



HAL
open science

Comparaison du microbiote bactérien digestif de poulets sélectionnés sur leur énergie métabolisable

Irène Gabriel, Sarah S. Guardia, Barbara B. Konsak, Maryse Leconte, Patricia Rideaud, Carole C. Moreau-Vauzelle, Christele Dupont, Sandrine Mignon-Grasteau

► To cite this version:

Irène Gabriel, Sarah S. Guardia, Barbara B. Konsak, Maryse Leconte, Patricia Rideaud, et al.. Comparaison du microbiote bactérien digestif de poulets sélectionnés sur leur énergie métabolisable. 9. Journées de la Recherche Avicole, Mar 2011, Tours, France. hal-02749812

HAL Id: hal-02749812

<https://hal.inrae.fr/hal-02749812>

Submitted on 4 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

COMPARAISON DU MICROBIOTE BACTÉRIEN DIGESTIF DE POULETS SÉLECTIONNÉS SUR LEUR ÉNERGIE MÉTABOLISABLE

Gabriel Irène¹, Guardia Sarah¹, Konsak Barbara¹, Leconte Maryse¹, Rideaud Patricia², Moreau-Vauzelle Carole²,
Dupont Christel², Mignon-Grasteau Sandrine¹

¹INRA - UR 83, URA -, 37380 NOUZILLY

²INRA - UE 1206, UEASM - 17700 SURGÈRES

Irene.gabriel@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Le microbiote digestif peut être modifié par de nombreux facteurs, comme l'alimentation dont les additifs alimentaires. Des facteurs intrinsèques à l'animal peuvent aussi être impliqués, telle que la génétique de l'individu du fait des interactions hôte-microorganismes. En particulier, la sélection génétique d'animaux sur leur capacité digestive, conduisant à une modification des composants non digérés par l'hôte représentant les substrats disponibles pour les micro-organismes de l'écosystème digestif, pourrait entraîner une modification du microbiote.

Ainsi, au cours de ce travail, nous avons comparé le microbiote digestif de deux lignées de poulets sélectionnées sur leur énergie métabolisable. Le microbiote a été étudié dans deux segments digestifs, l'iléon et les caeca, à la fois au niveau des contenus digestifs et au niveau des muqueuses. L'approche utilisée a été une méthode d'empreinte moléculaire. Les modifications du microbiote ont été étudiées par analyse de similarité des profils électrophorétiques d'ADN bactérien.

Les résultats montrent que ces animaux présentant des performances de croissance différentes, ainsi que des différences de développement de leurs organes digestifs, présentent aussi des différences au niveau de leur microbiote digestif. Ainsi des différences de degré de similarités entre profils bactériens d'animaux de la même lignée apparaissent au niveau des contenus aussi bien de l'iléon que des caeca. Par ailleurs, une légère différence de profils bactériens entre lignée est mise en évidence au niveau des contenus de l'iléon, ainsi qu'une nette différence au niveau des caeca aussi bien au niveau des contenus digestifs que des muqueuses.

Ainsi cette sélection génétique sur l'énergie métabolisable conduit à une nette modification du microbiote digestif.

ABSTRACT

Comparison of chicken digestive microbiota selected on their metabolizable energy

Digestive bacterial microbiota can be modified by several factors, as animal feed and several feed additives. Intrinsic factors may have an impact on microbiota, such as the genetics of the individual due to the host-microorganism interactions. Particularly, in the case of genetic selection of animals on digestive efficiency, non digested dietary compounds available to the digestive microbiota would vary, and this could change microbial populations within the gastrointestinal tract.

Thus during the present study, the digestive microbiota of two chicken strains divergently selected for metabolizable energy were compared. The microbiota was studied in both the digestive contents and mucosa, of the ileum and the caeca. The method used was a fingerprint molecular technique and the changes in microbiota were studied by similarity analyses of the bacterial DNA profiles.

The results showed that birds with different growth performance, which also have differences in the development of the digestive organs, exhibit differences in their digestive microbiota. Differences in the degree of similarity for the bacterial profiles of birds of the same strain were observed in the digestive contents of the ileum and the caeca. Moreover, a small difference in the bacterial profiles between the strains was observed in the ileal contents, along with clear differences in both the digestive contents and mucosa of the caeca.

