

Reconstituer la composition du régime alimentaire des herbivores domestiques au pâturage : l'approche par métabarcoding

A. Farruggia¹, F. Pompanon², C. Ginane¹, K. Vazeille³, V. Niderkorn¹, S. Hulin⁴

Savoir exactement ce que les animaux ont ingéré au pâturage demeure un verrou pour affiner l'analyse entre herbe offerte et caractéristiques du produit animal correspondant. La technique de métabarcoding (dite aussi code-barres ADN), ici présentée, offre des perspectives prometteuses pour la compréhension des interactions entre herbe, animal et produits animaux.

RÉSUMÉ

Une expérimentation a permis de tester cette technique sur des fèces de vaches laitières pâturant des prairies de composition botanique très contrastée. Par séquençage des fragments d'ADN des plantes retrouvés dans les fèces, nous avons pu identifier l'ensemble des taxons ingérés (au niveau de la famille, du genre ou de l'espèce végétale) et montrer qu'il y avait 2 fois plus de taxons différents dans les fèces des vaches pâturant à faible chargement une prairie diversifiée que dans les fèces des vaches pâturant à fort chargement une prairie moins diversifiée. Cette caractérisation des plantes ingérées au pâturage est un élément de connaissance important pour les études portant sur le comportement alimentaire et les performances des animaux ainsi que sur la qualité des produits.

SUMMARY

Reconstituting the diet of grazing domestic herbivores using metabarcoding

Identifying the type of grass ingested by grazing stock remains a bottleneck for analyzing the extent to which available grass affects the properties of end animal products. The use of metabarcoding technology, as presented in this document, offers promising perspectives in terms of better understanding the interactions between ingested grass, animals (mainly their eating habits) and end products (and their quality). This experiment was carried out in order to test this technology on the faeces of dairy cattle grazing on grassland with a diversified botanical composition. By sequencing plant DNA fragments found in tested faeces, it was possible to identify the full range of ingested taxons. Twice as many taxons were found in the faeces of cattle grazing on botanically rich grassland with a low stocking rate compared to faeces from cattle grazing on botanically poor grassland with a high stocking rate.

Lorsque les herbivores domestiques exploitent des couverts prairiaux complexes, caractérisés par une hétérogénéité structurelle et une diversité spécifique de la végétation importantes, ils sont confrontés à une multitude d'options de sélection alimentaire. **Connaître les espèces végétales qu'ils sélectionnent est un élément important pour comprendre les interactions entre l'herbe, les animaux et les produits qui en sont issus.** Ces nouveaux éléments de connaissance pourraient également intéresser fortement les filières de qualité qui

s'attachent à démontrer les liens au terroir pour consolider leur spécificité. Une part importante du lien entre le produit et son terroir s'établit en effet à travers l'alimentation du troupeau et les caractéristiques du régime alimentaire (COULON *et al.*, 2003 ; MARTIN *et al.*, 2005 ; LUCAS *et al.*, 2006 ; FARRUGGIA *et al.*, 2009). Accéder à ce niveau de finesse dans la connaissance des espèces ingérées n'est cependant pas aisé. La prairie permanente est en effet constituée d'un mélange intime d'espèces végétales qui rend complexe la détermination de la sélection de l'animal au niveau de l'espèce.

AUTEURS :

- 1 : INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle ; anne.farruggia@clermont.inra.fr
- 2 : Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, F-38041 Grenoble cedex 9
- 3 : INRA, UE1296 Monts d'Auvergne, F-63210 Orcival
- 4 : Pôle fromager Massif central, 20, côte de Reyne, F-15000 Aurillac

MOTS CLÉS : Chargement animal, comportement alimentaire, espèce fourragère, ingestibilité, inventaire botanique, marqueur moléculaire, pâturage, prairie, ration alimentaire, vache laitière, végétation.

KEY-WORDS : Botanical inventory, dairy cow, diet, feeding behaviour, forage species, grassland, grazing, molecular marking, stocking rate, vegetation, voluntary intake.

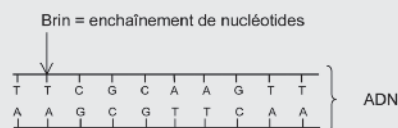
RÉFÉRENCE DE L'ARTICLE : Farruggia A., Pompanon F., Ginane C., Vazeille K., Niderkorn V., Hulin S. (2012) : "Reconstituer la composition du régime alimentaire des herbivores domestiques au pâturage : l'approche par métabarcoding", *Fourrages*, 209, 43-51.

Les méthodes de caractérisation du régime alimentaire des herbivores au pâturage développées jusqu'à maintenant restent peu satisfaisantes. Elles font appel à des observations directes sur l'animal, à des mesures portant sur la végétation ou encore à des analyses de déjections. Les méthodes basées sur l'observation visuelle du comportement alimentaire des animaux au pâturage (GINANE *et al.*, 2003 ; FARRUGGIA *et al.*, 2006 ; RUTTER, 2006 ; DUMONT *et al.*, 2007) donnent des informations sur la sélection des animaux au niveau du groupe botanique (graminées, légumineuses, diverses) mais il est impossible pour l'observateur de déterminer les espèces sélectionnées en raison de la multiplicité des espèces présentes, de la fréquence élevée des bouchées et de la distance à laquelle il se trouve de la tête de l'animal. De plus, ce type de mesure peut être influencé par l'observateur (FRASER *et al.*, 2006). L'analyse du contenu ruminal, prélevé sur des animaux fistulés (FRASER et GORDON, 1997), est une technique très lourde, coûteuse et de moins en moins acceptable d'un point de vue éthique (bien-être animal). L'examen visuel de la végétation pâturée est simple à mettre en œuvre mais il nécessite une expertise botanique (ORTH *et al.* 1998 ; COPPA *et al.*, 2011), est très coûteux en temps et ne peut donc s'effectuer que sur un échantillon réduit de l'ensemble des zones pâturées. L'identification au microscope de fragments de cuticule de plantes retrouvés dans les fèces des herbivores (reconnaissance microhistologique) est longue et fastidieuse et n'apporte que des informations très partielles (HESSLE *et al.*, 2008). L'analyse de la composition en alcanes de la cuticule des plantes n'est, elle, performante que pour un nombre limité d'espèces végétales (KELMAN *et al.*, 2003 ; ALI *et al.*, 2004 ; FERREIRA *et al.* 2009). Enfin, si les analyses en spectroscopie dans le proche infrarouge sur des fèces donnent une estimation de la composition en nutriments des espèces consommées, elles ne permettent pas, à l'heure actuelle, de les identifier (MOORBY *et al.*, 2010).

