



INRAE



Microbiote intestinal et stress chez le chevreuil sauvage (*Capreolus capreolus*) vivant dans un agroécosystème hétérogène

FLORENCE Estelle



Sous la direction de Lucie Debeffe & Hélène Verheyden

Avec la collaboration de Sylvie Combes & Erwan Quéméré

INRAE - CEFS (Comportement et Ecologie de la Faune Sauvage)
24 chemin de Borde-Rouge - Auzeville
31326 CASTANET-TOLOSAN

Du 04/01/2021 au 04/06/2021

ATTESTATION DE SOUTENANCE & APPRÉCIATIONS DU JURY

Mlle /Mme /Mr ,
étudiant(e) en M2 EE, a soutenu ce jour le présent mémoire, devant un jury composé
d'enseignants-chercheurs et de chercheurs de l'Université de Poitiers.



Le jury, après délibération, a donné les appréciations suivantes :

❖ Qualité générale du mémoire :

◆ Rédaction

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

◆ Richesse du contenu

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

◆ Qualité de l'analyse

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

❖ Qualité générale de la présentation orale :

◆ Prestation

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

◆ Esprit de synthèse

- Excellent
- Très bon
- Bon
- Moyen
- Médiocre

◆ Qualité de l'illustration

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

❖ Déroulement du stage (*Appréciations du Maître de stage*) :

◆ Insertion dans l'équipe

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

◆ Qualité d'assimilation

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre

◆ Implication personnelle

- Excellente
- Très bonne
- Bonne
- Moyenne
- Médiocre



En conséquence, les appréciations du jury, en l'état actuel du mémoire, sont les suivantes :

- Note sur le mémoire : / 20 ➤ Note sur l'oral : / 20 (coeff. 0.4)
(coeff. 0.6)

➤ Avis sur la divulgation du mémoire en l'état actuel :

- Autorisée sans modification.
- Autorisée après modifications mineures.
- Non divulgation pour clause de confidentialité
- Autorisée après modifications majeures.
- Non autorisée.

Fait à Poitiers, le : Signature et cachet du président du Jury :

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

Je souhaite en tout premier lieu remercier mes encadrantes Lucie Debeffe et Hélène Verheyden pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans les meilleures conditions malgré la période difficile. Merci pour leur écoute attentive, leur disponibilité, leurs bons conseils, la transmission de leur méthode de travail ainsi que de la pédagogie dont elles ont fait preuve.

Un grand merci à Sylvie Combes et Erwan Quéméré pour leur patience, leur disponibilité et le partage de leurs connaissances sur l'analyse du microbiote, ainsi que pour leurs relectures et leurs bons conseils. Merci également à Zhipeng Li, notre collaborateur de la Chinese Academy of Agricultural Sciences (Changcun, China) qui a généré les données microbiote à partir des échantillons de fèces.

De même, je remercie Jeffrey Carbillet pour sa réactivité et son aide précieuse dans le traitement des données sur le cortisol, et Staffan Jacob pour ses conseils concernant le traitement des données microbiote.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe du CEFS pour leur accueil, leur ouverture d'esprit et pour m'avoir fait découvrir le déroulement des captures de chevreuils.

Merci à ma famille et mes amis pour tout leur soutien depuis le début de mes études.

Sommaire

I. Introduction	1-5
II. Matériels & Méthodes	
1. Site d'étude.....	5-6
2. Collecte de données sur le terrain	6-7
3. Les variables environnementales représentatives des ressources alimentaires	
a. Les habitats utilisés.....	7-8
b. Abondance en glands.....	8-9
c. Degré-jour de croissance	9
4. Le stress basal exprimé par les chevreuils (cortisol).....	9-10
5. Le microbiote intestinal	
a. Extraction de l'ADN et séquençage	10
b. Traitement des séquences	10-11
6. Analyses statistiques	
a. Composition du microbiote intestinal.....	11
b. Diversité alpha et ses déterminants environnementaux et physiologiques	11-12
c. Diversité bêta et ses déterminants environnementaux et physiologiques	12-14
III. Résultats	
1. Composition du microbiote intestinal des chevreuils.....	15
2. Diversité alpha et ses déterminants environnementaux et physiologiques	15-16
3. Diversité bêta et ses déterminants environnementaux et physiologiques	16
a. Effets de la glandée sur la composition microbienne.....	17-18
b. Effets du type d'habitat et du stress sur la composition microbienne	18-21
IV. Discussion.....	21-26
1. Relation entre microbiote intestinal et environnement / régime alimentaire	22-23
2. Stress et microbiote	23-26
V. Conclusion & Perspectives	27

Sommaire des figures et tableaux

Figure 1 : Site d'Aurignac	6
Figure 2A : Carte du domaine vital de chaque animal et des habitats associés	8
Figure 2B : Diagramme de dispersion de l'Analyse en Composantes Principales (ACP)	8
Figures 3A, 3B & 3C : Abondance relative (%) des phyla, des 10 familles et des 10 genres (C) composant le microbiote intestinal.....	15
Figure 4 : Graphique PCoA de la diversité bêta du microbiote intestinal des chevreuils (calculée avec l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis) selon l'abondance en glands.....	17
Figures 5A & 5B : Abondance relative des familles <i>Muribaculaceae</i> et <i>UCG-011</i> en fonction des résidus du poids des glands	18
Figure 6 : Graphique PCoA du microbiote intestinal des chevreuils basé sur la métrique de Bray-Curtis selon l'interaction entre niveau de cortisol et le degré d'ouverture du paysage.....	19
Figure 7 : Graphique PCoA du microbiote intestinal des chevreuils basé sur la métrique de Bray-Curtis selon l'interaction entre niveau de cortisol et le type d'habitat ouvert.....	19
<hr/>	
Tableau 1 : Résultats de la Permanova basée sur les dissimilarités de Bray-Curtis	16
Tableaux 2A & 2B : Tableaux récapitulatifs de l'effet de l'interaction cortisol x habitat sur l'abondance relative des phyla, familles et genres	21

I. Introduction

L'ensemble du règne animal vit en symbiose avec une diversité de micro-organismes appelée « flore microbienne » ou encore « microbiote ». Ce microbiote est propre à chaque espèce et résulte d'une co-évolution de l'hôte et des micro-organismes qui le colonisent. Ces micro-organismes se situent au niveau de la peau et des muqueuses (buccale, intestinale, vaginale, ...). La biomasse microbienne présente dans l'intestin est l'une des plus importantes. Compte tenu des rôles du microbiote intestinal sur le développement et la physiologie de son hôte, c'est également l'un des plus étudié. La plus grande partie des espèces dominantes observées dans le microbiote intestinal d'un individu lui est propre, même si, un petit nombre d'espèces pourraient constituer un cœur phylogénétique partagé par la plupart des animaux appartenant à une même espèce (Tap *et al.*, 2009). Ainsi, l'analyse de sa composition en taxa (genres bactériens et/ou grands groupes phylogénétiques) fait ressortir l'existence de composantes récurrentes, retrouvées chez tous les individus. Les *Firmicutes* et *Bacteroidota* sont les deux phyla les plus importants trouvés dans le tractus gastro-intestinal des mammifères (Leser & Mølbak, 2009) où ils constituent respectivement la moitié et le tiers de l'ensemble des microbes. En plus d'être déterminé par le génome de l'hôte, le microbiote intestinal peut être modifié par des facteurs environnementaux comme le régime alimentaire (Zhang *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2018 ; Pereira-Marques *et al.*, 2019) et l'habitat (Huang *et al.*, 2018). Ces variations se caractérisent par des mesures spécifiques de diversité, les diversités alpha et bêta. La diversité alpha correspond au nombre de taxa différents (ex : phyla, familles, genres, espèces...) présents au sein de la communauté microbienne étudiée d'un individu ou d'un lot d'individus. Par exemple, Chi *et al.* ont montré en 2019 une augmentation de la diversité alpha chez des individus de l'espèce grand bharal (*Pseudois nayaur*) sauvages par rapport à des individus captifs (Chi *et al.*, 2019). La diversité bêta correspond à la différence de composition en espèces microbiennes entre échantillons (Whittaker, 1960). Par exemple, avec un régime plus ou moins riche en amidon, une modification de la composition du microbiote d'élan d'Alaska (*Alces americanus*) a eu lieu au niveau de la diversité bêta uniquement. En effet, les animaux nourris avec un régime plus riche en amidon présentent une abondance relative plus élevée d'archéobactéries dans le rumen que les autres individus (Ishaq & Wright, 2012). D'un point de vue fonctionnel, le microbiote intestinal des mammifères joue un rôle important dans le métabolisme de l'hôte, l'acquisition de nutriments et la réponse immunitaire (El Aidy *et al.*, 2013). Etant capable de fermenter les polysaccharides complexes (cellulose, hémicellulose et lignine) non digestibles par les seules enzymes de l'hôte, générant ainsi des acides gras à courte chaîne et d'autres métabolites facilement absorbables par les individus, la communauté microbienne intestinale est indispensable chez les espèces herbivores (Kohl *et al.*, 2014 ; Wolf *et al.*, 2020). Une diversité alpha et bêta du

microbiote intestinal variable est probablement bénéfique dans la nature, car permet aux individus de faire preuve de plasticité phénotypique, correspondant à la capacité d'un seul génotype à modifier son expression de manière à présenter différents phénotypes en réponse à des variations environnementales (Alberdi *et al.*, 2016). Cette plasticité microbienne est plus forte et plus rapide que celle qui serait autrement disponible soit par le génome, soit par une communauté de microorganismes intestinaux statiques uniquement (Alberdi *et al.*, 2016). Cela fournit à l'hôte diverses voies métaboliques qui peuvent faciliter l'exploitation de ressources différentes dans un environnement changeant.

Cependant, ces adaptations microbiennes sont altérées par le stress. En effet, les animaux sauvages vivent dans un environnement très dynamique, en perpétuel remaniement (Wingfield, 2015), les exposant à des variations environnementales. Ces dernières peuvent être régulières et prévisibles, comme les saisons, mais aussi rapides et imprévisibles (Romero & Wingfield, 2015), comme la prédation et les perturbations soudaines liées aux activités humaines, pouvant générer une réponse de stress. Depuis la moitié du XX^e siècle, une intensification croissante de l'utilisation des terres agricoles induisent de grands changements du paysage avec une fragmentation de l'habitat sur plus de 50% de la surface terrestre (Hooke *et al.*, 2012). Cette dynamique entraîne non seulement la perte d'habitats et de biodiversité, mais affecte également la façon dont les animaux se déplacent et utilisent l'espace, les obligeant à s'adapter continuellement (Tucker *et al.*, 2018). Ainsi, à l'heure actuelle, pratiquement tous les animaux font face à des situations de stress pouvant affecter leur condition physique et réduire leur survie ainsi que leur succès reproducteur (Redfern, 2016).

Ces facteurs de stress, ou stresser, perturbent l'homéostasie interne de l'animal en engendrant une réponse de stress de nature physiologique et comportementale, destinée à faire face à la situation (Amy *et al.*, 2017). Deux voies neuroendocriniennes sont généralement activées lors d'une réponse de stress : le système nerveux sympathique (SNS) et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) (Reeder & Kramer, 2005). L'activation de l'axe HPA entraîne la libération d'hormones de stress, les glucocorticoïdes, dans la circulation sanguine par les glandes surrénales (Sapolsky *et al.*, 2000 ; Reeder & Kramer, 2005). Les glucocorticoïdes sont largement représentés par le cortisol chez les poissons et la plupart des mammifères (Palme, 2019). Ces hormones exercent une rétroaction négative sur leur propre sécrétion de sorte que le niveau est restauré à son état basal une fois l'activation de l'axe HPA terminée (Wingfield & Sapolsky, 2003 ; Sheriff *et al.*, 2011). Mais si les facteurs de stress sont trop fréquents ou persistent, la rétroaction négative est moins efficace et le niveau de cortisol reste élevé, signature d'un stress chronique. Plusieurs études ont examiné la relation entre les facteurs de stress quotidiens et le niveau de cortisol, les résultats apportant la preuve qu'une sécrétion plus élevée de cortisol est liée à des niveaux de stress plus

élevés (Ockenfels *et al.*, 1995 ; Smyth *et al.*, 1998 ; Vedhara *et al.*, 1999). Enfin, pour faire face aux facteurs de stress, souvent d'origine anthropogéniques, les animaux sauvages peuvent adapter leur comportement. Par exemple, les chevreuils, à l'origine strictement forestiers, se sont adaptés à la fragmentation de leur paysage en utilisant des milieux ouverts qui présentent aussi des ressources alimentaires plus riches et plus abondantes (Abbas *et al.*, 2011), mais qui sont également associés à des risques liés à leur proximité avec les activités humaines (Bonnot *et al.*, 2013). En utilisant des zones de refuges pendant la journée ou en étant actifs la nuit, ces animaux parviennent à limiter la hausse des glucocorticoïdes fécaux liée à une proximité accrue avec l'homme (Carbillet *et al.*, 2020).

De nombreuses études montrent que le stress perçu par l'animal peut modifier la composition du microbiote et donc altérer son adéquation avec les ressources alimentaires locales. Par exemple, lorsque de jeunes singes rhésus sont exposés à des facteurs de stress tôt, ils montrent une diminution importante du taux de *Lactobacilles* (Bailey & Coe, 1999), bactéries lactiques bénéfiques de la flore intestinale normale. De plus, Webster *et al.* (2007) ont démontré qu'il y avait une réduction du nombre de taxa bactériens chez les poissons stressés par rapport aux poissons moins ou pas stressés, suggérant un effet inhibiteur du cortisol sur certains taxa. Ces fluctuations dans la composition et l'abondance des bactéries commensales peuvent également entraîner un stress physiologique et psychologique chez les individus (Mackos *et al.*, 2017). En effet, il existe une communication bidirectionnelle le long d'un axe cerveau-intestin-microbiote qui implique le système nerveux central (SNC), les systèmes neuro-endocrinien et neuro-immunitaire, y compris l'axe HPA, les branches sympathique et parasympathique du système nerveux autonome, le système nerveux entérique (SNE) et le microbiote intestinal (Rhee *et al.*, 2009 ; Cryan & O'Mahony, 2011). Ce réseau de communication bidirectionnel permet aux signaux du cerveau d'influencer les modalités motrices, sensorielles et sécrétoires du tractus gastro-intestinal et, inversement, les messages viscéraux de l'intestin peuvent influencer les fonctions cérébrales, notamment les zones du cerveau consacrées à la régulation du stress, plus particulièrement l'hypothalamus. Plusieurs études ont montré que les souris ou les rats élevés dans des conditions sans germes (dits axéniques) présentent une activité exagérée de l'axe HPA en réponse à des facteurs de stress aigus (Clarke *et al.*, 2013 ; Sudo *et al.*, 2004) et une diminution du comportement anxieux (Clarke *et al.*, 2013 ; de Palma *et al.*, 2015 ; Neufeld *et al.*, 2011). Les changements observés chez les animaux axéniques peuvent partiellement revenir à la normale après une colonisation par des bactéries commensales de souris témoins (Clarke *et al.*, 2013 ; de Palma *et al.*, 2015 ; Sudo *et al.*, 2004) démontrant ainsi un effet du microbiote sur la réponse de stress. A l'inverse, d'autres recherches suggèrent que le cerveau peut modifier le microbiote, comme l'a montré Kiliaan *et al.* en 1998. En effet, le stress entraîne une augmentation de la perméabilité de l'intestin permettant aux bactéries de traverser la

barrière épithéliale, ce qui peut activer une réponse immunitaire qui, à son tour, modifie la composition du microbiote (Kiliaan *et al.*, 1998).

Le microbiote intestinal est très dynamique dans sa diversité et composition et peut être influencé par de nombreux facteurs dont le régime alimentaire et le stress. Contrairement aux humains et aux animaux maintenus en captivité, peu d'études ont été menées pour examiner la variation du microbiote intestinal et ses déterminants chez des espèces sauvages. Or, la diversité et la composition du microbiote des animaux captifs, soumis à des conditions de vie contrôlées, rendent peu compte de ce qu'il se passe en milieu naturel et ne permettent donc pas d'étudier le rôle adaptatif de ces variations (Ley *et al.*, 2008 ; Nelson *et al.*, 2013). Travailler sur des animaux sauvages permettrait alors de couvrir une large gamme de situations d'adaptation à l'environnement grâce à une modulation de leur microbiote. Ainsi, l'objectif innovant de cette présente étude est d'examiner la variation du microbiote intestinal des chevreuils sauvages en fonction des ressources présentes dans leur milieu et de voir si le stress vécu par l'animal interfère dans cette relation.

Le chevreuil européen (*Capreolus capreolus*) sauvage, espèce ruminant généraliste, très abondante et bien étudiée, présente de nombreux avantages pour mener à bien cette étude. Notamment, cette espèce, considérée comme forestière à l'origine, représente une importante plasticité phénotypique qui a permis la colonisation d'une grande variété d'habitats ces dernières décennies (Andersen *et al.*, 1998) dont les milieux agricoles (Andersen *et al.*, 1998). Ces animaux maintenant très présents dans les milieux ouverts se retrouvent exposés à divers facteurs de stress, notamment la proximité avec les activités humaines (Hewison *et al.*, 2001). De plus, comme pour de nombreux herbivores, l'alimentation des chevreuils varie selon les saisons et donc selon la phénologie de la végétation. En hiver, leur régime alimentaire est principalement composé de ronces, de bruyère, de lierre et de quelques autres végétaux ou champignons. Il se nourrit également de glands, de faînes, et parfois n'hésite pas à consommer certaines cultures d'hiver, des céréales notamment. Les glands constituent une ressource alimentaire majeure pour les cervidés (Picard *et al.*, 1991 ; Weerasinghe & Takatsuki, 1999 ; Feldhamer, 2001). Ainsi, leur disponibilité a un impact marqué sur l'utilisation de l'habitat (McShea & Schwede, 1993), sur la masse corporelle juvénile (Kjellander *et al.*, 2006) et donc sur la dynamique des populations (Feldhamer, 2001).