Thus, this genetic selection based on metabolizable energy has resulted in a marked change in digestive microbiota.

INTRODUCTION

Le microbiote digestif peut être modifié par de nombreux facteurs, comme l'alimentation dont les additifs alimentaires, la présence de pathogènes digestifs ou le mode d'élevage. Des facteurs intrinsèques à l'animal peuvent aussi être impliqués, tel que la génétique de l'animal, du fait des interactions hôte-microorganismes, comme le suggère la forte variabilité inter-individuelle de ce microbiote (Gabriel et al, 2007 ; Guardia et al, 2009). L'influence de la génétique a aussi été montrée par la plus forte similarité de microbiote entre jumeaux homozygotes qu'entre individus non apparentés ou jumeaux dizygotes (Stewart et al, 2005). Cet effet génétique pourrait être lié aux interactions hôte-microorganismes (Hooper et Gordon, 2001).

Dans le cas particulier de la sélection génétique d'animaux sur leur capacité digestive, les substrats non digérés par l'hôte et par conséquent disponibles pour les micro-organismes de l'écosystème digestif sont différents, ainsi que les conditions rencontrées dans les différents biotopes digestifs. Ceci pourrait entraîner une modification du microbiote.

Pour déterminer si la sélection d'animaux sur ce critère de capacité digestive, peut avoir des conséquences sur le microbiote digestif, nous avons étudié celui-ci sur deux lignées de poulets divergentes (D+ et D-) sélectionnées sur leur énergie métabolisable à bilan azoté nul, EMAn (Mignon-Grasteau et al, 2004). Le microbiote digestif présentant des différences de composition à la fois le long de l'appareil digestif et entre les contenus et les muqueuses, cette étude a été effectuée à la fois au niveau de l'intestin grêle, lieu de la digestion, et au niveau des caeca, lieu où le microbiote est le plus concentré (Gabriel et al, 2005 ; Olsen et al, 2008 ; Guardia et al, 2010). Pour chacun de ces deux sites, nous nous sommes intéressées à la fois aux bactéries des contenus digestifs et à celles présentes au niveau des muqueuses. La plupart des bactéries digestive n'étant pas cultivables (Gabriel et al, 2005), nous avons utilisé une approche indépendante de la culture, qui est une technique moléculaire, l'électrophorèse en gradient de température dans le temps (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis : TTGE).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et dispositif expérimental

Les poulets utilisés (200 animaux ; mâles et femelles) provenaient des parents de la 10^{ème} génération des deux lignées divergentes (D+ et D-) précédemment indiquées (Mignon-Grasteau et al, 2004).

Après éclosion au couvoir de l'UEPEAT (INRA, Nouzilly), et vaccination contre la maladie de Marek et la bronchite infectieuse, les animaux ont été élevés au sol dans un parquet pendant les 12 premiers jours pour ne pas perturber la mise en place du microbiote

digestif. Pour chaque lignée et sexe, un parquet a été utilisé (soit 4 parquets dans la même cellule d'élevage) avec une densité de 12 animaux/m². A partir de 13j, les animaux ont été mis en cage pour contrôler leur consommation individuelle. Les conditions de température étaient les suivantes : 33°C à l'arrivée, puis une baisse graduelle jusqu'à 21°C à 22j. L'éclairage était continu de l'arrivée à 7j, puis de 7 à 23 j une période de lumière (5h-23h) alternait avec une période d'obscurité (23h-5h).

Les animaux ont reçu un régime contenant 20.5% de protéines et 2 943 kcal/kg, à base de blé de forte viscosité (blé Rialto ; 52.5%), comme celui utilisé au cours de la sélection de ces lignées (Mignon-Grasteau et al, 2004). Par ailleurs, l'anticoccidien utilisé était un produit de synthèse sans effet connu sur les bactéries (Clinacox® ; FDA, 1996).

1.2. Performances de croissance

Les animaux ont été pesés individuellement à l'éclosion, à 12j et à 22j. Leur consommation individuelle a été contrôlée de 12 à 22j. Leur efficacité alimentaire a été calculée.

1.3. Prélèvements et regroupement d'échantillons

A 23 jours, après euthanasie au CO₂, des prélèvements ont été réalisés sur 15 mâles et 15 femelles de chaque lignée, soit 60 animaux.