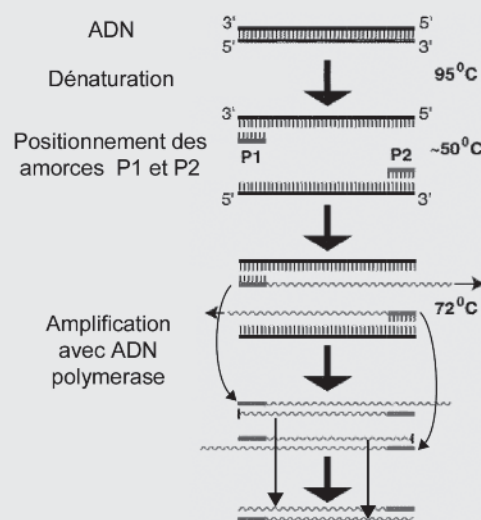
La technique de métabarcoding ou du code-barres ADN, récemment développée, **offre de nouvelles perspectives dans l'identification simultanée des espèces végétales présentes** dans des substrats complexes ou dégradés (POMPANON *et al.*, 2012 ; VALENTINI *et al.* 2009a). Elle est basée sur le séquençage massif de fragments d'ADN spécifiques de chaque espèce. Yoccoz *et al.* (sous presse) ont ainsi montré une bonne cohérence entre des relevés botaniques réalisés dans une mosaïque de prairies et de landes et les analyses des fragments ADN des racines dans les sols correspondants. De même, SOININEN *et al.* (2009) ont trouvé des résultats très satisfaisants en faveur du métabarcoding en comparant cette méthode avec la technique classique de reconnaissance microhistologique sur des contenus stomacaux de campagnols. En reconstituant les régimes alimentaires, par l'analyse des ADN végétaux présents dans les fèces (PEGARD *et al.* 2009 ; VALENTINI *et al.* 2009b), cette technique s'est aussi révélée plus efficace et plus performante que les méthodes traditionnelles utilisées décrites ci-dessus.

Dans cet article, nous décrivons le principe, la mise en œuvre et l'intérêt de cette technique à partir de son

Une molécule d'ADN est constituée de deux brins complémentaires formés par l'enchaînement de 4 nucléotides appariés (adénine [A], thymidine [T], cytosine [C], et guanine [G] : cf. 1^{er} schéma).



Dans une cellule, l'ADN est présent dans le noyau sous forme de paires de chromosomes homologues mais aussi sous forme de molécule circulaire dans les organites cellulaires (mitochondries et chloroplastes) en plusieurs centaines de copies par cellule. Pour caractériser un fragment d'ADN, il est nécessaire de l'obtenir en quantité suffisante. On utilise pour cela la méthode PCR (*Polymerase Chain Reaction*, voir 2^e schéma, ci-dessous). Il s'agit d'une réaction enzymatique *in vitro* qui permet l'amplification d'une séquence définie d'ADN. Elle comporte une étape de séparation des deux brins de l'ADN (dénaturation), puis une étape de positionnement de deux amorces (P1 et P2 dans le schéma) et leur fixation en face de leurs séquences complémentaires sur les brins d'ADN (hybridation). Les amorces donnent le point de départ et d'arrêt du processus de copiage. Chaque amorce est constituée d'une courte séquence de nucléotides, unique dans le génome de l'organisme qui, hybridée avec son fragment complémentaire sur l'ADN, permet à une enzyme, l'ADN polymérase, d'entamer la synthèse d'un nouveau brin d'ADN, complémentaire de celui ayant servi de matrice. La répétition de ce cycle de synthèse conduit à l'amplification exponentielle du fragment d'ADN défini par le choix des amorces. Le fragment d'ADN ainsi amplifié peut alors être caractérisé par séquençage, c'est-à-dire reconstitution de l'enchaînement des nucléotides qui le composent. Les nouvelles techniques de séquençage basées sur l'utilisation des nanotechnologies permettent maintenant de séquencer en parallèle jusqu'à plusieurs millions de fragments d'ADN. Elles permettent donc de caractériser rapidement la diversité des séquences d'ADN composant le produit d'amplification d'une PCR.



ENCADRÉ 1 : ADN, PCR et séquençage.

FRAME 1 : DNA, PCR and sequencing.

Nom de l'espèce	Séquence de la région correspondant à l'amorce universelle <i>g</i>	Séquence de la région amplifiée spécifique de l'espèce	Séquence de la région correspondant à l'amorce universelle <i>h</i>	Base de données
<i>Rumex acetosa</i> (oseille)	GGGCAATCCTGAGCCAA	CTCCTCCTTTCCAAAAGGAA GAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAATGG	GenBank
<i>Arctium lappa</i> (grande bardane)	GGGCAATCCTGAGCCAA	ATCAGCTTTCCGAAAACAACAAA GGTTCAGAAAGCGAAAATAAAAAAG	GATAGGTGCAGAGACTCAATGG	GenBank

TABLEAU 1 : Exemples de séquences du code-barres *trnL* amplifié avec les amorces universelles *g* et *h*.TABLE 1 : Examples of *trnL* barcode sequencing amplified by universal primers *g* and *h*.

utilisation sur des échantillons de fèces de vaches laitières pâturant des prairies contrastées du point de vue de la composition floristique. Nous présenterons les résultats obtenus sur un dispositif expérimental **mis en place dans le cadre du programme CASDAR PRAIRIES AOP** (COPPA *et al.*, 2012, ce même numéro). Nous discuterons et évoquerons ensuite les potentialités d'application de cette technique ainsi que les verrous restant à lever.

1. Principe de la technique du code-barres ADN

Lorsque l'on souhaite identifier les espèces qui composent un mélange à partir de l'ADN, il faut trouver une « région diagnostique » (nommée code-barres ADN), c'est-à-dire suffisamment variable pour différencier des espèces proches (*cf.* : <http://www.barcodeoflife.org>). Les introns étant les parties non codantes de l'ADN pour la synthèse des protéines, ils ne subissent pas de pression de sélection et leurs séquences ont ainsi divergé plus rapidement au cours de l'évolution des espèces. Ces **introns constituent donc des zones favorables pour localiser un code-barres** puisque les potentialités d'identification des espèces y sont les plus importantes. Pour pouvoir amplifier ce code-barres chez les différentes espèces du mélange en une seule PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec les mêmes amorces (*cf.* encadré 1), il faut que la zone variable soit encadrée par deux zones conservées qui constituent les zones de fixation des amorces. Afin de pouvoir travailler sur des substrats dégradés comme les fèces (ADN fragmentés et en faible quantité), il est de plus nécessaire que la zone amplifiée soit courte (150 nucléotides maximum) et que l'ADN soit en quantité initiale non limitante. Les ADN mitochondriaux et chloroplastiques, présents en un plus grand nombre de copies par cellule que l'ADN génomique, sont donc ciblés préférentiellement. Peu de régions de l'ADN remplissent ces conditions et l'une d'entre elles, brevetée par le laboratoire d'Ecologie Alpine de l'UMR Université Joseph Fourier-CNRS (LECA), est située dans l'intron du gène chloroplastique *trnL* (TABERLET *et al.*, 2007). **Les amorces utilisées (*g* et *h*)** sont dites "universelles" car elles **permettent d'amplifier chez toutes les espèces végétales le même fragment d'ADN**. De plus, plusieurs milliers de séquences sont déjà référencées et disponibles dans des bases de données publiques du type GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ce qui donne accès à un nombre très important d'espèces végétales issues de milieux extrêmement variés (milieux forestiers, espèces de grandes cultures, espèces potagères...). Ces bases sont nécessaires pour identifier les espèces végétales correspondant aux séquences produites lors des analyses. A titre d'illustration, le tableau 1 présente les séquences de *Rumex acetosa* (oseille sauvage) et *Arctium lappa* (grande bardane) encadrées par les amorces universelles *g* et *h*. L'identification jusqu'au niveau de l'espèce est cependant difficile avec le marqueur *trnL* pour trois familles végétales : Poaceae, Cyperaceae, Asteraceae. Un autre système plus performant pour ces familles (basé sur une région de l'ADN génomique dite ITS : *Internal Transcribed Spacer*) a été également défini par le LECA avec les bases de référence associées. Sur un plan pratique, il peut arriver que les plantes soient seulement identifiées au niveau de leur genre ou de leur famille. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ce faible niveau de détermination : soit le taxon n'est pas identifié au niveau de l'espèce dans la base mais seulement au niveau du genre (c'est le cas pour *Thymus* par exemple), soit la séquence-cible est identique pour plusieurs espèces du même genre ou de la même famille, soit enfin la séquence ne correspond exactement à aucune référence mais est proche de plusieurs références.