La première étape de cette étude a été la caractérisation des patrons de diversité et de la composition du microbiote intestinal d'une population de chevreuil évoluant dans un agroécosystème composé d'une mosaïque de bois, cultures et prairies. Sachant que le microbiote intestinal de nombreuses espèces d'herbivores est dominé par les phyla *Firmicutes* et *Bacteroidota*, nous nous attendons à trouver la même tendance chez le chevreuil. De plus, nous supposons observer d'importantes variations du microbiote entre individus dans ce paysage complexe.

Le second objectif a été de mettre en évidence d'éventuels déterminants environnementaux à l'origine des variations observées au niveaux de la diversité et de la composition du microbiote. Le régime alimentaire étant le principal facteur influençant la composition du microbiote intestinal (De Menezes *et al.*, 2011 ; Wolf *et al.*, 2017), nous nous attendons à mettre en évidence des variations de la diversité microbienne (diversité alpha) et/ou des niveaux d'abondance de certains taxa (diversité bêta) selon l'habitat dans lequel les chevreuils vivent et donc se nourrissent (forêt, prairie, culture). De plus, sachant que les glands sont très riches nutritionnellement et que les chevreuils concentrent leur alimentation sur cette ressource lorsqu'elle est présente (Abbas *et al.*, 2011), nous pouvons nous attendre à trouver une variation importante dans la structure du microbiote selon l'abondance de la glandée qui varie fortement d'une année à l'autre. Enfin, nous attendons un effet possible de la précocité du débourrement de la végétation qui offre des ressources appétentes aux chevreuils plus ou moins tôt selon les années.

Pour troisième objectif, nous avons fait le lien entre microbiote et stress chez le chevreuil en considérant les différences d'habitat. Nous pouvons nous attendre à ce que la sécrétion de glucocorticoïdes en réponse au stress induise un changement des diversités alpha et bêta du microbiote. En effet, en fonction des études soit une diminution, soit une augmentation de la diversité alpha en réponse à un stress a pu être observée (Bailey & Coe, 1999). Ainsi, nous n'avons pas de prédictions précises pour le chevreuil. Néanmoins, l'exposition au stress peut modifier la diversité bêta, en altérant les proportions de certains taxa bactériens. Plus précisément, le ratio *Firmicutes/Bacteroidota* est un biomarqueur de certaines pathologies (Magne *et al.*, 2020) et a tendance à varier suite à l'exposition à un stress. En effet, il augmente en cas d'obésité et diminue en cas de maladie intestinale inflammatoire (MII) (Magne *et al.*, 2020). On suppose donc trouver une variation de ce ratio en fonction du niveau de cortisol des individus.

II. Matériels & Méthodes

1. Site d'étude

Cette étude a été menée sur la population de chevreuils sauvages d'Aurignac, située dans une zone rurale dans le Sud-Ouest de la France (43°13'N, 0°52'E, 10 000 ha) (Figure 1). Ce site est désigné LTSER (Recherche Socio-Economique et Ecologique à Long Terme) et appartient à la Zone Atelier PyGar (Pyrénées Garonne). Ce paysage majoritairement agricole est hétérogène et est marqué par la présence d'habitats ouverts, tels que des prairies et des champs cultivés, souvent bordés de haies, entrecoupés par deux grandes forêts et des petites parcelles boisées (Martin *et al.*, 2018). Les principales infrastructures anthropiques sont constituées d'un réseau routier étendu et uniformément réparti (2,15 km/km²), et les bâtiments sont principalement des petits villages, des

fermes et des maisons isolées (Martin *et al.*, 2018). Six sites de capture ont été définis dans cette zone (Figure 1).

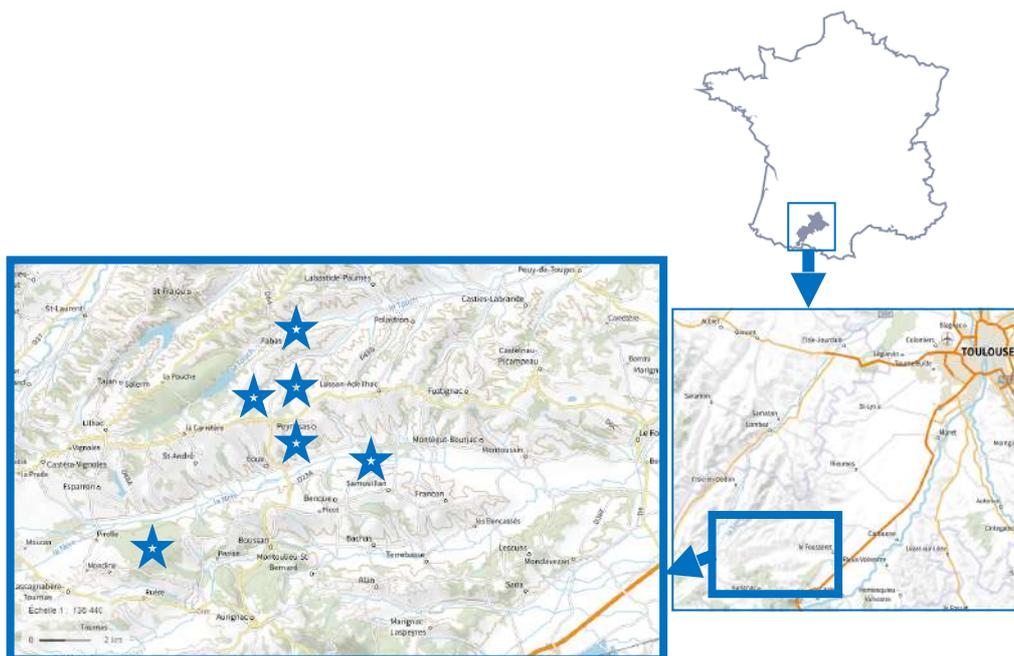


Figure 1 : Localisation du site d'Aurignac où ont été effectuées les captures. Chaque étoile représente un site de capture.

2. Collecte de données sur le terrain

Dans le cadre d'un programme de capture-marquage-recapture (CMR) à long terme initié en 1996, six jours de capture ont lieu chaque année entre début janvier et début mars avec l'aide de 30 à 100 rabatteurs et d'environ 4 km de filets. A leur arrivée dans les filets, les chevreuils ont été directement tranquilisés par injection intramusculaire d'acépromazine (Calmivet, Vetoquinol, France ; dose ciblée de 0,075 mg/kg), afin d'éviter des pics de stress. Durant les procédures de marquage, l'âge et le sexe des individus ont été enregistrés, et des fèces ont été directement prélevés dans le rectum et conservés à -4°C durant 3h au maximum avant d'être stockés à -20°C jusqu'à l'analyse. Les animaux ont ensuite été marqués avec 2 étiquettes fixées à l'oreille et, pour la plupart, équipés d'un collier GPS (Lotek 3300 GPS, Lotek Small WildCell GSM, Vectronic GPS PLUS-1C Store On Board, Vectronic GPS PLUS Mini-1C) programmé pour obtenir une localisation toutes les six heures (à 00:00, 06:00, 12:00 et 18:00). Les données spatiales sont récupérées lorsque le collier tombe un an environ après la capture, puis sont intégrées dans une base de données du CEFS. Toutes les procédures de capture et de marquage ont été réalisées conformément aux lois françaises et européennes relatives au bien-être animal (arrêté préfectoral de l'autorité administrative de Toulouse pour la capture et le suivi des chevreuils sauvages, accord n°. A31113001 délivré par la

Direction Départementale de la Protection des Populations, autorisation éthique du gouvernement français).

Ce travail s'est basé sur l'analyse de 114 fèces de chevreuils entre 2012 et 2018.

3. Les variables environnementales représentatives des ressources alimentaires

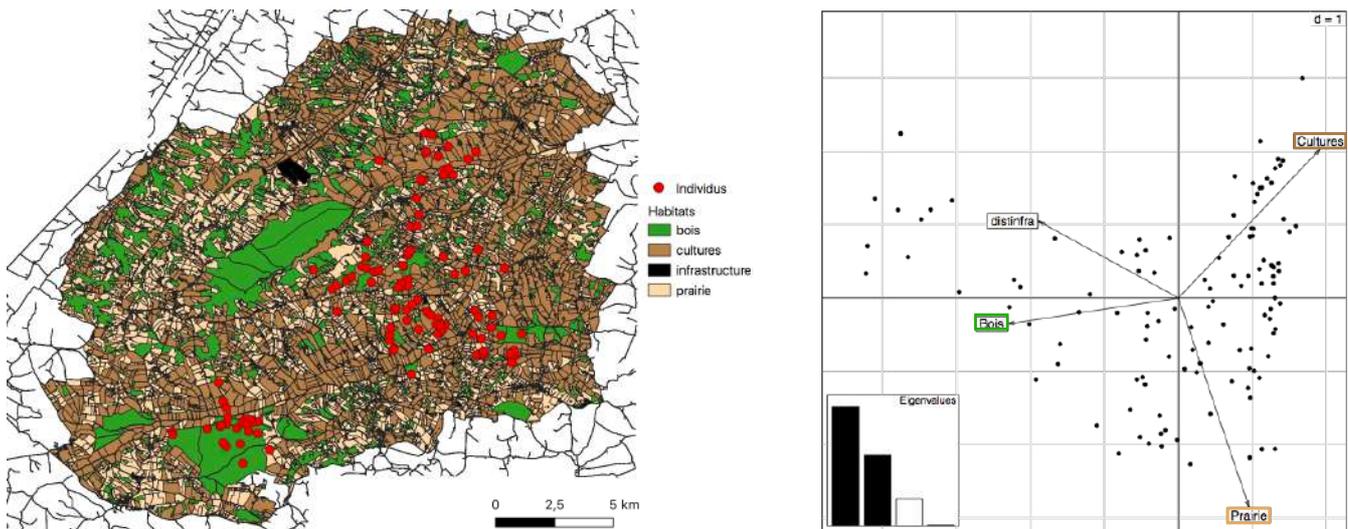
a. Les habitats utilisés

Les ressources alimentaires disponibles pour chaque individu ont été estimées dans l'espace qu'utilise les individus, appelé domaine vital. Selon Burt (1943), le domaine vital est la surface traversée par l'individu pendant ses activités normales de recherche de nourriture, de reproduction et de soin aux jeunes. Des sorties occasionnelles hors de la zone, telles que des explorations dans la nature, ne devant pas être considérées comme faisant partie du domaine vital (Burt, 1943). Les localisations GPS des six semaines suivants la capture ont permis de calculer le domaine vital hivernal de chaque individu à l'aide de la méthode paramétrique Kernel avec le package R 'adehabitatHR' (Calenge, 2006). Il est à noter que les sept premiers jours suivants la capture et la remise en liberté ont été supprimés du calcul, car la capture et la manipulation sont connues pour induire une modification transitoire du comportement spatial (Morellet *et al.*, 2009). Comme recommandé par Börger *et al.* (2006), afin de rendre compte d'un domaine vital réaliste tout en excluant les localisations correspondant à des comportements d'exploration, le Kernel à un seuil de 90% a été estimé (Worton, 1989 ; Börger *et al.*, 2006). Sachant que les chevreuils montrent une grande fidélité spatiale (Hewison *et al.*, 1998), nous supposons que ce domaine vital post-capture est identique à celui utilisé en hiver juste avant la capture.

Pour associer à chaque domaine vital la composition en habitat du paysage sous-jacent, les polygones des domaines vitaux ont été intersectés avec le parcellaire et l'occupation du sol référencés dans la base de données CEFS à l'aide du logiciel QGis version 3.16.0 en Lambert 93. Les habitats ont été regroupés en quatre catégories : cultures, prairie, bois et infrastructures humaines (routes, bâtiments) (Figure 2A). L'aire de chacune de ces catégories (ha) et leur proportion (%) dans le domaine vital ont été calculées pour chaque chevreuil.

Afin de décrire l'environnement dans lequel se trouvent les animaux étudiés, une Analyse en Composantes Principales (ACP) a été réalisée (Figure 2B). La dimension 1 explique 54,5% de la variance et est représentée par le degré d'ouverture du paysage (valeur propre = 2.18) et la distance aux infrastructures humaines (valeur propre = 2.18), avec une distinction des animaux exclusivement présents en milieu fermé (bois) qui sont également plus loin des infrastructures humaines, des animaux présents en milieu ouvert (prairie et cultures) (Figure 2B). La dimension 2 explique 32,5% de la variance et permet de distinguer les animaux majoritairement présents en

cultures (valeur propre = 1.30), des animaux davantage présents dans les prairies (valeur propre = 1.30) (Figure 2B). Pour la suite, les analyses statistiques se baseront sur les coordonnées des individus présents sur les deux axes 1 et 2 de l'ACP. Pour une meilleure visualisation, chaque chevreuil a été associé à un type d'habitat : ouvert (quand la proportion de prairie + cultures représentent plus de 50% de leur domaine vital), semi-ouvert (quand les proportions de bois et de cultures + prairies sont équivalentes dans leur domaine vital) et fermé (quand le bois représente plus de 50% de leur domaine vital).



Figures 2A & 2B : (A) Carte du site d'Aurignac montrant la localisation moyenne de chaque individu (points rouges) dans son domaine vital. Le milieu est fragmenté par des cultures, des prairies, des bois et des infrastructures humaines.

(B) Diagramme de dispersion de l'Analyse en Composantes Principales (ACP) pour résumer les descripteurs du paysage basés sur les deux premières composantes principales (PC1 et PC2). L'ACP a été réalisée sur des variables environnementales locales normalisées et centrées sur la moyenne, représentées sur le graphique par bois (proportion de bois dans le domaine vital), cultures (proportion de cultures dans le domaine vital), prairie (proportion de prairies dans le domaine vital) et distance aux infrastructures humaines (distinfra). Chaque point représente une observation. L'encart montre la proportion de la variance totale expliquée par chaque composante.

b. Abondance en glands

Chaque année depuis 2010, entre octobre et décembre, des données sur l'abondance totale des glands (g/m^2) ont été récoltées sur des chênes présents en forêt, dans des bosquets ou isolés en milieu ouvert. Le contexte paysager dans lequel les chênes ont été échantillonnés a été catégorisé en fonction du degré d'ouverture du paysage en trois contextes : ouvert, semi-ouvert et fermé. Dans notre base de données, la glandée est dépendante du contexte paysager local et de l'année. Il est donc nécessaire de rendre cette variable indépendante afin de réaliser au mieux les test statistiques étudiant la variation du microbiote en fonction de l'abondance en glands. Pour cela, nous avons

modélisé, à l'aide d'une régression linéaire (fonction 'lm' du package 'stats'), le poids des glands en fonction du contexte paysager local (ouvert, semi-ouvert, fermé) et de l'année d'échantillonnage (2012 à 2018). Puis nous avons extrait les résidus de cette régression nous permettant d'exprimer le poids des glands en s'affranchissant des effets liés au contexte paysager et à l'année dans la suite de nos analyses. Ainsi, les analyses du microbiote se feront en fonction des résidus du poids des glands.

c. Degrés jour de croissance

Le printemps pouvant être précoce certaines années, cela peut influencer la composition du régime alimentaire de fin d'hiver (février) et donc la composition du microbiote intestinal. La méthode des degré-jours de croissance (DJC) permet de déterminer le degré d'avancement du printemps dans la végétation. Cette méthode établit une relation linéaire entre le taux de développement et les températures supérieures à la température de base, en-dessous de laquelle le développement s'arrête (Ruml *et al.*, 2009). Les DJC journalières se calculent selon la formule suivante :
$$DJC = \frac{(T_{max} + T_{min})}{2} - T_{base}$$
. Dans notre cas, la température de base utilisée est de 10°C. Lorsque les DJC étaient négatives, nous les avons limité à 0°C. Nous avons par la suite effectué la somme cumulée des DJC entre le 1er janvier et la veille de la date de capture pour chaque animal. Si cette somme est supérieure à 10, cela signifie que la végétation commence à se développer.

Les températures journalières de 2012 à 2018 ont été fournies par la station météo Palaminy située en Haute-Garonne.

4. Le stress basal exprimé par les chevreuils (cortisol)

Les métabolites du cortisol fécal (FCM) ont été extraits selon une procédure à base de méthanol et analysés à l'aide d'un dosage immunoenzymatique (EIA) de la 11-oxoétiocholanolone spécifique au groupe, tel que décrit par Möstl & Palme en 2002, et validé pour le chevreuil (Zbyryt *et al.*, 2017). Leur concentration a été mesurée en double (les coefficients intra- et inter-essais de tous les échantillons étaient inférieurs à 10 et 15% respectivement) et les résultats exprimés en nanogrammes par gramme de fèces humides (ng/g).

Ces données de cortisol sont très répétables, nous confortant dans le fait que même si elles ne sont pas extraites du même échantillon fécal, elles sont suffisamment voisines pour être

considérées comme identiques (Annexe 5). Ces données ont été obtenues lors d'une étude précédente, voir Carbillet *et al.*, 2020 pour plus de détails.

5. Le microbiote intestinal

a. Extraction de l'ADN et séquençage

De même que pour le cortisol, les données microbiote proviennent de la collecte de fèces durant le marquage. L'ADN génomique total a ensuite été extrait des échantillons fécaux de chaque animal à l'aide du kit Quick-DNA Fecal/Soil (Zymo Research, Irvine, CA, USA) conformément aux instructions du fabricant. Les régions V4-V5 de l'ADNr 16S ont été amplifiées par une Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) à l'aide des amorces F515 : GTGCCAGCMGCCGCGG et R907 : CCGTCAATTCMTTTRAGTTT (Li *et al.*, 2014). Chaque amorce a été conçue de manière à contenir 1) la séquence adaptatrice Illumina appropriée permettant aux amplicons de se lier à la cellule d'écoulement ; 2) une séquence index de 8pb (c'est-à-dire un barcode) ; et 3) des séquences d'amorces spécifiques aux gènes, comme décrit ci-dessus. Les amplicons résultants ont été purifiés à l'aide du kit de purification QIAquick PCR (QIAGEN, Valencia, CA). Les amplicons purifiés ont ensuite été regroupés en concentrations équimolaires, et les bibliothèques d'amplicons ont été quantifiées à l'aide du fluoromètre QuantiFluor-P (Promega, CA). La bibliothèque de contrôle PhiX (Illumina) a été combinée avec la bibliothèque d'amplicons (prévue à 20%), puis séquencée sur la plateforme MiSeq (Li *et al.*, 2014). L'amplification du gène de l'ADNr 16S a suivi le programme suivant : 5 minutes de dénaturation à 95°C ; 27 cycles de 30 secondes à 95°C et 10 minutes d'élongation à 72°C.