Pour déterminer le poids des organes digestifs, le proventricule, le gésier, le duodénum et le jéjunum ont été prélevés, dégraissés, vidés et pesés.

Pour étudier le microbiote digestif, des prélèvements ont été effectués au niveau de l'iléon (la moitié distale) et des caeca, à la fois au niveau des contenus digestifs et des muqueuses selon la méthode de Guardia et al (2009). Pour les contenus digestifs, des quantités similaires d'échantillons provenant de 5 animaux de la même lignée et du même sexe ont été regroupés. Pour les échantillons appelés 'muqueuses' correspondant aux bactéries associées au mucus, les échantillons de l'ensemble du segment de chaque animal ont été rassemblés par groupe de 5 animaux.

1.4. Analyse du microbiote digestif

L'ADN bactérien a été extrait avec le kit G-Name® (Bio 101) selon la méthode de Furet et al (2009).

Après amplification par PCR de la région variable V6-V8 de l'ADNr 16S bactérien en utilisant des amorces ciblant l'ensemble des bactéries, les produits PCR ont été séparés par une méthode d'empreinte moléculaire sur gel, la TTGE, selon la méthode décrite par Gabriel et al (2007). Un marqueur de migration contenant un mélange de produits PCR issus de clones de 8 espèces bactériennes différentes a été déposé sur chaque gel.

1.5. Analyses statistiques

Les profils de TTGE obtenus sur un même gel, ont été comparés en utilisant le logiciel GelCompar II (Applied Maths, Belgique). Le marqueur de migration

a été utilisé pour normaliser les profils. Les coefficients de similarité entre les pistes ont été calculés en tenant compte de la position et de l'intensité des bandes en utilisant la méthode des corrélations de Pearson (seuil de similarité positive : 98%). Pour déterminer si les profils diffèrent entre les lignées et les sexes, le logiciel StatFingerprint Version 1.3 a été utilisé (Michelland et al, 2009). Une matrice de similarité a été construite en utilisant le coefficient de Pearson. Une analyse statistique de la similarité (ANOSIM) entre les profils a été effectuée. La valeur R d'ANOSIM indique le degré de similarité des groupes. Ceux-ci sont considérés comme différents pour $p < 0,05$ et $R > 0,25$ ($R > 0,75$, groupes bien séparés ; $0,50 < R < 0,75$: groupes séparés avec des recouvrements ; $0,25 < R < 0,5$: groupes séparés avec de très forts recouvrements). Ces valeurs de similarités ont aussi été explorées graphiquement par une technique de nMDS (non Metric Multidimensional Scaling). Le degré de contrainte imposé lors de la réduction dimensionnelle est représenté par le stress de Kruskal.

Les autres analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel StatView® (Abacus concepts, Berkeley, CA, USA). Pour les performances de croissance et le poids des organes digestifs, l'effet de la lignée et du sexe a été étudié par analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs. Les différences significatives entre groupes ont été déterminées en utilisant le test de Student-Newman-Keuls ($P \leq 0,05$). Pour les coefficients de similarité calculés pour chaque paire de profils des 6 pools de chaque lignée, les moyennes ont été comparées avec le test de Student ($p \leq 0,05$).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les gains de poids des D+ sont supérieurs à ceux des D- au cours des périodes 0 à 12 j (+8% et +25% pour les mâles et les femelles respectivement), et 12 à 22 j (+24% et 15% pour les mâles et les femelles respectivement). Cette meilleure croissance des D+ au cours de la seconde période est liée à un indice de consommation nettement meilleur que les D- (-31%), ces derniers présentant une consommation supérieure (+19%). Ceci est conforme aux résultats antérieurs obtenus avec ces lignées (de Verdal et al, 2010). La surconsommation des D- est probablement liée à une adaptation de ces animaux pour tenter de satisfaire leur besoin énergétique.

