Le niveau de biodiversité végétale des prairies modifie les processus digestifs, le microbiote ruminal et des fèces des vaches laitières et la composition du lait

MUSATI M. (1, 2), COPPA M. (3), DELBES C. (4), VERDIER-METZ I. (4), POPOVA M. (1), NIDERKORN V. (1), BOUCHON M. (5), FARIZON Y. (6), ENJALBERT F. (6), RENNA M. (7), LUSSIANA C. (8), NATALELLO A. (2), MARTIN B. (1), FERLAY A. (1)

(1) Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France
(2) Department Di3A, University of Catania, 95123 Catania, Italy
(3) Chercheur Independent, Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR 1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France
(4) Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR 0545 Fromage, F-15000, Aurillac, France
(5) INRAE, UE1414 Herbipôle, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France
(6) GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, INPT, Toulouse, France
(ENSAT), École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), UMR1289 Tandem, F-31076 Toulouse, France
(7) Department of Veterinary Sciences, University of Turin, 10095 Grugliasco (TO), Italy
(8) Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, University of Turin, 10095 Grugliasco (TO), Italy

RESUME
Pour étudier les interactions entre la biodiversité végétale des prairies, les ruminants, leur microbiote et leurs produits, des expérimentations in vivo et in vitro ont été menées au printemps 2018. Après une période d'adaptation de 5 semaines sur une parcelle commune, 2 lots de 7 vaches laitières ont été conduits pendant 4 semaines sur 2 parcelles présentant des niveaux de biodiversité végétale contrastés : LD (diversité flaible,19 espèces, beaucoup des graminées) et HD (diversité élevée 56 espèces, beaucoup des dicotylédones). Des prélèvements d'herbe sélectionnés par les vaches (bouchées simulées), de liquide ruminal, de fèces et de lait ont été réalisés en fin de période d'adaptation, et en fin de période expérimentale. La production laitière et les taux protéique et butyreux était similaires entre les lots. L'herbe du lot HD était plus fibreuse et avait une teneur en tanins totaux plus élevée. La teneur en acides gras (AG) totaux de l'herbe, et en C18:3 n3, était plus élevée pour LD. La production totale de gaz lors de la fermentation ruminale in vitro de l'herbe HD était plus faible par rapport à LD, ceci étant probablement dû à l'inhibition de l'activité bactérienne par les tanins, qui ont également protégé la digestion de la matière sèche (MS) du lot HD par rapport au lot LD. Le liquide ruminal des vaches HD a présenté une concentration plus faible en AG totaux mais une proportion plus élevée en acides gras polyinsaturés (AGPI). Cela suggère une biohydrogénation moins complète des AGPI alimentaires induite par les tanins. La β-diversité, qui considère l'équipartition des espèces, a montré des différences entre des communautés bactériennes et fongiques du liquide ruminal et des fèces des vaches entre les 2 lots. Le profil en AG du lait des vaches LD se distingue par une concentration plus importante en C18:2 *c*9*t*11. Par contre, la quantité de C18:3 n-3 n'est pas significativement différente entre les lots, malgré les différences marquées sur l'herbe. Le contenu en AG totaux et en n-3 plus faible de l'herbe du lot HD, pourrait avoir été compensé par l'effet protecteur des tanins dans le rumen.

The level of plant biodiversity in pasture modifies dairy cow digestive processes, rumen and faeces microbiota and milk composition

MUSATI M. (1, 2), COPPA M. (3), DELBES C. (4), VERDIER-METZ I. (4), NIDERKORN V. (1), BOUCHON M. (5), FARIZON Y. (6), ENJALBERT F. (6), RENNA M. (7), LUSSIANA C. (8), NATALELLO A. (2), MARTIN B. (1), FERLAY A. (1)