2. Application de la technique pour identifier les espèces ingérées par des vaches laitières au pâturage

■ Dispositif expérimental utilisé et mesures

Dans le cadre du programme CASDAR PRAIRIES AOP, une expérimentation a été mise en place en 2008 et 2009 dans une ferme de l'Unité Expérimentale des Monts d'Auvergne de l'INRA (Marcenat, Cantal). Il s'agissait d'évaluer les performances fourragères, zootechniques et la qualité des laits et des fromages issus de deux systèmes de pâturage pour vaches laitières :

- un **pâturage tournant** à fort niveau de chargement animal **sur une prairie peu diversifiée, système PROD** (pour « production ») ;
- un **pâturage continu** à faible niveau de chargement **sur une prairie très diversifiée, système Div** (pour « diversité »).

L'expérimentation a été conduite avec deux lots de 12 vaches de race Montbéliarde, appariées avant la sortie au pâturage à partir des critères de production classiques (rang de lactation, date de vêlage, production laitière, taux butyreux, taux protéique, concentration en cellules somatiques, poids, note d'état corporel). La prairie utilisée dans le système PROD (6,8 ha) était une ancienne prairie temporaire semée en 1998 avec du dactyle, découpée en 6 sous-parcelles pour le pâturage tournant. La prairie permanente utilisée dans le système DIV était une estive de 12,5 ha.

Des relevés botaniques ont été réalisés par un botaniste à la fin du mois de juillet 2009 en utilisant des quadrats de 1 m² répartis sur l'ensemble de la surface des parcelles : 40 quadrats sur la parcelle du système DIV et 5 quadrats par sous-parcelle du système PROD. La surface de recouvrement au sol des espèces végétales a été estimée visuellement et ramenée à un total de 100 % dans chaque quadrat. Les espèces dont le recouvrement représentait moins de 1 % ont été notées P (présentes). Les espèces présentes dans un rayon de 5 m autour de chaque quadrat ont également été notées.

Afin de connaître les espèces ingérées par les vaches laitières au pâturage, des **prélèvements de fèces** ont été réalisés en 2009 par fouille rectale deux matins consécutifs, les 15 et 16 juillet sur l'ensemble des 12 vaches par système (soit 48 échantillons de fèces). L'équivalent d'une cuillère à soupe de fèces par vache et par jour a été disposé sur un papier filtre de type Wathman, puis séché à l'air libre. Une fois sec, le papier avec l'échantillon de fèces a été placé dans un tube contenant du silica gel pour conservation jusqu'à l'extraction d'ADN.

Pour une identification plus précise des espèces par métabarcoding, **une base de données de séquences, spécifique à l'expérimentation** (pour l'intron *trnL*), a été établie à partir de 108 échantillons de feuilles ou de tiges représentant toutes les plantes identifiées lors des relevés botaniques. Un total de 105 échantillons ont été séquencés car, malgré plusieurs tentatives, 3 espèces n'ont pu être caractérisées (*Cerastium fontanum* ssp. *triviale*, *Rumex crispus*, *Silene vulgaris*). Après extraction d'ADN et amplification par PCR des 48 échantillons de fèces, les produits PCR ont été caractérisés par séquençage haut-débit. Pour identifier les fragments d'ADN présents dans les fèces, les deux systèmes (*trnL* et ITS) ont été utilisés. Lors des identifications, le seuil de similarité retenu pour assignation d'une séquence produite à une séquence de référence a été de 0,98.

■ Analyses des données botaniques et des données de code-barres ADN

Pour l'**analyse des données botaniques**, nous avons utilisé l'ensemble des quadrats sur la parcelle DIV et uniquement les relevés réalisés sur les quadrats de la sous-parcelle de PROD sur laquelle se trouvaient les vaches au moment du prélèvement des fèces. Le transit intestinal étant estimé à 48 heures, nous avons attendu que les vaches aient pâturé pendant 3 jours sur cette

sous-parcelle pour réaliser le prélèvement de fèces. De fait, la correspondance entre les relevés botaniques et les espèces retrouvées dans les fèces peut être considérée comme pertinente.

A partir de ces quadrats, nous avons calculé le nombre d'espèces présentes par m², l'indice de diversité de Shannon à l'échelle du quadrat et l'abondance moyenne par espèce et par groupe botanique (Poaceae, Fabaceae et diverses) sur la base de la surface de recouvrement de chaque espèce sur l'ensemble des carrés retenus dans chacun des systèmes.

Pour l'**analyse des données de code-barres ADN**, nous avons dans un premier temps calculé au total et par système, le nombre de séquences ADN retrouvées par taxon et leur pourcentage en différenciant le niveau taxonomique identifié (espèce, genre ou famille) et les groupes botaniques précités. Nous avons également calculé la fréquence de taxon par système, en nous basant sur le nombre de vaches (parmi les 12 par système) pour lesquelles nous avons identifié le taxon considéré dans les fèces au moins une fois sur les deux jours de prélèvement. Nous avons considéré que le taxon était très fréquent quand il avait été retrouvé dans les fèces d'au moins 10 vaches sur les 12 présentes. Enfin, nous avons calculé, par vache, le nombre de taxons différents identifiés dans leurs échantillons de fèces sur les deux jours. Ces dernières données ont été traitées sous SAS à l'aide d'une procédure ANOVA modèle mixte en considérant la vache comme individu statistique et le système comme effet fixe. Les différences entre traitements ont été détectées en utilisant la correction de Tucker-Kramer. Par ailleurs, nous avons comparé l'abondance des espèces identifiées sur le plan botanique à la fréquence du taxon uniquement lorsque les taxons avaient été identifiés au niveau de l'espèce. Nous avons également déterminé les espèces dont les fragments d'ADN ont été retrouvés dans les fèces mais qui n'ont pas été observées lors des relevés botaniques et *vice versa*.