Le poids des organes digestifs montre un effet significatif de la lignée au niveau du gésier et de l'intestin grêle avec chez les D+ un développement plus important du gésier que chez les D- ($22,0 \pm 0,65$ g/kg et $15,6 \pm 0,48$ g/kg respectivement ; moyenne \pm SE) et au contraire un développement moins important du duodénum ($12,6 \pm 0,31$ g/kg et $15,9 \pm 0,48$ g/kg) et du jéjunum ($17,8 \pm 0,38$ g/kg et $25,9 \pm 0,69$ g/kg) conforme aux observations précédentes avec cette lignée au même âge (de Verdal et al, 2010),

bien que dans cette étude nous n'observons pas de différence significative du poids du proventricule ($5,7 \pm 0,23$ g/kg et $5,3 \pm 0,19$ g/kg ; $p=0,15$). Ce fort développement de l'intestin grêle des D- est probablement un mécanisme d'adaptation pour compenser le faible développement de la région gastrique.

L'observation des profils microbiens ne montre aucun effet du sexe ou du pool. Au contraire, un net effet de la lignée est observé, aussi bien au niveau de similarité intra-lignée, que de leur structure. Ainsi au niveau des contenus digestifs d'iléon, les profils bactériens des D+ sont moins similaires que ceux des D- (Tableau 1), Au contraire, au niveau des contenus des caeca, les profils bactériens des D+ sont plus similaires que ceux des D-. Au niveau des muqueuses, que ce soit dans l'iléon ou les caeca, aucune différence n'est observée. La plus grande similarité du microbiote des D+ dans les contenus caecaux pourrait provenir d'un environnement moins variable qui pourrait être dû à une plus grande homogénéité des substrats disponibles comme le montre la plus grande homogénéité de digestibilité fécale des animaux D+ (Garcia et al, 2007). A l'opposé, la plus faible similarité chez les D+ dans les contenus de l'iléon est surprenante, mais pourrait provenir d'autres facteurs que les substrats disponibles telles que les conditions physicochimiques qui pourraient différer entre les 2 souches, comme le pH (H. de Verdal, comm. pers.).

Au niveau de la structure du microbiote, des différences importantes apparaissent entre les 2 lignées (Tableau 2) comme illustrées par les figures 1 et 2 pour les contenus de caeca. Ainsi, au niveau des contenus digestifs, aussi bien au niveau de l'iléon que des caeca, une différence apparaît, bien qu'il y ait un fort recouvrement des profils entre les deux lignées dans le cas de l'iléon, alors que dans les caeca, la différence de structure est beaucoup plus nette avec seulement quelques recouvrements. Au niveau des muqueuses, alors qu'aucune différence n'est mise en évidence dans l'iléon, une très nette différence de structure apparaît dans les caeca avec seulement quelques recouvrements. Ces différences de microbiote digestif entre les lignées D+ et D- confortent les résultats de Garcia et al (2007) suggérant un microbiote digestif propre à chacune des 2 lignées du fait des conséquences différentes de l'ajout d'antibiotiques à forte dose sur la quantité de sels biliaires et la digestibilité des lipides. Or certaines bactéries comme les lactobacilles ont un rôle dans la digestion des lipides via l'hydrolyse des sels biliaires. La différence de microbiote entre les lignées D+ et D- dans les contenus digestifs pourrait provenir des résidus alimentaires différents entre les deux lignées du fait de leur différence de digestibilité (Mignon-Grasteau et al, 2004), ainsi que de la différence de fonctionnement du proventricule-gésier, et donc des sécrétions acides, ainsi que des quantités de composants antimicrobiens tels les enzymes digestives et les acides biliaires contribuant à la

réduction du nombre de certains groupes bactériens (Garcia et al, 2007 ; Péron et al, 2007 ; de Verdal et al, 2010). La plus forte différence de microbiote entre les deux lignées dans les caeca par rapport à l'iléon pourrait provenir de la différence de composition microbienne entre ces deux compartiments. En effet, l'iléon contient environ 10^{10-11} bactéries/g de contenu et est composé principalement de bactéries aéro-tolérantes telles que les lactobacilles, alors que les caeca contiennent environ 10^{11-12} bactéries/g essentiellement anaérobies et représentant de nombreux groupes phylogénétiques, principalement des clostridies et des bactéroïdes (Gabriel et al, 2005 ; Guardia et al, 2010).