SUMMARY
To study the interactions between the plant biodiversity of pastures, ruminants, their microbiota and their products, an in vivo and in vitro experiment was carried out in the spring 2018. After a 5-week adaptation period on a common plot, 2 groups of 7 dairy cows were led for 4 weeks on 2 plots with contrasting levels of plant biodiversity: LD (19 species, mainly grasses) and HD (56 species, mostly dicots). Samples of grass selected by the cows (simulated bites), rumen fluid, faeces, and milk were taken at the end of the experimental periods, respectively. Milk production and protein and fat concentration were similar between treatments. The grass from group HD was more fibrous and had a higher total tannin content. Grass total fatty acids (FA) and C18:3 n-3 contents were higher for LD. Total gas production during in vitro ruminal fermentation of HD grass was lower compared to LD, this being probably due to the inhibition of bacterial proliferation by tannins, which also protected the digestion of the dry matter of the HD group compared to LD. Ruminal fluid of HD cows differed from that of LD cows by a lower concentration of total FA but a higher proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFA). This suggests a less complete biohydrogenation of dietary PUFA induced by tannins. The β-diversity, which considers the equipartition of species, showed differences between the bacterial and fungal communities of the ruminal liquid and the faeces of the cows between the 2 treatments. The FA profile of milk from LD cows is distinguished by a higher concentration of C18:2 *c*9*t*11. Moreover, the quantity of C18:3 n-3 is not significantly different between the treatments, despite the marked differences on grass. The lower total FA and n-3 content of the grass from the HD group could have been compensated by the protective role of tannins in the rumen.

INTRODUCTION

Les systèmes d'élevage herbagers apparaissent de plus en plus comme les options d'avenir les plus prometteuses pour l'élevage des ruminants. Ils permettent de concilier production, revenus agricoles, large éventail de services écosystémiques et produits de bonne qualité nutritionnelle. Bien que de nombreux travaux scientifiques aient déjà démontré les bénéfices des systèmes herbagers, des zones d'ombre subsistent pour comprendre tous les mécanismes en place depuis le pâturage jusqu'au produit.

Les recherches se sont concentrées sur l'étude des effets du stade phénologique de l'herbe ou des différentes techniques de pâturage sur la biohydrogénation ruminale des acides gras ingérés, sur la composition en acides gras du lait et sur le profil organoleptique des produits laitiers. Généralement, les vaches nourries au pâturage ou à l'herbe fraîche produisent un lait plus riche en acides gras n-3 et en isomères de l'acide linoléique conjugué - CLA (Chilliard et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'avancement du stade phénologique de l'herbe provoque une diminution des acides gras C18:1 *t*11, CLA et n-3 (Coppa et al., 2015), alors que le lait issu d'une technique de pâturage en rotation permet de maintenir sa qualité dans le temps par rapport à un système de pâturage continu (Coppa et al., 2011). De plus, il a été démontré que les tanins présents dans diverses espèces botaniques des prairies modulent la biohydrogénation ruminale, favorisant la conservation des acides gras insaturés (Frutos et al., 2020). Cependant, certains effets potentiels des métabolites secondaires des plantes, notamment les polyphénols, les tanins et les terpènes, sur le microbiote des ruminants et les interactions entre les espèces botaniques des prairies, les ruminants et leur microbiote restent peu explorés.

L'objectif de cette expérimentation est d'étudier les effets de la biodiversité botanique d'un pâturage sur la digestion, la qualité du lait et les interactions avec la communauté microbienne ruminale et fécale.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

L'expérimentation a été conduite sur le site expérimental de Marcenat (Herbipole, INRAE, Cantal, France). Au cours d'une période pré-expérimentale de 5 semaines, 14 vaches de race Holstein et Montbéliarde ont été conduites sur une parcelle commune en pâturage continu à faible niveau de biodiversité. Par la suite, les vaches ont été réparties en 2 groupes de 7 animaux conduits en pâturage continu pendant 4 semaines sur deux parcelles avec des niveaux de biodiversité botanique contrastés : LD (low diversity, 19 espèces botaniques, principalement graminées et légumineuses) et HD (high diversity, 56 espèces botaniques, principalement des dicotylédones non légumineuses).