■ Composition botanique de la ration ingérée par les vaches

Le séquençage haut-débit a produit 1,3 10⁶ séquences (dont 51 % pour les échantillons du système DIV et 49 % pour ceux du système PROD). **Au total, 80 séquences différentes ont été identifiées à 3 niveaux taxonomiques** : 53 au niveau de l'espèce, 20 au niveau du genre et 7 au niveau de la famille. Parmi celles-ci, 27 appartenaient au groupe des Poaceae, 7 à celui des Fabaceae et 46 aux diverses. Les séquences trouvées diffèrent à l'échelle des deux systèmes. Ainsi, nous avons retrouvé **72 taxons sur le système DIV** (24 Poaceae, 7 Fabaceae, 41 diverses) contre **33 sur le système PROD** (15 Poaceae, 4 Fabaceae et 14 diverses). Les séquences d'*Helianthemum nummularium*, petite espèce ligneuse, sont de loin les plus fréquentes dans les fèces collectées sur le système DIV puisqu'elles représentent 60 % de l'ensemble des séquences, suivies par celles de *Lathyrus pratensis* (7 %) et *Lotus corniculatus* (5 %) (tableau 2). Sur le système PROD, les séquences majori-

Taxon	NDT*	Séquences d'ADN (%)	Taxon	NDT*	Séquences d'ADN (%)
Présence d'ADN dans les fèces des vaches du système Div					
<i>Helianthemum nummularium</i>	E	59,88	<i>Meum athamanticum</i>	E	0,13
<i>Lathyrus pratensis</i>	E	7,21	<i>Genista sagittalis</i>	E	0,11
<i>Lotus corniculatus</i>	E	5,46	<i>Anthoxanthum aristatum</i>	E	0,10
<i>Trifolium repens</i>	E	3,23	<i>Stellaria graminea</i>	E	0,08
<i>Alchemilla</i>	E	2,66	<i>Silene vulgaris</i>	E	0,07
<i>Plantago lanceolata</i>	E	2,19	<i>Euphrasia</i>	G	0,07
<i>Dactylis glomerata</i>	E	1,56	<i>Festuca hephaestophila</i>	E	0,06
<i>Ranunculus acris</i>	E	1,40	<i>Rhinanthus minor</i>	E	0,06
Cistaceae	F	1,37	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	E	0,05
<i>Potentilla tabernaemontani</i>	E	1,06	<i>Arrhenatherum</i>	G	0,04
<i>Agrostis capillaris</i>	E	0,94	<i>Vicia cracca</i>	E	0,04
<i>Poa trivialis</i>	E	0,87	<i>Brachypodium</i>	G	0,03
<i>Rhinanthus glacialis</i>	E	0,85	<i>Euphrasia rostkoviana</i>	E	0,03
<i>Festuca lemanii</i>	E	0,85	<i>Gentiana lutea</i>	E	0,03
<i>Holcus mollis</i>	E	0,73	Caryophyllaceae	F	0,03
<i>Sanguisorba minor</i>	E	0,71	<i>Viola</i>	G	0,03
<i>Trisetum flavescens</i>	E	0,64	<i>Festuca roemerii</i>	E	0,02
<i>Rhinanthus</i>	G	0,62	<i>Tragopogon</i>	G	0,02
<i>Avenula pubescens</i>	E	0,62	<i>Ranunculus</i>	G	0,02
<i>Polygonum aviculare</i>	E	0,59	<i>Festuca rubra</i>	E	0,02
<i>Galium pumilum</i>	E	0,56	<i>Festuca petraea</i>	E	0,02
Poaceae	F	0,51	<i>Scabiosa columbaria</i>	E	0,02
<i>Veronica chamaedrys</i>	E	0,44	<i>Luzula campestris</i>	E	0,02
<i>Briza media</i>	E	0,44	<i>Pimpinella saxifraga</i>	E	0,01
<i>Festuca</i>	G	0,42	<i>Stellaria media</i>	E	0,01
Asteraceae	F	0,41	<i>Hieracium hoppeanum</i>	E	0,01
Fabaceae	F	0,39	Apiaceae	F	0,01
<i>Plantago</i>	G	0,34	<i>Agrostis</i>	G	0,01
<i>Rumex</i>	G	0,31	<i>Cirsium</i>	G	0,01
<i>Hieracium</i>	G	0,30	<i>Holcus lanatus</i>	E	0,01
<i>Phleum pratense</i>	E	0,28	<i>Hieracium pilosella</i>	E	0,004
<i>Trifolium pratense</i>	E	0,26	<i>Stachys officinalis</i>	E	0,004
<i>Taraxacum</i>	G	0,22	<i>Jasione laevis</i>	E	0,003
<i>Centaurea</i>	G	0,22	<i>Bromus hordeaceus</i>	E	0,002
<i>Anthoxanthum</i>	G	0,17	<i>Hypericum</i>	G	0,002
<i>Poa</i>	G	0,15	<i>Knautia arvensis</i>	E	0,002
Présence d'ADN dans les fèces des vaches du système PROD					
<i>Rumex</i>	G	44,33	<i>Polygonum</i>	G	0,09
<i>Polygonum aviculare</i>	E	13,50	<i>Lotus corniculatus</i>	E	0,08
<i>Trifolium repens</i>	E	9,63	<i>Poa infirma</i>	E	0,05
<i>Taraxacum</i>	G	9,56	<i>Festuca lemanii</i>	E	0,03
Asteraceae	F	8,01	<i>Trisetum flavescens</i>	E	0,03
<i>Dactylis glomerata</i>	E	6,31	<i>Phleum pratense</i>	E	0,03
<i>Alchemilla</i>	G	3,61	<i>Bromus hordeaceus</i>	E	0,02
Poaceae	F	1,17	<i>Agrostis capillaris</i>	E	0,02
<i>Poa trivialis</i>	E	1,13	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	E	0,01
<i>Taraxacum officinale</i>	E	0,80	<i>Elymus repens</i>	E	0,01
<i>Holcus mollis</i>	E	0,42	Rosaceae	F	0,01
<i>Helianthemum nummularium</i>	E	0,31	<i>Festuca</i>	G	0,008
<i>Poa</i>	G	0,24	<i>Campanula glomerata</i>	E	0,01
<i>Briza media</i>	E	0,21	<i>Trifolium pratense</i>	E	0,003
<i>Poa annua</i>	E	0,18	<i>Veronica chamaedrys</i>	E	0,003
<i>Plantago lanceolata</i>	E	0,12	<i>Galium pumilum</i>	E	0,002
<i>Lathyrus pratensis</i>	E	0,10			

* NDT, niveau de détermination taxonomique : E, espèce ; G, genre ; F, famille

TABLEAU 2 : Séquences d'ADN identifiées dans les fèces des vaches des systèmes Div et Prod par ordre décroissant de présence, avec le niveau de détermination taxonomique (NDT) et le pourcentage de fragments de séquences d'ADN trouvés par taxon.