Les échantillons de l'année 2014 n'ayant pas été correctement stockés dans le froid, aucune donnée n'est disponible pour cette année.

b. Traitement des séquences

Lors d'une précédente étude, les données de séquençage de l'ADNr 16S ont été analysées à l'aide de la suite d'outils bioinformatiques du pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (Escudié *et al.*, 2018) implémentée dans l'instance Galaxy (v.2.3.0) de la plateforme bioinformatique Genotoul (<http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr>). Au cours du prétraitement FROGS, les séquences ont été débarrassées de leur barcodes et les séquences d'une longueur non appropriée ou contenant des bases ambiguës ont été supprimées. Ensuite, les lectures ayant au moins trois paires de base identiques ont été regroupées en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTU) pour générer une table des OTU à l'aide de l'algorithme SWARM (Mahé *et al.*, 2014). Les

chimères ont ensuite été détectées et supprimées avec VSEARCH (Rognes *et al.*, 2016). De plus, les OTU ayant un nombre de séquences inférieur à 0.00005 ont également été supprimées. Les OTU sélectionnées ont été affiliés à six rangs taxonomiques : phylum, classe, ordre, famille, genre et espèce en utilisant la base de données de référence Silva release 132 (Quast *et al.*, 2013). Enfin, en raison du nombre inégal de séquences d'ADNr 16S dans chaque échantillon fécal, une étape de raréfaction a été réalisée afin de pouvoir comparer tous les échantillons à une profondeur de séquençage équivalente (proportion des taxa échantillonnée).

Après import des données de séquences à l'aide du package R 'phyloseq' (McMurdie & Holmes, 2013), j'ai réalisé un nettoyage plus poussé que celui effectué par la pipeline FROGS. Dans un premier temps, les OTU très rares ayant une prévalence relative inférieure à 5% et correspondant à du bruit de séquençage, soit 32 OTU sur les 1410 de départ, ont été éliminées. Ensuite, certains phyla dont les séquences sont très proches mais néanmoins différentes, ont été par défaut regroupées en une seule séquence, prénommée « Multi-affiliation » dans le jeu de données issu de FROGS, et ont donc été éliminées. J'ai ainsi travaillé sur 1374 OTU au total.

6. Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel R (version 1.1.456, R Development Core Team 2019). La significativité de l'ensemble des analyses a été fixée à $p = 0,05$.

a. Composition du microbiote intestinal

Pour visualiser la composition du microbiote, des diagrammes à barres empilées ont été construits à l'aide du package 'ggplot2' (Wickham & Chang, 2016). Ces graphiques montrent l'abondance relative des phyla, familles et genres des microorganismes peuplant l'intestin des chevreuils étudiés. Par la suite, les indices de diversité alpha et bêta ont été calculés.

b. Diversité alpha et ses déterminants environnementaux et physiologiques

Les mesures de diversité alpha ont été utilisées pour identifier la richesse et l'uniformité des taxa au sein d'un même individu ou d'un lot d'individus. Cette diversité a été analysée en utilisant des indices de diversité comme la richesse observée (Observed ; nombre d'OTU), l'indice de Shannon et l'indice de Simpson inverse (InvSimpson). L'indice de Shannon donne une idée de la diversité spécifique d'un milieu, c'est-à-dire du nombre d'espèces de ce milieu, et se calcule ainsi

(Shannon, 1948) :

$$H = - \sum_{i=1}^n P_i \ln P_i \quad \text{où } P_i \text{ représente l'abondance relative du taxon } i.$$

L'indice de Simpson inverse correspond à la probabilité inverse que deux individus pris au hasard appartiennent à la même espèce (Simpson, 1949). La formule est la suivante :

$$\frac{1}{\sum_{i=1}^R p_i^2} = {}^2D \quad \text{où } P_i \text{ représente l'abondance relative du taxon } i.$$

Afin d'analyser au mieux cette diversité, il a fallu tenir compte de la profondeur de séquençage pour chaque échantillon. Dans notre cas, les échantillons ont été raréfiés à une profondeur de 6940 séquences.

Les effets des variables explicatives sur chaque mesure de la diversité alpha (Observed, Shannon, InvSimpson) dans tous les échantillons ont été évalués à l'aide d'un modèle mixte linéaire utilisant le package 'lme4' (Bates *et al.*, 2015), en spécifiant l'âge, le sexe, les glandées, les DJC, les axes de l'ACP (PC1 et PC2) et le cortisol comme effets fixes. L'identité des chevreuils ainsi que l'année ont été intégrés comme effets aléatoires afin d'éviter les problèmes de pseudo-réplication (Hurlbert, 1984) et pour contrôler la variance inexplicée due aux différences entre individus et aux variations inter-annuelles. Nous avons ensuite comparé ces modèles de base avec tous les modèles imbriqués en utilisant le critère d'information d'Akaike corrigé pour la petite taille de l'échantillon (AICc), le poids d'Akaike (w), le delta AICc (Δ AICc) et le nombre de paramètres (df) (Burnham, Anderson, & Huyvaert, 2011) à l'aide de la fonction 'dredge' du package 'MuMIn' (Barton, 2015). Dans le lot de modèles montrant un Δ AICc inférieur à 2 par rapport au modèle ayant le plus petit AICc, celui ayant le plus petit nombre de paramètres a été retenu, d'après les règles de parcimonie, comme meilleur modèle.

c. Diversité bêta et ses déterminants environnementaux et physiologiques

En plus de la diversité alpha, les mesures de la diversité bêta sont couramment utilisées pour caractériser la composition des communautés microbiennes. Cette diversité bêta est basée sur la distance entre les OTU, calculée à l'aide des matrices de distance de Bray-Curtis, de Jaccard et d'Unifrac non pondéré (Bray & Curtis, 1957 ; Jaccard, 1901 ; Lozupone *et al.*, 2006). La matrice de Bray-Curtis prend en compte les abondances des taxa et permet de mesurer la dissimilarité de composition de la communauté microbienne entre les échantillons en fonction du nombre d'OTU, indépendamment de l'attribution taxonomique. Cet indice est compris entre 0 (les deux microbiotes ont la même composition) et 1 (les deux microbiotes sont totalement dissemblables) (Bray & Curtis,

1957). La distance de Bray-Curtis entre un premier microbiote x_1 et un deuxième microbiote x_2 se calcule de la manière suivante :

$$\beta(x_1, x_2) = \frac{\sum_{j=1}^p |y_{1j} - y_{2j}|}{\sum_{j=1}^p (y_{1j} + y_{2j})}$$

où y_{1j} est l'abondance de l'espèce j dans le microbiote x_1 et y_{2j} est l'abondance de l'espèce j dans le microbiote x_2 . p est le nombre d'espèces total.

Comme la dissimilarité de Bray-Curtis, la distance de Jaccard (Jaccard, 1900) est également comprise entre 0 et 1. La métrique de Jaccard compare uniquement la présence/absence d'OTU entre échantillons. A partir de deux échantillons A et B, elle est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$Jaccard_{AB} = 1 - \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} = 1 - \frac{|A \cap B|}{|A| + |B| - |A \cap B|} \quad \text{où } \cup \text{ est l'union entre deux ensembles.}$$

Enfin, la distance d'Unifrac non pondérée utilise une distance évolutive pour mesurer la similarité entre les échantillons. Elle nécessite un arbre phylogénétique de référence contenant tous les taxa présents dans les échantillons à examiner, ainsi que des informations sur les taxa détectés dans chaque échantillon. Une distance de 0 signifie que les échantillons sont identiques, et une distance de 1 signifie que les deux échantillons ne partagent aucun taxon en commun (Lozupone *et al.*, 2006). La formule est la suivante :

$$Unweighted_{AB} = \frac{\sum b_A \Delta b_B}{\sum b_A \cup b_B}$$

où b est l'ensemble des longueurs de branche dans l'arbre phylogénétique, A et B représentent les deux échantillons comparés, Δ est la différence symétrique entre deux ensembles, et \cup est l'union entre deux ensembles.

Après avoir calculé les distances entre échantillons, nous avons utilisé la fonction 'adonis' du package R 'vegan' (Oksanen *et al.*, 2015) pour effectuer une analyse de variance multivariée permutationnelle (Permanova) afin de tester les différences de distances entre les communautés microbiennes avec 999 permutations. Les effets du sexe, de l'âge, des résidus du poids des glands, des DJC, du cortisol et des axes de l'ACP représentant l'habitat sur la structure du microbiote ont été analysés par ce biais. Des interactions bidirectionnelles entre le cortisol et les axes de l'ACP ont également été analysées. Les différences significatives dans la Permanova pouvant interférer avec des différences de dispersion, nous avons donc utilisé la fonction 'betadisper' dans 'vegan' pour tester l'homogénéité des dispersions des échantillons. Aucune différence significative de dispersion n'a été détectée.

Nous avons souhaité par la suite visualiser cette diversité bêta à l'aide de l'ordination de type PCoA (Analyse en Coordonnées Principales), basée sur les matrices de distance et obtenues à l'aide de la fonction 'ordination_plot' du package 'phyloseq' (McMurdie & Holmes, 2013). Cette ordination consiste à représenter sur un plan (2D) la dissimilarité par paire entre les échantillons dans un espace à faible dimension. Les points les plus proches les uns des autres représentent des communautés microbiennes dont la composition des séquences est plus similaire.

Enfin, des analyses ont été effectuées sur l'abondance relative des différents niveaux taxonomiques (phylum, famille et genre) à l'aide de modèles linéaires mixtes (https://github.com/paescharlotte/early_life_nutrition_rabbit/blob/main/code.Rmd) en spécifiant les variables explicatives (sexe, âge, Glands, DJC, habitat (axes ACP), cortisol) comme effets fixes et l'identité des individus ainsi que l'année comme effets aléatoires. Des interactions bidirectionnelles entre le cortisol et les axes de l'ACP ont également été analysées. Les différences ont été visualisées à l'aide du package 'ggplot2'. La droite de régression a pu être ajoutée à l'aide de la fonction 'geom_smooth'.

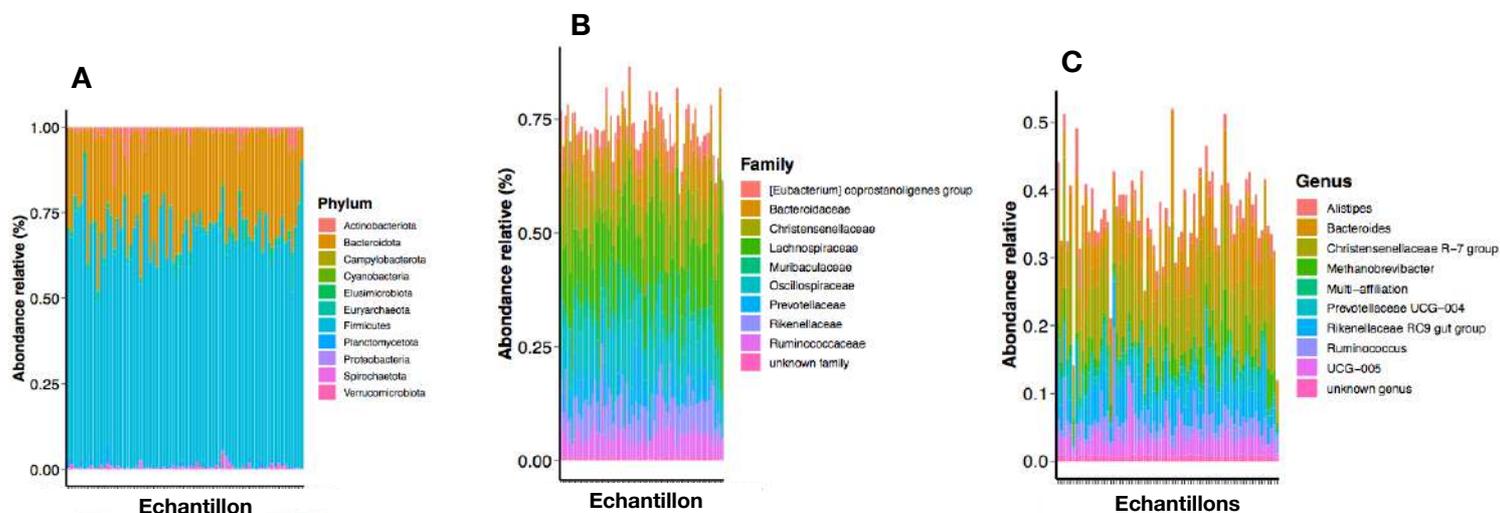
Pour tenir compte des variations du microbiote liées à l'âge et au sexe, ces deux facteurs ont été inclus comme effets fixes dans tous les modèles. Ces effets sont intégrés à titre de contrôle mais ne correspondent pas à des prédictions particulières.

III. Résultats

1. Composition du microbiote intestinal des chevreuils

A partir des 114 fèces de chevreuils, nous avons obtenu 1 068 760 séquences et après raréfaction, nous avons 6490 séquences en moyenne. Après nettoyage des données, 1374 OTU ont été identifiés et attribués à 11 phyla, 52 familles et 125 genres.

Le microbiote intestinal des chevreuils est dominé par deux phyla, les *Firmicutes* (69.16% \pm 0.79% d'abondance relative moyenne dans les échantillons) et les *Bacteroidota* (25.36% \pm 0.75% d'abondance moyenne) (Figure 3A). Les familles microbiennes les plus abondantes parmi les espèces hôtes sont les suivantes : *Lachnospiraceae* (17.05% \pm 0.66% d'abondance relative), *Oscillospiraceae* (13.07% \pm 0.43%), *Christensenellaceae* (9.87% \pm 0.31%), et *Bacteroidaceae* (7.67% \pm 0.28%) (Figure 3B). Enfin, les genres microbiens les plus répandus sont représentés par *Christensenellaceae R-7 group* (9.85% \pm 0.31% d'abondance relative), *Bacteroides* (7.67% \pm 0.28%), *Rikenellaceae RC9 gut group* (4.26% \pm 0.22%), *Ruminococcus* (3.18% \pm 0.24%) et *UCG-005* (3.18% \pm 0.16%) (Figure 3C).



Figures 3A, 3B & 3C : Abondance relative (%) des phyla (A), des 10 familles (B) et des 10 genres (C) les plus abondants composant le microbiote intestinal des chevreuils de la population sauvage d'Aurignac.

2. Diversité alpha et ses déterminants environnementaux et physiologiques

La diversité alpha a été évaluée pour chaque échantillon en calculant la richesse observée ainsi que des indices de diversité de Shannon et de Simpson inverse.

Les modèles mixtes linéaires sélectionnés pour chacun de ces indices sont les modèles nuls, ne montrant donc aucune variation évidente de la diversité microbienne entre groupements d'individus selon les critères environnementaux et physiologiques. Ainsi, la diversité du microbiote

des individus présentant une différence au niveau des conditions environnementales (Glands, DJC et habitat), des niveaux de cortisol et de l'interaction entre l'habitat et le stress semble être assez stable.

3. Diversité bêta et ses déterminants environnementaux et physiologiques

Des analyses Permanova ont permis de mettre en évidence des résultats cohérents entre les trois matrices de distance, ainsi, la suite du rapport se concentrera uniquement sur les résultats issus de la métrique de Bray-Curtis (c.a.d. comparaison des abondances relatives des taxa). Pour plus de détails, les résultats de Jaccard et d'Unifrac se trouveront en annexe (Annexes 2 & 3).

Le microbiote intestinal des chevreuils étudiés ne semble pas varier au niveau de l'abondance relative des taxa selon les degré-jours de croissance (DJC : pvalue = 0.158 pour Bray-Curtis) (Tableau 1). Cependant, les résidus du poids des glands, ainsi que les interactions entre l'habitat (axes de l'ACP) et le niveau de cortisol ont un effet significatif sur l'abondance relative des taxa (Glands : pvalue = 0.044 ; boisPC1*Cort : pvalue = 0.045 ; ouvertPC2*Cort : pvalue = 0.0127) (Tableau 1).

Variables explicatives	Df	SumsOfSqs	F.Model	R ²	Pr(>F)
Age	2	0.4389	1.06765	0.01842	0,28
Sexe	1	0.2465	1.19926	0.01035	0,11
Age*Sexe	2	0.3945	0.95949	0.01655	0,61
Glands	1	0.2675	1.30132	0.01123	0,04*
DJC	1	0.2425	1.1779	0.01033	0,16
Cort	1	0.3569	1.73624	0.01498	0,005 **
boisPC1	1	0.3459	0.3459	0.01517	0,01*
ouvertPC2	1	0.2720	1.32344	0.01142	0,04**
boisPC1*Cort	1	0.2802	1.36302	0.01176	0,045 *
ouvertPC2*Cort	1	0.2586	1.25813	0.01085	0,01*

Tableau 1 : Résultats de la Permanova basée sur les dissimilarités de Bray-Curtis de l'abondance relative des taxa en réponse à l'âge, au sexe, à la glandée (Glands), aux degré-jours de croissance (DJC), au niveau de cortisol (Cort) et à l'habitat (boisPC1 et ouvertPC2).

Df = nombre de paramètres ; SumsofSqs = somme des carrés ; F.Model = Valeur F par permutation.

