNA-Seq a également été initiée avec le séquençage de deux échantillons d'ARN issus de contenu de rumen, l'un ayant suivi toute la procédure d'enrichissement en ARNm, l'autre étant l'échantillon d'ARN non traité, dans l'objectif de valider l'efficacité de soustraction des ARNr et si besoin de compléter le jeu de sondes de déplétion des ARNr. Par ailleurs, les données de séquençage permettront de s'assurer que le profil d'expression des gènes n'est pas modifié par la procédure d'enrichissement, et n'induit pas de biais pour notre étude

métatranscriptomique. Des sondes ciblant les ARNr de plantes déjà déterminées et de bovin, pouvant être présents dans nos ARN, pourraient également contribuer à l'amélioration de l'enrichissement des ARNm microbiens. La stratégie de détermination des sondes selon un principe d'alignements itératifs a permis de réduire la complexité des sondes nécessaires pour cibler l'ensemble des séquences d'ADNr, en déterminant 18 sondes ciblant 204 genres ruminants, et pourrait aussi être appliquée à d'autres écosystèmes environnementaux. Enfin, des sondes de capture d'ARN biotinylées issues des sondes oligonucléotidiques pourraient être testées en comparaison du système actuel.

Métatranscriptomique dirigée du microbiote ruminal : une biopuce ADN ciblant la dégradation des fibres végétales par les microbiotes digestifs

L'outil cible 6 familles de glycoside hydrolases et 2 familles de carbohydre estérases, dont les activités enzymatiques sont impliquées dans la dégradation de la cellulose (GH5, GH9, GH48) et des xylanes (GH5, GH10, GH11, CE1 et CE6). Les gènes ciblés proviennent principalement d'espèces fibrolytiques du rumen (champignons, protozoaires et bactéries) et du colon de l'animal monogastrique (bactéries) capables de dégrader les polysaccharides insolubles (cellulose, hémicelluloses). Les gènes d'espèces connues pour leur capacité à dégrader les polysaccharides insolubles et les oligosaccharides, ont également été inclus. L'outil est composé de 4507 sondes, dont 1742 sondes 5' mers et 2765 sondes GoArrays, ciblant 436 séquences nucléiques codant essentiellement les domaines catalytiques. La biopuce est composée de 8 réseaux indépendants permettant d'analyser simultanément 16 échantillons, en utilisant deux fluorochromes différents. Ce format de biopuce offre ainsi une capacité d'analyse haut-débit en permettant d'étudier l'expression de 16 x 436 gènes. L'approche développée nous permet donc d'étudier l'expression d'un grand nombre de gènes simultanément et de cibler spécifiquement notre fonction microbienne d'intérêt, ce qui aurait été plus difficilement réalisable par des approches de RT-qPCR ou de RNAseq. Nous avons pu montrer l'excellente sensibilité et spécificité des sondes déterminées, tout en ayant un caractère exploratoire qui permet de prendre en compte des variants de séquences proches de celles qui ont servi à la détermination des sondes et de pallier la limitation du nombre de gènes ciblés. Au cours de la validation, la biopuce a été utilisée avec différentes cibles (amplicons, ADNg et ARN), ce qui souligne les nombreuses possibilités d'application,

notamment dans l'étude dirigée du transcriptome de souches fibrolytiques comme cela a été réalisé au cours de ce travail avec *Fibrobacter succinogenes* S85. Outre les caractères qualitatif et exploratoire, la biopuce ADN a également montré sa capacité à évaluer quantitativement les niveaux d'expression des gènes. Les tendances observées avec la biopuce ont été effectivement confirmées par qPCR.

Application de la biopuce ADN développée dans le cadre d'expérimentations animales

Après validation sur des échantillons « simples », l'application de la biopuce ADN à un échantillon ruminal a montré sa très bonne sensibilité et spécificité de détection en permettant la détection des 8 familles ciblées. Nos résultats suggèrent en particulier une forte transcription des gènes eucaryotes et un rôle jusque-là sous-estimé de ces microorganismes dans le processus de fibrolyse, et qui mérite des confirmations par RT-qPCR. La dominance des transcrits eucaryotes et l'aspect quantitatif intra-échantillon de la biopuce ADN pourront par ailleurs être évalués parallèlement avec les données de RNA-Seq obtenues pour ce même échantillon dans le cadre de la validation de notre méthode d'enrichissement. Enfin, afin de confirmer sa capacité à détecter des variations d'abondance des transcrits des gènes ciblés dans des échantillons biologiques, son application dans le cadre d'une expérimentation animale induisant des effets marqués sur l'abondance des microorganismes fibrolytiques et/ou sur la dégradation des fibres végétales constitue l'étape finale de la validation de cet outil. Cependant, l'étude sélectionnée n'a pas permis d'obtenir les effets marqués escomptés. Aussi, nous prévoyons d'utiliser la biopuce dans le cadre d'une autre expérimentation animale consistant en un challenge nutritionnel basé sur la supplémentation en glucides rapidement fermentescibles induisant une situation d'acidose, connue pour réduire la digestibilité des fibres végétales (Martin *et al.*, 2001). Cette étude permettra certainement de fournir des échantillons adaptés, présentant une digestibilité des fibres et des niveaux de microorganismes fibrolytiques contrastés. Par ailleurs, nous prévoyons également de réaliser des incubations *in vitro* de contenu ruminal avec différentes rations alimentaires et différentes fibres, pour évaluer l'intérêt de l'utilisation de la biopuce dans ces conditions. La biopuce pourrait ainsi permettre par exemple un crible rapide de l'efficacité des additifs alimentaires en systèmes *in vitro* avant la phase de test en modèles *in vivo*.

Approche fonctionnelle de la fibrolyse

Les 8 familles de glycoside hydrolases et de carbohydate estérases ciblées ont été sélectionnées à partir des données mécanistiques et génomiques disponibles au moment du développement de la biopuce ADN. Les données de métagénomique, disponibles depuis, indiquent que les familles ciblées par notre approche sont parmi les plus abondantes, et suggère leur rôle important dans le processus de fibrolyse. Ces données *in silico* ne nous permettent cependant que d'évaluer le potentiel fibrolytique du microbiote ruminal, et non son expression. Les études de transcriptomique sur différentes souches pures (bactéries et champignons), incluant la notre, mettent en évidence des mécanismes complexes de régulation de l'expression des gènes de fibrolyse en observant la surexpression de gènes d'hémicellulases ou de cellulases en fonction de la nature et des quantités relatives des différents polysaccharides disponibles dans le milieu, ce qui suggère également une forte implication de ces protéines dans leur dégradation. D'après ces données, les familles ciblées semblent être des choix pertinents. Cependant, sont-elles représentatives de l'expression des gènes de GH et de CE impliquées dans la dégradation de la cellulose et des xylanes *in vivo* ? Pourraient-ils être de bons marqueurs de la perturbation ou de la stimulation de l'activité fibrolytique ? Peu d'études nous permettent de répondre à ces questions parce qu'elles ont été réalisées dans une condition donnée. L'étude de métatranscriptomique de Qi *et al.* (2011), ciblée uniquement sur les eucaryotes ruminiaux chez le bœuf musqué montre que les familles GH5, 9, 10, 11 et 48, font partie des familles les plus exprimées *in vivo*, avec la réserve que cette étude concerne un régime et une espèce animale donnés. En outre, Béra-Maillet *et al.* (2009) avaient identifié, avec une approche de RT-qPCR, des profils d'expression différents de ceux que nous avons obtenus, pour les gènes d'endoglucanases et de xylanases de *Fibrobacter succinogenes* dans des contenus ruminiaux de moutons conventionnels. Le régime alimentaire, l'espèce animale, mais aussi des interactions interspécifiques au sein du microbiote ruminal, ont sans doute un rôle majeur dans l'expression des gènes d'hydrolases au sein du rumen. Notre approche de biopuce permettra à ce titre de prendre en compte l'expression des gènes de plusieurs microorganismes simultanément, peut-être sera-t-il possible de trouver un profil témoignant de corrélations fortes entre gènes exprimés et efficacité fibrolytique. Par ailleurs, des études *in vitro* de la dégradation par le microbiote ruminal de fibres végétales de différentes natures, variant dans leur composition en polysaccharides et en lignine, constitueront une approche intéressante pour valider les familles ciblées, comme déjà signalé ci-dessus, mais aussi nous orienter vers les familles ou

les gènes les plus pertinents dans toutes les conditions étudiées ou plus spécifique de chaque type de fibre testées. Nul doute également que l'utilisation de la biopuce ADN sur des cinétiques révélera des expressions coordonnées de cet arsenal enzymatique apportant de nouveaux éclairages sur les mécanismes de la fibrolyse. Enfin, couplées à l'analyse de l'expression des gènes ciblés avec la biopuce, des études d'activités enzymatiques et de digestibilité des fibres nous permettraient également de confirmer que le profil d'expression des gènes corrèle bien l'activité fibrolytique. En effet, dans notre approche de biopuce ADN, nous ciblons les ARN, or des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles pourraient avoir lieu. Dans une approche plus poussée, une étude métabolomique pourrait également être réalisée afin d'estimer la corrélation entre nos données de transcriptomique et les enzymes produites. Toutefois, le nombre de séquences de protéines disponibles dans les bases de données constituent toujours une limitation à cette approche comparative.

Evolution de la biopuce ADN

Les sondes 25 mers et GoArrays ont montré des informations complémentaires de par la spécificité des sondes courtes et la sensibilité des sondes longues, et, jusqu'à la validation finale de l'outil, le maintien de ces deux types de sondes semble approprié. Cependant, à terme, l'excellente sensibilité des sondes GoArrays semble la plus adaptée. Aussi, une sélection plus avancée (spécificité, composition, distance) des sous-séquences composant les sondes GoArrays et surtout de leurs associations sont envisagées. Par ailleurs, une sélection plus stricte des gènes appartenant à la famille CE1, comprenant également des estérases n'ayant pas forcément un lien avec la fibrolyse, devrait être réalisée afin d'interpréter plus aisément les résultats. De nombreuses séquences appartenant aux familles ciblées sont aujourd'hui disponibles grâce en particulier aux données nouvelles de métagénome sur le microbiote ruminal (Hess *et al.*, 2011 ; Brulc *et al.*, 2009 ; Dai *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2013) et sur le microbiote colique de l'homme (Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium *et al.*, 2010). De même, des familles, retrouvées abondamment dans les études de métagénomique et de l'étude métatranscriptomique sur les eucaryotes ruminants (Qi *et al.*, 2011), pourraient également être nouvellement ciblées, notamment des familles d'oligosaccharidases (GH3), d'endoglucanases (GH6 et GH45), des familles polyspécifiques (GH8 et GH26) et la famille CE4. Une mise à jour régulière des jeux de sondes utilisant ces données permettrait de faire évoluer l'outil tout en le rendant utilisable sur différents modèles

animaux (ruminants et monogastriques). La biopuce est en effet également destinée à être appliquée à des échantillons digestifs d'animaux monogastriques (porc) et la validation de l'outil a par ailleurs déjà été entreprise. Elle pourrait bien entendu être également utilisée dans le cadre d'études chez l'homme.

Vers une application « diagnostic »

La finalité de la biopuce ADN développée est son utilisation en tant qu'outil « diagnostic » par la société Lallemand Animal Nutrition qui souhaite à moyen terme pouvoir utiliser la biopuce pour évaluer l'effet de leurs additifs microbiens sur la dégradation des fibres végétales par les microbiotes digestifs et mieux comprendre leur mécanisme d'action. Afin de faciliter l'analyse des données de biopuce ADN et de limiter le coût de l'outil, ce travail pourra se poursuivre par la sélection de gènes identifiés comme marqueurs de conditions perturbées, représentatives de situations retrouvées en élevage, ou stimulantes pour la fibrolyse à partir des données issues d'expérimentations animales et d'études *in vitro*. Son application étant envisagée pour des échantillons d'animaux d'élevage où des dispositifs de canule ruminale ne seront pas disponibles, des échantillons fécaux seront également utilisés pour la sélection des gènes marqueurs et permettront d'évaluer si ces échantillons biologiques permettent une bonne corrélation avec l'activité fibrolytique du microbiote ruminal. Si tel était le cas, l'application de la biopuce pourrait également être intéressante dans le cadre de recherches nécessitant des expérimentations animales, pour lesquelles l'utilisation de méthodes non invasives est de plus en plus souhaitée, dans le contexte de garantir le bien être animal. Avec l'identification de gènes marqueurs de l'activité fibrolytique et de ses variations sous l'effet de différentes conditions alimentaires, il sera ainsi possible de faire un criblage efficace et maîtrisé d'additifs innovants capables de moduler, dans le sens le plus favorable à l'animal, la dégradation des fibres végétales au sein de l'écosystème digestif.

VALORISATION DES TRAVAUX

RUNNING SHORT TITLE: YEASTS AND CAMELINA OIL ON METHANE AND MILK
FAT

Effect of camelina oil or live yeasts on ruminal methane production, rumen fermentation, milk production, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets

A.R. Bayat,^{*1} P. Kairenius,* T. Stefański,* H. Leskinen,* S. Comtet-Marre,[†] E. Forano,[†] F. Chaucheyras-Durand,^{†,‡} and K.J. Shingfield,^{*,§}

*Animal Production Research, MTT, FI 31600, Jokioinen, Finland

[†]INRA, Microbiology unit UR454, CR Clermont Ferrand/Theix, 63122 St Genes Champanelle, France

[‡]Lallemand Animal Nutrition, 19 rue des Briquetiers, BP59, 31702 Blagnac Cedex, France

[§]Current address: Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Aberystwyth, SY23 3EB, United Kingdom

¹ Corresponding author: Dr. Alireza Bayat, Animal Production Research, MTT Agrifood Research Finland, FI-31600, Jokioinen, Finland

Telephone: +358503164941

E-mail: alireza.bayat@mtt.fi

INTERPRETIVE SUMMARY: Effect of camelina oil or live yeasts on ruminal methane production, rumen fermentation, milk production, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *By Bayat et al.* The effects of two strains of live yeasts or camelina oil on ruminal methane and carbon dioxide production, rumen microbial populations, nutrient digestibility, milk production, and milk composition were examined. Live yeasts had only a moderate influence on ruminal gas production and fermentation characteristics, animal performance or milk fat composition in cows fed diets based on grass silage. Dietary supplements of camelina oil altered milk fat composition and lowered ruminal methane and carbon dioxide production. However, these changes were accompanied by lowered intake and milk production and marginal decreases in nutrient digestibility, in the absence of substantial changes in rumen microbial populations.

ABSTRACT

The potential of dietary supplements of two live yeast strains (A and B) or camelina oil to lower ruminal methane (CH_4) and carbon dioxide (CO_2) production and the associated effects on intake, rumen fermentation, rumen microbial populations, nutrient utilization, milk production, and milk fatty acid (FA) composition of cows fed grass silage-based diets were examined. Four Finnish Ayrshire cows in mid-lactation fitted with rumen cannula were used in a 4×4 Latin Square with 42 d periods comprising 23 d adaptation, 5 d sample collection, and 14 d washout. Cows received a TMR with a 50:50 forage:concentrate ratio (on a DM basis) containing extensively fermented grass (*Festuca arundinacea*) silage (control), or the same basal diet supplemented with one of two live yeasts A or B administered directly in the rumen at 10^{10} cfu/d (treatments A and B) or 60 g/kg diet DM of camelina oil (CO). Relative to the control, live yeasts A and B had no effects on DMI, rumen fermentation, or nutrient digestion. In contrast, CO lowered DMI and ruminal CH_4 and CO_2 production, responses associated with marginal decreases in total tract nutrient digestion, in the absence of alterations in rumen fermentation characteristics and microbial populations. Compared with live yeast treatment A and the control, CO decreased the yields of milk and milk protein. Furthermore, CO decreased the yields of ECM and milk lactose compared with control and both live yeast treatments, whereas milk fat yield was lower for CO compared with control and live yeast treatment B. Relative to live yeast B, CO increased the efficiency of N utilization. Live yeast strains had minimal influence on milk FA composition, whereas CO decreased milk fat 8:0-16:0 and total saturated FA, and increased 18:0 and total 18:1, 18:2, conjugated linoleic acid, 18:3n-3, and *trans* FA concentrations. Decreases in ruminal CH_4 production to CO were related to lower DMI with little evidence of alterations in the repartitioning of metabolic hydrogen in the rumen or changes in CH_4 output/kg milk. Experimental data indicated that the live yeast strains tested had no influence on rumen fermentation or nutrient utilization in cows fed diets based on grass silage. Camelina oil can be used to decrease ruminal CH_4 and CO_2 losses in lactating cows, but animal performance may be compromised due to lower feed intake and nutrient digestion. Furthermore, the associated changes in milk fat composition to camelina oil on human health merits further investigation.

Key words: ruminal methane, live yeast, camelina oil, milk fat

INTRODUCTION

Agriculture accounts for 10-12% of global anthropogenic greenhouse gases (GHG) that includes about 58 and 47% of total anthropogenic nitrous oxide (N₂O) and methane (CH₄) emissions, respectively, and contribute to less than 1.0% of global carbon dioxide (CO₂) output (Smith *et al.*, 2007). Emissions of CH₄ and N₂O due to agricultural activities have increased by 17% from 1990 to 2005 (US-EPA, 2006), while the global output of CH₄ and N₂O from livestock production systems in 2030 is anticipated to increase from current levels by 60 and 35-60%, respectively (FAO, 2003).

Ruminal CH₄ production occurs due to the metabolic activity of a group of microbes specialized in utilizing hydrogen during the reduction of CO₂ to CH₄ in the rumen. Nutritional strategies to mitigate CH₄ emissions have sought to identify and investigate various feed additives and dietary ingredients to promote alternative pathways to CH₄ formation for the dissipation of metabolic hydrogen in the rumen (Boadi *et al.*, 2004). Dietary supplements of medium-chain saturated fatty acids (SFA; Jordan *et al.*, 2006; Machmüller, 2006; Hristov *et al.*, 2009) and plant oils (McGinn *et al.*, 2004; Beauchemin and McGinn, 2006; Martin *et al.*, 2008) are known to lower methanogenesis in lactating or growing cattle. However, the decreases in ruminal CH₄ formation to lipid supplements fed at a relatively high level of inclusion (≥ 50 g/kg DM) are often accompanied by decreases in DMI, nutrient digestion, and animal performance (Jordan *et al.*, 2006; Beauchemin and McGinn, 2006; Martin *et al.*, 2008).

Camelina (*Camelina sativa* L.), an ancient summer annual oilseed crop, is tolerant to drought and can adapt to different climatic and soil conditions. Cultivation of camelina has received renewed attention due to the oil containing relatively high amounts of 18:3n-3 (Hurtaud and Peyraud, 2007). In lactating cows, dietary supplements of camelina seeds or camelina oil have been shown to enrich *cis*-9 18:1, *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA), and 18:3 n-3 and lower milk fat medium-chain SFA concentrations (Hurtaud and Peyraud, 2007; Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011), changes considered beneficial to human health (Shingfield *et al.*, 2013). However, the effects of camelina oil on ruminal fermentation, CH₄ and CO₂ production, and microbial communities have not been determined. Substantial emphasis is being placed on developing diets and management systems for lowering ruminal CH₄ production to decrease the contribution of ruminant production systems to total GHG emissions and improve energy utilization in growing and lactating cattle. Recent evaluations have concluded that dietary lipid supplements result in the

most consistent decrease in CH₄ output when compared with alterations in forage:concentrate ratio, direct-fed microbials or exogenous enzymes (Martin *et al.*, 2010; Grainger and Beauchemin, 2011). Simply replacing forages with concentrate ingredients also ignores the important role of ruminants in utilizing fibrous feeds not suitable for human consumption (Grainger and Beauchemin, 2011), and that when fed in excess, concentrates increase the risk of ruminal acidosis (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006).

Live yeast products are used as feed additives for ruminants to improve feed efficiency, prevent digestive disorders through the scavenging of oxygen within the rumen, provision of microbial growth factors or compete directly with autochthonous species in the rumen (Newbold *et al.*, 1996; Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006). However, the effects *in vivo* vary substantially due to yeast strain and the interactions between the host ruminant and diet composition (Desnoyers *et al.*, 2009). Selection of specific yeast strains for lowering ruminal CH₄ production has been postulated (McGinn *et al.*, 2004; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2011). Furthermore, live yeasts may also influence methanogenesis per unit product and overall feed conversion efficiency indirectly through positive effects on ruminal fiber degradation.

The present experiment examined the potential of two strains of live yeasts or camelina oil enriched in polyunsaturated fatty acids (PUFA) to lower ruminal CH₄ and CO₂ production, and the associated effects on rumen fermentation, rumen microbial populations, nutrient utilization, milk production, and milk fatty acid (FA) composition of lactating cows fed grass silage-based diets.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Experimental Design, and Diets

All experimental procedures were approved by the National Ethics Committee (Hämeenlinna, Finland) in accordance with the guidelines established by the European Community Council Directives 86/609/EEC. Four multiparous Finnish Ayrshire dairy cows fitted with rumen cannula (i.d. 100 mm; Bar Diamond, Inc., Parma, ID) of mean \pm SD 53 \pm 7 DIM, 711 \pm 23 kg of BW, and producing 33.8 \pm 3.4 kg milk/d were allocated at random to experimental diets according to a 4 \times 4 Latin Square with 42 d experimental periods comprised 23 d adaptation, 5 d sample collection, and 14 d washout.

Cows were housed in individual tie stalls, had free access to water and salt block, and were milked *in situ* twice daily at 0700 and 1645 h. Treatments comprised TMR (forage to concentrate ratio 50:50 on a DM basis) based on grass silage (control), or the same basal diet supplemented with 10^{10} cfu/d of one of two live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains A and B, supplied as 0.5 g/d of a highly concentrated dried product (Lallemand Animal Nutrition, Blagnac, France) or 60 g of camelina oil (Raisio Feed Ltd., Raisio, Finland)/kg DM (CO). Strains A and B were selected based on *in vitro* studies demonstrating positive effects on fiber degradation by mixed rumen populations and stimulation of *Fibrobacter succinogenes* growth, respectively (Chaucheyras-Durand *et al.*, unpublished data). Viable yeast counts were checked before starting the trial and both dried products conformed to expectations. Yeast supplements were stored at +4°C, away from light and humidity throughout the experiment. Previous experiments *in vitro* have demonstrated that each yeast strain survives in the rumen for at least 12 h (Chaucheyras-Durand *et al.*, unpublished data). Live yeast supplements were administered directly in the rumen via the cannula at 0600 h daily, to ensure that no viable cell losses occurred, whereas camelina oil replaced concentrate ingredients (Table 1). Diets were offered as TMR to avoid selection of dietary components and to maintain the desired forage:concentrate ratio. Experimental diets were offered ad libitum to result in 5-10% refusals and formulated to meet or exceed requirements for metabolizable energy and protein (MTT Agrifood Research Finland, 2006).

Experimental silage was prepared from primary growths of tall fescue (*Festuca arundinacea*) grown at Jokioinen (60°49'N, 23°28'E), cut with a mower conditioner, and wilted for 5 h. Cut grass was ensiled with a mixture of *Pediococcus acidilactici* strain MA18/5M, *Lactobacillus buchneri* strain NCIMB 40788, cellulase, and hemicellulase applied at 5.0 L/t (Lalsil Dry, Lallemand Animal Nutrition) resulting in a silage with an *in vitro* OM digestibility of 686 g/kg DM.

Measurements and Chemical Analysis

Daily feed intake determined as the amount of TMR offered minus refusals and milk yield were recorded throughout the experiment, but only measurements made between d 24 and d 28 were used for statistical analysis. During this period, representative samples of silage and concentrates were collected daily, composited, and submitted for chemical composition determinations using standard laboratory methods (Shingfield *et al.*, 2001). Concentrations of

gross energy (**GE**) in samples of silage, concentrates, camelina oil, and excreta were determined by bomb calorimetry (1108 Oxygen bomb, Parr Instrument, Illinois, USA). For the determination of indigestible NDF (**iNDF**) concentration, 1.0 g DM of samples was weighed into nylon bags (60mm×120mm, pore size 0.017mm) and incubated in duplicate for 12 d in the rumen of two cows fed a grass silage based diet (forage:concentrate ratio 70:30 on a DM basis). Once removed from the rumen bags were rinsed in cold water for 25 min using a household washing machine, incubated for 1 h in boiling neutral detergent solution, rinsed, and dried to a constant weight at 60°C. Samples of rumen fluid ($n = 8$) were collected on d 28 of each period from each cow at 1.5 h intervals from 0600 h until 1630 h. Following removal, pH was measured and samples were filtered through two layers of cheesecloth. Samples of rumen fluid were stored at -20°C until analyzed for VFA and ammonia N determinations by routine procedures (Shingfield *et al.*, 2002).

For microbial assessment, samples of ruminal digesta were collected from four sites within the reticulo-rumen immediately after the collection of rumen fluid at 0600 h on d 28 of each experimental period. Samples of ruminal digesta were mixed thoroughly, and a sub sample (50 g) was mixed with 100 mL of RNAlater solution (Fisher Scientific, Illkirch, France), split into further aliquots, and stored at -80°C prior to quantitative PCR (**qPCR**) analysis.

Ruminal gas production was estimated using the sulfur hexafluoride (**SF₆**) tracer gas technique (Boadi *et al.*, 2002) with modifications. Measurements of CO₂ and CH₄ were made over a 4 d interval starting at 0600 h on d 24 of each experimental period. Thin wafer permeation tubes containing SF₆ (i.d. 16.4 × 46.5 mm Fine Permeation Tubes, Spadafora, Italy) with a declared rate of release of 1.0 mg/d were placed into the rumen of each cow on d 16 of the experiment. Actual SF₆ release (1.12 ± 0.17 mg/d) was determined gravimetrically over the course of the 20 wk experiment. Gases in the rumen headspace were drawn continuously (1.7 mL/min) over 4 consecutive 24-h periods into evacuated 5.5 L air tight canisters via capillary tubing (PEEK 1.6 mm × 0.13 mm i.d., VICI® Valcro Instruments Co, Houston, TX, USA). Tubes used to collect the ruminal gas were anchored securely to the neck of the rumen cannula allowing gas to be collected at approximately 5 cm above the rumen mat. Each canister was replaced after 24 h, pressurized with nitrogen gas to 110 kPa and left for 2 h to ensure thorough mixing. Collected gases were released slowly from the canister, sub-sampled in triplicate, and transferred into evacuated 10 mL glass tubes equipped with a rubber stopper, and analyzed for CH₄, CO₂, and SF₆ concentrations.