TABLE 2 : DNA sequences identified in cattle faeces (grazing on diversified, Div, and productive, Prod, grassland) in decreasing order of amount present, and showing level of taxonomic identification (NDT) and percentage of DNA sequence fragments per taxon.

taires appartiennent aux taxons du *Rumex* (44 % des séquences), du *Polygonum aviculare* (14 %), de *Taraxacum officinale* (10 %), de *Trifolium repens* (10 %), des Astéracées (8 %) et enfin de *Dactylis glomerata* (6 %).

Deux fois plus de taxons ont été retrouvés par vache dans les fèces du système Div par rapport aux fèces du système PROD (figure 1). Ainsi, **une moyenne de 32,0 taxons différents ont été identifiés par vache dans le système Div contre 14,8** dans le système PROD

($p < 0,001$). Le nombre de taxons appartenant aux groupes des diverses et des Fabaceae a été 2,5 fois plus élevé dans les fèces des vaches du système Div que dans celles du système PROD (16,9 vs 6,8, $p < 0,001$ et 4,8 vs 1,8, $p < 0,001$ respectivement). En ne prenant en compte que les taxons déterminés au niveau de l'espèce, on a dénombré 14 espèces très fréquentes dans le système Div (sur 47 identifiées à ce niveau taxonomique) et 6 dans le système PROD (sur 24 espèces identifiées).

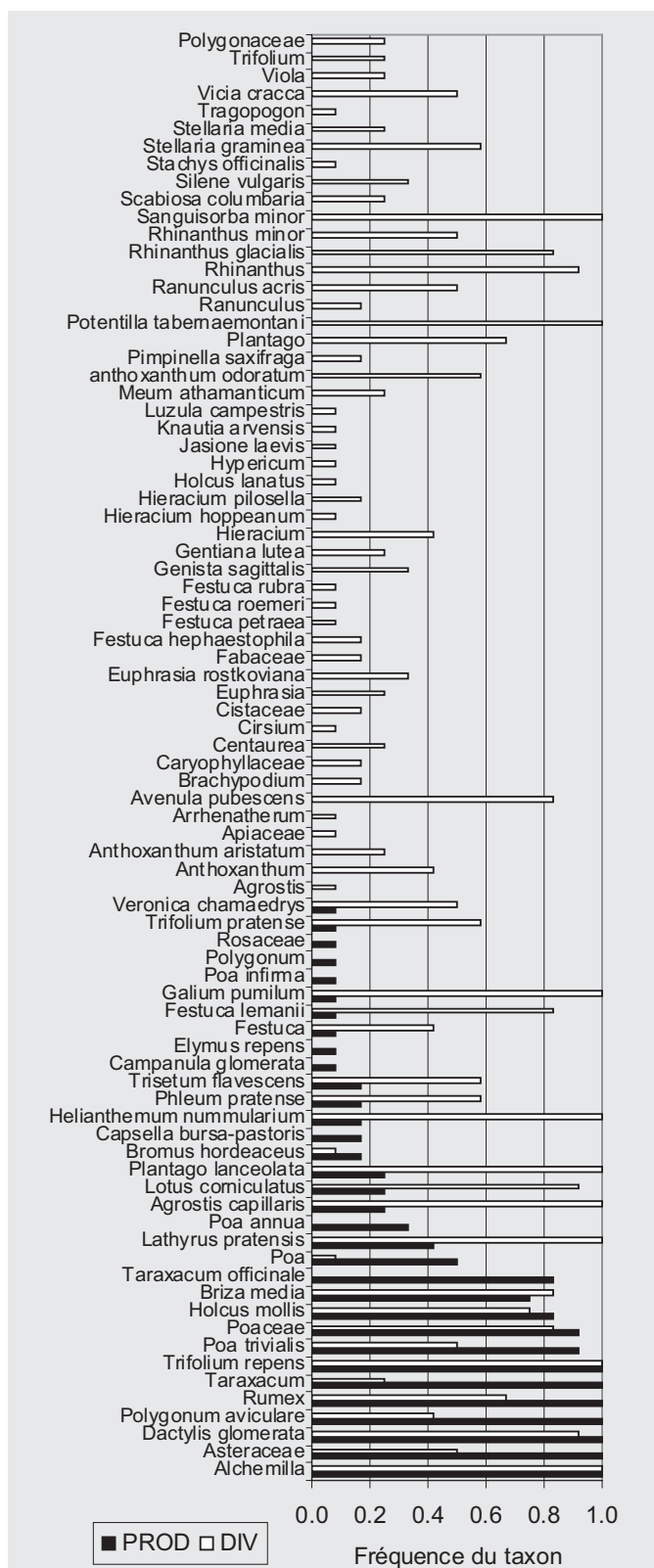


FIGURE 1 : Inventaire des taxons (espèces végétales) retrouvés dans les fèces des systèmes Div et PROD et fréquence des taxons (pourcentage de vaches pour lesquelles on a identifié au moins 1 fois le taxon dans leurs fèces au cours des 2 jours de prélèvement).

FIGURE 1 : List of taxons (plant species) found in faeces of cattle grazing on diversified (DIV) and productive grassland (PROD) and frequency (percentage of animals in whose faeces the taxon was identified at least once during the 2 days the samples were taken).

■ Composition botanique des prairies et espèces identifiées dans les fèces

La parcelle du système Div comprend deux fois plus d'espèces végétales par m² (valeurs moyennes ± écart type : 23,8 ± 5,7 vs. 12,0 ± 0,0) et un indice de diversité de Shannon plus important (3,43 ± 0,440 vs. 2,52 ± 0,169) que la sous-parcelle utilisée dans le système PROD. Tous quadrats confondus, il y a un total de **75 espèces identifiées sur la parcelle Div et 18 sur la sous-parcelle PROD**. La parcelle Div est caractérisée par une grande abondance des diverses (40,1 % contre 20,6 % pour la sous-parcelle PROD). Les espèces les plus abondantes dans le couvert (abondance supérieure à 2 %) sur la parcelle Div sont au nombre de 12 avec *Agrostis capillaris* (18,5 %), *Trifolium repens* (13,6 %), *Festuca rubra* (9,7 %), *Plantago lanceolata* (5,3 %), *Achillea millefolium* (5,1 %), *Veronica chamaedrys* (3,8 %), *Carex caryophylla* (3,3 %), *Helianthemum nummularium* (2,9 %), *Poa pratensis* (2,5 %), *Galium verum* (2,3 %), *Dactylis glomerata* (2,3 %) et *Thymus pulegioides* (2,2 %). Dans PROD, 7 espèces dominent : *Trifolium repens* (27,1 %), *Dactylis glomerata* (23,1 %), *Taraxacum officinale* (16,6 %), *Lolium perenne* (9,9 %), *Holcus mollis* (8,4 %), *Poa pratensis* (4,1 %) et *Poa trivialis* (2,6 %).