Les pvalues sont basées sur 999 permutations. Les astérisques indiquent les différences significatives (pvalue < 0.05).

a. Effets de la glandée sur la composition microbienne

Afin de visualiser les différences de composition du microbiote sous l'effet de l'importance de la glandée (résidus du poids des glands), un graphique de type PCoA à partir de la métrique de Bray-Curtis a été effectué (Figure 4). De plus, à des fins de visualisation, les résidus du poids des glands ont été regroupés en deux catégories : beaucoup de glands lorsque les résidus sont > 0 et peu de glands lorsque les résidus sont < 0 . Bien que l'effet glandée n'explique que 1% de la variance ($R^2 = 0.01123$) (Tableau 1), le microbiote intestinal des chevreuils semble varier selon l'abondance en glands présents dans le milieu, avec une variation plus importante lorsque les glands sont rares (Figure 4).

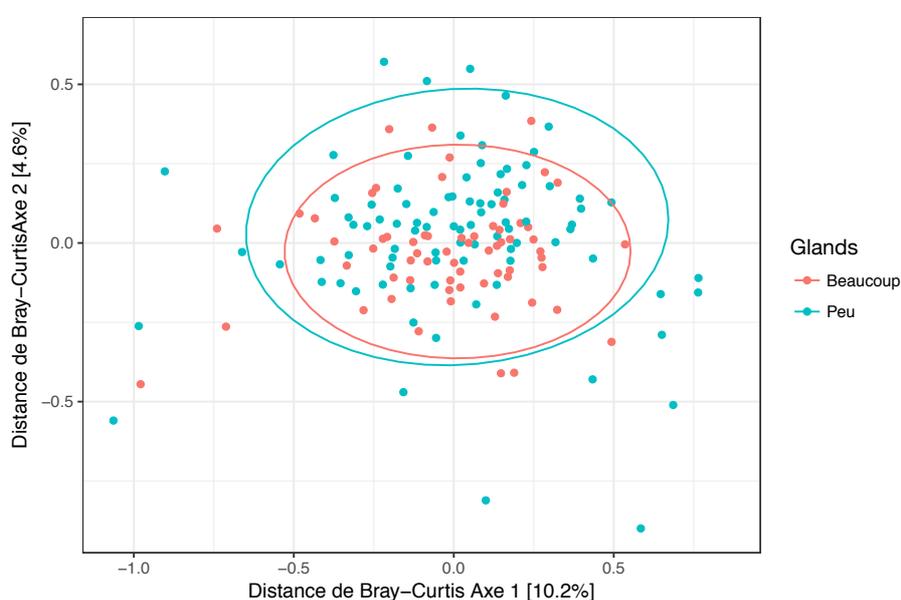
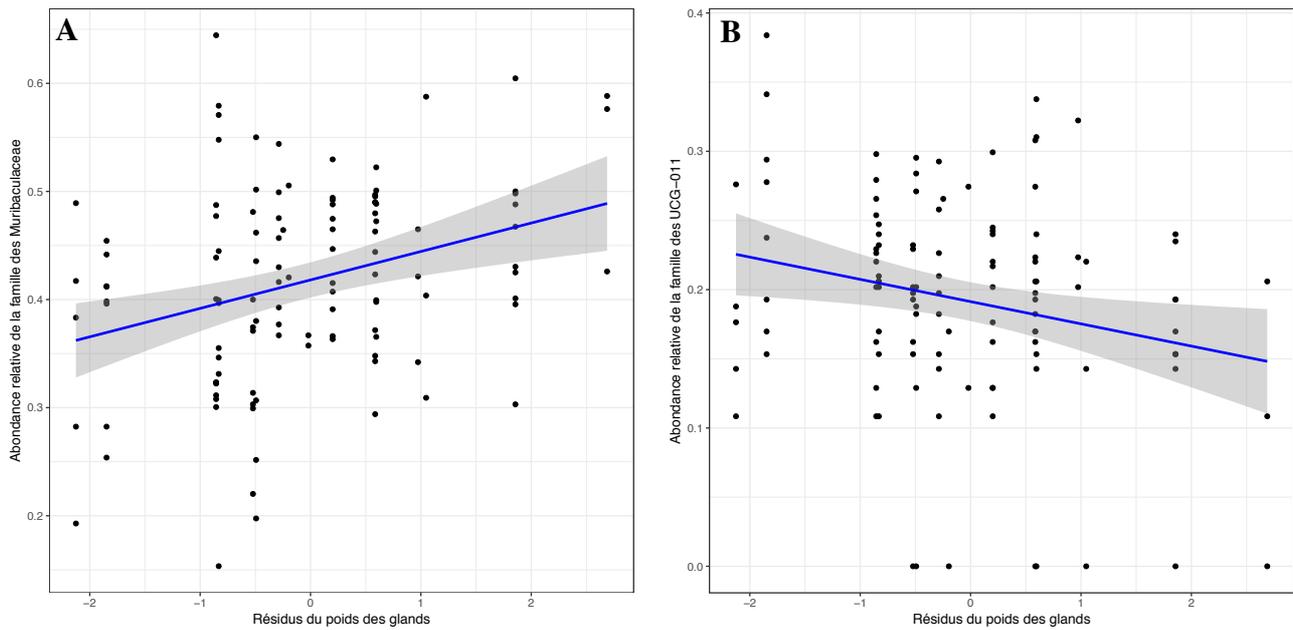


Figure 4 : Graphique d'analyse en coordonnées principales (PCoA) de la diversité bêta du microbiote intestinal des chevreuils (calculée avec l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis) selon l'abondance en glands. Les points correspondent aux échantillons. Les ellipses représentent les régions de confiance à 95% pour les années à forte ou faible glandée.

Des analyses plus approfondies des variations de l'abondance relative au niveau des phyla, familles et genres en fonction des résidus du poids des glands et le taux de cortisol ont été effectuées.

Une variation évidente de l'abondance des familles des *Muribaculaceae* (Phylum *Bacteroidota*) et des *UCG-011* (Phylum *Firmicutes*) en fonction de l'abondance en glands a été mise en évidence. En effet, l'abondance des *Muribaculaceae* est corrélée de manière positive avec l'abondance en glands (Estimate = 0.02, pvalue = =0.001*** ; Figure 5A). A l'inverse, plus les glands sont présents en quantité, moins la famille des *UCG-011* est abondante (Estimate = -0.013285, pvalue = 0.02* ; Figure 5B).



Figures 5A et 5B : Abondance relative des familles *Muribaculaceae* (A) et *UCG-011* (B) en fonction des résidus du poids des glands. La partie grisée correspond à l'intervalle de confiance à 95%.

b. Effets du type d'habitat et du stress sur la composition microbienne

Concernant la représentation des effets de l'interaction entre le stress et l'habitat sur la structure du microbiote intestinal, qui n'explique que 1% de la variance ($R^2 = 0.01176$) (Tableau 1), nous avons réalisé un graphique de type PCoA (Figure 6). A des fins de visualisation uniquement, trois types d'habitats ont été considérés, ouvert, semi-ouvert et fermé, à partir de la proportion de chacun de ces habitats dans le domaine vital de chaque individu. Le 1^{er} axe représente 10,9% de la variabilité de la diversité bêta (distance de Bray-Curtis) et le 2^{ème} axe représente 4,7% de cette variabilité. Dans tous les habitats (fermé, ouvert et semi-ouvert), les individus les plus stressés ont des valeurs de l'axe 2 élevées. Les individus moins stressés se répartissent sur l'ensemble de l'axe 2, sauf les chevreuils vivant en milieu plus fermé, qui se regroupent à des valeurs élevées sur l'axe 2 (Figure 6).

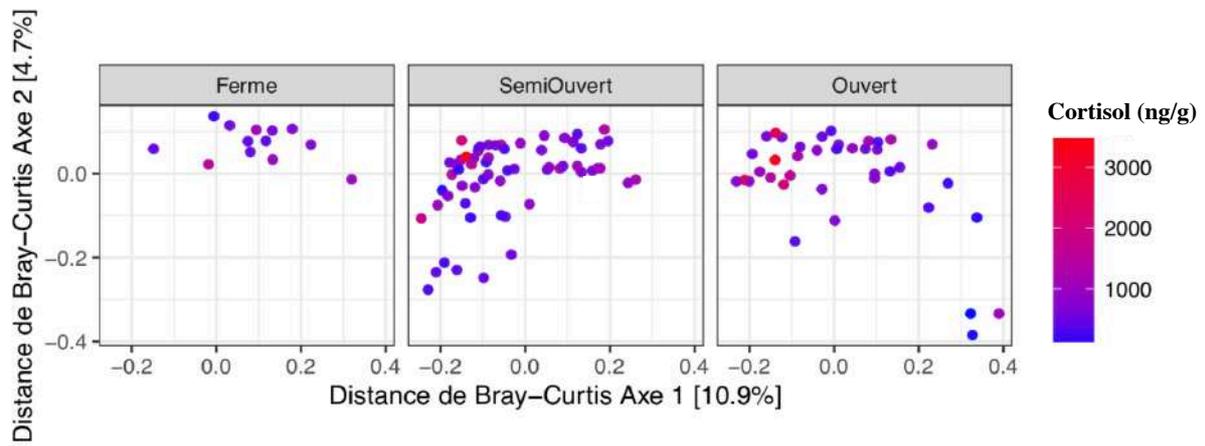


Figure 6 : Graphique d'analyse en coordonnées principales (PCoA) du microbiote intestinal des chevreaux basé sur la métrique de Bray-Curtis. Le niveau de cortisol est représenté par un gradient de couleur allant du bleu pour les plus petites valeurs au rouge pour les valeurs les plus élevées. Trois degrés d'ouverture du paysage sont considérés : ouvert, semi-ouvert et fermé.

Enfin, concernant le type de milieu ouvert (prairie/cultures), comme pour la Figure 6, l'effet de l'interaction entre le stress et l'habitat sur la structure du microbiote intestinal n'explique que 1% de la variance ($R^2 = 0.01085$) (Tableau 1). Ici, à des fins de visualisation uniquement, nous avons dissocié l'habitat ouvert en cultures et prairies à partir de la proportion de chacun de ces habitats dans le domaine vital de chaque individu (Figure 3). Le 1^{er} axe de la PCoA représente 10,9% de la variabilité de la diversité bêta (distance de Bray-Curtis) et le 2^{ème} axe représente 4,7% de cette variabilité (Figure 7). Dans les deux habitats, les individus les plus stressés ont des valeurs de l'axe 2 élevées alors que les individus moins stressés se répartissent sur l'ensemble de l'axe 2 (Figure 7). Enfin, la différence la plus évidente entre les prairies et les cultures est marquée par des individus peu stressés situées à des valeurs élevées sur l'axe 1 pour le milieu de cultures uniquement (Figure 7).

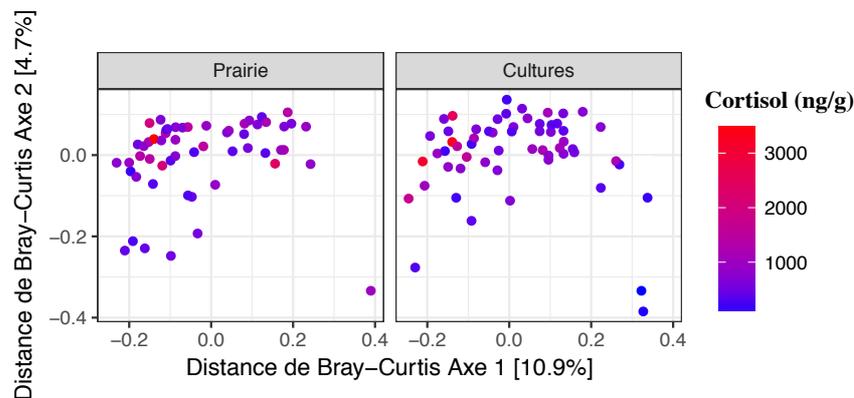


Figure 7 : Graphique d'analyse en coordonnées principales (PCoA) du microbiote intestinal des chevreaux basé sur la métrique de Bray-Curtis. Le niveau de cortisol est représenté par un gradient de couleur allant du bleu pour les plus petites valeurs au rouge pour les valeurs les plus élevées. Deux types d'habitats ouverts sont considérés : prairie et cultures.

Des analyses plus approfondies des variations de l'abondance relative au niveau des phyla, familles et genres en fonction des interactions entre l'environnement (i.e. ouvert, semi-ouvert, fermé ; cultures et prairie) et le taux de cortisol ont été effectuées.

L'effet de l'habitat (Fermé/Ouvert (PC1 de l'ACP) et Prairie/Cultures (PC2 de l'ACP)) conjugué au niveau de cortisol semble avoir une forte influence sur l'abondance relative de nombreux phyla, familles et genres (pvalue < 0.05, LMM). En effet, à l'exception de la famille des *Lachnospiraceae* et du genre *Coprococcus*, appartenant tous deux au phylum des *Firmicutes*, la très grande majorité des taxa diminuent en abondance chez les animaux présents en milieu fermé, à mesure que les niveaux de cortisol augmentent (Tableau 2A). A l'inverse, ces mêmes taxa ont tendance à augmenter en milieu ouvert chez les animaux stressés (Annexe 1). Cependant, la famille des *Lachnospiraceae* ne semble pas être fortement affectée par le stress lorsque les animaux sont présents en milieu fermé (pvalue = 0.10) (Tableau 2A).

Cette relation inverse est également visible entre les habitats de cultures et de prairie. En effet, certains taxa augmentent en abondance chez des animaux présents en prairie et très stressés (phylum *Firmicutes*, ratio *Firmicutes/Bacteroidota* et famille des *Oscillospiraceae*), mais diminuent en cultures (Tableau 2B) (Annexe 1). Enfin, l'abondance de la famille des *Oscillospiraceae* ne semble pas être fortement affectée par le stress lorsque les animaux sont présents en milieu dominé par les cultures (pvalue = 0.08). Il en a été de même pour les genres *Marvinbryantia* et *Family XIII AD3011 group* lorsque les animaux sont présents en prairie (pvalue = 0.06 et pvalue = 0.10 respectivement) (Tableau 2B).

Ainsi, lorsque les individus ont peu de stress basal, il semble y avoir un effet plus important du type d'habitat (ouvert, semi-ouvert et fermé ; prairie et cultures) sur la structure du microbiote. A l'inverse, le microbiote semble être altéré chez les animaux avec un niveau de stress basal plus élevé, de telle sorte que l'effet habitat est moins visible. De ce fait, la composition du microbiote n'entretient ainsi plus la même relation avec l'habitat.

A

Taxa	Sens de la pente	
	Ouvert	Fermé
Phylum		
Euryarchaeota		
Familles		
Lachnospiraceae		
Methanobacteriaceae		
Anaerovoracaceae		
Eggerthellaceae		
Erysipelotrichaceae		
Butyricicoccaceae		
Akkermansiaceae		
Genres		
Methanobrevibacter		
NK4A214 group		
Coprococcus		
Enterorhabdus		
[Eubacterium] brachy group		
UCG-009		
[Eubacterium] nodatum group		
Dielma		
Candidatus Soleaferrea		

B

Taxa	Sens de la pente	
	Cultures	Prairie
Phylum		
Bacteroidota		
Firmicutes		
Euryarchaeota		
Firmicutes / Bacteroidota		
Familles		
Oscillospiraceae		
Methanobacteriaceae		
Anaerovoracaceae		
Coriobacteriales Incertae Sedis		
Genres		
[Eubacterium] brachy group		
Marvinbryantia		
Family XIII AD3011 group		
[Eubacterium] nodatum group		
Shuttleworthia		
Odoribacter		

Tableaux 2A & 2B : Tableaux récapitulatifs de l'effet de l'interaction cortisol x habitat montrant les relations de corrélation entre l'abondance relative des composants du microbiote intestinal et le taux de cortisol fécal des chevreuils en fonction du type d'habitat dominant dans leur domaine vital (ouvert versus fermé ; cultures versus prairies). Les cases rouges et orange représentent une corrélation négative forte (pente > 10%) et faible (pente < 10%) respectivement. Les cases vertes foncées et vertes claires représentent une corrélation positive forte (pente > 10%) et faible (pente < 10%) respectivement. Enfin, les cases blanches correspondent à une corrélation nulle, non significative.

IV. Discussion

Les études menées sur le microbiote chez des espèces sauvages, en particulier sur la façon dont les facteurs écologiques influencent la dynamique spatiale de ces communautés, sont limitées car l'acquisition de ces données reste difficile en milieu naturel. Ainsi, dans notre étude, nous avons décrit le microbiote intestinal à partir de 114 échantillons fécaux de chevreuils évoluant dans un agroécosystème et étudié la façon dont les facteurs écologiques et biologiques ont influencé la diversité et la composition des communautés microbiennes. Bien que nous n'ayons pas observé de différence statistiquement significative au niveau de la diversité alpha entre groupements d'individus selon les critères environnementaux et physiologiques (habitat, DJC, Glands, stress), les

analyses de la diversité bêta ont révélé des différences dans la composition microbienne selon les glandées et l'interaction entre le taux de cortisol et l'habitat. Enfin, nos résultats s'ajoutent à ceux d'autres études suggérant que l'échantillonnage fécal constitue une alternative non invasive à la mesure du cortisol plasmatique chez le chevreuil sauvage (Bertotto *et al.*, 2010 ; De Mercado *et al.*, 2018), qui peut également être liée directement à l'analyse du microbiome.

1. Relation entre microbiote intestinal et environnement / régime alimentaire

Tout d'abord, nos résultats ont montré que le microbiote intestinal des chevreuils était principalement composé des phyla *Firmicutes* (69.16% ± 0.79% d'abondance relative moyenne dans les échantillons) et *Bacteroidota* (25.36% ± 0.75% d'abondance moyenne). La prévalence plus élevée de ces deux phyla est cohérente avec les études menées sur d'autres ruminants domestiques et sauvages tels que les bovins (*Firmicutes* 62.8%, *Bacteroidetes* 29.5%) et les cerfs de Virginie (*Odocoileus virginianus*) (*Firmicutes* 55.3%, *Bacteroidetes* 17.5%) (Durso *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2014).