Whole tract apparent digestibility coefficients were determined by total fecal collection over a 96 h interval starting at 1800 h on d 24 of each experimental period. Feces excreted was weighed, thoroughly mixed, sub-sampled (5%, wt/wt) and stored at -20°C prior to chemical analysis. Urine was separated from feces by means of a light harness and flexible tubing attached to the vulva and collected in plastic canisters containing 500 mL of 5 mol/L sulfuric acid. Collection vessels were changed at 12 h intervals.

Samples of milk were collected over four consecutive milking starting at 1700 h on d 24. Milk samples treated with preservative (Bronopol, Valio Ltd., Helsinki, Finland) were analyzed for milk fat, crude protein, and lactose by infrared analysis (MilkoScan FT6000, Foss Electric, Hillerød, Denmark). Unpreserved milk samples were also collected, composited according to yield, and stored at -20°C until analyzed for FA composition.

Gas Analysis

Samples of gases collected from the rumen were analyzed in triplicate for CH_4 , CO_2 , and SF_6 concentrations using a gas chromatograph (Agilent 6890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with flame ionization (**FID**) and electron capture (**ECD**) detectors, autosampler, and a nickel catalyst for converting CO_2 to CH_4 (Regina and Alakukku, 2010). Concentration of gases was determined based on calibration curves constructed using authentic standards (AGA Ltd., Espoo, Finland) over a range of 2.5-25% for CO_2 and CH_4 and 0.00625-0.125 ppm for SF_6). Peaks were identified by retention time comparisons with authentic standards. Daily CH_4 and CO_2 production was calculated based on known amount of SF_6 released in the rumen. No correction was made for background CH_4 and CO_2 concentrations because cows were housed in a well ventilated facility ($72 \text{ m}^3/\text{min}$) and fitted with custom made sponges placed between the outer edge of the cannula flange and the abdominal wall to minimize the exchange of surrounding air with ruminal contents.

Enumeration of Rumen Microbial Populations by qPCR

Microbial DNA was extracted from 250 mg of centrifuged rumen contents in quadruplicate with the Nucleospin for soil kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Samples were homogenized by bead beating in the presence of 700 μL of lysis buffer SL1 and 15 μL of Enhancer SX buffer using the Fast Prep-24 instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France). All steps were performed according to the instructions provided by the manufacturer. DNA

extracts were assessed for purity and quantity using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France), and stored at -20°C until molecular analysis.

Rumen microbes were quantified by qPCR targeting the *16S rRNA* gene for bacteria and methanogenic archaea, the *18S rRNA* gene for protozoa and the *ITS1* region for fungi. The qPCR was performed using SYBR-green chemistry on a MasterCycler ep Realplex thermal cycler (Eppendorf, Le Pecq, France). Primer sets and PCR conditions used were those described in the literature for methanogenic archaea (Ohene-Adjei *et al.*, 2007), protozoa (Sylvester *et al.*, 2005), *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, and fungi (Denman and McSweeney, 2006). Total bacteria were quantified using 520F and 799R2 primers (Edwards *et al.*, 2007; 2008) (Supplemental Table 1). The qPCR was carried out in a total volume of 20 µL containing 2X Takara SYBR Premix Ex Taq kit (Lonza, Levallois-Perret, France), 40 ng of DNA template, and 0.5 µM of each forward and reverse primer. Each reaction was run in triplicate in 96-well plates (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Standards were used to determine the absolute abundance of microbial groups, expressed as the log number of DNA copies per µg of DNA. For total bacteria, cellulolytic bacteria, and methanogenic archaea, the standard curves were prepared according to Mosoni *et al.* (2011). For protozoa, the standard curve was developed using pSC-A-amp/kan plasmids (Strataclone PCR cloning kit, Agilent Technologies, Santa Clara, California) containing the near full *18S rRNA* gene from *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii*, and *Ostracodinium dentatum* mixed in an equal amount. For fungi, the *ITS1* fragment from *Piromyces sp.* was amplified using qPCR primers (Lwin *et al.*, 2011) and cloned using the pCR2.1 Topo TA Cloning kit (Invitrogen, Life technologies, Saint Aubin, France). The number of gene copies present in each plasmid was calculated using the plasmid DNA concentration and the molecular mass of the vector and the insert. For each target, a standard curve was prepared from 10² to 10⁹ copies by serial dilution. Efficiency of the qPCR for each target varied between 97% and 102% with a slope from -3.0 to -3.4, and a regression coefficient above 0.95 in accordance with the MIQE guidelines (Bustin *et al.*, 2009).

Lipid Analysis

Fatty acid methyl esters (**FAME**) in freeze-dried feed samples were prepared in a one-step extraction-trans-esterification procedure using chloroform and 2 % (vol/vol) sulfuric acid in methanol (Shingfield *et al.*, 2003). Lipid in a 1-mL milk sample was extracted in triplicate using a mixture of ammonia, ethanol, diethylether, and hexane (0.2:1.0:2.5:2.5 vol/vol).

Extracts were combined and evaporated to dryness at 40°C under oxygen-free nitrogen. Samples were dissolved in hexane and methyl acetate and trans-esterified to FAME using freshly prepared methanolic sodium methoxide (Shingfield *et al.*, 2003).

The FAME prepared from samples of feeds and milk fat were quantified using a gas chromatograph (model 6890N, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a FID, automatic injector, split injection port, and a 100-m fused silica capillary column (i.d. 0.25 mm) coated with a 0.2-µm film of cyanopropyl polysiloxane (CP-Sil 88, Agilent Technologies; Shingfield *et al.*, 2003). The FAME not available as commercially standards peaks were identified based on GC-MS analysis of 4,4-dimethyloxoline (**DMOX**) derivatives prepared from FAME (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011). The distribution of CLA isomers in milk fat FAME was determined by Ag⁺ HPLC (Model 1090, Agilent Technologies; Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011).

Milk FA composition was expressed as a weight percentage of total FA using theoretical relative response factors to account for the carbon deficiency in the FID response for FAME containing 4- to 10-carbon atoms (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011). Concentrations of CLA isomers were calculated based on proportionate peak area responses determined by HPLC and the sum of *trans*-7, *cis*-9 CLA, *trans*-8, *cis*-10 CLA, and *cis*-9, *trans*-11 CLA weight percentage determined by GC analysis.

Calculations

Digestible and metabolizable energy (MJ/d) were calculated as follows:

$$\text{Digestible energy} = \text{Energy intake} - \text{Fecal energy}$$

$$\text{Metabolizable energy} = \text{Digestible energy} - \text{Urinary energy} - \text{Methane energy}$$

Retained N (g/d) was calculated as:

$$\text{Retained N} = \text{N intake} - \text{Fecal N} - \text{Urinary N} - \text{Milk N}$$

Daily ECM yield (kg/d) was calculated according to Sjaunja *et al.* (1990):

$$\text{ECM} = \text{milk (kg/d)} \times [38.3 \times \text{fat (g/kg)} + 24.2 \times \text{protein (g/kg)} + 16.54 \times \text{lactose (g/kg)} + 20.7]/3140$$

Statistical Analysis

Experimental data were analyzed by ANOVA for a 4×4 Latin square using the Mixed procedure of SAS (version 9.2, SAS institute, Cary, NC) with a model that included the fixed effects of period and treatment and random effect of cow. Measurements of rumen fermentation characteristics were analyzed by ANOVA for repeated measures using a model that included the fixed effects of period, treatment, time, and their interaction and random effect of cow assuming an Auto Regressive Order One Covariance Structure fitted on the basis of Akaike Information and Schwarz Bayesian model-fit criteria. Least squares means \pm SEM are reported and treatment effects declared significant at $P \leq 0.05$, whereas a tendency or trend was assumed for probabilities < 0.1 and > 0.05 . When the overall effect of treatment was significant, the difference among means was explored further using the Fisher's least significant difference (LSD) test.

RESULTS

Nutrient Intake

Treatment CO lowered ($P = 0.05$) DMI and tended ($P = 0.06$) to lower OM intake compared with the control and live yeast treatment B (Table 3). Relative to the control and live yeast treatments A and B, CO decreased ($P < 0.05$) the intake of CP, NDF, pdNDF, ADF, water soluble carbohydrate, and starch, but increased ($P < 0.05$) the intake of all FA, other than 12:0, 26:0, 28:0, and 30:0 (Table 3).

Rumen Fermentation and Microbial Populations

Relative to the control, CO tended ($P = 0.06$) to decrease rumen pH, whereas treatments had no effect ($P > 0.05$) on ruminal ammonia-N or total VFA concentrations (Table 4). Treatments had no influence ($P > 0.05$) on the molar proportions of major VFA, whereas CO and live yeast treatment B lowered ($P < 0.001$) the molar proportion of isobutyrate, and CO tended ($P = 0.06$) to decrease molar proportions of valerate and caproate (Table 4). Treatments had no effect ($P > 0.05$) on the abundance of total bacteria, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, methanogenic archaea, protozoa or fungi (Table 4).

Ruminal Methane and Carbon Dioxide Production

Live yeasts had no effect ($P > 0.05$) on ruminal CH₄ production, whereas dietary supplements of camelina oil decreased ($P < 0.05$) ruminal CH₄ output (Table 5). However, ruminal CH₄ production per unit total apparent OM digestion or kg milk did not differ ($P > 0.05$) between treatments. Compared with the control, CO decreased ($P < 0.05$) ruminal CO₂ production. Ruminal CO₂ output per unit milk yield also tended ($P = 0.09$) to be lower for CO compared with the control. Treatments had no effect ($P > 0.05$) on energy losses as CH₄ that averaged 5.68% of GE intake.

Nutrient Utilization

Apparent whole tract digestibility of nutrients, other than starch and GE were unaffected ($P > 0.05$) by treatment (Table 6). Digestion of starch ($P = 0.05$) and that of GE tended ($P = 0.08$) to be lower for CO compared with the control and live yeast treatment B. Relative to the control, CO decreased ($P < 0.05$) the intake, digestibility, urinary excretion, and secretion of N in milk, and tended ($P = 0.07$) to lower fecal N output. Compared with live yeast B, CO increased ($P < 0.05$) the efficiency of N utilization. Treatments had no effect ($P > 0.05$) on energy losses in feces and milk, whereas CO tended ($P = 0.06$) to lower urinary energy excretion.

Milk Production and Composition

Compared with live yeast treatment A and the control, CO decreased ($P < 0.05$) the yields of milk and milk protein (Table 7). CO decreased ($P < 0.05$) yields of ECM and milk lactose compared with control and live yeast treatments, whereas yield of milk fat was lower ($P < 0.05$) for CO compared with the control and live yeast treatment B. Treatments had no effect ($P > 0.05$) on milk fat and lactose concentrations, whereas protein concentrations tended ($P = 0.08$) to be lower for live yeast treatment A and CO.

Milk Fatty Acid Composition

Administration of live yeasts into the rumen had minimal influence on milk fat composition, whereas CO resulted in substantial changes that were characterized by decreases ($P < 0.05$) in 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 16:0 and total SFA, and increases ($P < 0.05$) in 18:0, total 18:1, 18:2, and CLA, 18:3n-3, total 20- and 22-carbon, mono unsaturated FA (MUFA), PUFA, and *trans* FA concentrations (Table 8). Relative to the control, live yeast treatment A

lowered ($P < 0.05$) milk *cis*-10 16:1 concentration, whereas CO increased ($P < 0.05$) *cis*-10 16:1, *cis*-12 16:1, and *trans*-9 to -13 16:1, and decreased ($P < 0.05$) *cis*-9 16:1 and *cis*-13 16:1 concentrations (Supplemental Table 2). Live yeasts had no effect ($P > 0.05$) on the distribution of milk fat 18:1 isomers, whereas CO increased ($P < 0.05$) *cis*-9, -12, -15, and -16 18:1 concentrations and resulted in a higher abundance of *trans* (Δ 4-16) 18:1 (Supplemental Table 2). Furthermore, CO enriched ($P < 0.05$) milk fat *cis* (Δ 9-15) and *trans* (Δ 9-13) 20:1 concentrations (Supplemental Table 2).

Supplements of live yeasts had no influence ($P > 0.05$) on milk fat 18:2 or CLA isomer concentrations (Supplemental Table 3). In contrast, CO increased ($P < 0.05$) total 18:2 concentrations and the abundance of non-methylene interrupted 18:2 isomers, including *cis*-9, *cis*-15 18:2, *cis*-9, *trans*-13 18:2, and *trans*-11, *cis*-15 18:2, but decreased ($P < 0.05$) 18:2n-6 concentration (Supplemental Table 3). Relative to other treatments, CO elevated ($P < 0.05$) total milk fat CLA content, due in the most part to increases ($P < 0.01$) in the *cis*-9, *trans*-11 CLA isomer, and enrichment ($P < 0.01$) of minor *cis*, *trans* (12,14), *trans*, *cis* (7,9; 9,11; 10,12; 11,13 and 12,14), and *trans*, *trans* (11,13 and 12,14) isomers.

Live yeast supplements had no influence ($P > 0.05$) on the concentrations of the majority of odd- and branched-chain FA (**OBCFA**) in milk fat, with the exception of a decrease ($P < 0.001$) in 11-cyclohexyl 11:0 concentration for live yeast treatment B compared with the control (Supplemental Table 4). In contrast, CO lowered ($P < 0.05$) the abundance of most OBCFA in milk fat, and increased ($P < 0.001$) 21:0 and *cis*-12 21:1 concentrations.

DISCUSSION

Intake and Nutrient Digestion

When fed in relatively high amounts (> 50 g/kg DM), plant oils and oilseeds typically lower DMI, a phenomenon often attributed to various mechanisms including the adverse effect of unsaturated FA on ruminal microbial communities, lowered OM and NDF digestion in the rumen, a tendency to shift the site of nutrient digestion from the rumen to the intestines, and elevated plasma gut peptide concentrations (Allen, 2000; Lock and Shingfield, 2004). Camelina oil lowered DMI by 12.1%, changes that were accompanied by numerical decreases in total tract OM, pdNDF, starch, and GE digestibility (-4.3, 5.2, 0.5, and 4.8 %, respectively). It remains unclear if the decrease in DMI in the absence of substantial changes in nutrient digestion is related to diets being based on grass silage, or due to differences in the FA

composition of camelina oil compared with other plant oils. Camelina oil is rich in 18:3n-3, 18:2n-6, *cis*-13 20:1, and *cis*-9 18:1, whereas linseed oil contains 18:3n-3, *cis*-9 18:1, 18:2n-6, and 16:0 as major constituents (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011). However, the FA profile of camelina oil differs markedly from more conventional sources, such as rapeseed oil (rich in *cis*-9 18:1, 18:2n-6 and 16:0) and sunflower oil (abundant in 18:2n-6, *cis*-9 18:1, and 16:0). Previous studies have reported that 88 g of rapeseed oil/kg DM had no influence on ruminal or total tract OM and NDF digestion (Chelikani *et al.*, 2004) in lactating cows offered diets based on alfalfa and barley silage. In contrast, sunflower oil offered up to 50 g/kg DM was shown to progressively decrease ruminal pdNDF and total NDF digestibility in cows fed grass silage based diets (Shingfield *et al.*, 2008), whereas linseed oil, or whole or processed linseeds (57 g/kg of lipid in diet DM) lowered total tract digestibility of OM and NDF in lactating cows fed maize silage based diets (Martin *et al.*, 2008). Direct comparisons are limited, but at low levels of inclusion (10 g/kg DM), the influence of rapeseed, sunflower or camelina oil on nutrient digestion do not differ (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011). Decreases in DMI to higher amounts of lipid supplements may also arise from alterations in gut motility, the release of gut hormones including cholecystokinin-octapeptide, and oxidation of fat in the liver (Allen, 2000). Studies involving post-ruminal infusions have demonstrated that increases in the amount of unsaturated FA entering the duodenum lower DMI, responses that are accompanied by elevated enterocyte secretion of glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin-octapeptide (Litherland *et al.*, 2005).

An extensive body of research has established the potential of live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) to accelerate the establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen and increase ruminal fiber digestion (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). However, ruminal administration of live yeast strains A and B had no effect on DMI, consistent with the outcome of a multiple-study analysis of the effects of a single live yeast strain in lactating cows (De Ondarza *et al.*, 2010). In contrast, a broader evaluation reported that various yeast strains may influence intake in several ruminant species (Desnoyers *et al.*, 2009). The influence of live yeasts on intake is thought to be dependent upon plane of nutrition, with positive responses observed at higher DM intakes (Erasmus *et al.*, 2005). Furthermore, there are some indications that the influence of live yeasts on fiber digestion are dependent on the inherent digestibility of dietary forages with the most significant improvements being reported in cows fed low quality forages (Guedes *et al.*, 2008). Data from the present experiment in cows fed diets based on grass silage indicate that live yeasts

do not necessarily elicit substantial intake responses or improve nutrient digestion. However, the principal objective of this experiment were to investigate treatment effects on rumen fermentation, gas production, and milk fat composition, and the number of cows used are rather limited with respect to establishing milk production responses.

Efficiency of N utilization defined as milk N/N intake averaged 0.272 that is consistent with mean values of 0.247-0.277 for cows fed grass silage based diets containing between 150 and 170 g CP/kg DM (Huhtanen and Hristov, 2009). Dietary CP concentration is the main determinant of the ratio of milk N/N intake in lactating cows (Huhtanen and Hristov, 2009). An improvement in this ratio on the CO treatment can be explained by the lower CP intake compared with other treatments.

Rumen Fermentation and Ruminal Gas Production

Live yeast strains A and B did not have a substantial influence on ruminal fermentation which is in agreement with earlier reports (McGinn *et al.*, 2004). *In vitro* studies have indicated that, by stimulating the growth of ruminal acetogenic bacteria, live yeasts may increase the ratio of acetate to propionate (Chaucheyras *et al.*, 1995). In dry cows, one strain of *Saccharomyces cerevisiae* was shown to increase propionate and decrease acetate, whereas another one had no influence on ruminal molar VFA proportions highlighting variable responses *in vivo* (Chung *et al.*, 2011).

A comprehensive meta-analysis of data from 77 experiments concluded that yeast supplements increase total VFA concentration on average by 5.4% (Desnoyers *et al.*, 2009). Relative to the control, live yeast treatments A and B resulted in mean changes in total VFA concentration of -1.4 and +4.5%, respectively. In growing cattle, probiotic yeasts have been reported to result in variable, and often non-significant differences in ruminal CH₄ production of between -3 and +6% (McGinn *et al.*, 2004). However, the effect of yeasts on rumen fermentation appears to be strain-dependent (Newbold *et al.*, 1995), with the corollary that effects on methanogenesis would also be influenced by strain type. In the present experiment, administration of live yeasts strains decreased CO₂ production with numerical differences in ruminal CH₄ production compared with the control (-10.3 and -8.6% for live yeasts A and B, respectively).

Treatments did not alter significantly the abundance of microbial groups or targeted ruminal cellulolytic bacterial species. Diet composition, including the amount and type of readily fermentable carbohydrates (Lettat *et al.*, 2012), and the digestibility of NDF in forages

(Guedes *et al.*, 2008) are important factors influencing animal responses to microbial additives, owing to the likelihood of different interactions between the additive and rumen microbial populations. It has been suggested that change-over designs may not be the most appropriate for assessing the effects of live yeast effects on rumen function due to possible treatment carry-over effects on the rumen microbiota (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2012). In the present experiment, a 14 d washout between treatments was used to minimize these effects.

Plant oils and oilseeds may increase molar proportions of propionate at the expense of acetate and/or butyrate depending on the composition of the basal diet (Chelikani *et al.*, 2004; Beauchemin and McGinn, 2006; Shingfield *et al.*, 2008). Camelina seeds or meal have been shown to lower molar proportions of acetate and increase those of propionate and valerate in rumen VFA for cows fed maize silage (Hurtaud and Peyraud, 2007). In contrast, the CO treatment resulted in minimal changes in rumen VFA. The apparent discrepancy between experiments may relate to the form in which camelina lipid is included in the diet and the composition of other feed ingredients. Experimental silage did not contain substantial amounts of lactic acid that is known to result in a rumen fermentation pattern containing relatively high molar proportion of propionate (Huhtanen *et al.*, 2007). Differential rumen fermentation responses to fat supplements may also be related to inclusion rate and the amount of lipid in the basal diet (Grainger and Beauchemin, 2011).

Dietary supplements of camelina oil resulted in a 4.9% decrease in CH₄ production per percentage increase in diet DM. The magnitude of this response is similar to a value of 4.8% for cows fed diets containing 58 g of linseed oil/kg diet DM (Martin *et al.*, 2008). Decreases in ruminal CH₄ and CO₂ emissions on the CO treatment of 29.5 and 34.3%, respectively can be explained, at least to some extent, by the associated changes in DMI (-12.1%). Supplementing the diet of growing cattle with 46 g/kg of rapeseed oil/kg diet DM were also reported to lower absolute CH₄ emissions or loss of CH₄ as a proportion of GE intake (Beauchemin and McGinn, 2006). However, ruminal CH₄ production as a percentage of DE intakes did not differ among treatments, indicating that changes in ruminal methanogenesis to rapeseed oil were due to lowered intake of DM and DE. However, CO resulted in numerical decreases in ruminal CH₄ when expressed per unit of total tract OM digestion or kg of milk of -18.4 and -16.1%, respectively, compared with the control. Stoichiometric considerations (Moss *et al.*, 2000) predict hydrogen production during the fermentation of pyruvate to major VFA of 57.9 and 55.4 mmol/L for the control and CO, respectively, which could be

considered as evidence of specific FA in camelina oil, including 18:2n-6 and 18:3n-3 influencing the utilization of metabolic hydrogen in the rumen. Both 18:2n-6 and 18:3n-6 exert toxic effects on ciliate protozoa and inhibit the growth of cellulolytic bacteria involved in fiber digestion and hydrogen production that may result in the direct inhibition of ruminal methanogens (Martin *et al.*, 2010).

In the present study, the abundance of protozoa in the rumen did not differ between CO and the control based on the analysis of samples collected pre-feeding. Furthermore, CO did not affect the abundance of fibrolytic bacteria, despite a tendency to increase the *R. flavefaciens* population. There are no reports on the effects of camelina oil on rumen microbial populations, but the FA composition of camelina oil is more similar to linseed oil than other plant oils. Earlier studies have reported that linseed oil had no effect on rumen microbial populations in samples collected before feeding, but decreased protozoal numbers with no influence on fibrolytic bacteria in samples collected 3h post-feeding (Mosoni *et al.*, 2008). It is possible that the lack of treatment effects on rumen protozoal numbers in this study may be due to the time of sampling. Incubations with crushed linseeds and sunflower seeds were also shown to lower CH₄ production without changes in protozoal numbers *in vitro*, suggesting that other mechanisms than the inhibition of protozoa, including changes in molar VFA proportions or activation of other hydrogen sinks such as reductive acetogenesis may be involved (Machmüller *et al.*, 1998). Even though total CH₄ production was decreased, the abundance of ruminal methanogens was not affected, suggesting that rather than influencing numbers, camelina oil may modulate the diversity or activity of this microbial population (Popova *et al.*, 2011).

Milk Production

In the present study, live yeast supplements had no influence on milk yield, composition, or energy secretion in milk consistent with no changes in intake or digestibility compared with the control. A recent meta-analysis based on data from 14 experiments including measurements of more than 1,600 cows fed a range of diets indicated that live yeasts can be expected to improve fat corrected milk yield and stimulate an increase in milk protein and fat secretion (De Ondarza *et al.*, 2010). The findings of other meta-analysis, have also shown that yeast supplements increase milk yield, and identified the level of DM intake, dietary forage:concentrate ratio, and concentrate NDF and CP content as being important factors influencing the magnitude of milk production responses (Desnoyers *et al.*, 2009).

Compared with the control, CO lowered the yields of milk, milk fat, protein, and lactose. Earlier studies have shown that inclusion of camelina oil (14.9 g/kg DM) or expeller (106 g/kg DM) have no adverse effects in cows fed red clover silage diets (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011), whereas camelina meal (95 g/kg DM), but not camelina seeds (29 g/kg DM), decrease milk protein yield in cows fed maize silage based diets (Hurtaud and Peyraud, 2007). It is generally accepted that energy intake is the major nutritional factor influencing milk protein synthesis, but the relation between increases in metabolizable energy and milk protein secretion only holds true for non-lipid sources (Lock and Shingfield, 2004). Depending on inclusion rate, dietary lipid supplements typically result in a 1-4 g/kg decrease in milk protein concentration (Wu and Huber, 1994). Often the decrease has been attributed to increases in milk yield rather than lowered milk protein output, but there is evidence to indicate that the decrease in milk protein content is not simply due to dilution, but reflects true physiological responses to fat supplements (Wu and Huber, 1994; Garnsworthy, 1997). Compared with the control, CO lowered milk fat output that was related to the overall decrease in milk yield, rather than a decrease in milk fat content. Previous studies have demonstrated that both camelina meal and camelina seeds induce milk fat depression (**MFD**) in cows fed maize silage based diets (Hurtaud and Peyraud, 2007). It is well established that plant oils induce MFD on low fibre high starch diets, a phenomena associated with alterations in ruminal lipid metabolism resulting in the formation and accumulation of specific biohydrogenation intermediates that directly inhibit milk fat synthesis (Bauman and Griinari, 2003). Even though CO enriched milk fat *trans*-9, *cis*-11 CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA, biohydrogenation intermediates implicated in diet-induced MFD (Shingfield and Griinari, 2007), the increases observed were not, in isolation, large enough to explain the decrease in milk fat secretion.

Milk Fatty Acid Composition

Live yeasts do not contain substantial amounts of lipid and therefore the effects on milk fat composition could be expected to be confined to alterations in the relative abundance of OBCFA and specific biohydrogenation intermediates rather than changes in the relative proportions of FA synthesized *de novo* in mammary glands or derived from the peripheral circulation. Ruminal administration of live yeasts influenced, albeit to a limited extent, the overall composition of milk fat or concentrations of specific OBCFA. These findings suggest that live yeasts A and B did not induce substantial changes in lipolysis or biohydrogenation of

dietary FA in the rumen, microbial lipid synthesis or on the relative abundance of specific ruminal microbial populations.