1.2 PRELEVEMENTS ET ANALYSES

Des échantillons d'herbe, de liquide ruminal, de matières fécales et de lait ont été prélevés au cours de la dernière semaine des périodes pré-expérimentale et expérimentale. La composition botanique a été déterminée en utilisant la méthode phyto-pastorale, tandis que les échantillons d'herbe étaient des bouchées simulées pour rendre compte de la sélection des animaux au pâturage. Les bouchées simulées ont été analysées pour déterminer leurs compositions acides gras, en polyphénols et en tanins, comme détaillé dans lussig et al. (2015). Par la suite, les échantillons d'herbe de chaque période ont été utilisés comme substrat pour des essais de fermentation ruminale in vitro. La production et la composition des gaz de fermentation (CO_2 et CH_4), la dégradabilité de la matière sèche et le profil en acides gras volatils (AGV) ont été mesurés. Le liquide ruminal prélevé avec une sonde gastro-œsophagienne a été divisé en 2 échantillons : le premier a été filtré et analysé en chromatographie en phase gazeuse (CPG) pour le profil des acides gras, tandis que le second a été centrifugé en vue de caractériser les communautés bactérienne et fongique par séquençage des amplicons (metabarcoding). De même, communautés bactérienne et fongique ont été analysées dans le fèces recueillies le lendemain. La production de lait a été enregistrée quotidiennement, tandis que la composition du lait a été analysée 2 fois par semaine par des analyses moyen infrarouge. Les échantillons de lait de la fin de chaque période ont été analysés par CPG pour déterminer le profil en acides gras.

Toutes les données ont été analysées avec un modèle linéaire mixte, avec le type de pâturage comme effet fixe, tandis que la β-diversité a été estimée avec la méthode de distance Unifrac et un Permanova (Figures 1, 2, 3).

2. RESULTATS

2.1 BOUCHEES SIMULEES

En comparaison du lot LD, l'herbe du lot HD était plus fibreuse (NDF : 509 vs. 489 g/kg MS ; ADF : et 260 vs. 238 g/kg MS) et avait une teneur en polyphénols et tanins totaux plus élevée (polyphénols : 24,63 vs. 10.69 g/kg MS ; tanins : 22,96 vs. 5,95 g/kg MS). La teneur en AG totaux de l'herbe était plus élevée dans le groupe LD (52,2 vs. 33,5 g/kg MS) et la teneur en AGPI était également plus élevée (26,2 vs. 14,4 g/kg MS) ; l'herbe du lot LD était beaucoup plus riche en C18:3 n-3 (37,4 vs. 27,3 g/100 g AG ; Tableau 1).

	LD	HD	SEM	*p*
AGS	32,72	41,22	0,66	***
AGMI	4,32	6,10	0,14	***
AGPI	51,96	42,82	3,56	ns
C18:3 n3	37,38	27,31	3,50	*
C18:2 n6	12,72	11,37	0,61	***
C16:0	18,14	23,48	0,35	***

Tableau 1. Acides gras (AG) des bouchées simulées (g/100g AG totaux). LD : pâturage peu diversifié ; HD : pâturage très diversifié ; AGS : AG saturés ; AGMI : AG monoinsaturés ; AGPI AG : polyinsaturés. *p :* Probabilité : * p<0,5 ; *** p>0,001 ; ns non significatif.

Lors de la fermentation in vitro, l'activité fermentaire a été réduite avec le traitement HD, au contraire, durant la période pré-expérimentale aucune différence significative n'a été mise en évidence. En effet, la production totale de gaz et la quantité totale d'AGV étaient plus faibles (-0,5 mmol/g MS et -0,76 mmol/g MS, respectivement). La proportion d'AGV a changé, en particulier la proportion d'acétate a augmenté dans le lot HD (66,4 vs. 64,4 %) tandis que la proportion de propionate a diminué dans le lot HD (20,8 vs. 21,3 %). Par conséquent, la digestion de la MS a également été plus faible de 5,9 %. Par ailleurs, le gaz de fermentation du lot HD avait un rapport CO_2 /CH_4 plus élevé (4,89 vs. 4,48), indiquant une production relative de CH_4 plus faible.