De plus, des études ont montré l'importance du régime alimentaire dans le façonnement et la variation structurelle des communautés microbiennes intestinales chez de nombreuses espèces (De Menezes *et al.*, 2011 ; Baldo *et al.*, 2015). Ainsi, comme attendu, nous avons observé une variabilité de la composition du microbiote en fonction des ressources alimentaires caractérisées par l'habitat et par l'abondance en glands. Plus précisément, nos résultats ont révélé une augmentation de l'abondance relative de la famille des *Muribaculaceae* (phylum *Bacteroidota*) et une diminution de l'abondance relative de la famille des *UCG-011* (phylum *Firmicutes*) lorsque l'abondance en glands augmentait. Les bactéries de la famille des *Muribaculaceae* sont essentiellement connues pour être prédominantes dans le tube digestif distal des souris (Lagkouvardos *et al.*, 2019), et se sont révélés être des utilisateurs majeurs des monosaccharides dérivés du mucus dans l'intestin (Pereira *et al.*, 2020). De plus, elles possèdent, entre autre, un ensemble conséquent d'enzymes affectant les glucides. Sachant que les glands sont des aliments très énergétiques, riches en glucides solubles et en graisse, mais pauvres en protéines, nous pouvons faire un lien entre l'augmentation des *Muribaculaceae* et la teneur importante en sucre qu'ils comportent. Néanmoins, nous n'avons pas d'explication biologique pour les membres bactériens de la famille des *UCG-011*. Ainsi, ce résultat innovant peut s'expliquer par le fait que la composition et la qualité du régime alimentaire des chevreuils à Aurignac varient en fonction de la variation inter-annuelle des glandées (Abbas *et al.*, 2011). Il est connu que lorsque les glands sont disponibles, ils constituent une ressource alimentaire majeure pour les cervidés (Picard *et al.*, 1991 ; Weerasinghe & Takatsuki, 1999 ; Feldhamer, 2001) car sont nutritionnellement riches (Abbas *et al.*, 2011 ; Feldhamer, 2001). Sur le site d'étude, la

quasi totalité du contenu de la panse des chevreuils est dominée par cette ressource lorsque disponible, et ce indépendamment de la structure du paysage local (Abbas *et al.*, 2011). En effet, la présence de glands durant les années à forte glandée homogénéise le microbiote. De plus, de manière générale, les chevreuils des forêts consomment moins de glands que ceux des habitats ouverts (Abbas *et al.*, 2011), peut être en raison d'une densité plus élevée de concurrents dans les bois, comme les sangliers (*Sus scrofa*) et d'autres petits mammifères, et/ou une production plus faible de glands par rapport aux habitats plus ouverts où les chênes individuels ont un meilleur accès à la lumière (Abrahamson & Layne, 2004). L'ensemble de ces éléments montrent que la disponibilité et la consommation de glands atténuent l'influence de la structure du paysage sur la composition et la qualité du régime alimentaire et donc sur la structure du microbiote. En revanche, lorsque les glands sont rares, la composition du régime alimentaire est fortement liée à la structure du paysage local, entraînant une plus grande hétérogénéité dans l'écosystème intestinal. En effet, dans ce cas, les chevreuils se rabattent sur des ressources alimentaires qui varient selon la composition du paysage : des ronces et du lierre en forêt, et davantage de plantes cultivées en milieu ouvert (Abbas *et al.*, 2011). Ainsi lorsqu'il y a peu de gland, le régime alimentaire des individus est plus variable dans l'espace qu'en présence d'une grande abondance en glands.

Cette variation spatiale s'est traduite par une qualité contrastée du régime alimentaire, avec un contenu cellulaire plus important et des teneurs en lignine et hémicellulose plus faibles pour les individus vivant dans des habitats cultivés ouverts. Ainsi, le régime alimentaire et donc le type d'habitat peuvent affecter la composition du microbiote intestinal, mettant en évidence des différences entre les individus présents en forêts des individus présents en milieu ouvert. D'un point de vue mécanistique, le régime alimentaire peut affecter la composition du microbiote en modifiant les conditions environnementales du tractus gastro-intestinal, notamment le pH, la température et les niveaux d'oxygène (Gu *et al.*, 2013). De plus, en utilisant des plantes cultivées, les chevreuils obtiennent des avantages nutritionnels en augmentant la valeur énergétique de leur régime alimentaire. Ainsi, la variation de l'alimentation et donc du microbiote intestinal des chevreuils reflète leur capacité à s'adapter à la fragmentation de leur habitat forestier en présentant un comportement alimentaire plastique, leur permettant d'utiliser des ressources supplémentaires présentes dans la matrice agricole.

2. Stress et microbiote

Cependant, les avantages nutritionnels des habitats ouverts peuvent être contrebalancés par un risque de prédation plus élevé lorsque les refuges boisés sont rares (Benhaïem *et al.*, 2008), pouvant être à l'origine de l'apparition d'une forme de stress chez les individus. Il a été démontré

que divers facteurs de stress comme par exemple la séparation maternelle, la promiscuité, le stress thermique et le stress acoustique modifient la composition du microbiote intestinal (Bailey & Coe, 1999 ; Bailey *et al.*, 2010 ; Collins & Bercik, 2009 ; García-Ródenas *et al.*, 2006 ; O'Mahony *et al.*, 2009). En adéquation avec ces conclusions, nos résultats indiquent que les changements dans les communautés microbiennes intestinales observés entre les habitats peuvent être conjugués à des changements dans la physiologie de l'hôte provoqués par des niveaux de cortisol fécaux différents. Plus précisément, des différences évidentes dans l'abondance relative de plusieurs phyla, familles et genres selon le taux de cortisol basal, sachant l'environnement ont été révélées. Ainsi, deux animaux présents dans le même milieu mais présentant des niveaux de stress différents ont une structure microbienne significativement différente. En effet, nous avons observé une tendance selon laquelle la majorité des taxa microbiens commensaux diminuent en abondance relative en habitat fermé à mesure que le taux de cortisol augmente. A l'inverse, ces mêmes taxa présentent, pour la majorité, une augmentation de leur abondance relative en concordance avec le niveau de stress chez les animaux présents en habitat ouvert. Cette relation inverse a également été observée entre les milieux de cultures et de prairie. Ainsi, ces résultats démontrent clairement que le stress accentue fortement les différences observées entre les différents milieux en affectant les mêmes taxa mais de manière nettement opposée.

En outre, nos analyses ont révélé cette tendance chez certaines bactéries abondantes, comprenant des bactéries potentiellement bénéfiques comme celles appartenant au phylum *Firmicutes* qui diminuent en culture et croissent en prairie à mesure que le stress augmente. Les *Firmicutes* ont été associées à la décomposition de biomolécules complexes chez les vertébrés, facilitant leur disponibilité comme source d'énergie pour l'organisme hôte (Flint *et al.*, 2008). Ainsi, la réduction de ces bactéries commensales bénéfiques pourrait entraîner une perte de croissance chez le chevreuil. On s'attend donc à trouver des différences de poids et de taille entre les animaux stressés présents en cultures et en prairie, avec des individus plus petits en cultures. De ce fait, il serait intéressant d'ajouter le poids et la taille de chaque animal dans les analyses afin de vérifier cette hypothèse. A l'inverse, le deuxième phylum le plus abondant, *Bacteroidota*, augmente faiblement chez les animaux stressés présents dans les milieux dominés par la culture et diminue chez les individus plus présents en prairie. Les *Bacteroidota* sont connus pour être des dégradateurs primaires de polysaccharides complexes et de parois végétales (El Kaoutari *et al.*, 2013).

Enfin, un très bon indicateur de l'effet du stress sur le microbiote intestinal est l'analyse du ratio *Firmicutes/Bacteroidota*. En effet, ce ratio est largement reconnu comme ayant une influence importante sur le maintien d'une homéostasie intestinale normale. Une augmentation ou une diminution de ce rapport est considérée comme une dysbiose, la première étant généralement observée en cas d'obésité et la seconde en cas de maladie intestinale inflammatoire (MII) (Magne *et*

al., 2020). Dans notre cas, ce ratio augmente fortement en prairie, supposant que les animaux stressés occupant ces milieux consomment des ressources très riches en calories induisant une prise de poids importante. A l'inverse, ce rapport diminue faiblement en cultures chez les chevreuils stressés, supposant que ces animaux souffrent probablement d'une maladie intestinale inflammatoire.

Ces variations dans la composition des communautés intestinales peuvent avoir plusieurs origines. Premièrement, de nombreuses études ont démontré que la composition du microbiote liée au stress joue un rôle causal dans les changements comportementaux. L'apparition soudaine d'un évènement stressant inhibe l'ingestion de nourriture et affecte le comportement alimentaire, c'est-à-dire la recherche, la découverte et la capture de nourriture (Kulczykowska & Sanchez Vazquez, 2010). De plus en plus de preuves indiquent que la CRH (« corticotropin-releasing hormone ») peut être l'un des médiateurs endogènes de l'inhibition de la consommation d'aliments induite par le stress (De Pedro *et al.*, 1993 ; Bernier & Peter, 2001a ; Bernier, 2006). La CRH, une neurohormone sécrétée par l'hypothalamus à la suite d'un évènement stressant, stimule la libération d'ACTH (adrénocorticotrophine) par l'hypophyse, entraînant la libération de glucocorticoïdes dans la circulation sanguine (Sapolsky *et al.*, 2000 ; Reeder & Kramer, 2005). La gestion du stress est un processus exigeant en énergie pour les animaux et peut avoir des conséquences sur leur métabolisme. Ainsi, en plus de redistribuer les substrats métaboliques vers d'autres tissus afin de pouvoir répondre aux besoins énergétiques croissants en cas de stress, la CRH semble détourner les besoins alimentaires de l'organisme afin de donner la priorité aux comportements de combat, de fuite ou de repli sur soi afin de pouvoir faire face à l'évènement stressant (Sominsky & Spencer, 2014). Cependant, une toute autre réponse comportementale est observée lorsque le stress est chronique. En effet, dans ce cas-là, une stimulation de la faim et du comportement alimentaire est médiée par les glucocorticoïdes (Sominsky & Spencer, 2014). Par exemple, les traitements à la corticostérone augmentent la locomotion dans un nouvel environnement chez les rats (Sandi *et al.*, 1996) et étendent les domaines vitaux des bruants à couronne blanche territoriaux (Breuner, 1998). De plus, des niveaux plus élevés de glucocorticoïdes accélèrent l'exploration chez les diamants mandarins (Martins *et al.*, 2007) et facilitent le comportement de mise en cache et la consommation de nourriture chez les mésanges boréales (Pravosudov, 2003). En d'autres termes, une élévation des niveaux de base de glucocorticoïdes pourrait renforcer l'activité d'exploration et l'alimentation. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que ces hormones de stress, émises sur le long terme, stimulent la libération de dopamine (Barrot *et al.*, 2001 ; Rougé-Pont *et al.*, 1998), un neurotransmetteur qui permet la communication au sein du système nerveux, et influe directement sur le comportement. Plus précisément, la dopamine est impliquée dans la motivation et la sensation de plaisir. Ainsi, le stress peut inciter les individus à manger des aliments à haute teneur en calories,

par le biais de son interaction avec les voies de récompense centrales (Sominisky & Spencer, 2014). Ces résultats suggèrent que l'élévation chronique modérée du cortisol peut servir d'adaptation à des environnements imprévisibles en facilitant le comportement d'alimentation et de recherche de nourriture (Pravosudov, 2003).

En plus d'agir sur le comportement alimentaire, le stress peut influencer sur d'autres voies métaboliques pouvant altérer les équilibres microbiens. En effet, une étude a démontré que les guppies (*Poecilia reticulata*) exprimaient des profils enzymatiques intestinaux différents selon le niveau de prédation auquel ils sont soumis (Sullam *et al.*, 2014), pouvant entraîner des changements dans la composition du microbiote. De plus, les activités du système nerveux sympathique (SNS) induites par le stress pourraient avoir une influence importante sur la sécrétion et la motilité de l'intestin et il a été démontré qu'elles influençaient la stabilité des communautés du microbiote chez la souris (Bailey *et al.*, 2010). Une autre explication probable est que les différences observées selon le niveau de cortisol résultent d'une mobilisation rapide des leucocytes et d'autres cellules immunitaires antimicrobiennes du sang circulant périphérique vers le tractus gastro-intestinal (Dhabhar, 2009). Enfin, le stress peut induire des altérations au niveau de la perméabilité intestinale, associés à l'inflammation du tractus gastro-intestinal, modifiant les communautés microbiennes. En effet, Bharwani *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la perméabilité intestinale entre le microbiote d'individus témoins non stressés et le microbiote d'individus soumis à des exercices intenses et prolongés provoquant du stress (Bharwani *et al.*, 2017). De plus, il est généralement admis que cette augmentation de perméabilité induite par les glucocorticoïdes augmente le risque de prolifération des bactéries pathogènes (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). Cependant, nos résultats ne confirment pas cette hypothèse car aucune variation de taxon pathogène n'a été mise en évidence.

Enfin, le stress joue également un grand rôle dans la plasticité phénotypique. En effet, Carbillet *et al.* ont démontré en 2020 que les chevreuils sont capables d'adapter leur comportement spatial afin de limiter leur exposition aux facteurs de stress, souvent d'origine anthropogéniques. Pour cela, ils ont tendance à concentrer leur prise alimentaire en milieu ouvert durant la nuit et en milieu boisé durant la journée (Carbillet *et al.*, 2020). Ces adaptations comportementales sont très certainement possible grâce à la modulation du microbiote intestinal de ces animaux. Cependant, en favorisant la forme physique des mammifères et en permettant la persistance de la population hôte dans des environnements variables, ces microbiotes intestinaux flexibles peuvent modifier les trajectoires évolutives futures de leurs lignées hôtes (Moeller & Sanders, 2020).

V. Conclusion & Perspectives

En conclusion, de multiples études ainsi que nos résultats suggèrent que les changements physiologiques dus au stress peuvent entraîner une perturbation de l'environnement intestinal, ce qui peut modifier la composition et le fonctionnement des communautés microbiennes sachant l'habitat dans lequel prospèrent les animaux. Ces changements comprennent notamment la réduction ou une augmentation de l'abondance de certains taxa bénéfiques comme les *Firmicutes* et les *Bacteroidota* respectivement. L'évaluation de plusieurs des mécanismes physiologiques à l'origine de ces perturbations dépassait le cadre de cette étude, mais les recherches futures auraient intérêt à inclure ces mesures dans l'étude des effets du stress sur l'activité de la flore bactérienne. De même, l'ensemble de nos analyses se sont centrées sur les variations de la composition du microbiote sans se pencher sur les fonctions des différents taxa affectés par l'habitat et le stress. Ainsi, il serait intéressant d'inclure ces nouvelles analyses dans une étude complémentaire afin de réellement comprendre l'adaptation fonctionnelle du microbiote face à ces variations environnementales et physiologiques. De plus, il est important de garder à l'esprit que la relation intestin-cerveau est bidirectionnelle. Dans cette étude, nous nous sommes uniquement concentrés sur l'effet du stress sur le microbiote intestinal, or, cette relation aurait pu être examinée dans le sens inverse, c'est-à-dire l'effet du microbiote sur le niveau de stress. En effet, considérée dans son ensemble, cette communication bidirectionnelle suggère qu'il existe une boucle de rétroaction positive dans laquelle l'exposition au stress modifie l'activité intestinale, entraînant finalement une dysbiose microbienne, et les populations microbiennes dysbiotiques modifient à leur tour l'activité neuroendocrine et les réponses comportementales induites par le stress (Luna & Foster, 2015).