Compared with the control, CO resulted in a substantial decrease in milk fat SFA originating from lowered 6- to 16-carbon FA concentrations that represents a typical response to relatively high amounts of plant oils in the diet (Chilliard *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008a; Shingfield *et al.*, 2013). Much of the decrease can be attributed to an increase in the availability of 18-carbon and longer FA inhibiting acyl-CoA carboxylase activity and decreasing 6:0 to 16:0 synthesis *de novo* in the mammary glands (Chilliard *et al.*, 2007).

Dietary supplements of camelina oil resulted in a higher intake of 18:0, but this alone does not account for the increase in milk fat 18:0 concentrations on the CO treatment. This apparent discrepancy can be explained by the much higher intake of 18-carbon unsaturated FA on the CO treatment which, following complete hydrogenation in the rumen increases the availability of 18:0 for absorption in the bovine small intestine. It is well established that plant oils increase the flow of 18:0 at the omasum or duodenum in lactating cows (Glasser *et al.*, 2008b), in an amount several fold higher than supplied by the diet.

Compared with other treatments, CO elevated milk fat *cis*-MUFA concentrations principally due to increases in *cis*-9 18:1, that can be attributed to both a higher intake and ruminal escape of *cis*-9 18:1 as well as increased availability of 18:0 for desaturation in the mammary glands. Studies involving administration of labeled substrate or measurements of arterio-venous differences indicate that between 44 and 78% of 18:0 extracted from the peripheral circulation is desaturated in the mammary glands of lactating cows (Shingfield *et al.*, 2013).

For all treatments, *cis*-9 16:1 represented the second most abundant *cis* MUFA in milk fat, more than 50% of which is synthesized endogenously via the action of stearoyl CoA desaturase on 16:0 in the mammary glands (Shingfield *et al.*, 2013). Milk fat also contained numerous *cis* and *trans* 16:1 isomers that may originate from the isomerization of *cis*-9 16:1 and *trans*-3 16:1 or oxidation of 18:1 biohydrogenation intermediates in the rumen (Destailats *et al.*, 2000).

Compared with the control, CO increased total *trans* FA content as a result of elevated *trans* 16:1, *trans* 18:1, and *trans* 18:2 concentrations. Much of the increase in milk *trans* FA was associated with *trans*-11 18:1, that represents a common intermediate formed during the penultimate step of PUFA biohydrogenation in the rumen (Harfoot and Hazlewood, 1988). Enrichment of *trans* FA in milk on the CO treatment can be attributed to the incomplete

biohydrogenation of unsaturated FA in camelina oil. Despite of the differences in milk *trans* 18:1 concentrations, the distribution of individual isomers did not differ substantially among treatments, indicating that camelina oil did not induce substantial alterations in the major biohydrogenation pathways in the rumen. Compared with previous reports, the increases in milk *trans*-11 18:1 concentrations to CO were lower than expected, with the implication that unsaturated 18-carbon FA were extensively biohydrogenated to 18:0 in the rumen. Camelina oil also enriched milk fat *cis*-9, *trans*-11 CLA concentrations, responses that are in the range that could be expected when plant oil supplements rich in 18:2n-6 and 18:3n-3 are offered in high forage diets or at pasture, but lower than for rations containing high proportions of concentrates (Chilliard *et al.*, 2007; Shingfield *et al.*, 2013).

Even though the intakes of 18:2n-6 and 18:3n-3 were increased on the CO treatment, enrichment of 18:3n-3 in milk was marginal, whereas 18:2n-6 abundance was decreased, changes that are in line with earlier reports on milk FA composition responses to camelina oil (Halmemies-Beauchet-Filleau *et al.*, 2011), seeds or expeller (Hurtaud and Peyraud, 2007).

Lower concentrations of most OBCFA in milk on the CO treatment are consistent with milk fat composition responses to plant oils in lactating cows (Glasser *et al.*, 2008a). While the appearance of OBCFA in milk fat originate principally from microbial lipids synthesized *de novo* in the rumen (Vlaeminck *et al.*, 2006), changes in the relative concentrations in milk, may at least in part, be related to a decrease in microbial synthesis or alterations in the relative abundance of specific populations of bacteria and protozoa in the rumen.

CONCLUSIONS

Ruminal administration of live yeast strains A and B had relatively minor effects on ruminal CH₄ and CO₂ production, rumen fermentation, milk production or nutrient utilization in cows fed diets based on grass silage. Supplements of camelina oil decreased ruminal CH₄ and CO₂ production, changes that were accompanied by lowered intake, the yields of milk and milk constituents, marginal decreases in total tract nutrient digestibility, and altered milk FA composition, in the absence of changes in ruminal fermentation and microbial populations. Decreases in CH₄ production to camelina oil were explained, in the most part, by the lower intake, with some evidence to suggest that other mechanisms, including changes in rumen VFA proportions may also be involved. Live yeast strains had minimal influence on milk FA composition, whereas inclusion of camelina oil in the diet decreased 8:0 to 16:0 even chain FA and total SFA, and increased 18:0, total 18:1, 18:2, CLA, 18:3 n-3, total 20- and,

22- carbon, MUFA, PUFA, and total *trans* FA. The impact of these changes in milk fat composition on human health merits further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their appreciation to staff in the metabolism unit at MTT for technical support, care of experimental animals, and assistance in sample collection. Competitive funding from the Finnish Ministry of Agriculture as part of the GreenDairy project is gratefully acknowledged. Plasmids used for protozoa quantification were a generous donation from Dr F. Ossa (Institut Rosell/Lallemand, Montréal, Canada).

REFERENCES

- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:1598–1624.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203–227.
- Beauchemin, K. A., and S. M. McGinn. 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84:1489–1496.
- Boadi, D. A., K. M. Wittenberg, and A. D. Kennedy. 2002. Validation of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique for measurement of methane and carbon dioxide production by cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 82:125–131.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, and D. Massé. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can. J. Anim. Sci.* 84:319–335.
- Bustin, S.A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G. L. Shipley, J. Vandesompele, and C. T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55:611–622.
- Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, and P. Gouet. 1995. *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3466–3467.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5–26.
- Chaucheyras-Durand, F., E. Chevaux, C. Martin, and E. Forano. 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. Pages 119-152 in *Probiotic in Animals*, E. C. Rigobelo, ed. Intech, Rijeka, Croatia.
- Chelikani, P. K., J. A. Bell, and J. J. Kennelly. 2004. Effect of feeding or abomasal infusion of canola oil in Holstein cows 1. Nutrient digestion and milk composition. *J. Dairy Res.* 71:279–287.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855.

- Chung, Y.-H., N. D. Walker, S. M. McGinn, and K. A. Beauchemin. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 2431–2439.
- De Ondarza, M. B., C. J. Sniffen, L. Dussert, E. Chevaux, J. Sullivan, and N. Walker. 2010. Case Study: Multiple-study analysis of the effect of live yeast on milk yield, milk component content and yield, and feed efficiency. *Prof. Anim. Sci.* 26:661–666.
- Denman, S.E., and C.S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58:572–82.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620–1632.
- Destailats, F., R. L. Wolff, D. Precht, and J. Molkentin. 2000. Study of individual *trans*- and *cis*-16:1 isomers in cow, goat and ewe cheese fats by gas-liquid chromatography with emphasis on the *trans*- Δ 3 isomer. *Lipids* 35:1027–1032.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62:323–335.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2008. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63:141–142.
- Erasmus, L. J., P. H. Robinson, A. Ahmadi, R. Hinders, and J. E. Garrett. 2005. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:219–239.
- FAO, 2003. World Agriculture: Towards 2015/2030. A FAO Perspective. FAO, Rome.
- Fonty, G., and F. Chaucheyras-Durand. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. Pages 741–750 in *Proceedings of the Second Probiotic Conference, Košice, 2004, Slovakia*.
- Garnsworthy, P. C. 1997. Fats in dairy cow diets. Pages 87–104 in *Advances in Animal Nutrition* P. C. Garnsworthy and J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Glasser, F., A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2008a. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 91:4687–4703.
- Glasser, F., P. Schmidely, D. Sauvant, and M. Doreau. 2008b. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal* 2:691–704.
- Grainger, C., and K. A. Beauchemin. 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166–167:308–320.
- Guedes, C. M., D. Goncalves, M. A. M. Rodrigues, and A. Dias-da-SILVA. 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:27–40.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., T. Kokkonen, A. M. Lampi, V. Toivonen, K. J. Shingfield, and A. Vanhatalo. 2011. Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. *J. Dairy Sci.* 94:4413–4430.
- Harfoot, C. G., and G. P. Hazlewood. 1988. Lipid metabolism in the rumen. Pages 285–322 in *The Rumen Microbial Ecosystem*. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Hristov, A.N., M. Vander Pol, M. Agle, S. Zaman, C. Schneider, P. Ndegwa, V. K. Vaddella, K. Johnson, K. J. Shingfield, and S. K. R. Karnati. 2009. Effect of lauric acid and coconut oil on

- ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 92:5561–5582.
- Huhtanen, P., and A. N. Hristov. 2009. A meta-analysis of the effects of protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3222–3232.
- Huhtanen, P., M. Rinne, and J. Nousiainen. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake in cows: A revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal* 1:758-770.
- Hurtaud, C., and J. L. Peyraud. 2007. Effects of feeding Camelina (seeds or meal) on milk fatty acid composition and butter spreadability. *J. Dairy Sci.* 90:5134–5145.
- Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan, J. Callan, B. Flynn, and F. P. O'Mara. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84:162–170.
- Lettat, A., P. Nozière, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger, and C. Martin. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiol.* 12:142.
- Litherland, N. B., S. Thire, A. D. Beaulieu, C. K. Reynolds, J. A. Benson, and J. K. Drackley. 2005. Dry matter is decreased more by abomasal infusion of unsaturated free fatty acids than by unsaturated triglycerides. *J. Dairy Sci.* 88:632–643.
- Lock, A. L., and K. J. Shingfield. 2004. Optimizing milk composition. Pages 107-88 in *UK Dairying: Using science to meet consumer's needs*. E. Kebreab, J. Mills, D. Beever, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Lwin, K. O., M. Hayakawa, T. Ban-Tokuda, and H. Matsui. 2011. Real-time PCR assays for monitoring anaerobic fungal biomass and population size in the rumen. *Curr. Microbiol.* 62:1147–1151.
- Machmüller, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric. Ecos. Environ.* 112:107–114.
- Machmüller, A., D. A. Ossowski, M. Wanner, and M. Kreuzer. 1998. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation *in vitro* (Rusitec). *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:117–130.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4:351–365.
- Martin, C., J. Rouel, J. P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86:2642–2650.
- McGinn, S. M., K. A. Beauchemin, T. Coates, and D. Colombatto. 2004. Methane emissions from beef cattle: effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82:3346–3356.
- Mosoni P., Y. Rochette, D. Graviou, C. Martin, E. Forano, and D. P. Morgavi. 2008. Influence of protozoa on the number of cellulolytic bacteria and methanogens in the rumen of sheep evaluated by qPCR. 6th INRA RRI Symp. Gut Microb., Clermont-Ferrand, France, 46p.
- Mosoni, P., C. Martin, E. Forano, and D. P. Morgavi. 2011. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* 89:783–791.
- Moss, A. R., J. Jouany, and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootechnol.* 49:231–253.
- MTT Agrifood Research Finland. 2006. Finnish feed tables and feeding recommendations: 2006. Accessed 13th November 2010. <http://www.mtt.fi/mmts/pdf/mmts106.pdf>.

- Newbold, C. J., R. J. Wallace, and F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76:249–261.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, X. B. Chen, and F. McIntosh. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73:1811–1818.
- Ohene-Adjei, S., R. M. Teather, M. Ivan, and R. J. Forster. 2007. Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4609–4618.
- Regina, K., and L. Alakukku. 2010. Greenhouse gas fluxes in varying soils types under conventional and no-tillage practices. *Soil Tillage Res.* 109:144–152.
- Shingfield, K. J., and J. M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109:799–816.
- Shingfield K. J., M. Bonnet, and N. D. Scollan. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7(S1):132–162.
- Shingfield K. J., S. Jaakkola, and P. Huhtanen. 2001. Effects of level of nitrogen fertiliser application and various nitrogenous supplements on milk production and nitrogen utilization of dairy cows fed grass silage-based diets. *Anim. Sci.* 73:541–554.
- Shingfield K. J., S. Jaakkola, and P. Huhtanen. 2002. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on diet digestibility, rumen fermentation, blood metabolite concentrations and nutrient utilization of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97:1–21.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Arölä, K. V. V. Nurmela, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165–179.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Vanhatalo, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2008. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *Br. J. Nutr.* 99:971–983.
- Sjaunja, L. O., L. Baevre, L. Junkkarinen, J. Pedersen, and J. Setälä. 1990. A nordic proposal for an energy corrected milk (ECM) formula. Page 156 in Proceedings of the 27th biennial session of the International Committee for Animal Recording (ICAR), Paris, France.
- Smith, P., D. Martino, Z. Cai, D. Gwary, H. Janzen, P. Kumar, B. McCarl, S. Ogle, F. O'Mara, C. Rice, B. Scholes, and O. Sirotenko. 2007. Agriculture. In *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. B. Metz, O.R. Davidson, P.R. Bosch, R. Dave, L.A. Meyer, ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Sylvester, J. T., S. K. R. Karnati, Z. Yu, C. J. Newbold, and J. L. Firkins. 2005. Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *J. Dairy Sci.* 88:2083–2095.
- US-EPA, 2006. Global Anthropogenic Non-CO₂ Greenhouse Gas Emissions: 1990-2020. United States Environmental Protection Agency, EPA 430-R-06-003, June 2006. Washington, D.C., <<http://www.epa.gov/nonco2/econ-inv/downloads/GlobalAnthroEmissionsReport.pdf>> accessed 26 January 2013.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389–417.
- Wu, Z., and J. T. Huber. 1994. Relationship between dietary-fat supplementation and milk protein-concentration in lactating cows - a review. *Livest. Prod. Sci.* 39:141–155.

Table 1. Formulation and chemical composition of experimental diets

	Treatment ¹			
	Control	A	B	CO
Ingredient (g/kg DM)				
Grass silage ²	500	500	500	500
Rolled barley	225	225	225	197
Molassed sugar beet pulp	120	120	120	105
Solvent extracted rapeseed meal	140	140	140	123
Camelina oil ³	-	-	-	60
Vitamin and mineral premix ⁴	15.0	15.0	15.0	15.0
Chemical composition (g/kg DM, unless otherwise stated)				
DM (g/kg as fed)	327	327	327	328
OM	913	913	913	917
CP	163	163	163	152
NDF	401	401	401	387
Potentially digestible NDF	325	325	325	313
ADF	228	228	228	221
Water soluble carbohydrate	32.7	32.7	32.7	29.0
Starch	120	120	120	106
Fatty acids	21.6	21.6	21.6	70.6
Gross energy (MJ/kg DM)	18.7	18.7	18.7	20.0

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of probiotic live yeast strains A or B or camelina oil (CO).

²Mean fermentation characteristics of experimental silage: pH 4.55, in DM (g/kg) lactic acid, 37.8; acetic acid 84.1; propionic acid, 16.1; butyric acid, 0.6; soluble N (g/kg total N) 693, ammonium N (g/kg total N) 127, GE (MJ/kg DM) 19.0.

³Gross energy content 40.2 MJ/kg DM

⁴Proprietary vitamin and mineral supplement (3, Onni-Kivennäinen, Melica Finland Ltd., Vaasa, Finland) declared as containing (g/kg) calcium (205), magnesium (72), sodium (85), phosphorus (27), zinc (1.46), manganese (0.35), copper (0.27); (mg/kg), iodine (39), cobalt (27), selenium (20); (IU/g) retinyl acetate (120), cholecalciferol (25), and dl- α tocopheryl acetate (0.34).

Table 2. Fatty acid composition of grass silage, concentrate supplements, and camelina oil

Fatty acid (g/100g FA)	Ingredient		
	Silage	Concentrate	Camelina oil
12:0	0.30	0.03	0.01
14:0	0.64	0.28	0.06
16:0	23.3	14.9	5.62
<i>trans</i> -3 16:1	2.18	-	-
<i>cis</i> -9 16:1	0.18	0.62	0.08
18:0	1.62	1.40	2.39
<i>cis</i> -9 18:1	4.23	26.9	11.6
<i>cis</i> -11 18:1	0.50	5.46	0.71
18:2n-6	18.0	39.4	15.7
18:3n-3	35.6	6.54	37.0
20:0	0.70	0.36	1.51
<i>cis</i> -11 20:1	0.33	0.76	15.1
20:2n-6	0.00	0.09	2.15
22:0	1.10	0.32	0.32
<i>cis</i> -13 22:1	0.21	0.18	5.25
22:2n-6	0.00	0.00	0.16
24:0	0.97	0.35	0.17
26:0	1.14	0.07	-
28:0	0.91	0.01	-
30:0	0.61	0.01	-
Unidentified	4.49	0.19	-
Others ¹	2.92	2.16	2.21
Σ SFA	32.8	18.3	10.2
Σ MUFA	6.98	35.1	34.6
Σ PUFA	55.7	46.5	55.2
Total fatty acids (g/kg DM)	13.8	30.0	954

¹Includes the sum of 15:0 *anteiso*, 15:0, 16:1 (n = 5 isomers), 16:2 (n = 2), 17:0, 17:1 (double bond position and geometry indeterminate), 18:1 (n = 9), 18:0 *iso*, 19:0, 18:2 (n = 6), 18:3 (n = 2), 20:1 (n = 4), 21:0, 18:4n-3, *cis*-15 22:1, 20:4n-6, 23:0, *cis*-14 23:1, *cis*-15 24:1, 25:0, *cis*-17 26:1, 29:0, and 10-*oxo*-18:0.

Table 3. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on nutrient intake in lactating cows

Intake (kg/d, unless otherwise stated)	Treatment ¹				SEM	<i>P</i> -value
	Control	A	B	CO		
DM	19.0 ^a	18.4 ^{ab}	19.2 ^a	16.7 ^b	0.91	0.05
OM	17.2 ^a	16.7 ^{ab}	17.4 ^a	15.2 ^b	0.83	0.06
CP	3.09 ^a	3.01 ^a	3.13 ^a	2.53 ^b	0.143	< 0.01
NDF	7.61 ^a	7.39 ^a	7.68 ^a	6.45 ^b	0.359	< 0.05
Potentially digestible NDF	6.16 ^a	5.99 ^a	6.22 ^a	5.23 ^b	0.291	< 0.05
ADF	4.32 ^a	4.20 ^a	4.37 ^a	3.68 ^b	0.205	< 0.05
Water soluble carbohydrate	0.62 ^a	0.60 ^a	0.63 ^a	0.49 ^b	0.003	< 0.01
Starch	2.28 ^a	2.22 ^a	2.30 ^a	1.77 ^b	0.105	< 0.01
Gross energy (MJ/d)	355	347	360	330	17.6	0.35
Fatty acids (g/d)						
12:0	0.50	0.49	0.50	0.48	0.024	0.52
14:0	1.61 ^b	1.57 ^b	1.63 ^b	1.88 ^a	0.092	< 0.05
16:0	71.7 ^b	69.8 ^b	72.6 ^b	109 ^a	4.90	< 0.001
<i>trans</i> -3 16:1	3.05 ^a	2.97 ^{ab}	3.09 ^a	2.68 ^b	0.147	< 0.05
<i>cis</i> -9 16:1	1.87 ^b	1.82 ^b	1.89 ^b	2.19 ^a	0.107	< 0.05
18:0	5.94 ^b	5.79 ^{1b}	6.02 ^b	26.0 ^a	1.03	< 0.001
<i>cis</i> -9 18:1	76.5 ^b	74.5 ^b	77.6 ^b	163 ^a	6.82	< 0.001
<i>cis</i> -11 18:1	15.1 ^b	14.7 ^b	15.3 ^b	18.0 ^a	0.88	< 0.05
18:2n-6	129 ^b	126 ^b	131 ^b	242 ^a	10.3	< 0.001
18:3n-3	67.1 ^b	65.3 ^b	67.9 ^b	385 ^a	14.9	< 0.001
20:0	1.93 ^b	1.88 ^b	1.95 ^b	15.0 ^a	0.58	< 0.001
<i>cis</i> -11 20:1	2.48 ^b	2.41 ^b	2.51 ^b	135 ^a	5.14	< 0.001
20:2n-6	0.25 ^b	0.24 ^b	0.25 ^b	19.2 ^a	0.73	< 0.001
22:0	2.39 ^b	2.32 ^b	2.42 ^b	4.82 ^a	0.202	< 0.001
<i>cis</i> -13 22:1	0.77 ^b	0.74 ^b	0.77 ^b	47.2 ^a	1.81	< 0.001
22:2n-6	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	1.43 ^a	0.053	< 0.001
24:0	2.26 ^b	2.21 ^b	2.30 ^b	3.42 ^a	0.152	< 0.001
26:0	1.78	1.73	1.79	1.61	0.088	0.14
28:0	1.31 ^a	1.27 ^a	1.32 ^a	1.14 ^b	0.065	0.06
30:0	0.88 ^a	0.86 ^a	0.89 ^a	0.77 ^b	0.044	0.06
Other	16.6 ^b	16.1 ^b	16.7 ^b	33.6 ^a	1.38	< 0.001
Σ SFA	93.9 ^b	91.5 ^b	95.1 ^b	168 ^a	7.29	< 0.001
Σ MUFA	102 ^b	99.3 ^b	103 ^b	387 ^a	15.2	< 0.001
Σ PUFA	200 ^b	195 ^b	203 ^b	653 ^a	26.0	< 0.001
Total	403 ^b	392 ^b	408 ^b	1213 ^a	48.7	< 0.001

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

Table 4. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on rumen fermentation characteristics and rumen microbial populations in lactating cows

	Treatment ¹				SEM	<i>P</i> -value
	Control	A	B	CO		
pH	6.65 ^a	6.65 ^a	6.52 ^{ab}	6.40 ^b	0.065	0.06
Ammonia-N (mmol/L)	6.43	6.42	6.28	5.53	0.621	0.31
Total VFA (mmol/L)	98.6	97.2	103	100	3.60	0.67
Molar proportion (mmol/mol)						
Acetate	672	670	668	675	4.2	0.67
Propionate	189	192	192	198	4.0	0.22
Butyrate	86.9	88.6	89.4	80.7	3.45	0.21
Isobutyrate	10.0 ^a	9.70 ^{ab}	9.16 ^b	7.73 ^c	0.225	< 0.001
Valerate	15.9 ^a	15.0 ^{ab}	15.7 ^a	14.2 ^b	0.41	0.06
Isovalerate	17.0	17.1	16.6	14.5	0.91	0.17
Caproate	9.59 ^a	8.94 ^{ab}	9.25 ^a	7.92 ^b	0.392	0.06
Molar ratio						
Acetate:propionate	3.58	3.52	3.47	3.41	0.081	0.45
Microbial numbers (log gene copies/μg of DNA)						
Total bacteria	10.08	10.13	10.16	10.13	0.032	0.44
Methanogens	7.27	7.35	7.30	7.30	0.034	0.26
Protozoa	7.63	7.59	7.60	7.42	0.083	0.23
Fungi	6.10	6.07	5.98	6.02	0.056	0.43
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	7.64	7.58	7.77	7.61	0.071	0.31
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	6.50	6.34	6.47	6.75	0.100	0.12

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

Table 5. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on ruminal gas production in lactating cows

	Treatment ¹				SEM	<i>P</i> -value
	Control	A	B	CO		
Ruminal methane						
g/d	407 ^a	365 ^a	372 ^a	287 ^b	22.3	< 0.05
g/kg OMD ²	32.7	30.4	29.6	27.9	2.12	0.51
g/kg NDFD	57.8	53.3	52.5	49.7	3.60	0.51
g/kg milk	15.6	13.8	15.0	13.1	1.33	0.27
% of GEI	6.31	5.82	5.73	4.86	0.368	0.14
Ruminal carbon dioxide						
g/d	3,493 ^a	3,006 ^a	3,172 ^a	2,295 ^b	226.4	< 0.05
g/kg OMD	281	251	252	220	16.8	0.18
g/kg NDFD	497	440	447	392	28.5	0.18
g/kg milk	133 ^a	114 ^{ab}	127 ^a	104 ^b	10.4	0.09

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

²OMD, total organic matter digested in the digestive tract; NDFD, total NDF digested in the digestive tract; GEI, gross energy intake

Table 6. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on apparent total tract digestibility of nutrients, and energy and nitrogen metabolism in lactating cows

	Treatment ¹				SEM	P-value
	Control	A	B	CO		
Apparent digestibility (g/kg, unless otherwise stated)						
OM	724	716	724	693	8.5	0.13
CP	711	710	712	688	10.5	0.31
NDF	585	570	589	545	13.0	0.18
Potentially digestible NDF	691	680	693	655	11.4	0.17
ADF	595	582	600	557	13.9	0.22
Starch	982 ^a	981 ^{ab}	983 ^a	977 ^b	1.1	0.05
Gross energy (KJ/MJ)	709 ^a	700 ^a	709 ^a	675 ^b	8.3	0.08
Energy (MJ/d)						
Intake	355	346	359	333	17.7	0.36
Feces	104	104	105	107	5.2	0.70
Urine	12.8 ^a	11.6 ^{ab}	12.2 ^a	10.9 ^b	0.77	0.06
Methane	21.2 ^a	19.3 ^a	20.2 ^a	15.1 ^b	1.38	0.06
Milk	83.3	79.9	78.8	74.7	7.46	0.19
Digestible energy	252	242	254	225	13.5	0.20
Metabolizable energy	218	211	222	199	12.8	0.43
Nitrogen (g/d)						
Intake	494 ^a	481 ^a	500 ^a	405 ^b	22.9	< 0.01
Feces	143 ^a	139 ^a	144 ^a	126 ^b	5.7	0.07
Urine	184 ^a	179 ^a	181 ^a	153 ^b	11.5	< 0.05
Milk	138 ^a	132 ^a	129 ^{ab}	120 ^b	10.0	< 0.05
Retained N	32.1	33.5	49.0	9.57	10.62	0.14
Milk N/intake N	0.274 ^{ab}	0.270 ^{ab}	0.254 ^b	0.290 ^a	0.0203	< 0.05

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

Table 7. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on milk yield and milk composition in lactating cows

	Treatment ¹				SEM	P-value
	Control	A	B	CO		
Yield						
Milk (kg/d)	27.0 ^a	26.5 ^a	25.6 ^{ab}	22.4 ^b	2.30	< 0.05
ECM (kg/d) ²	26.4 ^a	25.5 ^a	25.7 ^a	22.1 ^b	2.18	< 0.05
Fat (g/d)	1,070 ^a	1,020 ^{ab}	1,062 ^a	920 ^b	96.4	< 0.05
Protein (g/d)	859 ^a	827 ^a	824 ^{ab}	696 ^b	57.5	< 0.05
Lactose (g/d)	1,240 ^a	1,228 ^a	1,183 ^a	1,017 ^b	115.7	< 0.05
Composition (g/kg)						
Fat	39.9	38.3	41.6	40.8	1.31	0.24
Protein	32.4 ^a	31.2 ^b	32.4 ^a	31.3 ^b	1.08	0.08
Lactose	45.8	46.3	46.2	44.6	1.11	0.45

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

² Energy corrected milk yield calculated according to Sjaunja *et al.*, 1990.