La différence de microbiote des muqueuses des caeca en fonction des lignées D+ et D- pourrait provenir de production de mucus différente comme suggérée par le moins grand nombre de cellules à mucus au niveau des villosités intestinales chez les D+ par rapport au D- (de Verdal et al, 2010). De plus, la composition de ces mucines, ainsi que des cellules desquamées et des sécrétions digestives, pourraient présenter des variations selon ces deux lignées de poulets. Or le microbiote présent dans le mucus, dépend de ces différents composants à la fois en tant que substrats et en tant que paramètres de son biotope (ions, pH, ...). L'absence de différence de microbiote au niveau des muqueuses de l'iléon, contrairement aux caeca pourrait provenir des différences de microbiote entre ces deux segments (Olsen et al, 2008), lié à un environnement propre à chacun de ces segments en terme de composition en mucines ainsi que de sécrétions digestives et production de cellules desquamées (Sharma et al, 1997 ; Denbow, 1999). Globalement, les modifications de microbiote observées dans le cas de ces deux lignées de poulet pourraient provenir aussi d'autres différences de physiologie digestive de ces deux lignées comme leur transit et leur motricité digestive (Rougière et al, 2010 a et b), compte tenu de l'influence de la physiologie

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Collins, S. M., Bercik, P., 2009. *Gastroenterology*, 136, 2003-2014.
- de Verdal, H., Mignon-Grasteau, S., Jeulin, C., Le Bihan-Duval, E., Leconte, M., Mallet, S., Martin, C., Narcy, A., 2010. *Poult. Sci.*, 89, 1955-1961.
- Denbow, D. M. (1999). In : *Sturkie's avian physiology* (P. D. Sturkie Ed.) Academic Press, San Diego (USA), pp 299-325.
- FDA. 1996. NADA number 140-951
- Furet, J. P., Firmesse, O., Gourmelon, M., Bridonneau, C., Tap, J., Mondot, S., Doré, J., Corthier, G., 2009. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 68, 351-362.
- Gabriel, I., Mallet, S., Sibille, P., 2005. *INRA Prod. Anim.*, 18, 309-322.
- Gabriel, I., Leconte, M., Guillon, J., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., 2007. 7^{ème} Journ. Recherche Avicole, 28-29/03/2007, Tours, France, 224-228.
- Garcia, V., Gomez, J., Mignon-Grasteau, S., Sellier, N., Carré, B., 2007. *Animal*, 1, 435-1442.
- Guardia, S., F. Recoquillay, Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I., 2009. 8^{ème} Journ. Recherche Avicole, 25-26/03/2009, St Malo, France, 5 pages.
- Guardia, S., Recoquillay, F., Juin, H., Lessire, M., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Guillot, J.F., Gabriel, I., 2010. 7th Joint Symposium Rowett-INRA on Gut Microbiology, 23-25/06/2010, Aberdeen, UK, p130.
- Hooper, L. V., Gordon, J. I., 2001. *Science*, 292, 1115-1118.

digestive sur le microbiote (Hooper et Gordon, 2001 ; Collins et Bercik, 2009). Par ailleurs les différences de comportements de ces deux souches (Pelhaitre, 2010) pourraient aussi en partie être impliquées dans les modifications du microbiote digestif du fait de l'action du système nerveux central sur ce microbiote (Collins et Bercik, 2009).

Par ailleurs, cette modification de communauté bactérienne pourrait contribuer en partie aux différences de performance entre les 2 lignées, du fait de l'action du microbiote sur la physiologie digestive de l'hôte (Gabriel et al, 2005 ; Leser et Molbak, 2009).

CONCLUSION

Ainsi cette étude montre que la sélection de poulet sur l'EMAn a des conséquences sur le microbiote digestif, variable selon la localisation dans le tractus digestif. Ces différences de composition de microbiote pourraient contribuer à expliquer les différences d'EMAn entre les deux lignées. Cette voie de sélection pourrait contribuer à la maîtrise du microbiote pour permettre de produire des animaux en minimisant la consommation d'antibiotiques. Des études sont en cours pour déterminer plus précisément les différences entre lignées, et comprendre si la sélection des animaux a modifié le contrôle génétique de certains facteurs qui contrôlèrent les interactions hôte-bactéries.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (Programme ANR-CHIEF 2010-2012). Les auteurs remercient le personnel de l'UEPEAT pour l'élevage des animaux, ainsi que les différentes personnes impliquées lors des prélèvements.