Bibliographie

- Abbas, F., Morellet, N., Hewison, A.J.M., Merlet, J., Cargnelutti, B., Lourtet, B., Angibault, J.M., Daufresne, T., Aulagnier, S., Verheyden, H. (2011) Landscape fragmentation generates spatial variation of diet composition and quality in a generalist herbivore. *Oecologia*, 167:401–411. doi :10.1007/s00442-011-1994-0
- Abrahamson, W.G. & Layne, J.N. (2004) Long-term trends in annual reproductive output of the scrub hickory : factors influencing variation in size of nut crop. *American Journal of Botany*, 91(9) : 1378 - 1386.
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Bohmann, K., Zepeda-Mendoza, M.L., Gilbert, M.T.P. (2016) Do vertebrate gut metagenomes confer rapid ecological adaptation ? *Trends in Ecology & Evolution*, Vol.31, Issue 9, 689-699. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.06.008>
- Andersen, R., Duncan, P., Linnell J.D.C. (1998) *The European Roe Deer : The Biology of Success*. Edited by Andersen, R., Duncan, P., Linnell J.D.C, *Oslo : Scandinavian University Press*, 376 p.
- Bailey, M.T. & Coe, C.L. (1999) Maternal separation disrupts the integrity of the intestinal microflora in infant rhesus monkeys. *Dev Psychobiol*, 35(2):146-55
- Bailey, M.T., Dowd, S.E., Parry, N.M.A., Galley, J.D., Schauer, D.B., Lyte, M. (2010) Stressor exposure disrupts commensal microbial populations in the intestines and leads to increased colonization by *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun*, 78:1509–19. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/>
- Baldo, L., Riera, J.L., Tooming-Klunderud, A., Albà, M.M, Salzburger, W. (2015) Gut Microbiota Dynamics during Dietary Shift in Eastern African Cichlid Fishes. *Plos One*. 10(5): e0127462. doi:10.1371/journal.pone.0127462
- Barrot, M., Abrous, D.N., Marinelli, M., Rougé-Pont, F., Le Moal, M., Piazza, P.V. (2001) Influence of glucocorticoids on dopaminergic transmission in the rat dorsolateral striatum. *Eur J Neurosci.*, 13(4):812-8. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2001.01434.x
- Barton, K. (2015) MuMIn : multi-model inference. R package version 1.15.1. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S. (2015) lme4 : Linear Mixed-Effects Models using 'Eigen' and S4. *Journal of Statistical Software* 67.
- Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957) An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27.4, p. 325-349. doi : 10. 2307/1942268.
- Benhaiem, S., Delon, M., Lourtet, B., Cargnelutti, B., Aulagnier, S., Hewison, A. J. M., Morellet, N., and Verheyden, H. (2008). Hunting increases vigilance levels in roe deer and modifies feeding site selection. *Animal Behaviour*, 76(3): 611-618.
- Bernier, N.J. (2006) The corticotrophin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects of stress. *General and Comparative Endocrinology*, 146(1):45-55. DOI: 10.1016/j.ygcen.2005.11.016

- Bernier, N.J. & Peter, R.E. (2001) The hypothalamic–pituitary–interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Vol.129, Issue 2-3, pages 639-644. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00360-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00360-8)
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini, D., Radaelli, G., Simontacchi, G. (2010) Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquaculture Research*, Vol.41, Issue 8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02417.x>
- Bharwani, A., Mian, M.F., Surette, M.G., Bienenstock, J., Forsythe, P. (2017) Oral treatment with *Lactobacillus rhamnosus* attenuates behavioural deficits and immune changes in chronic social stress. *BMC Med.*, 15(1):7. doi: 10.1186/s12916-016-0771-7
- Bonnot, N., Morellet, N., Verheyden, H., Cargnelutti, B., Lourtet, B., Klein, F., *et al.* (2013). Habitat use under predation risk, hunting, roads and human dwellings influence the spatial behaviour of roe deer. *European Journal of Wildlife Research*, 59, 185e193.
- Börger, L., Franconi, N., Ferretti, F., Meschi, F., Michele, G.D., Gantz, A., Coulson, T. (2006) An integrated approach to identify spatiotemporal and individual-level determinants of animal home range size. *Am. Nat.* 168: 471-485. <https://doi.org/10.1086/507883>
- Breuner, C.W., Greenberg, A.L., Wingfield, J.C. (1998) Noninvasive corticosterone treatment rapidly increases activity in Gambel's white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *Gen Comp Endocrinol.* 111(3):386-94. doi: 10.1006/gcen.1998.7128.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., Huyvaert, K.P. (2011) AIC model selection and multimodel inference in behavioral ecology : some background, observations, and comparisons. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(1):23-35
- Burt, V.H. (1943) Territoriality and home range as applied to mammals. *Journal of Mammalogy*, 24:346-352
- Calenge, C. (2006) The package “adehabitat” for the R software : a tool for the analysis of space and habitat use by animals. *Ecol. Modell.*, 197: 516-519. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.03.017>
- Carbillet, J., Rey, B., Palme, R., Morellet, N., Bonnot, N., Chaval, Y., Cargnelutti, B., Hewison, A.J.M., Gilot-Fromont, E., Verheyden, H. (2020) Under cover of the night: context-dependency of anthropogenic disturbance on stress levels of wild roe deer *Capreolus capreolus*. *Conservation Physiology*, Vol.8, Issue 1. <https://doi.org/10.1093/conphys/coaa086>
- Chi, X., Gao, H., Wu, G., Qin, W., Song, P., Wang, L., Chen, J., Cai, Z., Zhang, T. (2019) Comparison of gut microbiota diversity between wild and captive bharals (*Pseudois nayaur*). *BMC Veterinary Research*, Vol.15, Article number: 243
- Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2013) The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, Vol.18, pages 666–673.
- Collins, S.M. & Bercik, P. (2009) The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology. AGA Institute American Gastroenterological Association*, 136:2003–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19457424>

- Cryan, J.F. & O'Mahony, S.M. (2011) The microbiome-gut-brain axis : from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil*, 23(3):187-92. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01664.x.
- Dhabhar, F.S. (2009) A hassle a day may keep the pathogens away : the fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. *Integr. Comp. Biol.* **49**, 215–236. doi:10.1093/icb/icp045
- De Menezes, A.B., Lewis, E., O'Donovan, M., *et al.* (2011) Microbiome analysis of dairy cows fed pasture or total mixed ration diets. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 78:256–265. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01151.x
- De Mercado, E., Larrán, A. M., Pinedo, J., & Tomás-Almenar, C. (2018). Skin mucus : A new approach to assess stress in rainbow trout. *Aquaculture*, **484**, 90– 97.
- De Palma, G., Blennerhassett, P., Lu, J., Deng, Y., Park, A.J., Green, W., Denou, E., Silva, M.A., Santacruz, A., Sanz, Y., Surette, M.G., Verdu, E.F., Collins, S.M., Bercik, P. (2015) Microbiota and host determinants of behavioural phenotype in maternally separated mice. *Nature Communications*, Vol. **6**, Article number: 7735
- De Pedro, N., Alonso-Gomez, A.L., Gancedo, B., Delgado, M.J., Alonso-Bedate, M. (1993) Role of Corticotropin-Releasing Factor (CRF) as a Food Intake Regulator in Goldfish. *Physiology Behavior*, Vol.53, pp. 517-52
- Durso, L.M., Harhay, G.P., Smith, T.P.L., *et al.* (2010) Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:4858–4862. doi:10.1128/AEM.00207-10
- El Aidy, S., Van Den Abbeele P., Van De Wiele T., *et al.* (2013) Intestinal colonization : how key microbial players become established in this dynamic process : microbial metabolic activities and the interplay between the host and microbes prospects & overviews. Aidy S.E. *et al.*, *BioEssays*, 35:913–923. doi:10.1002/bies. 201300073
- El Kaoutari, A., Armougom, F., Gordon, J.I., Raoult, D., Henrissat, B. (2013) The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol.*, 11(7): 497-504. doi: 10.1038/nrmicro3050.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G. (2018) FROGS : Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, Vol.34, Issue 8, Pages 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Feldhamer, G.A. (2001) Acorns and white-tailed deer : interrelationships in forest ecosystems. In : W.J. McShea, W.M. Healy (eds), Oak forest ecosystems : Ecology and management for wildlife. *Johns Hopkins Univ. Press*, Baltimore, MD, 215-223.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A. (2008) Polysaccharide utilization by gut bacteria : potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 121–131. doi:10.1038/nrmicro 1817
- García-Ródenas, C.L., Bergonzelli, G.E., Nutten, S., Schumann, A., Cherbut, C., Turini, M., Ornstein, K., Rochat, F., Corthésy-Theulaz, I. (2006) Nutritional approach to restore impaired intestinal barrier function and growth after neonatal stress in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 43(1):16-24. doi: 10.1097/01.mpg.0000226376.95623.9f.

- Glaser, R. & Kiecolt-Glaser, J.K. (2005) Stress-induced immune dysfunction : implications for health. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 243–251. doi:10.1038/nri1571
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J-N., *et al.* (2013) Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS One*, **8**:e74957. doi: 10.1371/journal.pone.0074957
- Lozupone, C., Hamady, M., Knight, R. (2006) Fast UniFrac : facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *ISME J.*, **4**(1):17-27. doi: 10.1038/ismej.2009.97.
- Hewison, A.J.M., Vincent, J.P., Reby, D. (1998) Social organisation of European roe deer. Andersen R, Duncan P, Linnell JDC (eds) *The European roe deer : the biology of success. Scandinavian University Press, Oslo*, pp 189–219.
- Hewison, A.J.M., Vincent, J.P., Joachim, J., Angibault, J.M., Cargnelutti, B., Cibien, C. (2001) The effects of woodland fragmentation and human activity on roe deer distribution in agricultural landscapes. *Canadian Journal of Zoology*, NRC Research Press, 2001, **79**, pp.679-689
- Hooke, R.L., Martín-Duque, J.F., Pedraza, J. (2012) Land transformation by humans: a review. *GSA today*, **22**: 4-10. <https://doi.org/10.1130/GSAT151A.1>
- Huang, L., Nazarova, E.V., Tan, S., Liu, Y., Russell, D.G. (2018) Growth of *Mycobacterium tuberculosis in vivo* segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. *J Exp Med*, **2;215**(4):1135-1152. doi: 10.1084/jem.20172020
- Hurlbert, S.H. (1984). Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological monographs*, **54**(2), 187-211.
- Ishaq, S.L. & Wright, A.D.G. (2012) Insight into the bacterial gut microbiome of the North American moose (*Alces alces*). *BMC Microbiol*, **12**:212.
- Jaccard, P. (1901) Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, **37**, p.547-579. doi : <http://dx.doi.org/10.5169/seals-266450>.
- Kiliaan, A.J., Saunders, P.R., Bijlsma, P.B., Berin, M.C., Taminiau, J.A., Groot, J.A., Perdue, M.H. (1998) Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am. J. Physiol.* **275**, G1037–G1044.
- Kjellander, P., Gaillard, J-M., Hewison, A.J.M. (2006) Density-dependent responses of fawn cohort body mass in two contrasting roe deer populations. *Oecologia*, **146**(4):521-30.
- Kohl, K.D. & Dearing, M.D. (2014) Wild-caught rodents retain a majority of their natural gut microbiota upon entrance into captivity. *Environ. Microbiol. Rep.*, **6**, 191-195.
- Kruskal, J.B. (1964) Nonmetric multidimensional scaling : A numerical method. *Psychometrika*, Vol.29, pages 115–129.
- Kulczykowska, E. & Sanchez Vazquez, F.J. (2010) Neurohormonal regulation of feed intake and response to nutrients in fish : Aspects of feeding rhythm and stress. *Aquaculture Research*, **41**(5): 654 - 667. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02350.x
- Lagkouvardos, I., Lesker, T.R., Hitch, T.C.A., Gálvez, E.J.C., Smit, N., Neuhaus, K., Wang, J., Baines, J.F., Abt, B., Stecher, B., Overmann, J., Strowig, T., Clavel, T. (2019) Sequence and

cultivation study of *Muribaculaceae* reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. *Microbiome*, Vol.7, Article number: 28

Leser, T.D. & Mølbaek, L. (2009) Better living through microbial action : the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.* 11:2194–2206. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x

Ley, R.E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P.J., Ramey, R.R., Bircher, J.S., *et al.* (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320: 1647– 1651.

Li, Z., Zhang, Z., Xu, C., *et al.* (2014) Bacteria and methanogens differ along the gastrointestinal tract of Chinese roe deer (*Capreolus pygargus*). *PLoS One*, 9:e114513. doi:10.1371/journal.pone.0114513

Li, N., Huang, S., Jiang, L., Wang, W., Li, T., Zuo, B., Li, Z., Wang, J. (2018) Differences in the Gut Microbiota Establishment and Metabolome Characteristics Between Low- and Normal-Birth-Weight Piglets During Early-Life. *Front Microbiol.*, 9: 1798. doi: [10.3389/fmicb.2018.01798](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01798)

Luna, R.A. & Foster, J.A. (2015) Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. *Curr Opin Biotechnol.*, 32:35-41. doi: 10.1016/j.copbio.2014.10.007.

Mackos, A.M., Maltz, R., Bailey, M.T. (2017) The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. *Hormones and Behavior*, 88 (2017) 70–78

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., Balamurugan, R. (2020) The *Firmicutes/Bacteroidetes* Ratio : A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients ? *Nutrients*, 12(5): 1474. doi: 10.3390/nu12051474

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M. (2014) Swarm : robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, DOI 10.7717/peerj.593

Martin, J., Vourc'h, G., Bonnot, N., Cargnelutti, B., Chaval, Y., Lourtet, B., *et al.* (2018). Temporal shifts in landscape connectivity for an ecosystem engineer, the roe deer, across a multiple-use landscape. *Landscape ecology*, 33(6), 937-954.

Martins, T.L.F., Roberts, M.L., Giblin, I., Huxham, R., Evans, M.R. (2007) Speed of exploration and risk-taking behavior are linked to corticosterone titres in zebra finches. *Hormones and Behavior*, Vol.52, Issue 4, pages 445-453. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.06.007>

McMurdie, P.J. & Holmes, S. (2013) phyloseq : An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4): e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

McShea, W.J. & Schwede, G. (1993) Variable Acorn Crops : Responses of White-Tailed Deer and Other Mast Consumers. *J. Mamm.*, 74(4):999-1006.

Moeller, A.H. & Sanders, J.G. (2020) Roles of the gut microbiota in the adaptive evolution of mammalian species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, Vol.375, Issue 1808. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0597>

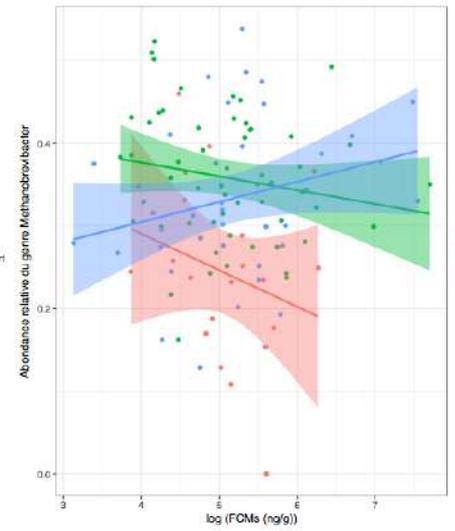
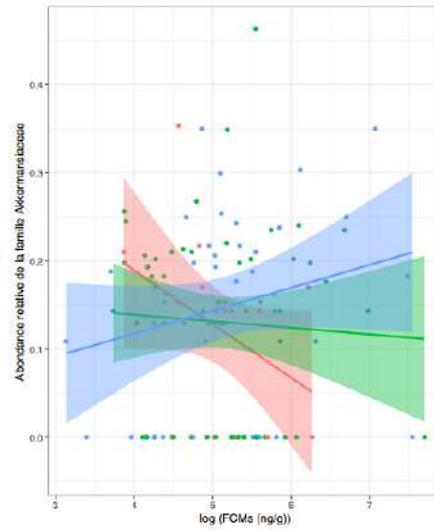
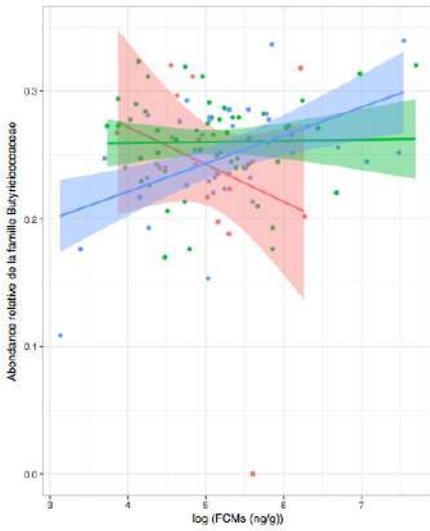
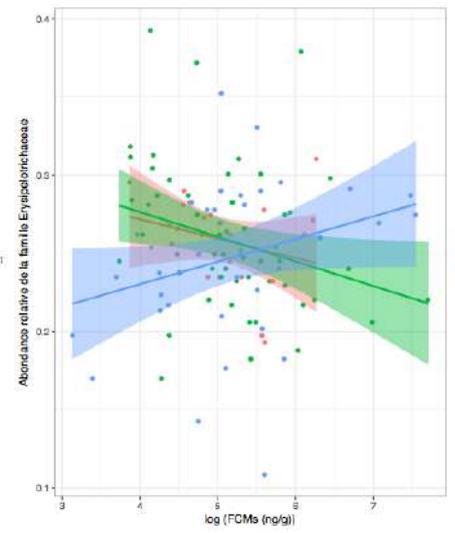
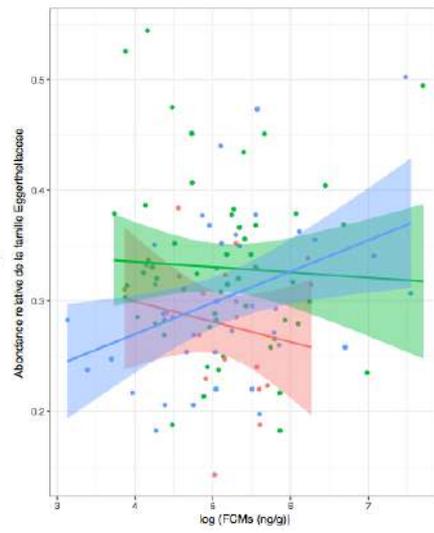
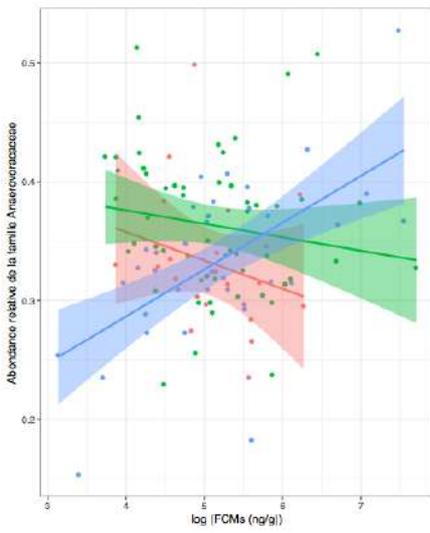
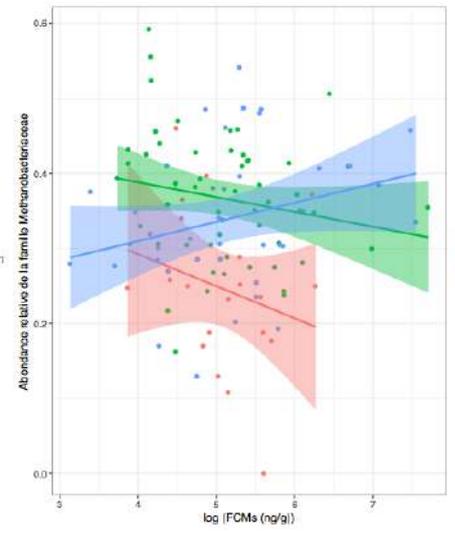
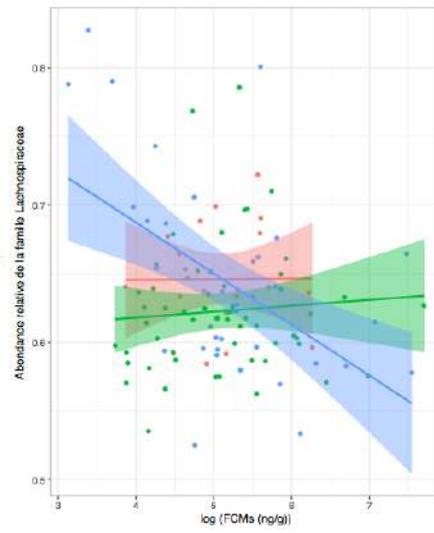
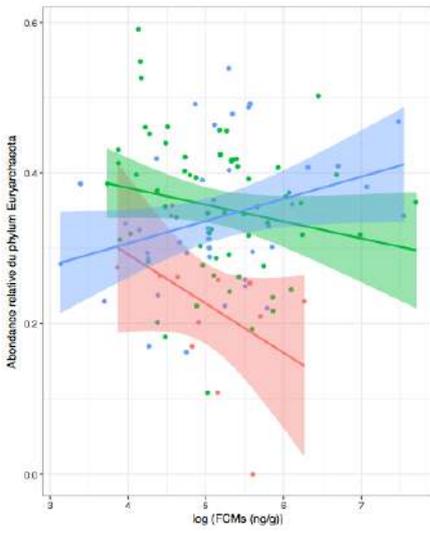
- Morellet, N., Verheyden, H., Angibault, J-M., Cargnelutti, B., Lourtet, B., Hewison, A.J.M. (2009) The effect of capture on ranging behaviour and activity of the European roe deer *Capreolus capreolus*. *Wildl Biol.*,15:278–287
- Möstl, E. & Palme, R. (2002) Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol*, 23(1-2): 67-74.
- Nelson, T.M., Rogers, T.L., Carlini, A.R., and Brown, M.V. (2013) Diet and phylogeny shape the gut microbiota of Antarctic seals : a comparison of wild and captive animals. *Environ Microbiol.*, 15: 1132–1145.
- Neufeld, K.M., Kang, N., Bienenstock, J., Foster, J.A. (2011) Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterology & Motility*, 23, 255–e119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
- Ockenfels, M.C., Porter, L., Smyth, J., Kirschbaum, C., Hellhammer, D.H., Stone, A.A. (1995) Effect of chronic stress associated with unemployment on salivary cortisol : overall cortisol levels, diurnal rhythm, and acute stress reactivity. *Psychosom Med.*, 57(5):460-7.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Kindt, R., Legendre, P. , Minchin, P.T., O’Hara, B., Simpson, G.S., Solymos, P., Stevens, H., Wagner, H.H. (2015) *Vegan : Community Ecology Package*.
- O’Mahony, S.M., Marchesi, J.R., Scully, P., Codling, C., Ceolho, A-N., Quigley, E.M.M., Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2009) Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry.*, 65(3): 263-7. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.06.026.
- Palme, R. (2019) Non-invasive measurement of glucocorticoids : advances and problems. *Physiol. Behav.*, 199: 229-243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.021>
- Pereira, F.C., Wasmund, K., Cobankovic, I., Jehmlich, N., Herbold, C.W., Lee, K.S., Sziranyi, B., Vesely, C., Decker, T., Stocker, R., Warth, B., von Bergen, M., Wagner, M., Berry, D. (2020) Rational design of a microbial consortium of mucosal sugar utilizers reduces *Clostridiodes difficile* colonization. *Nature Communications*, Vol.11, Article number: 5104
- Pereira-Marques, J., Ferreira, R.M., Pinto-Ribeiro, I., Figueiredo, C. (2019) *Helicobacter pylori* Infection, the Gastric Microbiome and Gastric Cancer. *Helicobacter pylori in Human Diseases*, pp 195-210
- Picard, J.F., Oleffe, P., Boisaubert, B. (1991) Influence of oak mast on feeding behaviour of red deer (*Cervus elaphus L*). *Ann. For. Sci.*, 48 5 (1991) 547-559.
- Pravosudov, V.V. (2013) Long-term moderate elevation of corticosterone facilitates avian food-caching behaviour and enhances spatial memory. *Proc Biol Sci.*, 22; 270(1533): 2599–2604. doi: 10.1098/rspb.2003.2551
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.*, 41(Database issue): D590–D596.
- R Core Team (2019) R : A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