Table 8. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on milk fatty acid composition in lactating cows

Fatty acid (g/100 g FA)	Treatment ¹				SEM	P-value
	Control	A	B	CO		
4:0	3.10	3.18	3.11	3.18	0.225	0.98
6:0	1.90 ^a	1.93 ^a	1.88 ^a	1.56 ^b	0.116	< 0.05
8:0	1.12 ^a	1.11 ^a	1.11 ^a	0.79 ^b	0.065	< 0.01
10:0	2.66 ^a	2.62 ^a	2.60 ^a	1.55 ^b	0.132	< 0.001
<i>cis</i> -9 10:1	0.296 ^a	0.276 ^b	0.303 ^a	0.193 ^c	0.0131	< 0.001
12:0	3.24 ^a	3.13 ^a	3.17 ^a	1.84 ^b	0.126	< 0.001
<i>cis</i> -9 12:1	0.082 ^a	0.075 ^a	0.083 ^a	0.043 ^b	0.0041	< 0.001
<i>trans</i> -9 12:1	0.081 ^a	0.073 ^a	0.082 ^a	0.046 ^b	0.0042	< 0.001
14:0	12.1 ^a	11.8 ^a	11.9 ^a	8.10 ^b	0.32	< 0.001
<i>cis</i> -9 14:1	1.12 ^a	1.02 ^a	1.15 ^a	0.77 ^b	0.073	< 0.001
<i>trans</i> -9 14:1	0.013 ^a	0.011 ^a	0.013 ^a	0.009 ^b	0.0007	< 0.05
Σ 15	2.36 ^a	2.31 ^a	2.22 ^a	1.55 ^b	0.126	< 0.01
16:0	34.4 ^a	35.8 ^a	34.6 ^a	21.3 ^b	1.32	< 0.001
Σ <i>cis</i> 16:1	2.20 ^a	2.09 ^a	2.23 ^a	1.64 ^b	0.153	< 0.05
Σ <i>trans</i> 16:1	0.230 ^b	0.227 ^b	0.236 ^b	0.456 ^a	0.0148	< 0.001
Σ 16:1	2.43	2.32	2.46	2.10	0.152	0.14
Σ 17	1.18 ^a	1.16 ^a	1.16 ^a	0.86 ^b	0.031	< 0.001
18:0	8.78 ^b	9.41 ^b	8.33 ^b	12.9 ^a	0.778	< 0.01
10- <i>oxo</i> -18:0	0.465 ^a	0.457 ^a	0.456 ^a	0.247 ^b	0.0430	< 0.001
13- <i>oxo</i> -18:0	0.022	0.023	0.023	0.017	0.0019	0.12
Σ <i>cis</i> 18:1	17.5 ^b	16.4 ^b	18.4 ^b	25.3 ^a	1.54	< 0.05
Σ <i>trans</i> 18:1	2.31 ^b	2.23 ^b	2.28 ^b	6.71 ^a	0.280	< 0.001
Σ 18:1	19.8 ^b	18.6 ^b	20.6 ^b	32.0 ^a	1.34	< 0.01
Σ 18:2 ²	1.71 ^b	1.63 ^b	1.69 ^b	2.65 ^a	0.095	< 0.001
Σ CLA ³	0.38 ^b	0.36 ^b	0.39 ^b	0.95 ^a	0.047	< 0.001
18:3n-3	0.454 ^b	0.437 ^b	0.437 ^b	0.489 ^a	0.0224	< 0.01
18:3n-6	0.015 ^a	0.016 ^a	0.016 ^a	0.007 ^b	0.0012	< 0.01
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:3	0.036 ^b	0.031 ^b	0.032 ^b	0.056 ^a	0.0050	< 0.05
20:0	0.178 ^b	0.169 ^b	0.146 ^b	1.69 ^a	0.056	< 0.001
Σ <i>cis</i> 20:1	0.247 ^b	0.211 ^b	0.218 ^b	2.48 ^a	0.089	< 0.001
Σ <i>trans</i> 20:1	0.040 ^b	0.031 ^b	0.031 ^b	0.585 ^a	0.0293	< 0.001
Σ 20:1	0.287 ^b	0.242 ^b	0.250 ^b	3.07 ^a	0.112	< 0.001
20:2n-6	0.024 ^b	0.023 ^b	0.022 ^b	0.063 ^a	0.0044	< 0.001
20:3n-3	0.008 ^b	0.008 ^b	0.007 ^b	0.046 ^a	0.0033	< 0.001
20:3n-6	0.047 ^a	0.049 ^a	0.047 ^a	0.033 ^b	0.0068	< 0.05
20:4n-3	0.034 ^a	0.035 ^a	0.036 ^a	0.026 ^b	0.0034	< 0.05
20:4n-6	0.066 ^a	0.065 ^a	0.059 ^a	0.046 ^b	0.0068	< 0.05
20:5n-3	0.049 ^a	0.052 ^a	0.048 ^a	0.032 ^b	0.0038	< 0.05
22:0	0.054 ^b	0.057 ^b	0.050 ^b	0.157 ^a	0.0078	< 0.001
<i>cis</i> -9 22:1	0.011 ^b	0.011 ^b	0.011 ^b	0.054 ^a	0.0038	< 0.001
<i>cis</i> -13 22:1	0.014 ^b	0.012 ^b	0.012 ^b	0.232 ^a	0.0139	< 0.001
22:4n-6	0.018	0.018	0.020	0.013	0.0033	0.33
22:5n-3	0.060 ^a	0.055 ^a	0.055 ^a	0.038 ^b	0.0064	< 0.01
24:0	0.039 ^a	0.037 ^{ab}	0.035 ^b	0.031 ^c	0.0038	< 0.01
<i>cis</i> -15 24:1	0.010 ^b	0.010 ^b	0.010 ^b	0.028 ^a	0.0017	< 0.001

26:0	0.030 ^a	0.029 ^a	0.029 ^a	0.013 ^b	0.0025	< 0.001
Others ⁴	0.161 ^b	0.153 ^b	0.155 ^b	0.234 ^a	0.0088	< 0.001
Summary						
Σ <i>trans</i> fatty acids	3.37 ^b	3.21 ^b	3.30 ^b	11.8 ^a	0.412	< 0.001
Σ SFA	72.1 ^a	73.7 ^a	71.3 ^a	56.0 ^b	1.50	< 0.001
Σ MUFA	24.7 ^b	23.3 ^b	25.6 ^b	39.1 ^a	1.47	< 0.001
Σ PUFA	2.89 ^b	2.78 ^b	2.86 ^b	4.46 ^a	0.164	< 0.001
Total fatty acid (g/100g fat)	94.6	94.3	94.3	94.3	0.13	0.47

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

²Sum of 18:2 fatty acids excluding isomers of CLA.

³CLA, conjugated linoleic acid

⁴Sum of 11 fatty acids

Supplemental Table 1. Oligonucleotide primers used for real-time quantitative PCR

Microbial groups	Primer sets	Fragment length (bp)	Reference
Total bacteria	5'-AGCAGCCGCGGTAAT-3' 5'-CAGGGTATCTAATCCTGTT-3'	280	Edwards <i>et al.</i> , 2007; 2008
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	5'-GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA-3' 5'-CGCCTGCCCTGAACTATC-3'	121	Denman and McSweeney, 2006
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	5'-CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG-3' 5'-CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC-3'	132	Denman and McSweeney, 2006
Methanogenic archaea	5'-GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA-3' 5'-ACGGGCGGTGTGTGCAAG-3'	233	Ohene-Adjei <i>et al.</i> , 2007
Fungi	5'-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC-3' 5'-CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT-3'	120	Denman and McSweeney, 2006
Protozoa	5'-GCTTTCGWTGGTAGTGTATT-3' 5'-CTTGCCCTCYAATCGTWCT-3'	223	Sylvester <i>et al.</i> , 2005

Supplemental Table 2. Effect of dietary supplements two live yeast strains or camelina oil on milk 16:1, 18:1, and 20:1 composition in lactating cows

Fatty acid (mg/100 g FA)	Treatment ¹				SEM	P-value
	Control	A	B	CO		
16:1 (mg/100 g FA)						
<i>cis</i> -7 16:1	24.9	25.3	26.2	25.3	1.66	0.89
<i>cis</i> -9 16:1 ²	1,844 ^a	1,764 ^a	1,900 ^a	1,369 ^b	146.8	< 0.05
<i>cis</i> -10 16:1	19.3 ^b	16.4 ^c	18.7 ^b	26.1 ^a	1.06	< 0.001
<i>cis</i> -11 16:1	171	160	151	151	14.5	0.74
<i>cis</i> -12 16:1	21.2 ^b	21.1 ^b	18.8 ^b	39.9 ^a	1.35	< 0.001
<i>cis</i> -13 16:1	141 ^a	128 ^a	140 ^a	57.3 ^b	7.69	< 0.001
<i>trans</i> -6 + -7 + -8 16:1	39.9 ^b	40.0 ^b	42.7 ^b	64.4 ^a	4.16	< 0.001
<i>trans</i> -9 16:1	20.2 ^b	21.4 ^b	21.6 ^b	81.5 ^a	4.51	< 0.001
<i>trans</i> -10 16:1	10.2 ^b	9.43 ^b	8.85 ^b	26.7 ^a	1.59	< 0.001
<i>trans</i> -11 + -12 16:1	147 ^b	143 ^b	149 ^b	236 ^a	8.1	< 0.001
<i>trans</i> -13 16:1	13.0 ^b	13.4 ^b	13.6 ^b	47.6 ^a	2.99	< 0.001
18:1 (g/100 g FA)						
<i>cis</i> -9 18:1	16.4 ^b	15.4 ^b	17.3 ^b	23.5 ^a	1.48	< 0.05
<i>cis</i> -11 18:1	0.612	0.572	0.635	0.564	0.0732	0.88
<i>cis</i> -12 18:1	0.164 ^b	0.154 ^b	0.160 ^b	0.430 ^a	0.0136	< 0.001
<i>cis</i> -13 18:1	0.087	0.080	0.093	0.131	0.0164	0.13
<i>cis</i> -15 18:1	0.119 ^b	0.131 ^b	0.123 ^b	0.476 ^a	0.0205	< 0.001
<i>cis</i> -16 18:1	0.036 ^b	0.037 ^b	0.037 ^b	0.145 ^a	0.0064	< 0.001
<i>trans</i> -4 18:1	0.019 ^b	0.021 ^b	0.022 ^b	0.032 ^a	0.0019	< 0.01
<i>trans</i> -5 18:1	0.015 ^b	0.016 ^b	0.017 ^b	0.024 ^a	0.0017	< 0.05
<i>trans</i> -6 + -7 + -8 18:1	0.194 ^b	0.210 ^b	0.195 ^b	0.366 ^a	0.0141	< 0.001
<i>trans</i> -9 18:1	0.173 ^b	0.156 ^b	0.169 ^b	0.379 ^a	0.0095	< 0.001
<i>trans</i> -10 18:1	0.157 ^b	0.152 ^b	0.160 ^b	0.292 ^a	0.0191	< 0.01
<i>trans</i> -11 18:1	0.595 ^b	0.622 ^b	0.577 ^b	1.60 ^a	0.105	< 0.001
<i>trans</i> -12 18:1	0.195 ^b	0.182 ^b	0.191 ^b	0.722 ^a	0.0260	< 0.001
<i>trans</i> -13 + -14 18:1	0.366 ^b	0.308 ^b	0.352 ^b	1.34 ^a	0.100	< 0.001
<i>trans</i> -15 18:1	0.375 ^b	0.348 ^b	0.382 ^b	1.10 ^a	0.026	< 0.001
<i>trans</i> -16 18:1 ³	0.222 ^b	0.215 ^b	0.214 ^b	0.859 ^a	0.0263	< 0.001
20:1 (mg/100 g FA)						
<i>cis</i> -9 20:1	159 ^b	137 ^b	142 ^b	1,427 ^a	59.2	< 0.001
<i>cis</i> -11 20:1	74.0 ^b	60.5 ^b	64.6 ^b	969 ^a	42.9	< 0.001
<i>cis</i> -13 20:1	9.78 ^b	8.51 ^b	7.76 ^b	54.0 ^a	2.50	< 0.001
<i>cis</i> -15 20:1	4.19 ^b	4.85 ^b	4.47 ^b	33.6 ^a	2.53	< 0.001
<i>trans</i> -9 + -10 20:1	9.46 ^b	6.76 ^b	6.65 ^b	174 ^a	9.66	< 0.001
<i>trans</i> -11 20:1	10.3 ^b	6.75 ^b	7.75 ^b	157 ^a	8.33	< 0.001
<i>trans</i> -12 20:1	12.9 ^b	11.3 ^b	11.0 ^b	130 ^a	5.78	< 0.001
<i>trans</i> -13 20:1	7.48 ^b	6.01 ^b	5.97 ^b	124 ^a	5.71	< 0.001

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

²Co-elutes with 17:0 *anteiso*.

³Contains *cis*-14 18:1 as a minor isomer.

Supplemental Table 3. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on milk 18:2 composition in lactating cows

Fatty acid (mg/100 g FA)	Treatment ¹				SEM	<i>P</i> - value
	Control	A	B	CO		
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2 ²	1,326 ^a	1,278 ^a	1,303 ^a	1,091 ^b	60.4	< 0.05
<i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 18:2	21.2 ^b	20.7 ^b	21.9 ^b	115 ^a	5.11	< 0.001
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -13 18:2	119 ^b	104 ^b	121 ^b	534 ^a	24.7	< 0.001
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12 + <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -14 18:2	90.0 ^b	81.9 ^b	91.9 ^b	287 ^a	15.5	< 0.001
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12 18:2	23.5 ^b	23.8 ^b	22.9 ^b	42.1 ^a	2.39	< 0.01
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:2	58.5 ^b	56.4 ^b	57.1 ^b	352 ^a	21.3	< 0.001
<i>trans</i> -12, <i>cis</i> -15 18:2	28.3 ^b	28.2 ^b	28.3 ^b	75.7 ^a	3.84	< 0.001
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12 18:2	5.93 ^b	6.66 ^b	6.45 ^b	15.7 ^a	1.68	< 0.05
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -13 18:2	21.9 ^b	22.0 ^b	22.7 ^b	53.2 ^a	1.36	< 0.001
<i>trans</i> -11, <i>trans</i> -15 18:2	12.7 ^b	12.3 ^b	12.0 ^b	89.4 ^a	6.62	< 0.001
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -11 CLA ³	1.16 ^b	3.32 ^a	1.32 ^b	2.18 ^b	0.306	< 0.01
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	292 ^b	276 ^b	304 ^b	730 ^a	45.3	< 0.01
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13 CLA	0.754	1.01	0.520	1.05	0.181	0.24
<i>cis</i> -12, <i>trans</i> -14 CLA	0.497 ^b	0.648 ^b	0.549 ^b	1.89 ^a	0.140	< 0.001
<i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9 CLA	23.0 ^b	16.2 ^c	22.9 ^b	56.4 ^a	2.35	< 0.001
<i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11 CLA	6.17 ^b	6.63 ^b	7.12 ^b	13.4 ^a	1.03	< 0.01
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	1.78 ^b	2.48 ^b	2.34 ^b	26.5 ^a	1.49	< 0.001
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -13 CLA	6.30 ^b	6.32 ^b	7.49 ^b	20.1 ^a	1.98	< 0.001
<i>trans</i> -12, <i>cis</i> -14 CLA ⁴	2.32 ^b	2.34 ^b	2.18 ^b	17.8 ^a	1.31	< 0.001
<i>trans</i> -13, <i>cis</i> -15 CLA	0.236	0.382	0.164	0.258	0.0629	0.20
<i>trans</i> -7, <i>trans</i> -9 CLA	0.782	0.776	0.967	0.515	0.1062	0.11
<i>trans</i> -8, <i>trans</i> -10 CLA	1.47	1.31	1.47	1.27	0.21	0.62
<i>trans</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	13.3	13.9	13.8	11.4	1.98	0.38
<i>trans</i> -10, <i>trans</i> -12 CLA	2.73	2.68	3.00	2.03	0.28	0.12
<i>trans</i> -11, <i>trans</i> -13 CLA	9.54 ^b	9.73 ^b	9.65 ^b	27.3 ^a	2.50	< 0.01
<i>trans</i> -12, <i>trans</i> -14 CLA	4.61 ^b	4.32 ^b	5.28 ^b	28.2 ^a	1.50	< 0.001
<i>trans</i> -13, <i>trans</i> -15 CLA	0.489	0.520	0.574	1.05	0.221	0.25

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

²Contains *cis*-9, *cis*-15 18:2 as a minor component.

³CLA, conjugated linoleic acid

⁴Contains *cis*-13, *trans*-15 CLA as a minor component.

Supplemental Table 4. Effect of dietary supplements of two live yeast strains or camelina oil on milk odd- and branched-chain fatty acid composition in lactating cows

Fatty acid (mg/100 g FA)	Treatment ¹				SEM	<i>P</i> -value
	Control	A	B	CO		
5:0	29.1	28.5	28.1	26.4	2.34	0.68
7:0	22.6 ^a	20.5 ^a	20.2 ^a	13.1 ^b	1.60	< 0.01
9:0	26.7 ^a	23.9 ^a	25.3 ^a	14.1 ^b	1.72	< 0.01
11:0	47.8 ^a	43.2 ^a	44.2 ^a	22.5 ^b	2.65	< 0.01
13:0 <i>anteiso</i>	16.5	16.4	15.5	10.9	1.75	0.13
13:0 <i>iso</i>	27.8 ^a	26.7 ^a	26.2 ^a	19.5 ^b	1.87	< 0.05
14:0 <i>iso</i>	134 ^a	123 ^a	126 ^a	86.7 ^b	13.9	< 0.01
15:0	1,438 ^a	1,376 ^a	1,350 ^a	952 ^b	69.3	< 0.01
15:0 <i>anteiso</i>	552 ^a	565 ^a	522 ^a	365 ^b	40.4	< 0.01
15:0 <i>iso</i>	269 ^a	268 ^a	253 ^a	169 ^b	20.0	< 0.01
<i>cis</i> -9 15:1	13.5 ^a	11.7 ^{ab}	12.6 ^{ab}	10.2 ^b	1.15	0.13
<i>trans</i> -5 15:1	47.3 ^a	47.8 ^a	44.7 ^a	23.2 ^b	4.87	< 0.001
<i>trans</i> -6 15:1	22.0 ^a	22.2 ^a	22.2 ^a	13.0 ^b	2.28	< 0.001
<i>trans</i> -9 15:1	13.5	13.8	11.9	12.1	2.18	0.43
16:0 <i>iso</i>	299 ^a	267 ^a	256 ^a	191 ^b	25.3	< 0.05
17:0	579 ^a	580 ^a	558 ^a	369 ^b	21.2	< 0.001
17:0 <i>iso</i>	292 ^a	288 ^a	291 ^a	253 ^b	10.6	0.11
<i>cis</i> -7 17:1	20.6 ^a	23.0 ^a	23.8 ^a	11.3 ^b	2.78	< 0.05
<i>cis</i> -8 17:1	74.5 ^a	74.9 ^a	69.8 ^a	62.2 ^b	3.87	< 0.01
<i>cis</i> -9 17:1	211 ^{ab}	194 ^{ab}	221 ^a	161 ^b	23.0	0.17
18:0 <i>iso</i>	54.5	52.1	51.7	37.7	4.64	0.06
11-cyclohexyl 11:0	110 ^a	104 ^{ab}	96.1 ^b	50.3 ^c	5.72	< 0.001
19:0	34.6	31.7	31.8	47.4	7.57	0.44
<i>cis</i> -7 19:1	67.8 ^a	71.5 ^a	66.4 ^a	58.8 ^b	4.05	< 0.05
<i>cis</i> -9 19:1	42.0	44.9	39.5	37.6	4.24	0.27
<i>cis</i> -10 19:1	32.3	30.8	36.8	30.2	4.90	0.59
3,7,11,15-tetramethyl-16:0	30.8 ^a	27.9 ^a	24.4 ^a	9.67 ^b	3.80	< 0.001
21:0	24.4 ^b	26.4 ^b	23.7 ^b	52.0 ^a	3.69	< 0.001
<i>cis</i> -12 21:1	6.77 ^b	6.60 ^b	7.12 ^b	13.2 ^a	0.57	< 0.001
23:0	17.8 ^a	20.3 ^a	17.1 ^{ab}	12.0 ^b	2.29	0.06
<i>cis</i> -14 23:1	46.9 ^a	46.5 ^a	46.1 ^a	26.9 ^b	3.54	< 0.01
27:0	6.04	4.80	7.62	8.78	1.497	0.22
29:0	110 ^a	117 ^a	100 ^a	55.0 ^b	18.3	< 0.05

^{a-b} Within a row means without a common superscripts differ ($P < 0.05$).

¹Refers to grass silage based diets containing no additional supplement (Control diet) or supplemented with 0.5 g/d of one of two strains of live yeasts A or B or 60 g/kg DM of camelina oil (CO).

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

INRA-Rowett Gut Microbiology Symposium, Clermont-Ferrand, juin 2012 [Affiche]

Congress on Gastrointestinal Function, Chicago, avril 2013 [Oral]

Journée des Microbiologistes du Pôle Clermontois, Clermont-Ferrand, avril 2013 [Oral]

Colloque annuel de l'AFEM, Parent, octobre 2013 [Oral]

An efficient method for rumen microbiota mRNAs enrichment improving metatranscriptomic analysis. S Comtet^{abd}, F Chaucheyras-Durand^{ad}, P Mosoni^a, J Denonfoux^b, C Petit-Bidierre^c, E Forano^a, P Peyret^b. ^aINRA, UR454 Microbiologie, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, ^bClermont Université, Université d'Auvergne, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, EA 4678, Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France, ^cClermont Université, Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France ^dLallemand Animal Nutrition, 19 Rue des Briquetiers, BP 59, F-31702 Blagnac Cedex, France.

The rumen is inhabited by a complex community of prokaryotic and eukaryotic microorganisms (bacteria, archaea, protozoa and fungi) which ensures essential functions for the ruminant. Global transcriptomic studies such as functional microarrays or metatranscriptomics represent suitable approaches which offer an overview of the microbiota functions in the rumen. However, for such approaches, enrichment of messenger RNAs (mRNAs) is necessary as they represent only 1 to 5% of total RNAs, improving the sensitivity for DNA microarrays approach and avoiding to produce unused sequences by next generation sequencing.

The aim of this work was to develop an efficient method dedicated to rumen samples for removing micro-organisms rRNAs from total RNAs samples. This method allows to substract eukaryotic and prokaryotic rRNAs by their capture. The principle is based on the use of Dynabeads (Life Technologies) and probes of 43 bases long. Probes were designed for targeting all rumen microorganisms already identified. The workflow allows preserving polyadenylated and non polyadenylated mRNAs from all microorganisms. This method was successfully applied to rumen samples allowing the near complete depletion of rRNAs. This procedure will be applied to analyze the effect of additives on targeted functions in the rumen and could easily be adapted to other ecosystems.

An efficient method for rumen microbiota mRNA enrichment improving metatranscriptomic analysis



S Comtet^{a,b,d}, F Chaucheyras-Durand^{a,d}, P Mosoni^a, J Denonfoux^b,
C Petit-Bidre^c, E Forano^a and P Peyret^b

^aINRA, UR454 Microbiologie, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

^bClermont Université, Université d'Auvergne, EA 4678, Conception, Ingénierie et Développement de l'Aliment et du Médicament, BP10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^cClermont Université, Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6023 Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, F-63000 Clermont-Ferrand, France

^dLallemand Animal Nutrition, 19 Rue des Briquetiers, BP 59, F-31702 Blagnac Cedex, France

INTRODUCTION

The rumen is inhabited by a complex community of prokaryotic and eukaryotic microorganisms (bacteria, archaea, protozoa and fungi) which ensures essential functions for the ruminant. Global transcriptomic studies such as functional microarrays or metatranscriptomics represent suitable approaches which offer an overview of the microbiota functions in the rumen. However, for such approaches, enrichment of messenger RNAs (mRNAs) is necessary as they represent only 1 to 5% of total RNAs, thereby it should improve the sensitivity for DNA microarrays approach and avoid to produce unused sequences by next generation sequencing.

The aim of this work was to develop an efficient method dedicated to rumen samples for removing microbial ribosomal RNAs (rRNAs) from total RNA samples.

MATERIALS AND METHODS

The method is based on the **capture of the rRNA molecules**. For this, probes complementary to conserved regions of rRNA were designed. Capture probes were determined in order to target all rumen microorganisms already identified and their specificity was tested to avoid removing of mRNA of interest (figure 1).

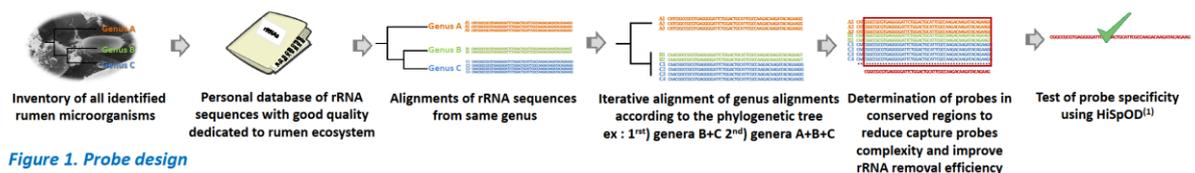


Figure 1. Probe design

The **general principle** consists in :

- hybridization of the selected probes with rRNAs,
- immobilization of probe-rRNA complexes on poly-T coated magnetic beads (Dynabeads Oligo(dT)₂₅, invitrogen),
- precipitation of the mRNA enriched RNA fractions.