2.2 LIQUIDE RUMINAL ET FECES

Le liquide ruminal des vaches HD s'est distingué de celui des vaches LD par une concentration plus faible en AG totaux (34,15 vs. 25,42 g/kg MS) mais une proportion plus élevée en AGPI (Tableau 2). En particulier, les proportions en AG n-3, n-6 et C18:1 *c*9 ont été plus élevées dans le liquide ruminal des vaches HD, au contraire du C18:0 qui a été significativement plus faible. D'un point de vue microbien, si le niveau de diversité végétale des prairies n'a eu aucun effet sur l'α-diversité (nombre d'espèces et équitabilité) ni des fèces ni des rumens. L'α-diversité, exprimée en indice de Shannon, des bactéries était égale à 4,91 ± 0,11 dans le liquide ruminal et 4,21 ± 0,06 dans les fèces, tandis que les fungi s'élevaient à 3,45 ± 0,12 dans le rumen et à 3,19 ± 0,28 dans les fèces. Il a influencé leur composition (Figure 1) et l'abondance relative

des différentes espèces microbiennes (β-diversité, Figures 2 et 3).
Au contraire, le microbiote du liquide ruminal et des fèces collectées au cours de la période pré-expérimentale n'a pas montré de différences significatives entre les traitements.

	LD	HD	SEM	*p*
AGS	60,92	56,98	0,66	***
AGMI	15,23	13,00	0,47	***
AGPI	5,41	7,51	0,40	***
C18:3 n-3	1,74	2,35	0,11	***
C18:0	39,95	31,30	1,04	***
C18:1 *c*9	0,05	2,25	0,29	**
C18:2 n-6	1,79	3,37	0,30	***
C18:1 *t*11	10,82	8,24	0,57	***

Tableau 2. Acides gras (AG) du liquide ruminal (g/100g AG totaux).
LD : pâturage peu diversifié ; HD : pâturage très diversifié ; AGS : AG saturés ; AGMI : AG monoinsaturés ; AGPI : AG polyinsaturés. *p :* Probabilité : * p<0,5 ; *** p>0,001.

2.3 PRODUCTION ET COMPOSITION DU LAIT

Enfin, les vaches des groupes LD et HD ont eu une production et des taux butyreux et protéique similaires (production quotidienne du lait : 14,0 vs. 12,9 L ; taux butyreux : 39,8 vs. 41,4 g/kg du lait ; taux protéique : 33,2 vs. 32,2 g/kg lait, LD et HD respectivement). Le profil en AG du lait des vaches LD s'est distingué par une concentration en AGPI plus élevée que celle du lait HD (+1,63 g/100g AG), et surtout par une concentration plus importante en CLA totaux (+1,16 g/100g AG) et en C18:1 *t*11 (+1,53 g/100g AG ; Tableau 3). Cependant, les proportions d'oméga 3 totaux et d'AG impairs et ramifiés dans le lait n'ont pas été significativement différentes entre les lots.

	LD	HD	SEM	*p*
AGS	58,56	62,18	1,14	*
AGMI	33,21	31,46	0,87	*ns*
AGPI	7,30	5,67	0,34	***
C18:3 n3	0,97	0,92	0,05	*ns*
C18:1 t11	5,52	4,00	0,44	*
CLA	3,06	1,89	0,23	***
AGIR	5,40	5,47	0,11	*ns*

Tableau 3. Acides gras (AG) du lait (g/100g AG totaux).
LD : pâturage peu diversifié ; HD : pâturage très diversifié ; AGS : AG saturés ; AGMI : AG monoinsaturés ; AGPI : AG polyinsaturés ; *t :* trans ; CLA : acide linoléique conjugué ; AGIR : AG impairs et ramifiés. *p :* Probabilité : * p<0,5 ; *** p>0,001 ; ns non significatif.