- Michelland, R. J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. *Mol. Ecol. Resour.*, 9, 1359-1363.
- Mignon-Grasteau, Muley, S., N., Bastianelli, D., Gomez, J., Peron, A., Sellier, N., Millet, N., Besnard, J., Hallouis, J. M., Carre, B., 2004. *Poult. Sci.*, 83, 860-867.
- Olsen, K. N., Henriksen, M., Bisgaard, M., Nielsen, O. L., Christensen, H., 2008. *Antonie Van Leeuwenhoek Intern. J. General and Mol. Microbiol.*, 94, 423-437.
- Pelhaitre, A. (2010). Master, Université Paris XIII, 27 pages.
- Rougiere, N., Carre, B., 2010a. *Animal*, 4, 1861-1872.
- Rougiere, N., 2010b. Thèse, Université de Tours, 249 pages.
- Peron, A., Svihus, B., Gabriel, I., Bérot, S., Tanguy, D., Bouchet, B., Gomez, J., Carré, B., 2007. *Br. Poult. Sci.*, 48, 370-380.
- Sharma, R., Fernandez, F., Hinton, M., Schumacher, U., 1997. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53, 935-942.
- Stewart, J. A., Chadwick, V.S., Murray, A., 2005. *J. Med. Microbiol.*, 54, 1239-42.

Tableau 1. Similarité intra-lignée (%) entre profils d'échantillon de même localisation (calculé à partir d'une matrice de coefficients de Pearson) (n=6 pools de 5 animaux)

	Contenu		Muqueuse	
	Iléon	Caeca	Iléon	Caeca
D+	49,7 ^b	60,3 ^a	71,3	46,4
D-	73,5 ^a	45,0 ^b	68,6	56,9
SEM	4.08	3.46	2.45	5.83
p	**	**	NS	NS

NS : non significatif ($p > 0.05$) ; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$; ^{a-b} Les moyennes sans lettre commune, au sein d'une même colonne pour un paramètre donné, différent significativement

Tableau 2. Effet de la lignée, du sexe et du pool sur les distances entre profils du microbiote digestif déterminées par ANOSIM (distances calculées à partir d'une matrice de distance de Pearson) (Pour chaque lignée et chaque sexe, n=6 pools de 5 animaux)

	Contenu				Muqueuse			
	Iléon		Caeca		Iléon		Caeca	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Lignée	0,30	**	0,61	**	0,19	NS	0,54	**
Sexe	-0,14	NS	0,10	NS	0,20	NS	0,15	NS
Pool	0,07	NS	-0,06	NS	-0,26	NS	-0,25	NS

NS : non significatif ($p > 0.05$) ; * : $p \leq 0.05$; ** : $p \leq 0.01$;

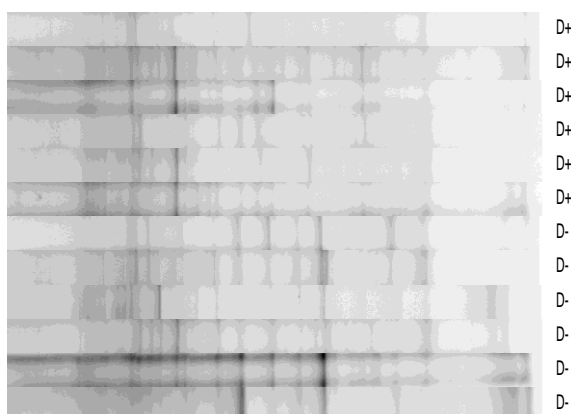


Figure 1. Profils TTGE de contenus de caeca des poulets des lignées D+ et D-

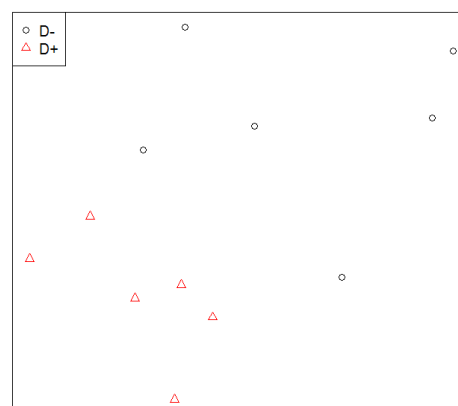


Figure 2. Représentation graphique par nMDS à deux dimensions des profils TTGE de contenus de caeca des poulets des lignées D+ et D- (Effectuée avec l'index de similarité de Pearson ; Stress de Kruskal : 12,079)