The workflow of mRNA enrichment procedure allows preserving polyadenylated and non polyadenylated mRNAs from all microorganisms (figure 2).

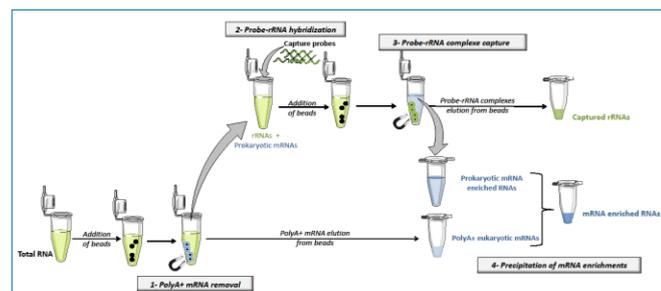
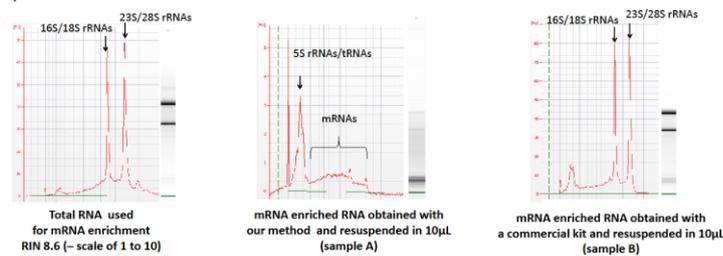


Figure 2. mRNA enrichment procedure

RESULTS

Seventeen probes of 43 base-long were designed to target the small (16S, 18S) and the large (23S, 28S) ribosomal subunits of rumen bacteria, archaea, protozoa and fungi. To validate the method, total RNA was extracted from whole rumen content of a cow using a modified protocol from Béra-Maillet *et al.*⁽²⁾ and TRIzol (invitrogen). RNA extraction of all microbial groups was confirmed by rRNA RT-qPCR. Enrichment of mRNAs was performed using 10µg of total RNA. To ensure that there was no RNA degradation, enrichment procedure was applied to the same amount of ribonucleic acids, without capture (RNA control). Efficiency of rRNAs removal with our method was additionally compared with a commercial kit. The recovered RNAs were analyzed using the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).



RNA samples	Quantity of recovered RNA (ng)
Sample A	750
RNA control for sample A	6520
Sample B	6080
RNA control for sample B	6706

No RNA degradation was observed as RIN was unmodified for RNA control. Bioanalyzer profiles show an effective depletion of rRNA peaks with our method as rRNA are almost undetectable. To evaluate the efficiency of mRNA enrichment, RNA recovery from RNA control and processed RNAs were compared. The commercial kit allowed an enrichment of only 9,4% while our method provided a mRNA enrichment up to 88,5%.

CONCLUSION

An efficient method for rRNA removal from total RNA was developed to optimize global transcriptomic results. This method was successfully applied to rumen samples, which contain a great diversity and abundance of prokaryotic and eukaryotic microorganisms, and allowed the near complete depletion of ribosomal RNAs. This procedure will be applied to analyze the effect of additives on targeted functions in the rumen and could easily be adapted to other ecosystems.

(1) S Comtet, F Chaucheyras-Durand *et al.* (2014) Probe design for functional RNA microarrays. *Metabonomics* 7, 241-248

(2) Béra-Maillet *et al.* (2008) Development of a RT-qPCR method for the quantification of microbial species-specific 16S rDNA hybridization products in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *J. Microbiol. Methods* 77, 8-16



Journée de l'école doctorale Clermont-Ferrand SVSAE, mai 2013 [Affiche]

**DEGRADATION DES FIBRES DANS LE RUMEN ET EFFET DE PROBIOTIQUES :
ETUDE METATRANSCRIPTOMIQUE**

Sophie Comtet

La dégradation des fibres alimentaires est une fonction essentielle des écosystèmes digestifs. Chez les ruminants, cette fonction est assurée par des bactéries, champignons, et protozoaires au niveau du rumen. Ces microorganismes produisent de nombreuses enzymes qui hydrolysent les polysides complexes composant les fibres végétales. Des additifs alimentaires tels que les levures probiotiques exercent des effets bénéfiques sur la dégradation des parois végétales *in vivo* ainsi que sur l'abondance de certaines espèces bactériennes. Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent ces effets positifs sont encore mal connus. Afin de mieux connaître la structure et le rôle des systèmes fibrolytiques actifs dans le microbiote digestif de l'animal dans différentes conditions nutritionnelles ou physiologiques, une étude métatranscriptomique par puce à ADN a été initiée. La biopuce développée comporte 4507 sondes et cible 8 familles d'enzymes clés du processus de fibrolyse, soit 436 gènes portés par 44 espèces microbiennes présentes dans le rumen et le côlon de l'animal monogastrique. L'outil a été validé sur ADN, puis sur ARN de souche pure. Pour son application sur ARN issus de contenus ruminiaux, une méthode dédiée a été mise au point pour l'enrichissement des ARN messagers par soustraction des ARN ribosomiques (ARNr). En effet, la détection des transcrits peu abondants peut être limitée par la présence d'une forte proportion d'ARNr dans les ARN totaux. La méthode d'enrichissement est basée sur l'utilisation de billes magnétiques et de 17 sondes permettant la capture des grands ARNr de tous les microorganismes ruminiaux déjà identifiés. La stratégie de conception des sondes reposant sur des alignements itératifs a permis de réduire la complexité des sondes et ainsi d'optimiser l'efficacité de la soustraction des ARNr. Cette méthode d'enrichissement en ARNm a été appliquée avec succès aux échantillons de rumen. L'effet de levures et d'autres additifs alimentaires est actuellement analysé avec la biopuce fonctionnelle développée ainsi qu'une approche RNA-Seq.



DÉGRADATION DES FIBRES DANS LE RUMEN

ET EFFET DE PROBIOTIQUES : ÉTUDE MÉTATRANSCRIPTOMIQUE

S. Comtet^{ab}, O. Bouzid^b, A. Ameilbonne^{ae}, F. Jaziri^d, J. Denonfoux^b,

C. Biderre-Petit^c, D. Hill^d, P. Mosoni^b, F. Chaucheyras-Durand^{ae}, E. Forano^a et P. Peyret^b

^aINRA, UR454 Microbiologie, Saint-Genès-Champagnelle, France

^bClermont Université, Université d'Auvergne, EA 4678, CIDAM, Clermont-Ferrand, France

^cClermont Université, Université Blaise Pascal, UMR CNRS 6023, LMGE, Clermont-Ferrand, France

^dClermont Université, Université Blaise Pascal, LIMOS, Clermont-Ferrand, UMR CNRS 6158, LIMOS, Aubière

^eLallemand Animal Nutrition, Blagnac, France



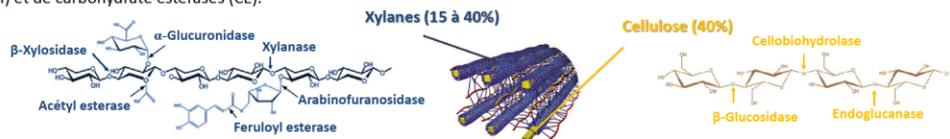
Introduction

La dégradation des fibres alimentaires est une **fonction essentielle** des écosystèmes digestifs. Chez les ruminants, cette fonction est assurée par des bactéries, champignons, et protozoaires au niveau du rumen. En produisant de **nombreuses enzymes** capables d'hydrolyser les polysides complexes végétaux, ces microorganismes permettent de satisfaire les besoins en énergie et en carbone de leur hôte. Les **levures probiotiques exercent des effets bénéfiques** sur la dégradation des parois végétales *in vivo* ainsi que sur l'abondance de certaines espèces bactériennes. Toutefois, **les mécanismes qui sous-tendent ces effets positifs sont encore mal connus**.

Afin de mieux comprendre l'impact de levures probiotiques sur les systèmes fibrolytiques actifs au sein du microbiote digestif de l'animal, une étude métatranscriptomique centrée sur la fonction fibrolytique ruminale a été initiée.

FibroArray : biopuce ADN ciblant la fonction fibrolytique ruminale

La paroi végétale, principal constituant de la ration des ruminants, est composée en majorité de **cellulose** et d'hémicelluloses (**xylanes** en particulier). De nombreuses activités enzymatiques sont nécessaires à l'hydrolyse complète de ces polysides et sont regroupées dans plusieurs familles de glycoside hydrolases (GH) et de carbohydrate estérases (CE).



Objectif

Identifier rapidement les gènes codant les cellulases et les xylanases dont la transcription est stimulée par l'apport de probiotiques.

Caractéristiques de la biopuce

➢ 4507 sondes (1742 sondes de 25mers et 2765 sondes de 54mers) ont été conçues avec le logiciel HiSpOD¹ et ciblent:

8 familles majeures de cellulases et de xylanases (6 GH et 2 CE)
soit 430 gènes portés par 57 espèces microbiennes

➢ Format Agilent 8x15K permettant l'hybridation de 16 échantillons simultanément

Validation

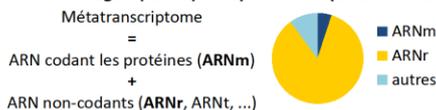
La biopuce a été validée sur ADN, puis sur ARN de souches pures.

	Bactéries	Protozoaires	Champignons
Nb d'espèces	44	4	9
Nb de gènes	365	26	39

Méthode d'enrichissement en ARNm dédiée à l'étude du métatranscriptome ruminal

Pourquoi?

Les ARN messagers (ARNm) ne représentent que 1 à 5% des ARN totaux

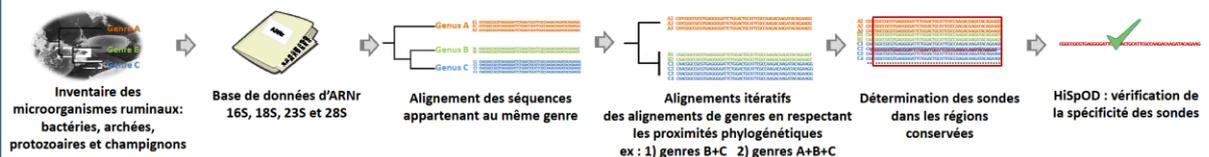


Difficulté de détection des transcrits les moins abondants

Etape d'enrichissement en ARNm nécessaire pour améliorer la sensibilité de détection des messagers.

Une stratégie d'enrichissement des ARNm par soustraction des ARN des petites (16S, 18S) et grandes sous-unités (23S, 28S) ribosomiques a été suivie. Le principe de la méthode repose sur l'utilisation de sondes permettant la capture des ARNr et de billes magnétiques assurant l'élimination des duplex formés.

Détermination d'un nombre minimal de sondes de capture



17 sondes ont été déterminées couvrant la totalité de la diversité ruminale

Evaluation de l'efficacité de l'enrichissement en ARNm par RT-qPCR

- 95% des ARNr 16S (bactéries et archées) et 18S (protozoaires et champignons) sont éliminés.
- L'abondance relative des messagers, de *Fibrobacter succinogenes* S85, est conservée pendant la procédure d'enrichissement.
- Enrichissement d'environ 80% des ARNm.

Conclusion/Perspectives

Les levures probiotiques permettent d'optimiser la fonction fibrolytique ruminale et ainsi de mieux valoriser la ration des ruminants. Dans le but d'identifier les systèmes fibrolytiques stimulés par l'apport de probiotiques, une biopuce ADN fonctionnelle ciblant 8 familles clés de cellulases et de xylanases a été développée. De même, une méthode optimisée d'enrichissement en ARNm a été développée dans le but de permettre la détection des transcrits les moins abondants.

L'approche biopuce ADN permettra de comparer aisément des dizaines d'échantillons issus d'expérimentations animales et de mettre en évidence les gènes impliqués dans la fibrolyse dont la transcription est stimulée par l'apport de probiotiques, ce qui permettra de mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

¹ Dugat-Bony, Missaoui et al (2011) HiSpOD : probe design for functional DNA microarrays. *Bioinformatics*, 27, 641-648

ANNEXES

ANNEXE 1- Protocole de co-extraction d'ADN et d'ARN à partir de contenus ruminiaux préservés en RNAlater.

- 1. Élimination de la solution de RNAlater**
 - a) Transférer 400 mg de contenu ruminal préservé dans du RNAlater dans un tube Eppendorf 2 mL.
 - b) Ajouter 1 mL de PBS 1X et homogénéiser.
 - c) Centrifuger pendant 15 min à 6000 g à 4°C et éliminer le surnageant.
 - d) Laver avec 1,4 mL de PBS 1X.
 - e) Centrifuger pendant 5 min à 12000 g à 4°C et éliminer le surnageant.
- 2. Lyse chimique et mécanique de l'échantillon**
 - a) Transférer le culot dans un tube à vis 2 mL.
 - b) Ajouter 1,2 mL de Trizol et 100 mg de billes de zirconium Ø 0,1 mm (BioSpecProducts) et homogénéiser.
 - c) Incuber 5 min à température ambiante puis placer dans la glace.
 - d) Homogénéiser au FastPrep (MP Biomedicals) pendant 2 cycles de 1 min à vitesse 6,5 m/sec entrecoupés par une incubation de 5 min dans la glace.
- 3. Séparation des phases**
 - a) Ajouter 240 µL de chloroforme et agiter vigoureusement 15 sec.
 - b) Incuber 3 min à température ambiante.
 - c) Centrifuger pendant 15 min à 12000 g à 4°C.
 - d) A la fin de cette étape, le contenu du tube est organisé en deux phases séparées par une phase intermédiaire. La phase organique contient les ARN.
- 4. Précipitation des ARN**
 - a) Prélever 900 µL de la phase aqueuse (phase supérieure).
 - b) Ajouter 450 µL d'isopropanol 100% glacé et 450 µL de solution saline (NaCl 1,2 M, disodium citrate 0,8 M).
 - c) Incuber 10 min à température ambiante.
 - d) Centrifuger pendant 15 min à 12000g à 4°C.
 - e) Éliminer le surnageant.
 - f) Laver le culot avec 2 mL d'éthanol 75% glacé.
 - g) Centrifuger pendant 10 min à 7400 g à 4°C.
 - h) Renouveler le lavage une fois.
 - i) Laisser sécher le culot pendant 5 min.
 - j) Resolubiliser les ARN avec 100 µL d'eau MilliQ.
 - k) Traiter les ARN avec 1 µL de rDNase (Macherey-Nagel) pendant 15 min à 37°C.
- 5. Resolubilisation et précipitation des ADN**
 - a) Retirer la totalité de la phase aqueuse restante.
 - b) Ajouter 600 µL de tampon BEB (guanidine thiocyanate 4 M; sodium citrate 50 mM; Tris 1 M, pH 8,0) et homogénéiser.
 - c) Agiter sur une plaque agitante pendant 10 min à 300 rpm à température ambiante.
 - d) Centrifuger pendant 30 min à 12000g à 20°C.

- e) A la fin de cette étape, le contenu du tube est organisé en deux phases séparées par une phase intermédiaire. La phase organique contient les ADN tandis que la phase organique et la phase intermédiaire contiennent les protéines.
- f) Prélever 600 μ L de la phase aqueuse.
- g) Ajouter 480 μ L d'isopropanol 100% glacé.
- h) Incuber 30 min à -20°C .
- i) Centrifuger pendant 15 min à 12000 g à 4°C .
- j) Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70% glacé.
- k) Centrifuger pendant 5 min à 12000g à 4°C .
- l) Renouveler le lavage une fois.
- m) Laisser sécher le culot pendant 5 min.
- n) Resolubiliser les ADN avec 50 μ L d'eau MilliQ.
- o) Traiter les ADN avec 1 μ L de RNase pendant 30 min à 37°C .

ANNEXE 2 – Protocole d'enrichissement en ARNm développé.**1. Isolement des ARN polyadénylés**

- a) Placer 10 µg d'ARN dans un tube Eppendorf 1,5 mL, ajuster le volume à 100µL avec de l'eau MilliQ et ajouter 100 µL de Binding buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, LiCl 1,0 M, EDTA 2 mM).
- b) Dénaturer les ARN à 70°C pendant 2 min puis placer dans la glace.
- c) Ajouter 200 µL de Dynabeads Oligo(dT)25.
- d) Incuber 5 min à température ambiante sous agitation.
- e) Placer le tube sur un portoir aimanté et placer le surnageant qui contient les ARN procaryotes et les ARNr dans un nouveau tube Eppendorf 1,5 mL.
- f) Laver les billes avec 400 µL de tampon de lavage (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, LiCl 0,15 M, EDTA 1 mM Tris-HCl 10 mM, pH 7,5).
- g) Placer le tube sur un portoir aimanté et éliminer le tampon de lavage.
- h) Renouveler le lavage une fois.
- i) Eluer les ARN polyadénylés avec 40 µL de Tris HCl 10 mM froid et incubation à 70°C pendant 2 min.
- j) Placer le surnageant contenant les ARN polyadénylés dans un nouveau tube Eppendorf 2 mL et conserver dans la glace.

2. Hybridation des sondes de capture et des ARNr

- a) Ajouter les sondes de capture à la solution d'ARN procaryotes et d'ARNr
- b) Dénaturer 6 min à 70°C.
- c) Placer immédiatement à 37°C sous une agitation de 100 rpm pendant 10 min puis sans agitation pendant 10 min.

3. Capture des complexes sondes-ARNr

- a) Ajouter les billes Dynabeads Oligo(dT)25 précédemment utilisées.
- b) Incuber 10 min à température ambiante sous agitation.
- c) Placer le tube sur un portoir aimanté et placer le surnageant dans un tube Eppendorf 1,5 mL.
- d) Laver les billes avec 400 µL de tampon de lavage.
- e) Renouveler le lavage une fois.
- f) Eluer les complexes sondes-ARNr avec 40 µL de Tris HCl 10 mM froid et incubation à 70°C pendant 2 min.
- g) Éliminer le surnageant qui contient les sondes de capture et les ARNr capturés.
- h) Laver les billes avec 800 µL de tampon de lavage.
- i) Replacer le surnageant de l'étape 3-c dans le tube et répéter les étapes 3.b) à 3.i) trois fois.

4. Précipitation des ARN polyadénylés et des ARN procaryotes enrichis en ARNm

- a) Pooler les ARN polyadénylés et le dernier surnageant de l'étape 3 contenant les ARN procaryotes enrichis en ARNm.
- b) Ajouter 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M et 1/50ème de glycogène (5mg/µL).
- c) Homogénéiser et ajouter 3 volumes d'éthanol 100% glacé.

- d) Placer 1 h à -20°C.
- e) Centrifuger pendant 30min à 12000g à 4°C.
- f) Eliminer le surnageant et laver le culot avec 1,5 mL d'éthanol 80% glacé.
- g) Centrifuger pendant 5min à 8000g.
- h) Répéter le lavage une fois.
- i) Sécher le culot à température ambiante.
- j) Reprendre les ARN dans 10 µL d'eau MiiliQ.

ANNEXE 3 – Amorces utilisées pour le séquençage des inserts des plasmides recombinants.
Les couples d'amorces sont indiqués par une association de deux chiffres.

Gènes	Amorces	Séquences 5'-3'	Couples d'amorces
Bactéries			
GH5 <i>cel 5G / AAA24893</i> <i>F. succinogenes</i> S85	1 S85-cel5G-WF	CATAAAACCGACCCCCAAAT	1-4
	2 S85-Cel5G-WR	AGTAACAGGAATGGCGCAAT	2-3
	3 seqS85-Cel5G-IF	TTGAATTACCGAAGCTGAAATCA	
	4 seqS85-Cel5G-IR	CTTCATGGCCTTTTCCTGCAAC	
GH9 <i>cel 9B / CAS03458</i> <i>R. albus</i> 20	1 Seq-SacII-IBA33-F1	CAAAAAATCTAGATAACGAGGGC	1-4
	2 Seq-SmaI-IBA33-R1	CTGAGACCATGGATCCTC	3-6
	3 seqRa20-Cel9B-IF1	GTGCTGACCCTGATTCCGGG	5-2
	4 seqRa20-Cel9B-IR1	CCTTGCCGACCTTTACAGTAGT	
	5 seqRa20-Cel9B-IF2	CCTCAAGCAGTACAAGAATCCT	
	6 seqRa20-Cel9B-IR2	CCAGGTTGGTGGTCAGGCTG	
GH43 BT_2895 / AAO78001 <i>B. thetaiotaomicron</i> VPI 5482	1 Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	1-2
	2 T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
GH48 <i>cel 48A / CAS03459</i> <i>R. albus</i> 20	1 Seq-XhoI-IBA33-F2	CCCGAATTCGAGTCGG	1-4
	2 Seq-NcoI-IBA33-R2	GATGGTGATGCGATCCTC	3-6
	3 seq-Ra20-cel48A-IF1	CCGCGATACTACTGTAACCAATC	5-2
	4 seq-Ra20-cel48A-IR1	GTCAGGAGCGTTGGTGTATG	
	5 seq-Ra20-cel48A-IF2	GGCTCTGACATCAACGGCATG	
	6 seq-Ra20-cel48A-IR2	GATGTTGTAGTTGAACTTACCGCC	
GH10 <i>xyn 10A / CBH32823</i> <i>B. xylanisolvens</i> XB1A	1 Seq-XhoI-IBA33-F2	CCCGAATTCGAGTCGG	1-4
	2 Seq-NcoI-IBA33-R2	GATGGTGATGCGATCCTC	2-3
	3 seqXB1A-xyn10A-IF	TAACGATTATTCAATGGCTCAACC	
	4 seqXB1A-xyn10A-IR	TTCACCATCTTCAACTGCAGC	
GH11 <i>xyn A / AAA85198</i> <i>R. albus</i> 7	1 Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	2-3
	2 T7	TAATACGACTCACTATAGGG	1-4
	3 seqRa7-xynA-IF1	AGGCTTCCGAGGGAAGGG	
	4 seqRa7-xynA-IR1	GTTATCCGTTCTGCCGCTTACG	
CE1 <i>xyn B / BAB39493</i> <i>R. albus</i> 7	1 Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	1-2
	2 T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
CE6 <i>axe 6B / ACX75360</i> <i>F. succinogenes</i> S85	1 Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	1-2
	2 T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
Protozoaires			
GH10 <i>xyn B / CAB65753</i> <i>P. multivesiculatum</i>	1 seqPolymulti_xynB_WF	ATGAAAAAGTCTACTATAGCATTCTTATTAATC	1-2
	2 seqPolymulti_xynB_WR	CGTTGTCAACAATAGAATAAAAAGC	
GH11 <i>xyn A / CAA08859</i> <i>P. multivesiculatum</i>	1 seqPolymulti_xynA_WF	GAAAAGGTTATCTGCCTTCTAATAGC	1-2
	2 seqPolymulti_xynA_WR	TCATAAATATAATATTTTCATCCAAATIGGATGAAAT	
Champignons			
GH9 <i>Piromyces sp.</i> M4	1 Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	1-2
	2 T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
GH48 <i>Piromyces sp.</i> M4	1 Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG	1-3
	2 T7	TAATACGACTCACTATAGGG	2-4
	3 seqPiroM4-GH48-IF1	TATCTCTTGGTACTTCGCCTGGG	
	4 seqPiroM4-GH48-IR1	CAATTCTCCAGGCCAGTCA	

REFERENCES

- Abdou L, Boileau C, de Philip P, Pagès S, Fiérobe H-P, Tardif C (2008) Transcriptional regulation of the *Clostridium cellulolyticum* cip-cel operon: a complex mechanism involving a catabolite-responsive element. *J. Bacteriol.* **190** : 1499–506
- Abe F, Ishibashi N, Shimamura S (1995) Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* **78** : 2838–46
- Abu-Tarboush HM, Al-Saiady MY, Keir El-Din AH (1996) Evaluation of diet containing lactobacilli on performance, fecal coliform, and lactobacilli of young dairy calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* **57** : 39–49
- Aguirre de Cárcer D, Cuív PO, Wang T, Kang S, Worthley D, Whitehall V, Gordon I, McSweeney C, Leggett B, Morrison M (2011) Numerical ecology validates a biogeographical distribution and gender-based effect on mucosa-associated bacteria along the human colon. *ISME J.* **5** : 801–9
- Ahamed A, Vermette P (2008) Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochem. Eng. J.* **40** : 399–407
- Alahuhta M, Xu Q, Brunecky R, Adney WS, Ding S-Y, Himmel ME, Lunin V V (2010) Structure of a fibronectin type III-like module from *Clostridium thermocellum*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66** : 878–80
- Aminov RI (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* **2** : 158
- Arai T, Kosugi A, Chan H, Koukiekolo R, Yukawa H, Inui M, Doi RH (2006) Properties of cellulosomal family 9 cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71** : 654–60
- Aspeborg H, Coutinho PM, Wang Y, Brumer H, Henrissat B (2012) Evolution, substrate specificity and subfamily classification of glycoside hydrolase family 5 (GH5). *BMC Evol. Biol.* **12** : 186
- Bach A, Calsamiglia S, Stern MD (2005) Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* **88 Suppl 1** : E9–21
- Bach A, Iglesias C, Devant M (2007) Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **136** : 146–153
- Bahl MI, Bergström A, Licht TR (2012) Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the Firmicutes to Bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative PCR analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **329** : 193–7
- Bai S, Li J, He Z, Van Nostrand JD, Tian Y, Lin G, Zhou J, Zheng T (2013) GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of soil microbial communities of mangroves. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97** : 7035–48
- Balch WE, Fox GE, Magrum LJ, Woese CR, Wolfe RS (1979) Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43** : 260–96
- Baldwin RL, Allison MJ (1983) Rumen Metabolism. *J. Anim. Sci.* **57** : 461–477
- Baumont R, Aufrère J, Meschy F (2009) La valeur alimentaire des fourrages : rôle des pratiques de culture, de récolte et de conservation. *Fourrages* **198** : 153–173