Globalement, les taxons (identifiés au niveau de l'espèce) **très fréquemment retrouvés dans les fèces correspondent aux espèces les plus abondantes dans le couvert** au sein des deux systèmes. Il s'agit d'*Agrostis capillaris*, *Trifolium repens*, *Plantago lanceolata*, *Helianthemum nummularium* et *Dactylis glomerata* dans Div, et *Trifolium repens*, *Dactylis glomerata*, *Taraxacum officinale*, *Holcus mollis* et *Poa trivialis* dans PROD (figure 2). ***Festuca rubra*, très abondante dans Div, a en revanche été très peu retrouvée.** Plusieurs autres espèces abondantes à très abondantes n'ont pas été du tout identifiées comme *Achillea millefolium*, *Carex caryophylla*, *Poa pratensis* et *Thymus pulegioides* dans Div, et *Lolium perenne* et *Poa pratensis* dans PROD. Des espèces peu abondantes (abondance < 2 %) ont été par ailleurs très retrouvées surtout dans le système Div : *Lathyrus pratensis*, *Galium pumilum*, *Avenula pubescens*, *Sanguisorba minor*, *Lotus corniculatus*, *Briza media*, *Potentilla tabernaemontani* et *Festuca lemanii*. Des espèces absentes des relevés dans les quadrats, mais néanmoins présentes sur le site, ont pu être très identifiées comme *Polygonum aviculare*. Enfin, des espèces qui n'ont jamais été identifiées par le botaniste sur ce site ont été retrouvées dans les fèces comme *Anthoxanthum aristatum* ou *Festuca hephaestophila*, par exemple.

■ Apports et limites de la technique dans cette expérimentation

Certaines plantes pourtant très abondantes dans les prairies peuvent être très peu retrouvées dans les fèces des vaches. C'est le cas dans notre suivi de *Festuca rubra* qui semble évitée par les bovins bien que très présente dans la prairie Div. Ces résultats confirment les observa-

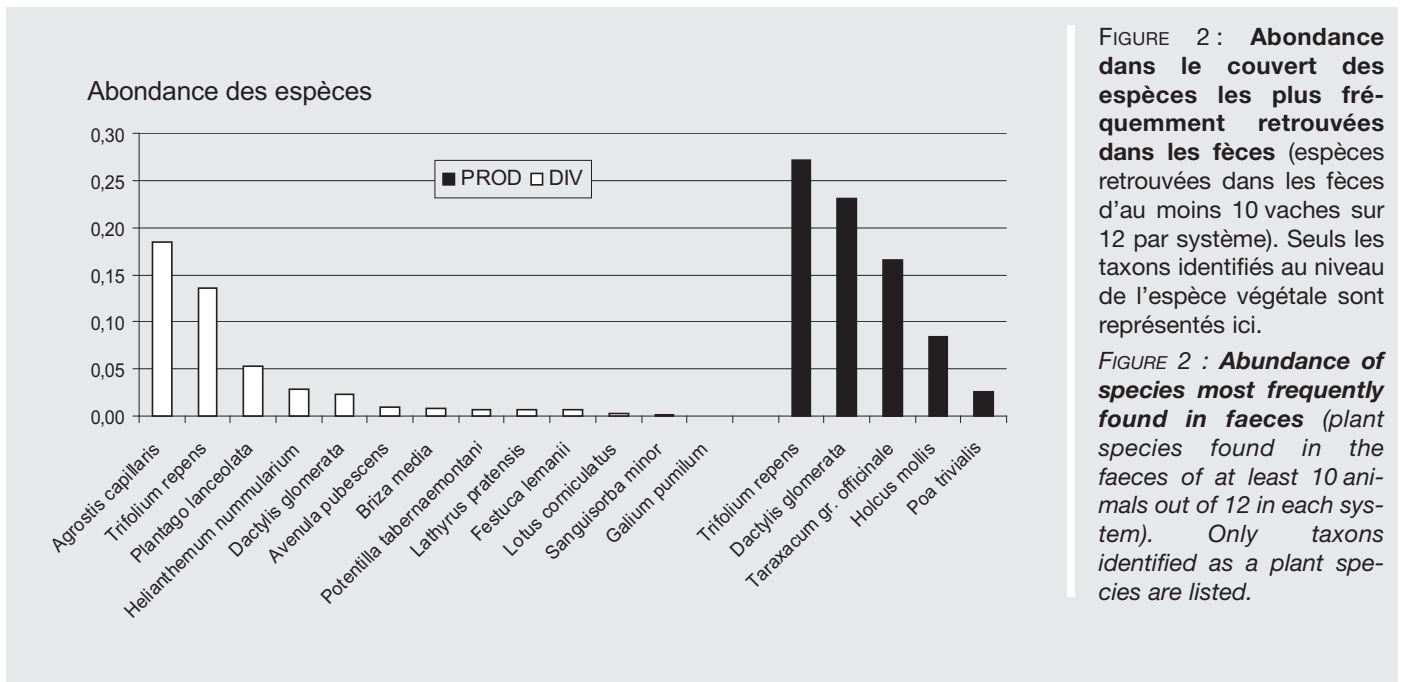


FIGURE 2 : **Abondance dans le couvert des espèces les plus fréquemment retrouvées dans les fèces** (espèces retrouvées dans les fèces d'au moins 10 vaches sur 12 par système). Seuls les taxons identifiés au niveau de l'espèce végétale sont représentés ici.

FIGURE 2 : **Abundance of species most frequently found in faeces** (plant species found in the faeces of at least 10 animals out of 12 in each system). Only taxons identified as a plant species are listed.

tions de COPPA *et al.* (2011) sur le comportement d'évitement vis-à-vis de cette espèce. Nous avons également montré que les plantes d'aire d'attraction piétinée (points d'eau, entrée de parcelle) comme *Polygonum aviculare* font bien partie de la ration alimentaire des vaches. Nous avons pu par ailleurs objectiver que la gamme des plantes ingérées par les vaches laitières du système le plus extensif Div était beaucoup plus importante, en particulier le nombre de plantes appartenant à d'autres familles que les Poaceae (figure 1). **Ces résultats pourraient contribuer à expliquer les différences de caractéristiques sensorielles mesurées sur les fromages** issus des deux systèmes (COPPA *et al.*, 2012, ce numéro). Enfin, sur le plan du temps de travail, l'obtention de ces résultats a demandé très peu de temps sur le terrain par comparaison avec la plupart des autres techniques de détermination des espèces végétales ingérées au pâturage par les ruminants. Le temps de travail s'est toutefois déplacé sur les étapes réalisées au laboratoire d'extraction de l'ADN et de séquençage massif des produits PCR.