3. DISCUSSION

L'activité fermentaire *in vitro* plus faible des bouchées simulées du lot HD est probablement liée aux tanins présents en quantités plus importantes dans les bouchées HD. Les tanins HD ont vraisemblablement inhibé l'activité des bactéries, ce qui pourrait expliquer que la production totale de gaz et d'AGV ait été plus faibles dans ce lot. De plus, les tanins et les polyphénols ont pu avoir également un effet anti-méthanogène. Comme déjà montré par d'autres études, les tanins ont eu un effet inhibiteur sur la archaea méthanogènes, ce qui pourrait expliquer la réduction du CH_4 dans le lot HD (relativement au CO_2 ; Aboagye et Beauchemin, 2019).
Bien que l'herbe des bouchées simulées du lot LD ait été beaucoup plus riche en AG n-3, le liquide ruminal des vaches HD a eu une proportion d'AGPI supérieure. Cela suggère une biohydrogénation des AG ingérés moins complète dans le rumen des vaches HD (Frutos et al., 2020). Cette hypothèse est également étayée par la proportion plus faible en C18:0 dans le rumen des vaches HD puisque le C18:0 est le produit final de la biohydrogénation.
Les indices de diversités microbiennes ont révélé que le type de pâture n'influe pas sur la richesse mais sur la composition et l'abondance relative aussi bien des bactéries que des fongiques présents tant dans les fèces que dans le liquide ruminal. En effet, les populations fongiques dominantes des fèces diffèrent selon le type de prairie et certaines espèces bactériennes sous-dominantes telles que *Fibrobacter succinogenes* et *Prevotella ruminicola*, se sont révélées significativement plus abondantes dans les rumens HD. Cela pourrait être lié à la plus forte fibrosité de l'herbe HD qui aurait pu favoriser la prolifération de ces bactéries. La fibrosité de la ration étant le principal facteur de variation de l'écosystème microbien du rumen, les modifications observées peuvent ainsi être liées à la nature de la matière organique ingérée par l'animal. Ces effets pourraient aussi résulter de l'exposition du microbiote ruminal à un ensemble de micro-organismes et de composés secondaires des plantes, potentiellement plus complexes dans les pâtures HD.
La plus forte fibrosité de la ration n'a cependant influencé ni la quantité de lait produit, ni sa teneur en protéines et matières grasses. Quant aux AG, le lait des vaches LD était plus riche en AGPI (7,30 vs. 5,67 g/100g AG). Ceux-ci étaient principalement composés de C18:2 *c*9*t*11, qui est un produit intermédiaire de la biohydrogénation des AGPI de l'herbe (Chilliard et al., 2007).
Fait intéressant, la teneur en n-3 ne diffère pas entre les deux lots, probablement en raison de l'action des polyphénols, tanins et autres métabolites secondaires qui ont protégé les AG oméga 3 présents dans l'herbe HD ingérée de la biohydrogénation ruminale. L'absence de différences entre les AG impairs et ramifiés dans le lait pourrait indiquer une activité microbienne similaire dans le rumen entre les deux lots.

CONCLUSION

Les vaches pâturant une parcelle très biodiversifiée et riche en tanins ont montré un profil en AG du lait différent de celui issu de vaches pâturant une parcelle moins diversifiée. Bien que la digestibilité de l'herbe soit réduite en présence d'une prairie diversifiée, le profil en AG du rumen suggère une modulation de la biohydrogénation par les tanins ou les autres métabolites secondaires des plantes, qui ont permis de protéger les AG oméga 3 de l'herbe de la biohydrogénation. Ainsi, les vaches ingérant une herbe diversifiée pauvre en n-3 mais riche en tanins ont produit un lait avec une concentration en n-3 similaire à celle d'un lait issu d'une herbe faiblement diversifiée riche en n-3 mais pauvre en tanins. Le type de pâture ne semble pas influencer la richesse microbienne dans le rumen et les fèces mais il joue un rôle sur la composition et l'abondance relative des microorganismes du rumen et des fèces.
Ce travail permet ainsi de confirmer et d'expliquer partiellement le fait que le pâturage de prairies permanentes diversifiées favorise le transfert des AGPI de l'herbe dans le lait et limite les émissions de méthane entérique.

Les auteurs remercient l'ensemble du personnel du site de Marcenat de l'UE Herbipole ainsi que les techniciens ayant contribué aux analyses dans les différents laboratoires impliqués. Ce projet a bénéficié d'un soutien financier obtenu dans le cadre des Crédits Incitatifs des départements Phase et Mica de l'INRAE.