- Baumont R, Aufrère J, Niderkorn V, Andueza D, Surault F, Peccatte J, Delaby L, Pelletier P (2008) La diversité spécifique dans le fourrage : conséquences sur la valeur alimentaire. *Fourrages* **194** : 189–206
- Bayat A, Kairenius P, Stefański T, Leskinen H, Comtet-Marre S, Forano E, Chaucheyras-Durand F, Shingfield K (2014) Effect of camelina oil or probiotic yeasts on enteric methane production, rumen microbial populations, milk production, and milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage diets. *J. Dairy Sci.*(soumis)
- Bayer EA, Belaich J-P, Shoham Y, Lamed R (2004) The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58** : 521–54
- Bayer EA, Lamed R, White BA, Flint HJ (2008) From cellulosomes to cellulosomes. *Chem. Rec.* **8** : 364–77
- Bayer EA, Setter E, Lamed R (1985) Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.* **163** : 552–9
- Beauchemin KA, McGinn SM (2006) Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* **84** : 1489–96
- Beauchemin KA, Yang WZ, Morgavi DP, Ghorbani GR, Kautz W, Leedle JAZ (2003) Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J Anim Sci* **81** : 1628–1640
- Béra-Maillet C, Devillard E, Cezette M, Jouany J-P, Forano E (2005) Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium sp.* *FEMS Microbiol. Lett.* **244** : 149–56
- Béra-Maillet C, Gaudet G, Forano E (2000) Endoglucanase activity and relative expression of glycoside hydrolase genes of *Fibrobacter succinogenes* S85 grown on different substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **1543** : 77–85
- Béra-Maillet C, Mosoni P, Kwasiborski A, Suau F, Ribot Y, Forano E (2009) Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *J. Microbiol. Methods* **77** : 8–16
- Béra-Maillet C, Ribot Y, Forano E (2004) Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 2172–9
- Berg Miller ME, Antonopoulos DA, Rincon MT, Band M, Bari A, Akraiko T, Hernandez A, Thimmapuram J, Henrissat B, Coutinho PM, Borovok I, Jindou S, Lamed R, Flint HJ, Bayer EA, White BA (2009) Diversity and strain specificity of plant cell wall degrading enzymes revealed by the draft genome of *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS One* **4** : e6650
- Berg Miller ME, Yeoman CJ, Chia N, Tringe SG, Angly FE, Edwards RA, Flint HJ, Lamed R, Bayer E a, White BA (2012) Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environ. Microbiol.* **14** : 207–27

- Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* **70** : 567–590
- Berrin J-G, Ajandouz EH, Georis J, Arnaut F, Juge N (2007) Substrate and product hydrolysis specificity in family 11 glycoside hydrolases: an analysis of *Penicillium funiculosum* and *Penicillium griseofulvum* xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74** : 1001–10
- Bhuiyan N, Selvaraj G (2009) Role of lignification in plant defense. *Plant Signal Behav.* **4** : 158–159
- Biely P (2012) Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **30** : 1575–88
- Biely P, Vrsanská M, Tenkanen M, Kluepfel D (1997) Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *J. Biotechnol.* **57** : 151–66
- Blake AW, McCartney L, Flint JE, Bolam DN, Boraston AB, Gilbert HJ, Knox JP (2006) Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes. *J. Biol. Chem.* **281** : 29321–9
- Blouzard J-C, Coutinho PM, Fierobe H-P, Henrissat B, Lignon S, Tardif C, Pagès S, de Philip P (2010) Modulation of cellulosome composition in *Clostridium cellulolyticum*: adaptation to the polysaccharide environment revealed by proteomic and carbohydrate-active enzyme analyses. *Proteomics* **10** : 541–54
- Boadi DA, Wittenberg KM, Kennedy AD (2002) Validation of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique for measurement of methane and carbon dioxide production by cattle. *Can. J. Anim. Sci.* **82** : 125–131
- Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Murrell JC, Radajewski S, Weilharter A, Sessitsch A (2003) Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ. Microbiol.* **5** : 566–82
- Van den Bogert B, de Vos WM, Zoetendal EG, Kleerebezem M (2011) Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **77** : 2071–80
- Bohatier J, Senaud J, Benyahya M (1990) *In situ* degradation of cellulose fibres by the entodiniomorph rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Protoplasma* **154** : 122–131
- Boisset C, Fraschini C, Schüle M, Henrissat B, Chanzy H (2000) Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 1444–52
- Bok JD, Yernool DA, Eveleigh DE (1998) Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** : 4774–81
- Bornscheuer U (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **26** : 73–81

- Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Brugère J-F, Gribaldo S (2013) Phylogenomic data support a seventh order of Methylophilic methanogens and provide insights into the evolution of Methanogenesis. *Genome Biol. Evol.* **5** : 1769–80
- Bourgeois TM, Van Craeyveld V, Van Campenhout S, Courtin CM, Delcour JA, Robben J, Volckaert G (2007) Recombinant expression and characterization of XynD from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ATCC 6051: a GH 43 arabinoxylan arabinofuranohydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75** : 1309–17
- Brennan Y, Callen WN, Christoffersen L, Dupree P, Goubet F, Healey S, Hernández M, Keller M, Li K, Palackal N, Sittenfeld A, Tamayo G, Wells S, Hazlewood GP, Mathur EJ, Short JM, Robertson DE, Steer BA (2004) Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 3609–17
- Brodie EL, Desantis TZ, Joyner DC, Baek SM, Larsen JT, Andersen GL, Hazen TC, Richardson PM, Herman DJ, Tokunaga TK, Wan JM, Firestone MK (2006) Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** : 6288–98
- Van den Broek LAM, Lloyd RM, Beldman G, Verdoes JC, McCleary B V, Voragen AGJ (2005) Cloning and characterization of arabinoxylan arabinofuranohydrolase-D3 (AXHd3) from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67** : 641–7
- Bronnenmeier K, Meissner H, Stocker S, Staudenbauer WL (1995) Alpha-D-glucuronidases from the xylanolytic thermophiles *Clostridium stercorarium* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. *Microbiology* **141** : 2033–40
- Brossard L, Chaucheyras-Durand F, Michalet-Doreau B, Martin C (2007) Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Anim. Sci.* **82** : 829
- Broussolle V, Forano E, Gaudet G, Ribot Y (1994) Gene sequence and analysis of protein domains of EGB, a novel family E endoglucanase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *FEMS Microbiol. Lett.* **124** : 439–47
- Bruhl JM, Antonopoulos D a, Berg Miller ME, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA, Edwards RE, Frank ED, Emerson JB, Wacklin P, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE, White BA (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106** : 1948–53
- Bryant MP, Robinson IM (1961) Studies on the nitrogen requirements of some ruminal cellulolytic bacteria. *Appl. Microbiol.* **9** : 96–103
- Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A (2012) Lipid metabolism in the rumen: new insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* **174** : 1–25

- Burton R a, Gidley MJ, Fincher GB (2010) Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nat. Chem. Biol.* **6** : 724–32
- Cai S, Li J, Hu FZ, Zhang K, Luo Y, Janto B, Boissy R, Ehrlich G, Dong X (2010) *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate- borne fibrolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** : 3818–24
- Callaway TR, Dowd SE, Edrington TS, Anderson RC, Krueger N, Bauer N, Kononoff PJ, Nisbet DJ (2010) Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *J. Anim. Sci.* **88** : 3977–83
- Cantu D, Vicente AR, Labavitch JM, Bennett AB, Powell ALTT (2008) Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends Plant Sci.* **13** : 610–617
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters W a, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, Gormley N, Gilbert J a, Smith G, Knight R (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* **6** : 1621–4
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R (2010) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl** : 4516–22
- Castillo C, Benedito JL, Méndez J, García-Partida P, Vázquez P, Pereira V, López-Alonso M, Hernández J (2006) Effects of long-term dietary supplementation of monensin or *Saccharomyces cerevisiae* on blood acid-base and productive performance in growing feedlot steers. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **119** : 480–5
- Castro H, Williams N, Ogram A (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **31** : 1–9
- Chao A (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J. Stat.* **11** : 265–270
- Charnock SJ, Lakey JH, Virden R, Hughes N, Sinnott ML, Hazlewood GP, Pickersgill R, Gilbert HJ (1997) Key residues in subsite F play a critical role in the activity of *Pseudomonas fluorescens subspecies cellulosa* xylanase A against xylooligosaccharides but not against highly polymeric substrates such as xylan. *J. Biol. Chem.* **272** : 2942–51
- Chassard C, Delmas E, Lawson PA, Bernalier-Donadille A (2008) *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58** : 1008–13
- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P (1995a) *In vitro* H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3466–7

- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Gouet P (1995b) Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH3. *Curr. Microbiol.* **31** : 201–5
- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Salmon JM, Gouet P (1996) Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Can. J. Microbiol.* **42** : 927–33
- Chaucheyras-Durand F (2012) Use of yeast probiotics in ruminants: Effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In *Probiotic in Animals*, Prof. Everlon Rigobelo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0777-4, InTech
- Chaucheyras-Durand F, Ameilbonne A, Walker ND, Mosoni P, Forano E (2010a) Effect of a live yeast, *Saccharomyces cerevisiae* I-1077 on *in situ* ruminal degradation of alfalfa hay and fiber-associated microbes. *J. Anim. Sci.* **88** : 145
- Chaucheyras-Durand F, Durand H (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microbes* **1** : 3–9
- Chaucheyras-Durand F, Faqir F, Ameilbonne A, Rozand C, Martin C (2010b) Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** : 640–7
- Chaucheyras-Durand F, Fonty G (2001) Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod. Nutr. Dev.* **41** : 57–68
- Chaucheyras-Durand F, Masségli S, Fonty G (2005) Effect of the microbial feed additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 on protein and peptide degrading activities of rumen bacteria grown *in vitro*. *Curr. Microbiol.* **50** : 96–101
- Chaucheyras-Durand F, Masségli S, Fonty G, Forano E (2010c) Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** : 7931–7
- Chaucheyras-Durand F, Walker ND, Bach A (2008) Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* **145** : 5–26
- Chen Y, Sarkanen S, Wang YY (2012) Lignin-degrading enzyme activities. *Methods Mol. Biol.* **908** : 251–68
- Cho K, Kim S, Woo J, Bok J, Choi Y (2000) Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **27** : 475–481
- Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* **15** : 532–4, 536–7

- Chou CC, Chen CH, Lee TT, Peck K (2004) Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **32** : e99
- Chung YH, Walker ND, McGinn SM, Beauchemin KA (2011) Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **94** : 2431–9
- Claesson MJ, O’Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O’Toole PW (2009) Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. N. Ahmed, ed. *PLoS One* **4** : e6669
- Claesson MJ, Wang Q, O’Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O’Toole PW (2010) Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* **38** : e200
- Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37** : D141–5
- Coleman GS (1978) Rumen Entodiniomorphid Protozoa In : Academic Press (Eds), *Methods of cultivating Parasites in vitro*, 39–54. London, Taylor ED
- Collins T, Meuwis M-A, Stals I, Claeysens M, Feller G, Gerday C (2002) A novel family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **277** : 35133–9
- Cosgrove DJ (2001) Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant Physiol.* **125** : 131–4
- Cosgrove DJ (2005) Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6** : 850–61
- Cosgrove DJ, Jarvis MC (2012) Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.* **3** : 204
- Craig WM, Broderick GA, Ricker DB (1987) Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* **117** : 56–62
- D’Elia JN, Salyers AA (1996) Effect of regulatory protein levels on utilization of starch by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *J. Bacteriol.* **178** : 7180–6
- Dai X, Zhu Y, Luo Y, Song L, Liu D, Liu L, Chen F, Wang M, Li J, Zeng X, Dong Z, Hu S, Li L, Xu J, Huang L, Dong X (2012) Metagenomic insights into the fibrolytic microbiome in yak rumen. *PLoS One* **7** : e40430
- Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*
- Davison A, Blaxter M (2005) Ancient origin of glycosyl hydrolase family 9 cellulase genes. *Mol. Biol. Evol.* **22** : 1273–84
- Dehority BA (1984) Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** : 182–5

- Demarquilly C, Andrieu J (1988) Les fourrages. In Alimentation des bovins, ovins et caprins, p. 315–335. Paris, INRA.
- Denman SE, McSweeney CS (2006) Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* **58** : 572–82
- Denness L, McKenna JF, Segonzac C, Wormit A, Madhou P, Bennett M, Mansfield J, Zipfel C, Hamann T (2011) Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **156** : 1364–74
- Dennis SM, Arambel MJ, Bartley EE, Dayton AD (1983) Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci.* **66** : 1248–54
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** : 5069–72
- Desnoyers M, Giger-Reverdin S, Bertin G, Duvaux-Ponter C, Sauvant D (2009) Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* **92** : 1620–32
- Deswysen AG, Dardillat C, Baumont R (1995) Le feuillet et ses fonctions. In Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 407–430. Paris, France, INRA Editions
- Devillard E, Béra-Maillet C, Flint HJ, Scott KP, Newbold CJ, Wallace RJ, Jouany J-P, Forano E (2003) Characterization of XYN10B, a modular xylanase from the ruminal protozoan *Polyplastron multivesiculatum*, with a family 22 carbohydrate-binding module that binds to cellulose. *Biochem. J.* **373** : 495–503
- Devillard E, Goodheart DB, Karnati SKR, Bayer EA, Lamed R, Miron J, Nelson KE, Morrison M (2004) *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, Cel48A and Cel9B, both of which possess a novel modular architecture. *J. Bacteriol.* **186** : 136–45
- Dijkstra J, Tamminga S (1995) Simulation of the effects of diet on the contribution of rumen protozoa to degradation of fibre in the rumen. *Br. J. Nutr.* **74** : 617–634
- Divne C, Ståhlberg J, Teeri TT, Jones TA (1998) High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *J. Mol. Biol.* **275** : 309–25
- Do JH, Choi D-K (2007) cDNA labeling strategies for microarrays using fluorescent dyes. *Eng. Life Sci.* **7** : 26–34
- Doblin MS, Pettolino F, Bacic A (2010) Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Funct. Plant Biol.* **37** : 357

- Dodd D, Mackie RI, Cann IKO (2011) Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. *Mol. Microbiol.* **79** : 292–304
- Dodd D, Moon Y-H, Swaminathan K, Mackie RI, Cann IKO (2010) Transcriptomic analyses of xylan degradation by *Prevotella bryantii* and insights into energy acquisition by xylanolytic bacteroidetes. *J. Biol. Chem.* **285** : 30261–73
- Dominguez-Bello M (1996) Detoxification in the rumen. *Ann. Zootech.* **45** : 323–327
- Donaldson L (2007) Cellulose microfibril aggregates and their size variation with cell wall type. *Wood Sci. Technol.* **41** : 443–460
- Doreau M, Ferlay A (1995) Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livest. Prod. Sci.* **43** : 97–110
- Doreau M, Fievez V, Troegeler-Meynadier A, Glasser F (2012) Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant : le point des connaissances récentes. *INRA Prod. Anim* **25** : 361–374
- Doreau M, Martin C, Popova M, Morgavi DP, Eugène M (2011a) Leviers d’ action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *INRA Prod. Anim* **24** : 461–474
- Doreau M, Martin C, Popova M, Morgavi DP, Eugène M (2011b) Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *INRA Prod. Anim* **24** : 447–460
- Dorigo U, Volatier L, Humbert J-F (2005) Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.* **39** : 2207–18
- Dugat-Bony E, Biderre-Petit C, Jaziri F, David MM, Denonfoux J, Lyon DY, Richard J-Y, Curvers C, Boucher D, Vogel TM, Peyretailade E, Peyret P (2012a) *In situ* TCE degradation mediated by complex dehalorespiring communities during biostimulation processes. *Microb. Biotechnol.* **5** : 642–53
- Dugat-Bony E, Missaoui M, Peyretailade E, Biderre-Petit C, Bouzid O, Gouinaud C, Hill D, Peyret P (2011) HiSpOD: probe design for functional DNA microarrays. *Bioinformatics* **27** : 641–8
- Dugat-Bony E, Peyretailade E, Parisot N, Biderre-Petit C, Jaziri F, Hill D, Rimour S, Peyret P (2012b) Detecting unknown sequences with DNA microarrays: explorative probe design strategies. *Environ. Microbiol.* **14** : 356–71
- Eadie JM (1962) Inter-relationships between certain rumen ciliate protozoa. *J. Gen. Microbiol.* **29** : 579–588
- Ebringerová A (2005) Structural diversity and application potential of hemicelluloses. *Macromol. Symp.* **232** : 1–12
- Edwards J, Huws S, Swarbreck D, Rees Stevens P, Febrer M, Alston M, Pachebat J, Kingston-Smith A (2011) Investigation of a rumen bacterial “functional core” utilising a metatranscriptomics approach. In 8th INRA-Rowett Symposium on Gut Microbiology, P–34. Clermont-Ferrand, France.

- Edwards JE, Huws SA, Kim EJ, Kingston-Smith AH (2007) Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* **62** : 141–142
- Edwards JE, Kingston-Smith AH, Jimenez HR, Huws S a, Skøt KP, Griffith GW, McEwan NR, Theodorou MK (2008) Dynamics of initial colonization of nonconserved perennial ryegrass by anaerobic fungi in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* **66** : 537–45
- Erasmus LJ, Coertze RF, Leviton MN, Chevaux E (2009) A meta-analysis of the effect of monensin or live yeast or a combination thereof on performance of beef cattle In Joint Annual Meeting of the American Dairy Science Association & American Society of Animal Science, Montréal, Québec, Canada.
- Escherich T (1885) Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Med.* **3** : 515–522
- Ettle T, Schwartz FJ (2002) Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*, Levucell) on performance of beef and dairy cattle In Proceedings of the Society of Nutrition Physiology, Band 11.
- Eugène M, Archimède H, Michalet-Doreau B, Fonty G (2004) Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Anim. Res.* **53** : 187–200
- FAO/WHO (2006) Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food Nutr. Pap.*
- Faulds CB, Mandalari G, Lo Curto RB, Bisignano G, Christakopoulos P, Waldron KW (2006) Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71** : 622–9
- Fazary A, Ju Y (2007) Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **39** : 811–828
- Feng L, Liu H, Liu Y, Lu Z, Guo G, Guo S, Zheng H, Gao Y, Cheng S, Wang J, Zhang K, Zhang Y (2010) Power of deep sequencing and agilent microarray for gene expression profiling study. *Mol. Biotechnol.* **45** : 101–10
- Fernando SC, Purvis HT, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Krehbiel CR, Nagaraja TG, Roe BA, Desilva U, Ii HTP (2010) Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** : 7482–90
- Findley SD, Mormile MR, Sommer-Hurley A, Zhang X, Tipton P, Arnett K, Porter JH, Kerley M, Stacey G (2011) Activity-based metagenomic screening and biochemical characterization of bovine ruminal protozoan glycoside hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.* **77** : 8106–13

- Fliegerova K, Tapio I, Bonin A, Mrazek J, Callegari ML, Bani P, Bayat A, Vilkki J, Kopečný J, Shingfield KJ, Boyer F, Coissac E, Taberlet P, Wallace RJ (2013) Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population. *Anaerobe*
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E (2012) Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* **3** : 289–306
- Fontes CMG a, Gilbert HJ (2010) Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annu. Rev. Biochem.* **79** : 655–81
- Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2007) Les écosystèmes digestifs. Ed. Lavoisier, Paris, France.
- Fonty G, Gouet P, Jouany J-P, Senaud J (1987) Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Microbiology* **133** : 1835–1843
- Fonty G, Jouany J-P, Forano E, Gouet P (1995) L'écosystème microbien du réticulo-rumen In Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 299–347. Paris, France, INRA Editions
- Fonty G, Senaud J, Jouany JP, Gouet P (1988) Establishment of ciliate protozoa in the rumen of conventional and conventionalized lambs: influence of diet and management conditions. *Can. J. Microbiol.* **34** : 235–41
- Forano E, Broussolle V, Gaudet G, Bryant JA (1994) Molecular cloning, expression, and characterization of a new endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Curr. Microbiol.* **28** : 7–14
- Forsberg CW, Lam K (1977) Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* **33** : 528–37
- Fouts DE, Szpakowski S, Purushe J, Torralba M, Waterman RC, MacNeil MD, Alexander LJ, Nelson KE (2012) Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS One* **7** : e48289
- Frizzo LS, Zbrun MV, Soto LP, Signorini ML (2011) Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Anim. Feed Sci. Technol.* **169** : 147–156
- Fry SC (2004) Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New Phytol.* **161** : 641–675
- Galvão KN, Santos JEP, Coscioni A, Villaseñor M, Sicho WM, Berge ACB (2005) Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reprod. Nutr. Dev.* **45** : 427–40
- Gao H, Yang ZK, Gentry TJ, Wu L, Schadt CW, Zhou J (2007) Microarray-based analysis of microbial community RNAs by whole-community RNA amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** : 563–71
- Garcia-Vallvé S, Romeu a, Palau J (2000) Horizontal gene transfer of glycosyl hydrolases of the rumen fungi. *Mol. Biol. Evol.* **17** : 352–61

- Gentry TJ, Wickham GS, Schadt CW, He Z, Zhou J (2006) Microarray applications in microbial ecology research. *Microb. Ecol.* **52** : 159–75
- Giannoukos G, Ciulla DM, Huang K, Haas BJ, IZard J, Levin JZ, Livny J, Earl AM, Gevers D, Ward D V, Nusbaum C, Birren BW, Gnirke A (2012) Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes. *Genome Biol.* **13** : R23
- Gilad R, Rabinovich L, Yaron S, Bayer EA, Lamed R, Gilbert HJ, Shoham Y (2003) CellI, a noncellulosomal family 9 enzyme from *Clostridium thermocellum*, is a processive endoglucanase that degrades crystalline cellulose. *J. Bacteriol.* **185** : 391–8
- Gilbert HJ (2010) The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. *Plant Physiol.* **153** : 444–55
- Gilbert JA, Field D, Huang Y, Edwards R, Li W, Gilna P, Joint I (2008) Detection of large numbers of novel sequences in the metatranscriptomes of complex marine microbial communities. N. Ahmed, ed. *PLoS One* **3** : e3042
- Gill M, Smith P, Wilkinson JM (2010) Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *Animal* **4** : 323–33
- Girard I, Dawson KA (1994) Effects of a yeast culture on the growth characteristics of representative ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* **77** : 300
- Glasser F, Schmidely P, Sauvant D, Doreau M (2008) Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal* **2** : 691–704
- Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 2802–13
- Godoy-Vitorino F, Goldfarb KC, Karaoz U, Leal S, Garcia-Amado M a, Hugenholtz P, Tringe SG, Brodie EL, Dominguez-Bello MG (2012) Comparative analyses of foregut and hindgut bacterial communities in hoatzins and cows. *ISME J.* **6** : 531–41
- Gong J, Forsberg CW (1989) Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 and adherence-defective mutants to cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 3039–44
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40** : 237–264
- Gosalbes MJ, Pérez-González JA, González R, Navarro A (1991) Two beta-glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo-beta-(1,3)-(1,4)-glucanase. *J. Bacteriol.* **173** : 7705–10
- Gottschalk LMF, Oliveira RA, Bon EP da S, Maria L, Gottschalk F, Pinto E (2010) Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochem. Eng. J.* **51** : 72–78

- Grenet E, Breton A, Barry P, Fonty G (1989) Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* **26** : 55–70
- Griffith GW, Baker S, Fliegerova K, Ligginstoffer A, van der Giezen M, Voigt K, Beakes G (2010) Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA Fungus* **1** : 181–5
- Groleau D, Forsberg CW (1981) Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Can. J. Microbiol.* **27** : 517–30
- Guan LL, Nkrumah JD, Basarab J a, Moore SS (2008) Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiol. Lett.* **288** : 85–91
- Guedes CM, Gonçalves D, Rodrigues MAM, Dias-da-Silva A (2008) Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **145** : 27–40
- Guo B, Li P-Y, Yue Y-S, Zhao H-L, Dong S, Song X-Y, Sun C-Y, Zhang W-X, Chen X-L, Zhang X-Y, Zhou B-C, Zhang Y-Z (2013a) Gene cloning, expression and characterization of a novel xylanase from the marine bacterium, *Glaciecola mesophila* KMM241. *Mar. Drugs* **11** : 1173–87
- Guo F, Ju F, Cai L, Zhang T (2013b) Taxonomic precision of different hypervariable regions of 16S rRNA gene and annotation methods for functional bacterial groups in biological wastewater treatment. *PLoS One* **8** : e76185
- Hallac B, Ragauskas A (2011) Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* **5** : 215–225
- Halliwell G, Bryant MP (1963) The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. *J. Gen. Microbiol.* **32** : 441–448
- Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H (2010) Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.* **153** : 384–395
- Hatfield R, Vermerris W (2001) Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol.* **126** : 1351–1357
- He S, Deng Y, Van Nostrand JD, Tu Q, Xu M, Hemme CL, Li X, Wu L, Gentry TJ, Yin Y, Liebich J, Hazen TC, Zhou J (2010a) GeoChip 3.0 as a high-throughput tool for analyzing microbial community composition, structure and functional activity. *ISME J.* **4** : 1167–79
- He S, Wurtzel O, Singh K, Froula JL, Yilmaz S, Tringe SG, Wang Z, Chen F, Lindquist E a, Sorek R, Hugenholtz P (2010b) Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. *Nat. Methods* **7** : 807–12
- He Z, Gentry TJ, Schadt CW, Wu L, Liebich J, Chong SC, Huang Z, Wu W, Gu B, Jardine P, Criddle C, Zhou J (2007) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *ISME J.* **1** : 67–77
- He Z, Wu L, Li X, Fields MW, Zhou J (2005) Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 3753–60

- Hegarty RS (1999) Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Crop Pasture Sci.* **50** : 1321–1328
- Hegarty RS, Goopy JP, Herd RM, McCorkell B (2007) Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *J. Anim. Sci.* **85** : 1479–86
- Henderson G, Cox F, Kittelmann S, Miri VH, Zethof M, Noel SJ, Waghorn GC, Janssen PH (2013) Effect of DNA extraction methods and sampling techniques on the apparent structure of cow and sheep rumen microbial communities. *PLoS One* **8** : e74787
- Henrissat B, Claeyssens M, Tomme P, Lemesle L, Mornon JP (1989) Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* **81** : 83–95
- Henrissat B, Davies G (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7** : 637–44
- Hervé C, Rogowski A, Blake AW, Marcus SE, Gilbert HJ, Knox JP (2010) Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *PNAS* **107** : 1–6
- Hess M, Sczyrba A, Egan R, Kim TT-W, Chokhawala H, Schroth G, Luo S, Clark DS, Chen F, Zhang T, Mackie RI, Pennacchio L a, Tringe SG, Visel A, Woyke T, Wang Z, Rubin EM (2011) Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science (80-. .)*. **331** : 463–7
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Thorsten Lumbsch H, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111** : 509–547
- Hobson PN (1969) Rumen bacteria In *Methods in microbiology*, 133–160. New York, Etats-Unis et Londres, Angleterre.
- Hooper L V (2004) Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* **12** : 129–34
- Hosmer K, Mohnen D, Caffall KH (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **344** : 1879–900
- Hristov AN, Vander Pol M, Agle M, Zaman S, Schneider C, Ndegwa P, Vaddella VK, Johnson K, Shingfield KJ, Karnati SKR (2009) Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. *J. Dairy Sci.* **92** : 5561–82
- Huang L, Forsberg CW (1987) Isolation of a Cellodextrinase from *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 1034–41
- Huang XD, Tan HY, Long R, Liang JB, Wright A-DG (2012) Comparison of methanogen diversity of yak (*Bos grunniens*) and cattle (*Bos taurus*) from the Qinghai-Tibetan plateau, China. *BMC Microbiol.* **12** : 237