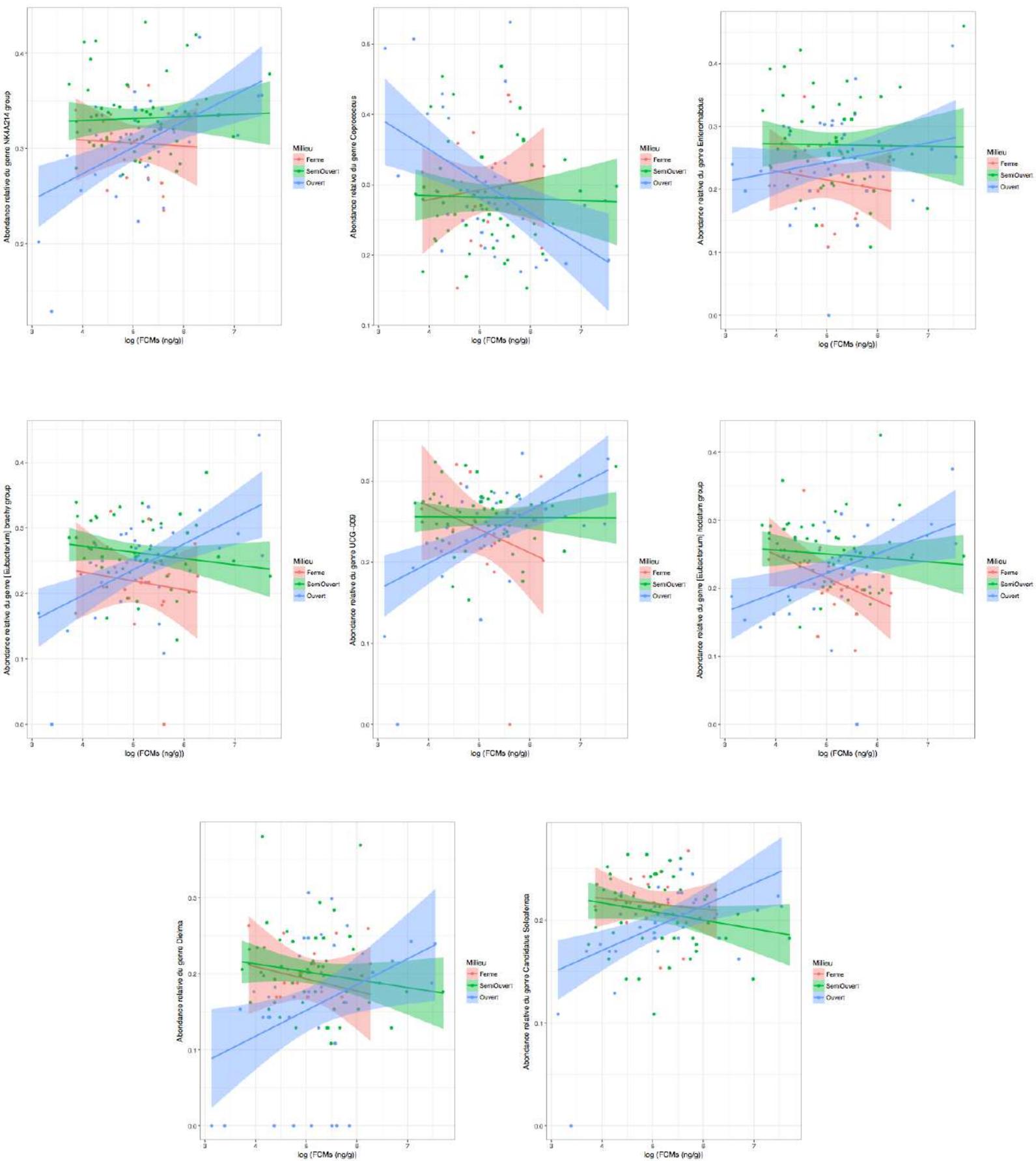
- Redfern, K. (2016) An empirical investigation of the incidence of negative psychological symptoms among Chinese international students at an Australian university. *Australian Journal of Psychology*, Vol.68, Issue 4
- Reeder, D.M. & Kramer, K.M. (2005) Stress in free-ranging mammals : integrating physiology, ecology, and natural history. *J. Mammal.*, 86 : 225-235. <https://doi.org/10.1644/BHE-003.1>
- Rhee, R.H., Pothoulakis, C., Mayer, E.A. (2009) Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 6(5):306-14.
- Rognes, R., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. (2016) VSEARCH : a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584.
- Romero, L.M. & Wingfield, J.C. (2015) Tempests, poxes, predators, and people : stress in wild animals and how they cope. *Oxford University Press*, <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195366693.001.0001>
- Rougé-Pont, F., Deroche, V., Le Moal, M., Piazza, P.V. (1998) Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *Eur J Neurosci.*, 10(12):3903-7. doi: 10.1046/j.1460-9568.1998.00438.x.
- Ruml, M., Vuković, A., Milatović, D. (2009) Evaluation of different methods for determining growing degree-day thresholds in apricot cultivars. *International Journal of Biometeorology*. Vol. 54, pages 411-422
- Sandi, C., Venero, C., Guaza, C. (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci.*, 8(4):794-800. doi: 10.1111/j.1460-9568.1996.tb01264.x.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses ? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.*, 21: 55-89. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>
- Shannon, C.E. (1948) A Mathematical Theory of Communication. *The Bell System Technical Journal*, 27, p.379-423.
- Sheriff, M.J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., Boonstra, R. (2011) Measuring stress in wildlife : techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166: 869-887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>
- Simpson, E. H. (1949) Measurement of diversity. *Nature*, 163.4148, p.688
- Smyth, J., Ockenfels, M.C., Porter, L., Kirschbaum, C., Hellhammer, D.H., Stone, A.A. (1998) Stressors and mood measured on a momentary basis are associated with salivary cortisol secretion. *Psychoneuroendocrinology*, 23(4):353-70. doi: 10.1016/s0306-4530(98)00008-0.
- Sominsky, L. & Spencer, S.J. (2014) Eating behavior and stress : a pathway to obesity. *Front Psychol.*, 5: 434. doi: 10.3389/fpsyg.2014.00434
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X-N., Kubo, C., Koga, Y. (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.*, 558(Pt 1): 263-275.

- Sullam, K.E., Dalton, C.M., Russell, J.A., Kilham, S.S., El-Sabaawi, R., German, D.P., *et al.* (2014) Changes in digestive traits and body nutritional composition accommodate a trophic niche shift in Trinidadian guppies. *Oecologia*, 177:245–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25430044>
- Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D.L.E., Nalin, R., Dore, J., Leclerc, M. (2009) Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.*, 11(10):2574-84. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.
- Tucker, M.A., Böhning-Gaese, K., Fagan, W.F., Fryxell, J.M., Van Moorter, B., Alberts, S.C., *et al.* (2018) Moving in the Anthropocene : Global reductions in terrestrial mammalian movements. *Science*, 359: 466-469. <https://doi.org/10.1126/science.aam9712>
- Vedhara, K., Cox, N.K., Wilcock, G.K., Perks, P., Hunt, M., Anderson, S., Lightman, S.L., Shanks, N.M. (1999) Chronic stress in elderly carers of dementia patients and antibody response to influenza vaccination. *Lancet*, 20;353(9153):627-31. doi: 10.1016/S0140-6736(98)06098-x
- Webster, M.M., Atton, N., Ward, A.J.W., Hart, P.J.B. (2007) Turbidity and foraging rate in three-spined sticklebacks : the importance of visual and chemical cues. *Behaviour* **144**, 1347–1360.
- Weerasinghe, U.R. & Takatsuki, S. (1999) A record of acorn eating by sika deer in western Japan. *Ecological Research*, Vol.14, pages 205–209
- Wickham, H. & Chang, W. (2016) ggplot2 : An Implementation of the Grammar of Graphics. <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>.
- Wingfield, J.C. & Sapolsky, R.M. (2003) Reproduction and resistance to stress : when and how. *J. Neuroendocrinol.*, 15: 711-724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01033.x>
- Wingfield, J.C. (2015) Coping with change : a framework for environmental signals and how neuroendocrine pathways might respond. *Front Neuroendocrinol*, 37: 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.005>
- Whittaker, R.H. (1960) Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs*, 30.3, p. 279-338. doi : 10.2307/1943563
- Wolf, J.F., Kriss, K.D., MacAulay, K.M., Munro, K., Patterson, B.R., Shafer, A.B.A. (2020) Gut microbiome composition predicts summer core range size in a generalist and specialist ungulate. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.236638>
- Worton, B.J. (1989) Kernel methods for estimating the utilization distribution in home-range studies. *Ecology*, 70: 164-168. <https://doi.org/10.2307/1938423>
- Zbyryt, A., Bubnicki, J.W., Kuijper, D.P.J., Dehnhard, M., Churski, M., Schmidt, K. (2017) Do wild ungulates experience higher stress with humans than with large carnivores ? *Behavioral Ecology*, Vol 00(00), 12 p.
- Zhang, J., Guo, Z., Xue, Z., Sun, Z., Zhang, M., Wang, L., Wang, G., Wang, F., Xu, J., Cao, H., Xu, H., Lv, Q., Zhong, Z., Chen, Y., Qimuge, S., Menghe, B., Zheng, Y., Zhao, L., Chen W., Zhang, H. (2015) A phylo-functional core of gut microbiota in healthy young Chinese cohorts across lifestyles, geography and ethnicities. *The ISME Journal*, Vol.9, pages 1979–1990.

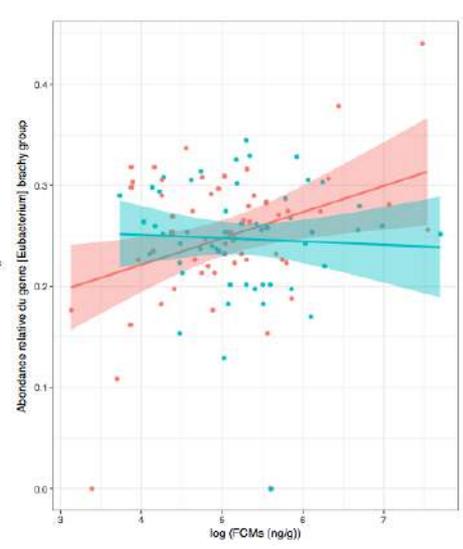
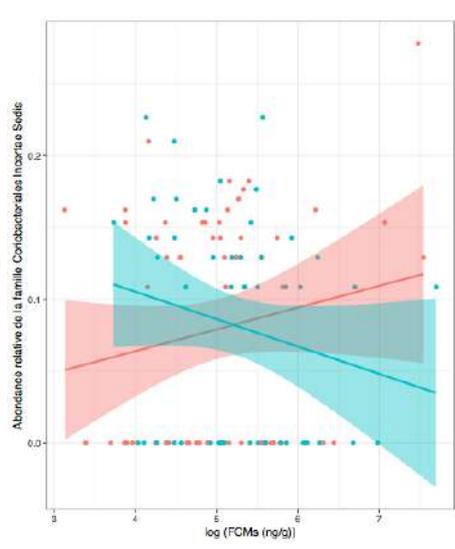
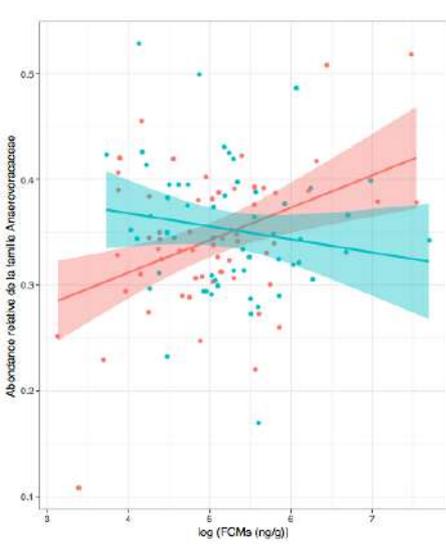
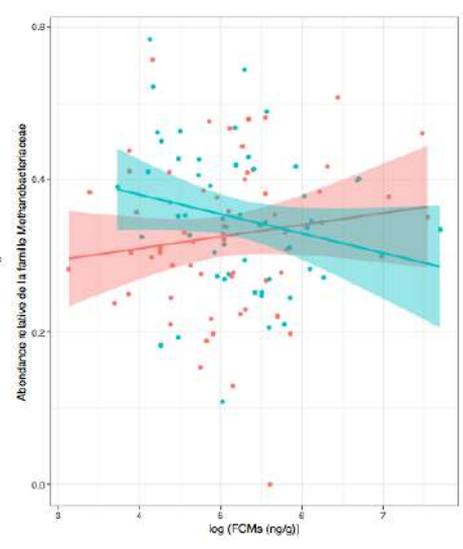
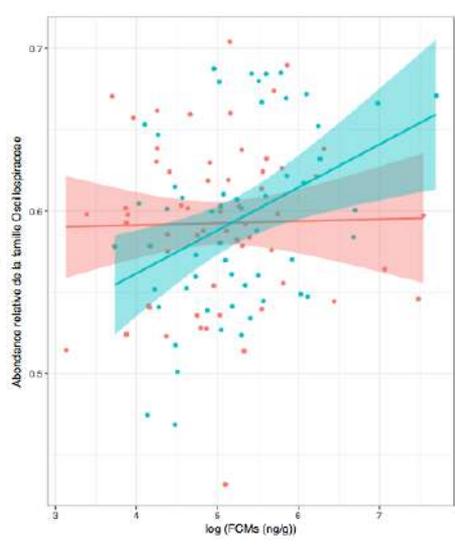
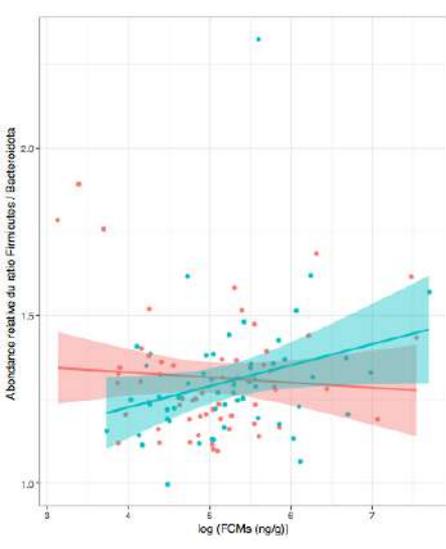
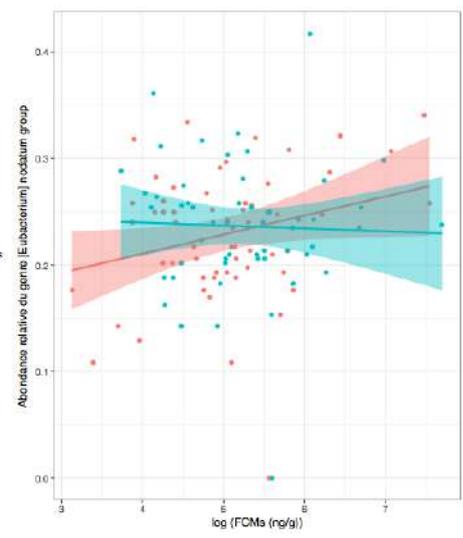
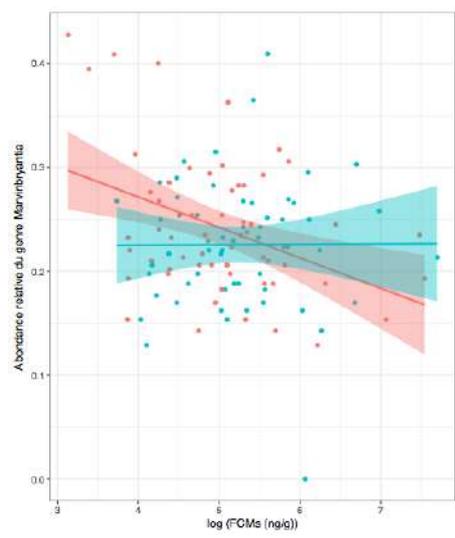
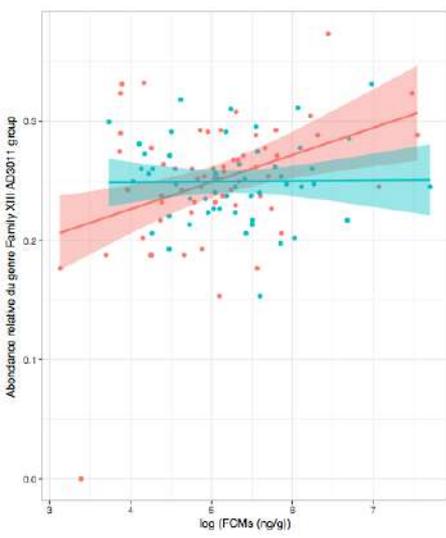
Annexes