Cette technique possède cependant des limites et une marge de progression. Malgré une base de données pour l'intron *trnL* établie "sur mesure", spécifique à notre site expérimental, **des espèces prairiales appartenant aux familles des Asteraceae et des Poaceae ne sont encore pas bien référencées** comme *Achillea millefolium*, *Lolium perenne* ou *Poa pratensis*, ce qui diminue le pouvoir résolutif des analyses et expliquerait le fait que ces trois espèces abondantes et habituellement considérées comme appétentes n'ont pas été identifiées dans les fragments d'ADN. Par ailleurs, encore beaucoup d'espèces importantes dans les prairies ne sont référencées qu'au niveau du genre comme *Rumex* sp. ou *Alchemilla* sp. De plus, dans la base de séquences publique utilisée pour l'identification des fragments ITS, il est probable que l'on trouve des espèces proches de nos espèces présentes qui

ont une séquence identique, comme *Festuca hephaestophila* ou *Anthoxanthum aristatum* par exemple, ce qui expliquerait qu'on les identifie alors qu'elles ne sont pas présentes sur notre site. **La qualité de la base de référence est donc essentielle et une base exhaustive établie avec les deux systèmes (*trnL* et ITS) faite sur mesure est préférable**, même si elle suppose un travail botanique initial important.

De plus, si **cette technique** permet d'apprécier qualitativement la composition en espèces végétales d'une ration à base de fourrage, elle **ne permet pas pour l'instant de quantifier les consommations par espèce** en s'appuyant sur le nombre de séquences dans le produit PCR. Il est possible en effet que la très forte représentation d'une espèce soit en partie due à un biais d'amplification ou à des différences quantitatives de présence d'ADN chloroplastique ou de digestibilité. Sur ce dernier point, il se peut que les espèces les plus retrouvées dans les fèces correspondent à celles qui sont les moins bien assimilées par l'animal ; à l'inverse, certaines espèces pourraient être peu présentes car fortement assimilées. La forte présence par exemple des séquences d'*Helianthemum nummularium* dans Div pourrait s'expliquer au moins en partie par la forte lignification de cette plante qui la rend moins digestible. Afin d'évaluer le potentiel de cette technique à produire des résultats quantitatifs, une expérimentation est en cours dans le cadre d'un projet *Bottom up* de l'INRA dont l'objectif est de déterminer dans quelle mesure la fréquence relative d'une espèce végétale dans des mélanges binaires fournis à des animaux est reflétée par la fréquence de son ADN dans les produits de séquençage massif. Enfin, notons que nous n'avons pas mis ici en parallèle de méthode de référence pour tester la validité de nos résultats.

3. Perspectives d'application dans les domaines des interactions plantes - animal - produits

Au-delà de la détermination des espèces végétales ingérées, l'utilisation du métabarcoding pourrait apporter des éléments précieux de compréhension sur la "chaîne" plantes-herbivores-qualité des produits et rejets animaux. Beaucoup d'études récentes mettent en avant l'importance des composés secondaires présents dans les plantes, qui sont souvent propres à l'espèce ou à la famille botanique (VIALLO *et al.*, 2000). **Certaines plantes contiennent en effet des jeux spécifiques de micro-constituants** susceptibles i) d'améliorer le bien-être, la santé et les performances animales, ii) d'apporter des éléments de qualité et de typicité aux produits animaux (vitamines, caroténoïdes, polyphénols, terpènes, acides gras) et iii) de limiter les rejets polluants comme le méthane ou l'excès d'azote. A titre d'exemple, les tanins condensés, les saponines et le polyphénol oxydase peuvent affecter le métabolisme ruminal (NIDERKORN *et al.*, 2009) et améliorer l'efficacité d'utilisation de l'azote. Cette technique pourrait également permettre de mieux comprendre le fonctionnement de l'écosystème prairial pâturé et, en particulier, l'impact du pâturage sur la biodiversité. Etre en mesure de connaître la sélection des herbivores à ce niveau très précis qu'est l'espèce permettrait d'analyser le processus de sélection **en comprenant pourquoi, et sur la base de quelles caractéristiques, l'animal consomme certaines espèces alors qu'il en délaisse d'autres.**

Le métabarcoding offre également de nouvelles perspectives avec la possibilité de combiner différents codes-barres pour **réaliser des études intégrées sur l'animal à partir d'un même échantillon de contenu digestif**. On peut ainsi concevoir l'analyse simultanée du microbiote intestinal ou ruminal, du cortège parasitaire et du régime alimentaire d'une espèce animale. Le métabarcoding peut aussi se substituer aux relevés botaniques classiquement utilisés notamment dans les milieux où la diversité végétale est extrêmement élevée (POMPANON *et al.*, 2011 ; YOCOZ *et al.*, soumis).

Le potentiel de cette technique ne se limite pas aux herbivores domestiques : il a aussi été démontré chez les **animaux sauvages** parmi lesquels les oiseaux et les insectes (VALENTINI *et al.*, 2009b). Chez le bison d'Europe, cette technique a, par exemple, été utilisée pour étudier l'influence d'un apport de fourrage sur le comportement alimentaire en hiver (KOWALCZYK *et al.*, 2011). Les interactions trophiques entre les campagnols et les plantes, considérées comme un facteur déterminant pour les fluctuations de populations au même titre que les interactions proies - prédateurs, ont également été récemment étudiées grâce à cette technique (DEAGLE *et al.*, 2009).

Conclusion

La mise en œuvre de la technique du métabarcoding pour déterminer les espèces ingérées par les vaches au pâturage dans des prairies complexes, à partir des fragments d'ADN des plantes retrouvées dans les fèces, a permis de montrer les atouts mais aussi les limites actuelles de cette technique. Cette nouvelle approche est actuellement en plein essor grâce à l'utilisation des nouvelles techniques de séquençage et de la bio-informatique, et devient plus accessible pour un grand nombre d'utilisations.

Accepté pour publication,
le 18 janvier 2012.