- Hugenholtz P (2002) Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol.* **3** : REVIEWS0003
- Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium, Nelson KE, Weinstock GM, Highlander SK, Worley KC, Creasy HH, Wortman JR, Rusch DB, Mitreva M, Sodergren E, Chinwalla AT, Feldgarden M, Gevers D, Haas BJ, Madupu R, Ward D V, Birren BW, Gibbs RA, Methe B *et al.* (2010) A catalog of reference genomes from the human microbiome. *Science (80-)*. **328** : 994–9
- Hungate R (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes In : Academic Press (Eds), *Methods in microbiology*, 117–132. New York.
- Hungate RE (1950) The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **14** : 1–49
- Huws SA, Kim EJ, Lee MRF, Scott MB, Tweed JKS, Pinloche E, Wallace RJ, Scollan ND (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. *Environ. Microbiol.* **13** : 1500–12
- Huyghe A, Francois P, Charbonnier Y, Tangomo-Bento M, Bonetti E-J, Paster BJ, Bolivar I, Baratti-Mayer D, Pittet D, Schrenzel J (2008) Novel microarray design strategy to study complex bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** : 1876–85
- Irwin DC, Zhang S, Wilson DB (2000) Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. *Eur. J. Biochem.* **267** : 4988–97
- Ivan M, Mir P., Koenig K., Rode L., Neill L, Entz T, Mir Z (2001) Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rumin. Res.* **41** : 215–227
- Iyo AH, Forsberg CW (1994) Features of the cellodextrinase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Can. J. Microbiol.* **40** : 592–6
- Jami E, Mizrahi I (2012a) Similarity of the ruminal bacteria across individual lactating cows. *Anaerobe* **18** : 338–43
- Jami E, Mizrahi I (2012b) Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One* **7** : e33306
- Jami E, White BA, Mizrahi I (2014) Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. M. M. Heimesaat, ed. *PLoS One* **9** : e85423
- Janssen PH, Kirs M (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** : 3619–25
- Jarrige R, Ruckebusch Y, Demarquilly C, Farce M-H, Journet M (1995) Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion. INRA Editions.
- Jeyanathan J, Martin C, Morgavi DP (2013) The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. *Anim* **11**–12

- Jindou S, Xu Q, Kenig R, Shulman M, Shoham Y, Bayer E a, Lamed R (2006) Novel architecture of family-9 glycoside hydrolases identified in cellulosomal enzymes of *Acetivibrio cellulolyticus* and *Clostridium thermocellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **254** : 308–16
- Joblin KN (1981) Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* **42** : 1119–22
- Johnson K a, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* **73** : 2483–92
- Jordan DB, Li X-L (2007) Variation in relative substrate specificity of bifunctional beta-D-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase by single-site mutations: roles of substrate distortion and recognition. *Biochim. Biophys. Acta* **1774** : 1192–8
- Jordan E, Lovett DK, Monahan FJ, Callan J, Flynn B, O'Mara FP (2006) Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* **84** : 162–70
- Josè-Estanyol M, Puigdomènech P (2000) Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiol. Biochem.* **38** : 97–108
- Jouany J-P (2006) Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Anim. Reprod. Sci.* **96** : 250–64
- Jouany JP, Broudiscou L, Prins RA, Komisarczuk-Bony S (1995) Métabolisme et Nutrition de la population microbienne du rumen In Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 349–382. Paris, France, INRA Editions
- Jun HS, Ha JK, Malburg LM, Verrinder GAM, Forsberg CW (2003) Characteristics of a cluster of xylanase genes in *Fibrobacter succinogenes* S85. *Can. J. Microbiol.* **49** : 171–80
- Kam DK, Jun H-S, Ha JK, Inglis GD, Forsberg CW (2005) Characteristics of adjacent family 6 acetylxy lan esterases from *Fibrobacter succinogenes* and the interaction with the Xyn10E xylanase in hydrolysis of acetylated xylan. *Can. J. Microbiol.* **51** : 821–32
- Kane MD, Jatko e T a, Stumpf CR, Lu J, Thomas JD, Madore SJ (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.* **28** : 4552–7
- Kang S, Denman SE, Morrison M, Yu Z, Dore J, Leclerc M, McSweeney CS (2010) Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflamm. Bowel Dis.* **16** : 2034–42
- Kang S, Denman SE, Morrison M, Yu Z, McSweeney CS (2009) An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. *Curr. Microbiol.* **58** : 464–71
- Kang SH, Evans P, Morrison M, McSweeney C (2013) Identification of metabolically active proteobacterial and archaeal communities in the rumen by DNA- and RNA-derived 16S rRNA gene. *J. Appl. Microbiol.* **115** : 644–53

- El Kaoutari A, Armougom F, Leroy Q, Vialettes B, Million M, Raoult D, Henrissat B (2013) Development and validation of a microarray for the investigation of the CAZymes encoded by the human gut microbiome. *PLoS One* **8** : e84033
- Karnati SKR, Yu Z, Sylvester JT, Dehority BA, Morrison M, Firkins JL (2003) Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *J. Anim. Sci.* **81** : 812–5
- Kenters N, Henderson G, Jeyanathan J, Kittelmann S, Janssen PH (2011) Isolation of previously uncultured rumen bacteria by dilution to extinction using a new liquid culture medium. *J. Microbiol. Methods* **84** : 52–60
- Khafipour E, Li S, Plaizier JC, Krause DO (2009) Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** : 7115–24
- Kim EJ, Huws SA, Lee MRF, Wood JD, Muetzel SM, Wallace RJ, Scollan ND (2008) Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and trans-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J. Nutr.* **138** : 889–96
- Kim M, Morrison M, Yu Z (2011a) Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* **76** : 49–63
- Kim M, Morrison M, Yu Z (2011b) Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J. Microbiol. Methods* **84** : 81–7
- Kim M, Morrison M, Yu Z (2011c) Development of RumenArray for comprehensive analysis of ruminal bacteriome In 8ème Symposium INRA-Rowett Gut Microbiology, P–94. Clermont-Ferrand, France.
- Kittelmann S, Janssen PH (2011) Characterization of rumen ciliate community composition in domestic sheep, deer, and cattle, feeding on varying diets, by means of PCR-DGGE and clone libraries. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75** : 468–81
- Kittelmann S, Naylor GE, Koolaard JP, Janssen PH (2012) A proposed taxonomy of anaerobic fungi (class Neocallimastigomycetes) suitable for large-scale sequence-based community structure analysis. *PLoS One* **7** : e36866
- Kittelmann S, Seedorf H, Walters W a, Clemente JC, Knight R, Gordon JI, Janssen PH (2013) Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. B. A. White, ed. *PLoS One* **8** : e47879
- Klemm D, Heublein B, Fink H-P, Bohn A (2005) Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew. Chemie* **44** : 3358–93
- Klieve a V, Bauchop T (1988) Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1637–41
- Klieve A V, Swain RA (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 2299–303

- Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glöckner FO (2012) Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **41** : e1
- Kobayashi Y, Shinkai T, Koike S (2008) Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion - review. *Folia Microbiol. (Praha)*. **53** : 195–200
- Koenig KM, Newbold CJ, McIntosh FM, Rode LM (2000) Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *J. Anim. Sci.* **78** : 2431–45
- Koike S, Kobayashi Y (2001) Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* **204** : 361–6
- Koike S, Pan J, Kobayashi Y, Tanaka K (2003a) Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J. Dairy Sci.* **86** : 1429–35
- Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y, Tanaka K (2003b) Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **229** : 23–30
- Kong Y, He M, McAlister T, Seviour R, Forster R (2010) Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of microbial communities in the rumens of cattle fed different diets. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** : 6933–8
- Kong Y, Xia Y, Seviour R, Forster R, McAllister T a (2012) Biodiversity and composition of methanogenic populations in the rumen of cows fed alfalfa hay or triticale straw. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1–14
- Koshland DE (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev.* **28** : 416–436
- Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **27** : 663–93
- Kruus K, Wang WK, Ching J, Wu JH (1995) Exoglucanase activities of the recombinant *Clostridium thermocellum* CelS, a major cellulosome component. *J. Bacteriol.* **177** : 1641–4
- Kumar S, Dagar SS, Mohanty AK, Sirohi SK, Puniya M, Kuhad RC, Sangu KPS, Griffith GW, Puniya AK (2011) Enumeration of methanogens with a focus on fluorescence *in situ* hybridization. *Naturwissenschaften* **98** : 457–72
- Kušar D, Avguštin G (2012) Optimization of the DGGE band identification method. *Folia Microbiol. (Praha)*. **57** : 301–6
- Lamendella R, Domingo JWS, Ghosh S, Martinson J, Oerther DB (2011) Comparative fecal metagenomics unveils unique functional capacity of the swine gut. *BMC Microbiol.* **11** : 103

- Lampert DT a, Kieliszewski MJ, Chen Y, Cannon MC (2011) Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *Plant Physiol.* **156** : 11–9
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23** : 2947–8
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** : 13057–62
- Lasken RS (2012) Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat. Rev. Microbiol.* **10** : 631–40
- LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M (2013) Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24** : 160–8
- Lee CC, Kibblewhite-Accinelli RE, Wagschal K, Robertson GH, Wong DWS (2006) Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library. *Extremophiles* **10** : 295–300
- Lee HJ, Jung JY, Oh YK, Lee S-S, Madsen EL, Jeon CO (2012) Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using bar-coded pyrosequencing and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **78** : 5983–93
- Lee SS, Ha JK, Cheng K (2000) Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** : 3807–13
- Leedle JA, Greening RC (1988) Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 502–6
- Lemoine S, Combes F, Le Crom S (2009) An evaluation of custom microarray applications: the oligonucleotide design challenge. *Nucleic Acids Res.* **37** : 1726–39
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Møller K (2002a) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 673–90
- Leser TD, Boye M, Amenuvor JZ, Jensen TK, Moller K (2002b) Development of a microarray for structural analysis of pig gastrointesinal bacterial communities. *Reprod. Nutr. Dev.* **42** :
- Letowski J, Brousseau R, Masson L (2004) Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J. Microbiol. Methods* **57** : 269–78
- Lettat A, Nozière P, Berger C, Martin C (2012a) Procédé de réduction de la production de méthane chez un animal ruminant - Brevet WO2012147044

- Lettat A, Nozière P, Silberberg M, Morgavi DP, Berger C, Martin C (2012b) Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *BMC Microbiol.* **12** : 142
- Levasseur A, Drula E, Lombard V, Coutinho PM, Henrissat B (2013) Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol. Biofuels* **6** : 1
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320** : 1647–51
- Li L-L, McCorkle SR, Monchy S, Taghavi S, van der Lelie D (2009) Bioprospecting metagenomes: glycosyl hydrolases for converting biomass. *Biotechnol. Biofuels* **2** : 10
- Li RW, Wu S, Baldwin RL, Li W, Li C (2012) Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. *PLoS One* **7** : e29392
- Li ZP, Liu HL, Li GY, Bao K, Wang KY, Xu C, Yang YF, Yang FH, Wright A-DG (2013) Molecular diversity of rumen bacterial communities from tannin-rich and fiber-rich forage fed domestic Sika deer (*Cervus nippon*) in China. *BMC Microbiol.* **13** : 151
- Liggenstoffer AS, Youssef NH, Couger MB, Elshahed MS (2010) Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and non-ruminant herbivores. *ISME J.* **4** : 1225–35
- Liu H, Pereira JH, Adams PD, Sapra R, Simmons B a, Sale KL (2010) Molecular simulations provide new insights into the role of the accessory immunoglobulin-like domain of Cel9A. *FEBS Lett.* **584** : 3431–5
- Liu R, Yu H, Huang Y (2005) Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose* **12** : 25–34
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès J-P, Godon J-J (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* **8** : 720–31
- Looft T, Johnson T a, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, Sul WJ, Stedtfeld TM, Chai B, Cole JR, Hashsham S a, Tiedje JM, Stanton TB (2012) In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** : 1691–6
- Lourenço M, Ramos-Morales E, Wallace RJ (2010) The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* **4** : 1008–23
- Lowe SE, Theodorou MK, Trinci APJ, Hespell RB (1985) Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. *Microbiology* **131** : 2225–2229
- Lucas S, Copeland A, Lapidus A, Glavina del Rio T, Tice H, Bruce D, Goodwin L, Pitluck S, Chertkov O, Detter J, Han C, Tapia R, Larimer F, Land M, Hauser L, Kyrpides N, Mikhailova N,

- Weimer P, Stevenson D *et al.* (2009) Complete sequence of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Non publié*
- Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148** : 3521–30
- Lwin KO, Hayakawa M, Ban-Tokuda T, Matsui H (2011) Real-time PCR assays for monitoring anaerobic fungal biomass and population size in the rumen. *Curr. Microbiol.* **62** : 1147–51
- Maamar H, Abdou L, Boileau C, Valette O, Tardif C (2006) Transcriptional analysis of the *cip-cel* gene cluster from *Clostridium cellulolyticum*. *J. Bacteriol.* **188** : 2614–24
- Machmüller A (2006) Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric. Ecosyst. Environ.* **112** : 107–114
- Maia MRG, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, Graham IA, Wallace RJ (2010) Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* **10** : 52
- Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ (2007) Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91** : 303–14
- Mao H-L, Wang J-K, Zhou Y-Y, Liu J-X (2010) Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livest. Sci.* **129** : 56–62
- Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R, Bayourthe C (2008) How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.* **91** : 3528–35
- Martens EC, Koropatkin NM, Smith TJ, Gordon JI (2009a) Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes Sus-like paradigm. *J. Biol. Chem.* **284** : 24673–7
- Martens EC, Roth R, Heuser JE, Gordon JI (2009b) Coordinate regulation of glycan degradation and polysaccharide capsule biosynthesis by a prominent human gut symbiont. *J. Biol. Chem.* **284** : 18445–57
- Martin C, Brossard L, Doreau M (2006) Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Prod. Anim* **19** : 93–108
- Martin C, Devillard E, Michalet-Doreau B (1999) Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* **77** : 979–87
- Martin C, Millet L, Fonty G, Michalet-Doreau B (2001) Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* **41** : 413–24
- Martin C, Mirande C, Morgavi DP, Forano E, Devillard E, Mosoni P (2013) Methionine analogues HMB and HMBi increase the abundance of cellulolytic bacterial representatives in the rumen of cattle with no direct effects on fibre degradation. *Anim. Feed Sci. Technol.* **182** : 16–24

- Martin C, Morgavi DP, Doreau M (2010) Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* **4** : 351–65
- Martin C, Rouel J, Jouany JP, Doreau M, Chilliard Y (2008) Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.* **86** : 2642–50
- Matsuo N, Kaneko S, Kuno A, Kobayashi H, Kusakabe I (2000) Purification, characterization and gene cloning of two alpha-L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. *Biochem. J.* **346** : 9–15
- Matulova M, Nouaille R, Capek P, Péan M, Delort A-M, Forano E (2008) NMR study of cellulose and wheat straw degradation by *Ruminococcus albus* 20. *FEBS J.* **275** : 3503–11
- Matulova M, Nouaille R, Capek P, Péan M, Forano E, Delort A-M (2005) Degradation of wheat straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a liquid- and solid-state nuclear magnetic resonance study. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** : 1247–53
- Mba Medie F, Davies GJ, Drancourt M, Henrissat B (2012) Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. *Nat. Rev. Microbiol.* **10** : 227–34
- McGavin M, Forsberg CW (1988) Isolation and characterization of endoglucanases 1 and 2 from *Bacteroides succinogenes* S85. *J. Bacteriol.* **170** : 2914–22
- McGinn SM, Beauchemin KA, Coates T, Colombatto D (2004) Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* **82** : 3346–56
- McSweeney CS, Dulieu A, Katayama Y, Lowry JB (1994) Solubilization of lignin by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix patriciarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 2985–9
- De Menezes AB, Lewis E, O'Donovan M, O'Neill BF, Clipson N, Doyle EM (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **78** : 256–65
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11** : 31–46
- Michalet-Doreau B, Fernandez I, Fonty G (2002) A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* **80** : 790–6
- Michalet-Doreau B, Fernandez I, Peyron C, Millet L, Fonty G (2001) Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.* **41** : 187–94
- Mihajlovski A, Alric M, Brugère J-F (2008) A putative new order of methanogenic Archaea inhabiting the human gut, as revealed by molecular analyses of the *mcrA* gene. *Res. Microbiol.* **159** : 516–21
- Milton C, Rimour S, Missaoui M, Biderre C, Barra V, Hill D, Moné A, Gagne G, Meier H, Peyretailade E, Peyret P (2007) PhylArray: phylogenetic probe design algorithm for microarray. *Bioinformatics* **23** : 2550–7

- Miller TL (1978) The pathway of formation of acetate and succinate from pyruvate by *Bacteroides succinogenes*. *Arch. Microbiol.* **117** : 145–52
- Mir Z, Mir PS (1994) Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets and on feed digestibility and *in situ* degradability. *J. Anim. Sci.* **72** : 537–45
- Mirande C, Kadlecikova E, Matulova M, Capek P, Bernalier-Donadille A, Forano E, Béra-Maillet C (2010a) Dietary fibre degradation and fermentation by two xylanolytic bacteria *Bacteroides xylanisolvens* XB1A and *Roseburia intestinalis* XB6B4 from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* **109** : 451–60
- Mirande C, Mosoni P, Béra-Maillet C, Bernalier-Donadille A, Forano E (2010b) Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87** : 2097–105
- Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M (2001) Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* **84** : 1294–309
- Mizrahi-Man O, Davenport ER, Gilad Y (2013) Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. B. A. White, ed. *PLoS One* **8** : e53608
- Mohnen D (2008) Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11** : 266–77
- Moore AM, Munck C, Sommer MOA, Dantas G (2011) Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. *Front. Microbiol.* **2** : 188
- Morgavi DP, Kelly WJ, Janssen PH, Attwood GT (2012) Rumen microbial (meta)genomics and its application to ruminant production. *Animals* **11**–18
- Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G, Gouet P (1996) Quantitative determination of H₂ -utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Curr. Microbiol.* **32** : 129–133
- Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Béra-Maillet C, Forano E (2007) Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *J. Appl. Microbiol.* **103** : 2676–85
- Mosoni P, Martin C, Forano E, Morgavi DP (2011) Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *J. Anim. Sci.* **89** : 783–91
- Mosoni P, Rochette Y, Graviou D, Martin C, Forano E, Morgavi DP (2008) Influence of protozoa on the number of cellulolytic bacteria and methanogens in the rumen of sheep evaluated by qPCR In 6th INRA RRI Symp. Gut Microb., 46. Clermont-Ferrand, France.
- Mueller RE, Iannotti EL, Asplund JM (1984) Isolation and identification of adherent epimural bacteria during succession in young lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* **47** : 724–30

- Murrell JC, Radajewski S (2000) Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. *Res. Microbiol.* **151** : 807–14
- Nagaraja TG, Newbold CJ, Nevel CJ, Demeyer DI (1997) Manipulation of ruminal fermentation In : Springer Netherlands (Eds), *The Rumen Microbial Ecosystem* SE - 13, 523–632.
- Nagaraja TG, Titgemeyer EC (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* **90 Suppl 1** : E17–38
- Nakashima K, Sugiyama J, Satoh N (2008) A spectroscopic assessment of cellulose and the molecular mechanisms of cellulose biosynthesis in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mar. Genomics* **1** : 9–14
- Nataf Y, Bahari L, Kahel-Raifer H, Borovok I, Lamed R, Bayer EA, Sonenshein AL, Shoham Y (2010) *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes are regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative sigma factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** : 18646–51
- Nechvatal JM, Ram JL, Basson MD, Namprachan P, Niec SR, Badsha KZ, Matherly LH, Majumdar APN, Kato I (2008) Fecal collection, ambient preservation, and DNA extraction for PCR amplification of bacterial and human markers from human feces. *J. Microbiol. Methods* **72** : 124–32
- Neilson JW, Jordan FL, Maier RM (2013) Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J. Microbiol. Methods* **92** : 256–63
- Newbold CJ, Wallace RJ, Chen XB, McIntosh FM (1995) Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* **73** : 1811–8
- Newbold CJ, Wallace RJ, McIntosh FM (1996) Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* **76** : 249–61
- Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, Opsteegh M, Langelaar M, Threlfall J, Scheutz F, van der Giessen J, Kruse H (2010) Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol.* **139 Suppl** : S3–15
- Nicholson MJ, Theodorou MK, Brookman JL (2005) Molecular analysis of the anaerobic rumen fungus *Orpinomyces* - insights into an AT-rich genome. *Microbiology* **151** : 121–33
- Nisbet DJ, Martin SA (1991) Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* **69** : 4628–33
- Nkrumah JD, Okine EK, Mathison GW, Schmid K, Li C, Basarab JA, Price MA, Wang Z, Moore SS (2006) Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J. Anim. Sci.* **84** : 145–53
- Noblet J, Fortune H, Dubois S, Henry Y (1989) Nouvelles bases d'estimation des teneurs en énergie digestible, métabolisable et nette des aliments pour le porc Paris, INRA Editions.

- Nouaille R, Matulova M, Pätöprstý V, Delort A-M, Forano E (2009) Production of oligosaccharides and cellobionic acid by *Fibrobacter succinogenes* S85 growing on sugars, cellulose and wheat straw. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83** : 425–33
- Nyonyo T, Shinkai T, Tajima a, Mitsumori M (2013) Effect of media composition, including gelling agents, on isolation of previously uncultured rumen bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **56** : 63–70
- De O Buanafina MM (2009) Feruloylation in grasses: current and future perspectives. *Mol. Plant* **2** : 861–72
- Ó Cuív P, Aguirre de Cárcer D, Jones M, Klaassens ES, Worthley DL, Whitehall VLJ, Kang S, McSweeney CS, Leggett B a, Morrison M (2011) The effects from DNA extraction methods on the evaluation of microbial diversity associated with human colonic tissue. *Microb. Ecol.* **61** : 353–62
- O’Sullivan A (1997) Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* **4** : 173–207
- Ogino A, Orito H, Shimada K, Hirooka H (2007) Evaluating environmental impacts of the Japanese beef cow calf-system by the life cycle assessment method. *Anim. Sci. J.* **78** : 424–432
- Ohara H, Karita S, Kimura T, Sakka K, Ohmiya K (2000) Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) from *Ruminococcus albus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64** : 254–60
- Ohene-Adjei S, Teather RM, Ivan M, Forster RJ (2007) Postinoculation protozoan establishment and association patterns of methanogenic archaea in the ovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** : 4609–18
- Olson DG, Tripathi SA, Giannone RJ, Lo J, Caiazza NC, Hogsett DA, Hettich RL, Guss AM, Dubrovsky G, Lynd LR (2010) Deletion of the Cel48S cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107** : 17727–32
- De Ondarza MB, Sniffen CJ, Dussert L, Chevaux E, Sullivan J, Walker N (2010) Case study: multiple-study analysis of the effect of live yeast on milk yield, milk component content and yield, and feed efficiency. *Prof. Anim. Sci.* **26** : 661–666
- Orpin CG (1975) Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* **91** : 249–62
- Orpin CG (1981) Fungi in ruminant degradation In Degradation of plant cell-wall material , Agricultural Research Council, 37–46. London, UK.
- Parisot N, Denonfoux J, Dugat-Bony E, Peyret P, Peyretailade E (2012) KASpOD--a web service for highly specific and explorative oligonucleotide design. *Bioinformatics* **28** : 3161–2
- Park YB, Cosgrove DJ (2012) A revised architecture of primary cell walls based on biomechanical changes induced by substrate-specific endoglucanases. *Plant Physiol.* **158** : 1933–43
- Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A (2012) “Methanoplasmatales,” Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **78** : 8245–53

- Perez JM (1990) Prédiction de l'énergie digestible des aliments pour le porc : intérêt du dosage des parois végétales par voie enzymatique. *INRA Prod. Anim* **3** : 171–179
- Peterson RE, Klopfenstein TJ, Erickson GE, Folmer J, Hinkley S, Moxley RA, Smith DR (2007) Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. *J. Food Prot.* **70** : 287–91
- Pfleiderer A, Lagier J-C, Armougom F, Robert C, Vialettes B, Raoult D (2013) Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **32** : 1471–81
- Pinloche E, McEwan N, Marden J-P, Bayourthe C, Auclair E, Newbold CJ (2013) The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PLoS One* **8** : e67824
- Pitta DW, Pinchak E, Dowd SE, Osterstock J, Gontcharova V, Youn E, Dorton K, Yoon I, Min BR, Fulford JD, Wickersham TA, Malinowski DP (2010) Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.* **59** : 511–22
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW (2008) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* **176** : 21–31
- Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.* **13** : 236–46
- Pope PB, Mackenzie AK, Gregor I, Smith W, Sundset M a, McHardy AC, Morrison M, Eijsink VGH (2012) Metagenomics of the Svalbard reindeer rumen microbiome reveals abundance of polysaccharide utilization loci. *PLoS One* **7** : e38571
- Pope PB, Smith W, Denman SE, Tringe SG, Barry K, Hugenholtz P, McSweeney CS, McHardy a C, Morrison M (2011) Isolation of *Succinivibrionaceae* implicated in low methane emissions from Tamar wallabies. *Science* **333** : 646–8
- Popova M, Martin C, Eugène M, Mialon MM, Doreau M, Morgavi DP (2011) Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **166** : 113–121
- Popova M, Martin C, Morgavi DP (2010) Improved protocol for high-quality co-extraction of DNA and RNA from rumen digesta. *Folia Microbiol. (Praha).* **55** : 368–72
- Popova M, Morgavi DP, Martin C (2012) Methanogens and methanogenesis in the rumen and cecum of lambs fed two different high-concentrate diets. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WGT, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB (2011) Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62** : 567–590
- Poroyko V, White JR, Wang M, Donovan S, Alverdy J, Liu DC, Morowitz MJ (2010) Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets. *PLoS One* **5** : e12459