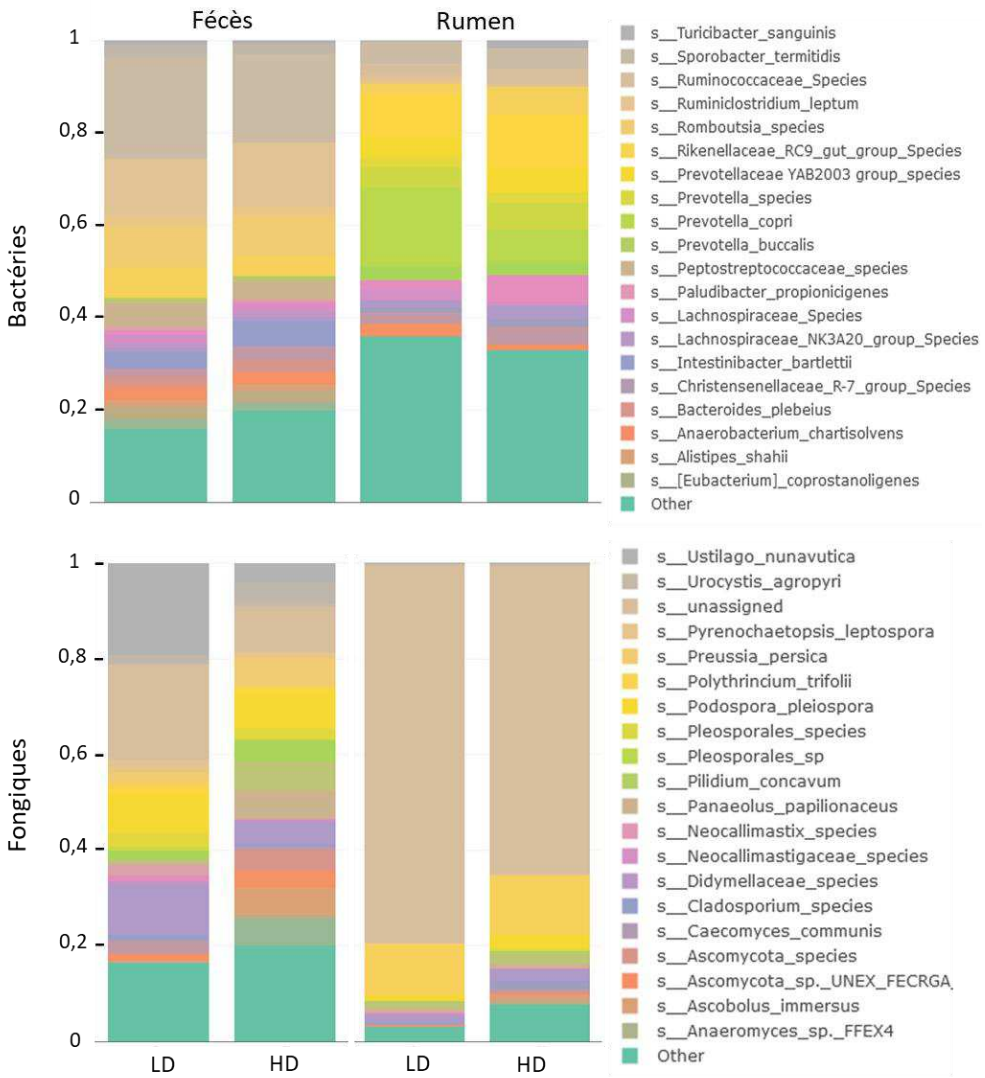

Figure 1 : Abondance relative des espèces bactériennes et fongiques dans les fèces et les liquides ruminaux LD et HD (moyenne des 7 vaches par lot)