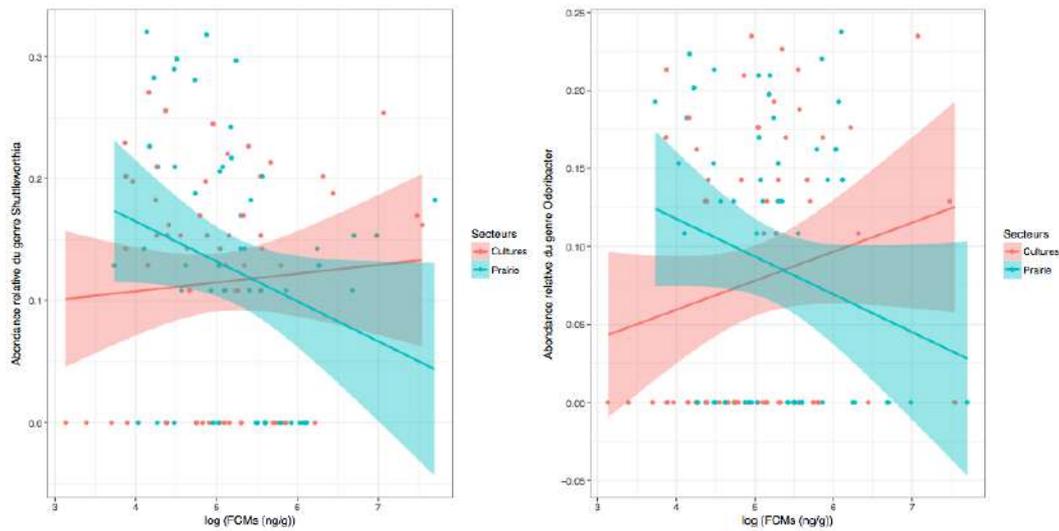
Annexe 1 :





Figures 8 : Variation des abondances relatives (%) des phyla, familles et genres des taxa composants le microbiote intestinal selon l'interaction entre taux de cortisol et le degré d'ouverture du paysage (Ouvert / Fermé).





Figures 9 : Variation des abondances relatives (%) des phyla, familles et genres des taxa composants le microbiote intestinal selon l'interaction entre le taux de cortisol et le type de milieu ouvert (Cultures / Prairie).

Annexe 2 : Diversité bêta : matrice de distance de Jaccard

Variables explicatives	Df	SumsOfSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Age	2	0,691	1.10279	0.01257	0,111
Sexe	1	0,316	1.01042	0.00576	0,390
Age*Sexe	2	0,676	1.07909	0.01230	0,158
Résidus poids glands	1	0,393	1.25455	0.00715	0,040*
DJC	1	0,383	1.26190	0.01082	0,270
Cort	1	0,436	1.42467	0.00927	0,005**
boisPC1	1	0,443	1.4584	0.01229	0,004**
ouvertPC2	1	0,396	1.3049	0.01100	0,047*
boisPC1*Cort	1	0,311	1.0259	0.00865	0,0361*
ouvertPC2*Cort	1	0,411	1.3548	0.01142	0,016*

Tableau 3 : Résultats de la Permanova basée sur la matrice de distance de Jaccard de l'abondance relative des OTU en réponse à l'âge, au sexe, à la glandée (Glands), aux degré-jour de croissance (DJC), au niveau de cortisol (Cort) et à l'habitat (boisPC1 et ouvertPC2).

Df = nombre de paramètres ; SumsofSqs = somme des carrés ; F.Model = Valeur F par permutation.

Les pvalues sont basées sur 999 permutations. Les astérisques indiquent les différences significatives (pvalue < 0.05).

Annexe 3 : Diversité bêta : matrice de distance d'Unifrac

Variables explicatives	Df	SumsOfSqs	F.Model	R2	Pr(>F)
Age	2	0.0528	0.58286	0.00666	0,920
Sexe	1	0.1132	2.49799	0.01426	0,056
Age*Sexe	2	0.0772	0.85186	0.00973	0,622
Glands	1	0.0909	0.090941	0.01146	0,042*
DJC	1	0.2425	1.1779	0.01033	0,158
Cort	1	0.1221	3.04737	0.01942	0,011*
boisPC1	1	0.0680	1.69572	0.01406	0,105
ouvertPC2	1	0.0464	1.15579	0.00958	0,249
boicPC1*Cort	1	0.0336	0.83884	0.00695	0,556
ouvertPC2*Cort	1	0.0761	1.89814	0.01574	0,094

Tableau 4 : Résultats de la PERMANOVA basée sur la matrice de distance d'Unifrac de l'abondance relative des OTU en réponse à l'âge, au sexe, à la glandée (Glands), aux degré-jour de croissance (DJC), au niveau de cortisol (Cort) et à l'habitat (boisPC1 et ouvertPC2).

Df = nombre de paramètres ; SumsOfSqs = somme des carrés ; F.Model = Valeur F par permutation.

Les pvalues sont basées sur 999 permutations. Les astérisques indiquent les différences significatives (pvalue < 0.05).

Annexe 4 : Abondance des glands selon l'année et le secteur

Une analyse ANOVA a permis de démontrer que l'abondance des glands (g/m²) variait selon l'interaction entre l'année et le secteur (pvalue < 0.05). Puis, un test post-hoc de Tukey a montré une différence significative entre le milieu ouvert et le milieu semi-ouvert (pvalue = 0.0000012***) et entre le milieu ouvert et le milieu fermé (pvalue = 0.000003***). En effet, les chênes présents en milieu ouvert ont un plus grand accès à la lumière ce qui leur permet de produire davantage de glands. De plus, les années 2012 et 2017 ont été marquées par une grande richesse en glands, à l'inverse des années 2013 et 2018 marquées par une abondance en glands très faible.

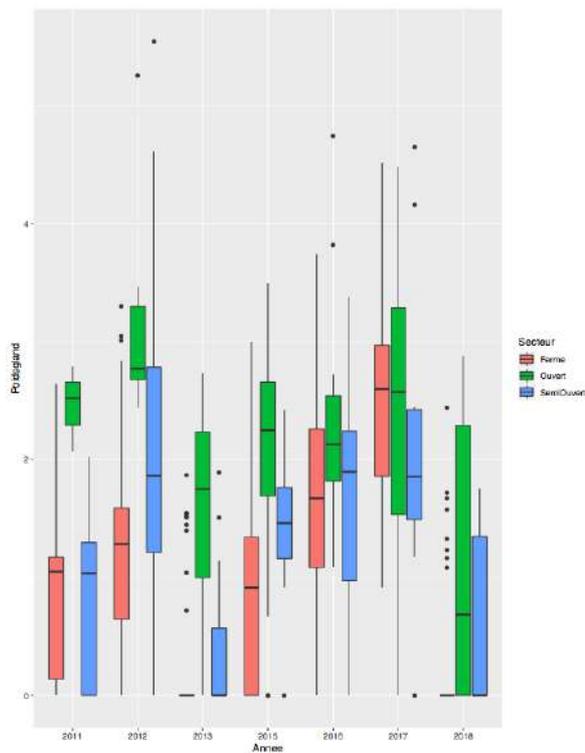


Figure 10 : Variation de l'abondance en glands (g/m^2) en fonction de l'année et du secteur.

Annexe 5 : Analyses sur les niveaux de cortisol

• Etude de la répétabilité des données cortisol

La répétabilité individuelle du cortisol a été estimée à l'aide de 260 observations de 218 individus et de modèles mixtes utilisant la méthode du maximum de vraisemblance restreint (REML), avec le package 'rptR' (Stoeffel *et al.*, 2017) pour les distributions gaussiennes. Les individus échantillonnés une seule fois ont été inclus dans ces analyses car cette procédure peut améliorer la puissance d'estimation de la variance interindividuelle, évitant ainsi des résultats biaisés (Martin *et al.*, 2011).

Dans notre échantillon ($n=260$), les niveaux de cortisol variaient de 63 à 4913.7 ng/g, avec une valeur moyenne de 805 ng/g. De plus, les niveaux de cortisol étaient très répétables ($R=0.635$, intervalle de confiance à 95%=[0.522, 0.817], $p\text{value}<0,01$).

• Variation des niveaux de cortisol

Pour analyser la variation des niveaux de cortisol, nous avons effectué des modèles linéaires à effets mixtes (LMM). Les individus avec des valeurs extrêmes de cortisol ont été supprimés. Deux individus avec une valeur de cortisol extrêmement basse (< 80 ng/g) ont été retirés, car cela correspondrait à problèmes de qualité d'échantillon et/ou une possible contamination (Lexen *et al.*, 2008). Deux individus avec des valeurs de cortisol élevées (> 4500 ng/g) ont également été identifiés et supprimés de notre jeu de données car ont probablement subi un stress aigu dans les

heures précédents la capture. Après transformation en racine carré des variables le nécessitant, nous avons réalisé deux modèles linéaires mixtes à l'aide du package 'lmerTest' (Kuznetsova, Brockhoff, & Christensen, 2016). Nous avons évalué l'impact du sexe, de l'âge, des DJC et des résidus du poids des glands sur le taux de cortisol émis par chaque individu. N'ayant pas toutes les données pour tous les animaux, ces analyses ont été effectuées sur 156 observations de 139 individus. Un second modèle, basé sur 121 observations de 114 individus, a permis d'étudier l'impact du paysage sur le taux de cortisol émis par les chevreuils. Moins d'animaux ont été utilisés pour ces analyses par rapport aux analyses de répétabilité car tous les animaux n'étaient pas équipés de colliers GPS. Ces modèles comprenaient l'ensemble des variables âge, sexe, DJC, résidus du poids des glands et paysage comme facteurs fixes. Une interaction bidirectionnelle entre le sexe et l'âge a également été testée. L'identité des chevreuils et l'année ont été incluses en tant que facteurs aléatoires pour tenir compte de la non-indépendance des mesures provenant d'un même individu et d'une même année. Nous avons ensuite comparé ces modèles de base avec tous les modèles imbriqués en utilisant le critère d'information d'Akaike corrigé.

L'unique modèle sélectionné était le modèle comprenant les interactions bidirectionnelles entre l'âge et le sexe. Ce modèle a indiqué que les jeunes femelles ont un niveau de cortisol plus faible que celui des jeunes mâles, suivie d'une tendance inverse à l'âge adulte avec les mâles qui émettent moins de cortisol que les femelles (Figure 11). Aucun des autres modèles étudiant les variations de cortisol en fonction des résidus du poids total des glands, de l'habitat et des DJC n'a été sélectionné (Tableau 5). Ainsi, les animaux les plus proches des infrastructures humaines ne sont pas nécessairement les plus stressés. De même, que les animaux aient davantage de milieu ouvert ou de milieu fermé dans leur domaine vital ne semble n'avoir aucun impact sur leur niveau de stress.

Variables explicatives										Critères de sélection		
Age	Sexe	Age*Sexe	Glands	DJC	Cort	boicPC1	ouvertPC2	Cort*boisPC1	CortouvertPC2	df	Δ AICc	w
+	+	+								9	0	0.410
	+									5	2.19	0.137
					-0.1365		-0.1993		-2.967	7	2.57	0.163

Tableau 5 : Modèle sélectionné pour expliquer les variations des niveaux de cortisol selon plusieurs variables explicatives

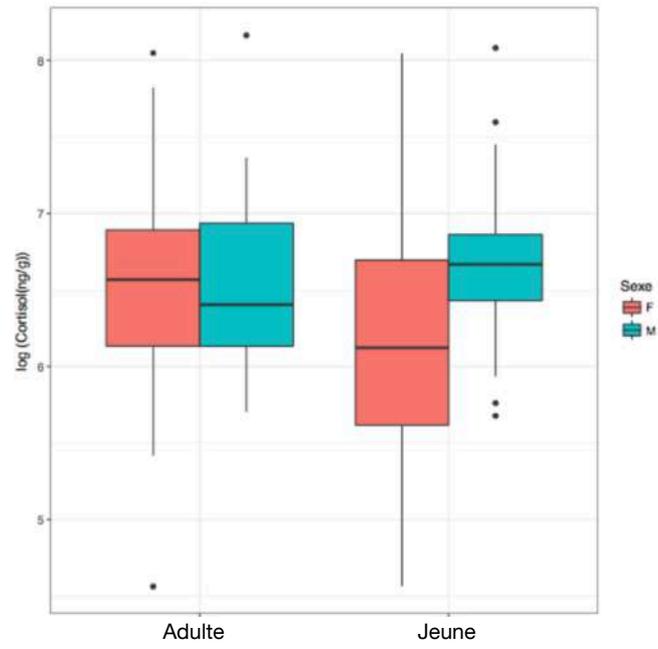


Figure 11 : Variation des niveaux de cortisol (ng/g) en fonction de l'âge et du sexe

Résumé

L'objectif innovant de cette étude est d'examiner la variation du microbiote intestinal en fonction des ressources présentes dans le milieu et de voir si le stress interfère dans cette relation chez le chevreuil sauvage (*Capreolus capreolus*). Nous avons mesuré le niveau de cortisol et caractérisé le microbiote intestinal de chaque individu à partir de matières fécales. La composition globale du microbiote intestinal chez le chevreuil répondait de manière significative à l'habitat, donc à la ration alimentaire, et au stress. Par exemple, l'abondance en glands est positivement corrélée à l'abondance relative des bactéries *Muribaculaceae* et négativement corrélée à l'abondance relative des *UCG-011*. De plus, le stress a induit des changements prononcés dans la structure du microbiote intestinal sachant l'habitat. En particulier, nous avons identifié un déclin des bactéries bénéfiques *Firmicutes* et une augmentation des *Bacteroidota* chez les animaux stressés majoritairement présents en prairie. Une tendance inverse a été observée pour chacun de ces phyla chez les individus présents majoritairement en cultures. Enfin, le stress joue un rôle dans la plasticité phénotypique, avec les chevreuils qui adaptent leur comportement spatial afin de limiter leur exposition aux facteurs de stress. Cette adaptation est possible grâce à la modulation du microbiote intestinal.

Mots-clés : Microbiote intestinal, environnement, régime alimentaire, cortisol basal, axe intestin-cerveau, *Capreolus capreolus*

Summary

The innovative objective of this study is to examine the variation in gut microbiota as a function of environmental resources and to see if stress interferes with this relationship in wild deer (*Capreolus capreolus*). We measured cortisol levels and characterized the gut microbiota of each individual from fecal material. The overall composition of the gut microbiota in deer was significantly responsive to habitat, and thus diet, and stress. For example, acorn abundance was positively correlated with the relative abundance of *Muribaculaceae* bacteria and negatively correlated with the relative abundance of *UCG-011*. In addition, stress induced pronounced changes in the structure of the gut microbiota knowing the habitat. In particular, we identified a decline in beneficial *Firmicutes* bacteria and an increase in *Bacteroidota* in stressed animals predominantly present in grasslands. An opposite trend was observed for each of these phyla in individuals present mostly in crops. Finally, stress plays a role in phenotypic plasticity, with deer adapting their spatial behavior to limit their exposure to stressors. This adaptation is possible through modulation of the gut microbiota.

Key words : Gut microbiota, environment, diet, baseline cortisol, brain-gut axis, *Capreolus capreolus*