Remerciements : Ce travail a été financé par le ministère en charge de l'agriculture et de la pêche à l'occasion du projet CASDAR PRAIRIES AOP. Nous remercions l'ensemble des partenaires de ce projet qui ont contribué à cet essai. Nous remercions également le relecteur qui nous a permis de bien améliorer ce texte.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALI H.A.M., MAYES R.W., LAMB C.S., HECTOR B.L., VERMA A.K., ORSKOV E.R. (2004) : "The potential of long-chain fatty alcohols and long-chain fatty acids as diet composition markers: development of methods for quantitative analysis and faecal recoveries of these compounds in sheep fed mixed diets", *J. Agricultural Sci.*, 142, 71-78.
- COPPA M., FARRUGGIA A., PRADEL P., LOMBARDI G., MARTIN B. (2011) : "An improved grazed class method to estimate species selection and dry matter intake by cows at pasture", *Italian J. Animal Sci.*, 10, 58-68.
- COPPA M., FERLAY A., MONSALLIER F., VERDIER-METZ I., PRADEL P., DIDIENNE R., MONTEL M.C., POMIES D., MARTIN B., FARRUGGIA A. (2012) : "Le système de pâturage influence-t-il les caractéristiques nutritionnelles et sensorielles des fromages ?", *Fourrages*, 209, ce numéro 33-41.
- COULON J.B., ROCK E., NOEL Y. (2003) : "Caractéristiques nutritionnelles des produits laitiers et variations selon leur origine", *INRA Productions Animales*, 16(4), 275-278.
- DEAGLE B.E., KIRKWOOD R., JARMAN S.N. (2009) : "Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces", *Molecular Ecology*, 18, 2022-2038.
- DUMONT B., GAREL J.P., GINANE C., DECUQ F., FARRUGGIA A., PRADEL P., RIGOLOTT C., PETIT M. (2007) : "Effect of cattle grazing a species-rich mountain pasture under different stocking rates on the dynamics of diet selection and sward structure", *Animal*, 1 (7), 1042-1052.
- FARRUGGIA A., DUMONT B., D'HOOR P., EGAL D., PETIT M. (2006) : "Diet selection of dry and lactating beef cows grazing extensive pastures in late autumn", *Grass and Forage Sci.*, 61(4), 347-353.
- FARRUGGIA A., PARGUEL P., HULIN S., REUILLON J.L., POMIES D., BAUMONT B., RISOU D., HAUWUY A., VEYSSET P., MARTIN B. (2009) : "En filière fromagère AOP, les conditions de production dans les cahiers des charges et leurs conséquences pour les exploitations", *Fourrages*, 199, 311-329.
- FERREIRA L.M.M., CARVALHO S., FALCO V., CELAYA R., GARCIA U., SANTOS A.S., RODRIGUES M.A.M., OSORO K. (2009) : "Assessment of very long-chain fatty acids as complementary or alternative natural fecal markers to n-alkanes for estimating diet composition of goats feeding on mixed diets", *J. Animal Sci.*, 87(8), 2732-2745.
- FRASER M.D., GORDON I.J. (1997) : "The diet of goats, red deer and South American camelids feeding on three contrasting Scottish upland vegetation communities", *J. Applied Ecology*, 34(3), 668-686.
- FRASER M.D., THEOBALD V.J., MOORBY J.M. (2006) : "Determining diet composition on complex swards using n-alkanes and long-chain fatty alcohols", *Ecological Applications*, 16(5), 1901-1910.
- GINANE C., PETIT M., D'HOOR P. (2003) : "How do grazing heifers choose between maturing reproductive and tall or short vegetative swards?", *Applied Animal Behaviour Sci.*, 83(1), 15-27.
- HESSLE A., WISSMAN J., BERTILSSON J., BURSTEDT E. (2008) : "Effect of breed of cattle and season on diet selection and defoliation of competitive plant species in semi-natural grasslands", *Grass and Forage Sci.*, 63(1), 86-93.
- KELMAN W., BUGALHO M., DOVE H. (2003) : "Cuticular wax alkanes and alcohols used as markers to estimate diet composition of sheep (*Ovis aries*)", *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 919-927.
- KOWALCZYK R., TABERLET P., COISSAC E., VALENTINI A., MIQUEL C., KAMINSKI T., WOJCIK J.M. (2011) : "Influence of management practices on large herbivore diet-Case of European bison in Bialowieza Primeval Forest (Poland)", *Forest Ecology and Management*, 261(4), 821-828.
- LUCAS A., AGABRIEL C., MARTIN B., FERLAY A., VERDIER-METZ I., COULON J.B., ROCK E. (2006) : "Relationships between the conditions of cow's milk production and the contents of components of nutritional interest in raw milk farmhouse cheese", *Lait*, 86(3), 177-202.
- MARTIN B., VERDIER-METZ I., BUCHIN S., HURTAUD C., COULON J.B. (2005) : "How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products?", *Animal Sci.*, 81, 205-212.
- MOORBY J.M., FRASER M.D., PARVEEN I., LEE M.R.F., WOLD J.P. (2010) : "Comparison of 2 high-throughput spectral techniques to predict differences in diet composition of grazing sheep and cattle", *J. Animal Sci.*, 88(5), 1905-1913.
- NIDERKORN V., BAUMONT R. (2009) : "Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants", *Animal*, 3(7), 951-960.
- ORTH D., CARRERE P., LEFEVRE A., DUQUET P., MICHELIN Y., JOSIEN E., L'HOMME G. (1998) : "L'adjonction de chevaux aux bovins en conditions de sous chargement modifie-t-elle l'utilisation de la ressource herbagère?", *Fourrages*, 153, 125-138.
- PEGARD A., MIQUEL C., VALENTINI A., COISSAC E., BOUVIER F., FRANCOIS D., TABERLET P., ENGEL E., POMPANON F. (2009) : "Universal DNA-Based Methods for Assessing the Diet of Grazing Livestock and Wildlife from Feces", *J. Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5700-5706.
- POMPANON F., COISSAC E., TABERLET P. (2011) : "Metabarcoding, une nouvelle façon d'analyser la biodiversité", *Biofutur*, 30(319), 30-32.
- POMPANON F., DEAGLE B.E., SYMONDSON W.O.C., BROWN D.S., JARMAN S.N., TABERLET P. (2012) : "Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing", *Molecular ecology*, sous presse, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05403.x
- RUTTER S.M. (2006) : "Diet preference for grass and legumes in free-ranging domestic sheep and cattle: Current theory and future application", *Applied Animal Behaviour Sci.*, 97(1), 17-35.
- SOININEN E.M., VALENTINI A., COISSAC E., MIQUEL C., GIELLY L., BROCHMANN C., BRYSTING A.K., SONSTEBØ J.H., IMS R.A., YOCOZ N.G., TABERLET P. (2009) : "Analysing diet of small herbivores: the efficiency of DNA barcoding coupled with high-throughput pyrosequencing for deciphering the composition of complex plant mixtures", *Frontiers in Zoology*, 6.
- TABERLET P., COISSAC E., POMPANON F., GIELLY L., MIQUEL C., VALENTINI A., VERMAT T., CORTHIER G., BROCHMANN C., WILLERSLEV E. (2007) : "Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding", *Nucleic Acids Research*, 35(3).
- VALENTINI A., POMPANON F., TABERLET P. (2009A) : "DNA barcoding for ecologists", *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117.
- VALENTINI A., MIQUEL C., NAWAZ M.A., BELLEMANN E., COISSAC E., POMPANON F., GIELLY L., CRUAUD C., NASCETTI G., WINCKER P., SWENSON J.E., TABERLET P. (2009b) : "New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach", *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 51-60.
- VIALON C., MARTIN B., VERDIER-METZ I., PRADEL P., GAREL J.P., COULON J.B., BERDAGUE J.L. (2000) : "Transfer of monoterpenes and sesquiterpenes from forages into milk fat", *Lait*, 80 (6), 635-641.
- YOCOZ N., BRATHEN K.A., GIELLY L., HAILE J., EDWARDS M., GOSLAR T., MICKIEWICZ A., VON STEDINGK J., BRYSTING A., COISSAC E., POMPANON F., SONSTEBØ J., MIQUEL C., VALENTINI A., DE BELLO F., CHAVE J., THUILLER W., WINCKER P., CRUAUD C., GAVORY F., RASMUSSEN M., GILBERT P. THOMAS M., ORLANDO L., WILLERSLEV E., TABERLET P. (2012) : "DNA from soil mirrors plant functional and structural diversity", *Molecular ecology*, sous presse.