1

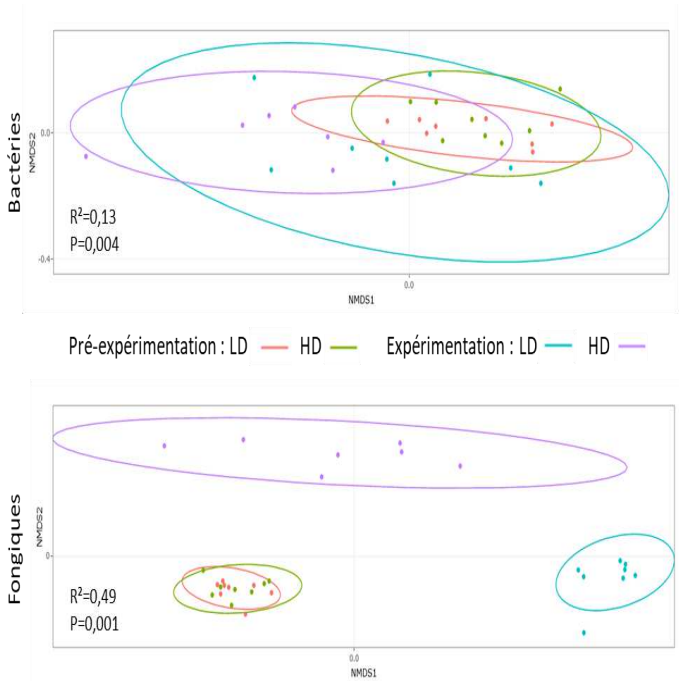

Figure 2 : Distribution des échantillons de fèces LD et HD selon leur profil microbien

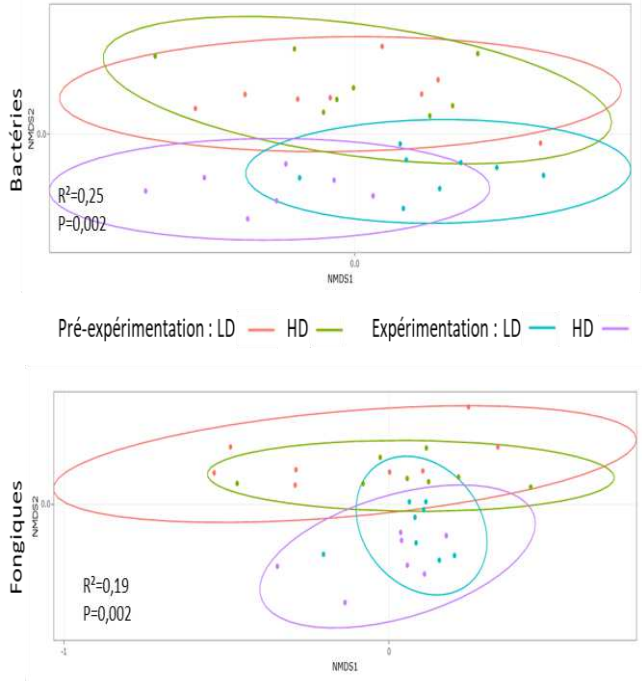

Figure 3 : Distribution des échantillons de rumen LD et HD selon leur profil microbien

Aboagye I.A., Beauchemin K.A., 2019. Animals, 9(11), 856
Chilliard Y., Glasser F., Ferlay A., Bernard L., Rouel J., Doreau M., 2007. Eur. J. Lipid Sci. Technol., 109, 828-855
Coppa M., Ferlay A., Monsallier F., Verdier-Metz I., Pradel P., Didienne R., Farruggia A., Montel M.C., Martin B., 2011.J. Dairy Sci., 94(3), 1132-1145
Coppa M., Ferlay A., Borreani G., Revello-Chion A., Tabacco A., Tornambé G., Pradel P., Martin B., 2015. Anim. Feed Sci. Technol., 208, 66-78
Frutos P., Hervás G., Natalello A., Luciano G., Fondevila M.,
Priolo A., Toral P.G., 2020. Anim. Feed Sci. Technol., 269, 114623**Iussig G., Renna M., Gorlier A., Lonati M., Lussiana C., Battaglini L.M., Lombardi G., 2015.** Small Rumin. Res., 132, 12-24