- Poulsen M, Schwab C, Borg Jensen B, Engberg RM, Spang A, Canibe N, Højberg O, Milinovich G, Fragner L, Schleper C, Weckwerth W, Lund P, Schramm A, Urich T, Jensen BB (2013) Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat. Commun.* **4** : 1428
- Prins RA, Rheenen DL, Klooster AT (1983) Characterization of microbial proteolytic enzymes in the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49** : 585–595
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glöckner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* **35** : 7188–96
- Purushe J, Fouts DE, Morrison M, White B a, Mackie RI, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE (2010) Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and *Prevotella bryantii*: insights into their environmental niche. *Microb. Ecol.* **60** : 721–9
- Qi M, Jun H-S, Forsberg CW (2007) Characterization and synergistic interactions of *Fibrobacter succinogenes* glycoside hydrolases. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** : 6098–105
- Qi M, Wang P, O’Toole N, Barboza PS, Ungerfeld E, Leigh MB, Selinger LB, Butler G, Tsang A, McAllister T a, Forster RJ (2011) Snapshot of the eukaryotic gene expression in muskoxen rumen--a metatranscriptomic approach. *PLoS One* **6** : e20521
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li SSSSSS, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464** : 59–65
- Quince C, Curtis TP, Sloan WT (2008) The rational exploration of microbial diversity. *ISME J.* **2** : 997–1006
- Quiroz-Castañeda RE, Folch-Mallol JL (2011) Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotechnol. Apl.* **28** : 205–215
- Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, de Vos WM (2009) Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ. Microbiol.* **11** : 1736–51
- Rakotoarivonina H, Larson MA, Morrison M, Girardeau J-P, Gaillard-Martinie B, Forano E, Mosoni P (2005) The *Ruminococcus albus pilA1-pilA2* locus: expression and putative role of two adjacent *pil* genes in pilus formation and bacterial adhesion to cellulose. *Microbiology* **151** : 1291–9
- Rakotoarivonina H, Terrie C, Chambon C, Forano E, Mosoni P (2009) Proteomic identification of CBM37-containing cellulases produced by the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 20 and their putative involvement in bacterial adhesion to cellulose. *Arch. Microbiol.* **191** : 379–88

- Ralph J, Lundquist K, Brunow G, Lu F, Kim H, Schatz PF, Marita JM, Hatfield RD, Ralph S a., Christensen JH, Boerjan W (2004) Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl- propanoids. *Phytochem. Rev.* **3** : 29–60
- Ransom-Jones E, Jones DL, McCarthy AJ, McDonald JE (2012) The Fibrobacteres: an important phylum of cellulose-degrading bacteria. *Microb. Ecol.* **63** : 267–81
- Rapport du Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Pêche L'alimentation animale, principale destination des productions végétales Consultable : <http://agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/conjsynt208201304mpro.pdf>.
- Rastogi G, Osman S, Vaishampayan PA, Andersen GL, Stetler LD, Sani RK (2010) Microbial diversity in uranium mining-impacted soils as revealed by high-density 16S microarray and clone library. *Microb. Ecol.* **59** : 94–108
- Reilly K, Carruthers VR, Attwood GT (2002) Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. *Microb. Ecol.* **43** : 259–70
- Relógio A, Schwager C, Richter A, Ansorge W, Valcárcel J (2002) Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* **30** : e51
- Rémond B, Brugère H, Poncet C, Baumont R (1995) Le contenu du réticulo-rumen In Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 253–298. Paris, France, INRA Editions
- Rey M (2012) Implantation du microbiote et mise en place des fonctions du rumen chez le veau de race laitière et effet de la supplémentation en levures vivantes. Université de Toulouse
- Rezaeian M, Beakes GW, Parker DS (2004) Distribution and estimation of anaerobic zoosporic fungi along the digestive tracts of sheep. *Mycol. Res.* **108** : 1227–1233
- Rhee S-K, Liu X, Wu L, Chong SC, Wan X, Zhou J (2004) Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 4303–17
- Ricard G, McEwan NR, Dutilh BE, Jouany J-P, Macheboeuf D, Mitsumori M, McIntosh FM, Michalowski T, Nagamine T, Nelson N, Newbold CJ, Nsabimana E, Takenaka A, Thomas N a, Ushida K, Hackstein JHP, Huynen M a (2006) Horizontal gene transfer from Bacteria to rumen Ciliates indicates adaptation to their anaerobic, carbohydrates-rich environment. *BMC Genomics* **7** : 22
- Rigsbee L, Agans R, Foy BD, Paliy O (2011) Optimizing the analysis of human intestinal microbiota with phylogenetic microarray. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75** : 332–42
- Rimour S, Hill D, Milton C, Peyret P (2005) GoArrays: highly dynamic and efficient microarray probe design. *Bioinformatics* **21** : 1094–103
- Rincon MT, Dassa B, Flint HJ, Travis AJ, Jindou S, Borovok I, Lamed R, Bayer E a, Henrissat B, Coutinho PM, Antonopoulos D a, Berg Miller ME, White B a (2010) Abundance and diversity of dockerin-containing proteins in the fiber-degrading rumen bacterium, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *PLoS One* **5** : e12476

- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* **1** : 283–90
- Rorbach J, Bobrowicz A, Pearce S, Minczuk M (2014) Polyadenylation in bacteria and organelles. *Methods Mol. Biol.* **1125** : 211–27
- Ross P, Mayer R, Benziman M (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* **55** : 35–58
- Sadet S, Martin C, Meunier B, Morgavi DP (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1** : 939–44
- Sanandiya ND, Prasad K, Meena R, Siddhanta AK (2010) Cellulose of *Salicornia brachiata*. *Nat. Prod. Commun.* **5** : 603–606
- Sánchez MM, Pastor FIJ, Diaz P (2003) Exo-mode of action of cellobiohydrolase Cel48C from *Paenibacillus* sp. BP-23. A unique type of cellulase among Bacillales. *Eur. J. Biochem.* **270** : 2913–9
- Saulnier L, Guillon F (2012) Cell wall deposition and metabolism in wheat grain. *J. Cereal Sci.* **56** : 91–108
- Sauvant D, Meschy F, Mertens D (1999) Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Prod. Anim* **12** : 46–60
- Scheller HV, Ulvskov P (2010) Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61** : 263–89
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270** : 467–70
- Schloss PD (2009) A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. *PLoS One* **4** : e8230
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75** : 7537–41
- Seifert GJ, Roberts K (2007) The biology of arabinogalactan proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58** : 137–61
- Sekhavati MH, Mesgaran MD, Nassiri MR, Mohammadabadi T, Rezaii F, Fani Maleki A (2009) Development and use of quantitative competitive PCR assays for relative quantifying rumen anaerobic fungal populations in both *in vitro* and *in vivo* systems. *Mycol. Res.* **113** : 1146–53
- Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E (2011) The fecal virome of pigs on a high-density farm. *J. Virol.* **85** : 11697–708
- Shannon CE (1948) A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* **27** : 379–423

- Shaw N, Irwin D, Wilson D (2000) Cloning and sequencing of a 6.7 kb fragment of *Fibrobacter succinogenes* S-85 DNA encoding four open reading frames homologous to glycosyl hydrolases and showing xylanase activity on RBB xylan plates. *Non publié*
- Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington J a, Baker SC, Collins PJ, de Longueville F, Kawasaki ES, Lee KY, Luo Y, Sun YA, Willey JC, Setterquist R a, Fischer GM, Tong W, Dragan YP, Dix DJ, Frueh FW *et al.* (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat. Biotechnol.* **24** : 1151–61
- Shin EC, Choi BR, Lim WJ, Hong SY, An CL, Cho KM, Kim YK, An JM, Kang JM, Lee SS, Kim H, Yun HD (2004) Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. *Anaerobe* **10** : 313–9
- Shingfield KJ, Ahvenjärvi S, Toivonen V, Vanhatalo A, Huhtanen P, Griinari JM (2008) Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *Br. J. Nutr.* **99** : 971–83
- Shingfield KJ, Kairenius P, Arölä A, Paillard D, Muetzel S, Ahvenjärvi S, Vanhatalo A, Huhtanen P, Toivonen V, Griinari JM, Wallace RJ (2012) Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* **142** : 1437–48
- Shinkai T, Kobayashi Y (2007) Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** : 1646–52
- Shoseyov O, Shani Z, Levy I (2006) Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70** : 283–95
- Silberberg M, Chaucheyras-Durand F, Commun L, Mialon MM, Monteils V, Mosoni P, Morgavi DP, Martin C (2013) Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep. *Animal* **7** : 1910–20
- Simpson EH (1949) Measurement of Diversity. *Nature* **163** : 688–688
- Sirohi SK, Chaudhary PP, Singh N, Singh D, Puniya AK (2013) The 16S rRNA and *mcrA* gene based comparative diversity of methanogens in cattle fed on high fibre based diet. *Gene* **523** : 161–6
- Sirohi SK, Singh N, Dagar SS, Puniya AK (2012) Molecular tools for deciphering the microbial community structure and diversity in rumen ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95** : 1135–54
- Skillman LC, Evans PN, Strömpl C, Joblin KN (2006) 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* **42** : 222–8
- Smith P, Martino D, Cai Z, Gwary D, Janzen H, Kumar P, McCarl B, Ogle S, O'Mara F, Rice C, Scholes B, Sirotenko O (2007) Agriculture in climate change 2007: Mitigation. Contribution of

- working group III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge, United Kingdom et New York, NY, USA.
- Soergel DAW, Dey N, Knight R, Brenner SE (2012) Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* **6** : 1440–4
- Van Soest PJ (1967) Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.* **26** : 119–128
- Van Soest PJ (1982) Nutritional ecology of the ruminant: Ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibers, Corvallis, Oregon, USA, O & B Book
- Somerville C, Bauer S, Brininstool G, Facette M, Hamann T, Milne J, Osborne E, Paredes A, Persson S, Raab T, Vorwerk S, Youngs H (2004) Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306** : 2206–11
- Sonnenburg ED, Sonnenburg JL, Manchester JK, Hansen EE, Chiang HC, Gordon JI (2006) A hybrid two-component system protein of a prominent human gut symbiont couples glycan sensing *in vivo* to carbohydrate metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103** : 8834–9
- Stewart C, Flint H (1989) *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30** : 433–9
- Stewart FJ, Ottesen E a, DeLong EF (2010) Development and quantitative analyses of a universal rRNA-subtraction protocol for microbial metatranscriptomics. *ISME J.* **4** : 896–907
- Stralis-Pavese N, Sessitsch A, Weilharter A, Reichenauer T, Riesing J, Csontos J, Murrell JC, Bodrossy L (2004) Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. *Environ. Microbiol.* **6** : 347–63
- Suen G, Stevenson DM, Bruce DC, Chertkov O, Copeland A, Cheng J, Detter C, Detter JC, Goodwin L a, Han CS, Hauser LJ, Ivanova NN, Kyrpides NC, Land ML, Lapidus A, Lucas S, Ovchinnikova G, Pitluck S, Tapia R *et al.* (2011a) Complete genome of the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7. *J. Bacteriol.* **193** : 5574–5
- Suen G, Weimer PJ, Stevenson DM, Aylward FO, Boyum J, Deneke J, Drinkwater C, Ivanova NN, Mikhailova N, Chertkov O, Goodwin L a, Currie CR, Mead D, Brumm PJ (2011b) The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. *PLoS One* **6** : e18814
- Sukharnikov LO, Alahuhta M, Brunecky R, Upadhyay A, Himmel ME, Lunin V V, Zhulin IB, Himmel E, Igor B (2012) Sequence, structure, and evolution of cellulases in glycoside hydrolase family 48. *J. Biol. Chem.* **287** : 41068–77
- Sun R (1996) Fractional and structural characterization of wheat straw hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* **29** : 325–331
- Sun R, Fang J, Rowlands P (1998) Physico-chemical and thermal characterization of alkali-soluble lignins from wheat straw. *Polym. J.* **30** : 289–294

- Sun R, Lawther JM, Banks WB (1995) Influence of alkaline pre-treatments on the cell wall components of wheat straw. *Ind. Crops Prod.* **4** : 127–145
- Sylvester JT, Karnati SKR, Yu Z, Morrison M, Firkins JL (2004) Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *J. Nutr.* **134** : 3378–84
- Sylvester JT, Karnati SKR, Yu Z, Newbold CJ, Firkins JL (2005) Evaluation of a real-time PCR assay quantifying the ruminal pool size and duodenal flow of protozoal nitrogen. *J. Dairy Sci.* **88** : 2083–95
- Tabe ES, Oloya J, Doetkott DK, Bauer ML, Gibbs PS, Khaita ML (2008) Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *J. Food Prot.* **71** : 539–44
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y (2001) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 2766–74
- Takenak A, D’Silva CG, Kudo H, Itabashi H, Cheng K-J (1999) Molecular cloning, expression, and characterization of an endo-beta-1,4-glucanase cDNA from *Epidinium caudatum*1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45** : 57–61
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28** : 2731–9
- Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet J-P, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DLE, Nalin R, Dore J, Leclerc M (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* **11** : 2574–84
- Teeri T (1997) Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.* **7799** : 141–148
- Terrat S, Peyretailade E, Gonçalves O, Dugat-Bony E, Gravelat F, Moné A, Biderre-Petit C, Boucher D, Troquet J, Peyret P (2010) Detecting variants with Metabolic Design, a new software tool to design probes for explorative functional DNA microarray development. *BMC Bioinformatics* **11** : 478
- Thoetkiattikul H, Mhuantong W, Laothanachareon T, Tangphatsornruang S, Pattarajinda V, Eurwilaichitr L, Champreda V (2013) comparative analysis of microbial profiles in cow rumen fed with different dietary fiber by tagged 16S rRNA gene pyrosequencing. *Curr. Microbiol.* **67** : 130–7
- Thomas LH, Forsyth VT, Sturcová A, Kennedy CJ, May RP, Altaner CM, Apperley DC, Wess TJ, Jarvis MC (2013) Structure of cellulose microfibrils in primary cell walls from collenchyma. *Plant Physiol.* **161** : 465–76

- Timmerman HM, Mulder L, Everts H, van Espen DC, van der Wal E, Klaassen G, Rouwers SMG, Hartemink R, Rombouts FM, Beynen AC (2005) Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* **88** : 2154–65
- Tiquia SM, Wu L, Chong SC, Passovets S, Xu D, Xu Y, Zhou J (2004) Evaluation of 50-mer oligonucleotide arrays for detecting microbial populations in environmental samples. *Biotechniques* **36** : 664–70, 672, 674–5
- Tisserand JL, Demarquilly C (1995) Digestion et absorption dans le gros intestin In Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 583–600. Paris, France, INRA Editions
- Torsvik V, Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5** : 240–5
- Totter W, Denonfoux J, Jaziri F, Parisot N, Missaoui M, Hill D, Borrel G, Peyretailade E, Alric M, Harris HMB, Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, Peyret P, Brugère J-F (2013) The human gut chip “HuGChip”, an explorative phylogenetic microarray for determining gut microbiome diversity at family level. *PLoS One* **8** : e62544
- Toullec R, Lallès JP (1995) Digestion dans la caillette et l'intestin grêle In Nutrition des ruminants domestiques - Ingestion et digestion, 527–582. Paris, France, INRA Editions
- Towne G, Nagaraja TG, Brandt RT, Kemp KE (1990) Ruminant ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemental fat. *J. Anim. Sci.* **68** : 2150–5
- Tuckwell DS, Nicholson MJ, McSweeney CS, Theodorou MK, Brookman JL (2005) The rapid assignment of ruminal fungi to presumptive genera using ITS1 and ITS2 RNA secondary structures to produce group-specific fingerprints. *Microbiology* **151** : 1557–67
- US-EPA (2006) Global anthropogenic non-CO2 greenhouse gas emissions: 1990-2020. United States Environmental Protection Agency, EPA 430-R-06-003 Washington, D.C., Consultable : <http://www.epa.gov/nonco2/econ-inv/downloads/GlobalAnthroEmissionsReport.pdf>.
- Vanholme R, Demedts B, Morreel K, Ralph J, Boerjan W (2010) Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* **153** : 895–905
- Větrovský T, Baldrian P (2013) The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. J. Neufeld, ed. *PLoS One* **8** : e57923
- Visakh PM, Thomas S (2010) Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. *Waste and Biomass Valorization* **1** : 121–134
- Vogel J (2008) Unique aspects of the grass cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11** : 301–307
- Vuong T, Wilson D (2010) Glycoside hydrolases: catalytic base/nucleophile diversity. *Biotechnol. Bioeng.* **107** : 195–205
- Wagner M, Smidt H, Loy A, Zhou J (2007) Unravelling microbial communities with DNA-microarrays: challenges and future directions. *Microb. Ecol.* **53** : 498–506

- Wang L, Hatem A, Catalyurek U V., Morrison M, Yu Z (2013) Metagenomic insights into the carbohydrate-active enzymes carried by the microorganisms adhering to solid digesta in the rumen of cows H. Smidt, ed. *PLoS One* **8** : e78507
- Wang P, Qi M, Barboza P, Leigh MB, Ungerfeld E, Selinger LB, McAllister TA, Forster RJ (2011a) Isolation of high-quality total RNA from rumen anaerobic bacteria and fungi, and subsequent detection of glycoside hydrolases. *Can. J. Microbiol.* **57** : 590–8
- Wang T-Y, Chen H-L, Lu M-YJ, Chen Y-CY-H, Sung H-M, Mao C-T, Cho H-Y, Ke H-M, Hwa T-Y, Ruan S-K, Hung K-Y, Chen C-K, Li J-Y, Wu Y-C, Chou S-P, Tsai Y-W, Chu T-C, Shih C-CA, Li W-H *et al.* (2011b) Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. *Biotechnol. Biofuels* **4** : 24
- Wang Y, McAllister T (2002) Rumen microbes, enzymes and feed digestion: A review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci* **15** : 1659–1676
- Wang Y, Qian P-Y (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One* **4** : e7401
- Weeks KM (2010) Advances in RNA structure analysis by chemical probing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20** : 295–304
- Weimann A, Trukhina Y, Pope PB, Konietzny SG, McHardy AC (2013) *De novo* prediction of the genomic components and capabilities for microbial plant biomass degradation from (meta-)genomes. *Biotechnol. Biofuels* **6** : 24
- Weimer PJ (1996) Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *J. Dairy Sci.* **79** : 1496–502
- Weimer PJ, Stevenson DM, Mertens DR (2010) Shifts in bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows under milk fat-depressing conditions. *J. Dairy Sci.* **93** : 265–78
- Weimer PJ, Waghorn GC, Odt CL, Mertens DR (1999) Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **82** : 122–34
- Weinert N, Piceno Y, Ding G-C, Meincke R, Heuer H, Berg G, Schlöter M, Andersen G, Smalla K (2011) PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75** : 497–506
- Welkie DG, Stevenson DM, Weimer PJ (2010) ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe* **16** : 94–100
- White BA, Roderick I. M, Kinchel C. D (1993) Enzymatic hydrolysis of forage cell walls In : American Society of America. Soil science society of America, Madison, Wis (Eds), Forage Cell Wall Structure and Digestibility, 455–484.
- Williams AG, Coleman GS (1992) Identification and classification of entodiniomorphid protozoa In : Springer New York (Eds), The Rumen Protozoa, Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. New York, NY.

- Williams AG, Coleman GS (1997) The rumen protozoa In : Springer Netherlands (Eds), The Rumen Microbial Ecosystem, 73–139. Dordrecht.
- Windeyer MC, Leslie KE, Godden SM, Hodgins DC, Lissemore KD, LeBlanc SJ (2013) Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev. Vet. Med.*
- Wright A-DG, Auckland CH, Lynn DH (2007) Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* **73** : 4206–10
- Wright A-DG, Toovey AF, Pimm CL (2006) Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* **12** : 134–9
- Xu J, Chiang HC, Bjursell MK, Gordon JI (2004a) Message from a human gut symbiont: sensitivity is a prerequisite for sharing. *Trends Microbiol.* **12** : 21–8
- Xu Q, Bayer EA, Goldman M, Kenig R, Shoham Y, Lamed R (2004b) Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome: description of a cell surface-anchoring scaffoldin and a family 48 cellulase. *J. Bacteriol.* **186** : 968–977
- Xu Q, Gao W, Ding S-Y, Kenig R, Shoham Y, Bayer EA, Lamed R (2003) The cellulosome system of *Acetivibrio cellulolyticus* includes a novel type of adaptor protein and a cell surface anchoring protein. *J. Bacteriol.* **185** : 4548–57
- Xu T, Li Y, He Z, Zhou J (2013) Dockerin-containing protease inhibitor protects key cellulosomal cellulases from proteolysis in *Clostridium cellulolyticum*. *Mol. Microbiol.*
- Yang SL, Bu DP, Wang JQ, Hu ZY, Li D, Wei HY, Zhou LY, Looor JJ (2009) Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal* **3** : 1562–9
- Yeoman CJ, Han Y, Dodd D, Schroeder CM, Mackie RI, Cann IKO (2010) Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv. Appl. Microbiol.* **70** : 1–55
- Yoshida S, Mackie RI, Cann IKO (2010) Biochemical and domain analyses of FSUAxe6B, a modular acetyl xylan esterase, identify a unique carbohydrate binding module in *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Bacteriol.* **192** : 483–93
- Youssef NH, Couger M, Struchtemeyer CG, Ligginstoffer AS, Prade R a, Najjar FZ, Atiyeh HK, Wilkins MR, Elshahed MS (2013) Genome of the anaerobic fungus *Orpinomyces* sp. C1A reveals the unique evolutionary history of a remarkable plant biomass degrader. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Yu Z, Morrison M (2004) Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 4800–6
- Zened A, Combes S, Cauquil L, Mariette J, Klopp C, Bouchez O, Troegeler-Meynadier A, Enjalbert F (2013) Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83** : 504–14

- Zentilin L, Giacca M (2010) The renaissance of competitive PCR as an accurate tool for precise nucleic acid quantification. *Methods Mol. Biol.* **630** : 233–48
- Zhang J, Siika-Aho M, Tenkanen M, Viikari L (2011) The role of acetyl xylan esterase in the solubilization of xylan and enzymatic hydrolysis of wheat straw and giant reed. *Biotechnol. Biofuels* **4** : 60
- Zhang R, Zhu W, Zhu W, Liu J, Mao S (2013) Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. *J. Sci. Food Agric.*
- Zhao S, Wang J, Bu D, Liu K, Zhu Y, Dong Z, Yu Z (2010) Novel glycoside hydrolases identified by screening a Chinese Holstein dairy cow rumen-derived metagenome library. *Appl. Environ. Microbiol.* **76** : 6701–5
- Zhong R, Ye Z-H (2009) Secondary cell walls. *Encycl. Life Sci.* 1–9
- Zhou Y, Stuart-Williams H, Farquhar GD, Hocart CH (2010) The use of natural abundance stable isotopic ratios to indicate the presence of oxygen-containing chemical linkages between cellulose and lignin in plant cell walls. *Phytochemistry* **71** : 982–93
- Ziemer CJ (2013) Broad diversity and newly cultured bacterial isolates from enrichment of pig feces on complex polysaccharides. *Microb. Ecol.*
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A Review. *J. Nutr.* **134** : 465–472

RESUME

La dégradation des fibres alimentaires est une fonction essentielle des écosystèmes digestifs microbiens. Chez le ruminant, elle est assurée par des bactéries, champignons et protozoaires capables de produire de nombreuses enzymes nécessaires à l'hydrolyse des polysaccharides de paroi végétale. Parmi les facteurs susceptibles d'influencer l'efficacité de dégradation des fibres, qui est une composante importante de la productivité et de la santé animales, des additifs tels que des levures probiotiques apparaissent comme un levier intéressant. Afin d'approfondir les connaissances sur les facteurs de modulation de l'activité fibrolytique, une biopuce ADN fonctionnelle, outil moléculaire haut-débit, ciblant les gènes codant les enzymes clés de la dégradation de la cellulose et des xylanes dans les écosystèmes digestifs a été développée. Aussi, une méthode efficace dédiée à des échantillons ruminants pour la soustraction des ARNr à partir des ARN totaux a été mise au point afin d'accroître la sensibilité de l'outil. La biopuce fonctionnelle a été validée sur échantillons de complexité croissante et démontre d'excellents caractères de spécificité et de sensibilité tout en étant exploratoire et quantitative. Des régulations différentielles de l'arsenal des gènes de la fibrolyse de la bactérie du rumen *Fibrobacter succinogenes* ont pu être montrées. De même, les résultats sur échantillons de rumen suggèrent un rôle des microorganismes eucaryotes dans la fibrolyse pouvant être plus important qu'initialement envisagé. Cette approche métatranscriptomique dirigée pourra *in fine* continuer d'être appliquée dans l'étude de l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur la fonction fibrolytique microbienne chez les animaux d'élevage.

Mots clés : écosystèmes microbiens digestifs, dégradation des fibres alimentaires, glycoside hydrolases, carbohydrate estérases, biopuce ADN fonctionnelle, capture de gènes, métatranscriptomique.

ABSTRACT

Dietary fibre degradation is an essential function of microbial digestive ecosystems. In ruminants, this function is ensured by bacteria, fungi and protozoa, producing a large array of enzymes able to degrade plant cell wall polysaccharides. Among factors likely to influence the efficiency of fibre degradation, which is an important component in animal productivity and health, dietary additives such as probiotic yeasts appear as an interesting tool. To provide more insight on factors modulating fibrolytic activity, we designed a functional DNA microarray targeting genes coding for key enzymes involved in cellulose and xylan degradation by digestive microbiota. Also, an efficient method dedicated to rumen samples for removing microorganisms' rRNA from total RNA samples was developed to increase the sensitivity of the tool. The DNA microarray was validated using targets of increasing complexity and demonstrated sensitivity and specificity as well as explorative and quantitative potential. Differential expression of genes involved in fibrolysis was evidenced in the rumen bacterium *Fibrobacter succinogenes*. Moreover, results on rumen samples suggest a more important role of eucaryotes in fibre degradation than previously thought. This targeted metatranscriptomic approach will be further applied to the study of the impact of biotic and abiotic factors on the microbial mechanisms of fibre degradation in livestock.

Key words: digestive microbiota, dietary fibre degradation, glycoside hydrolases, carbohydrate esterase, functional DNA microarray, gene capture, metatranscriptomics.