

Explorer les fonctionnalités du microbiote pour comprendre son action sur son hôte animal : apports de la métaprotéomique et de la métabolomique

Irène Gabriel, Martin Beaumont

▶ **To cite this version:**

Irène Gabriel, Martin Beaumont. Explorer les fonctionnalités du microbiote pour comprendre son action sur son hôte animal : apports de la métaprotéomique et de la métabolomique. Réseau Microbiote Volaille (PoultryMic), Nov 2019, Paris, France. 79 diapo. hal-02788711

HAL Id: hal-02788711
https://hal.inrae.fr/hal-02788711

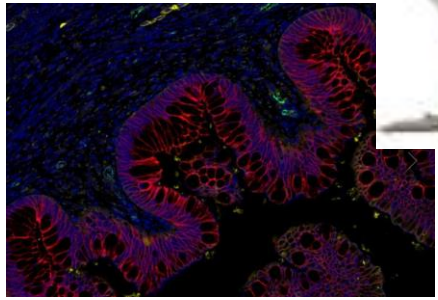
Submitted on 6 Nov 2020

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.

Explorer les fonctionnalités du microbiote pour comprendre son action sur son hôte animal : apports de la métaprotéomique et de la métabolomique









Irène Gabriel

Chargé de recherche
Equipe AliSE (Alimentation et Systèmes d'Elevage)
UMR BOA (Biologie des Oiseaux et Aviculture)
Centre INRA Val de Loire
37 380 Nouzilly

Martin Beaumont

Chargé de recherche
Equipe NED (Nutrition et Ecosystèmes Digestifs)
UMUR GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage)
Centre INRA Occitanie-Toulouse
31 326 Castanet Tolosan

De la description aux fonctionnalités du microbiote



1. Limite des approches descriptives par séquençage de régions variables du 16S

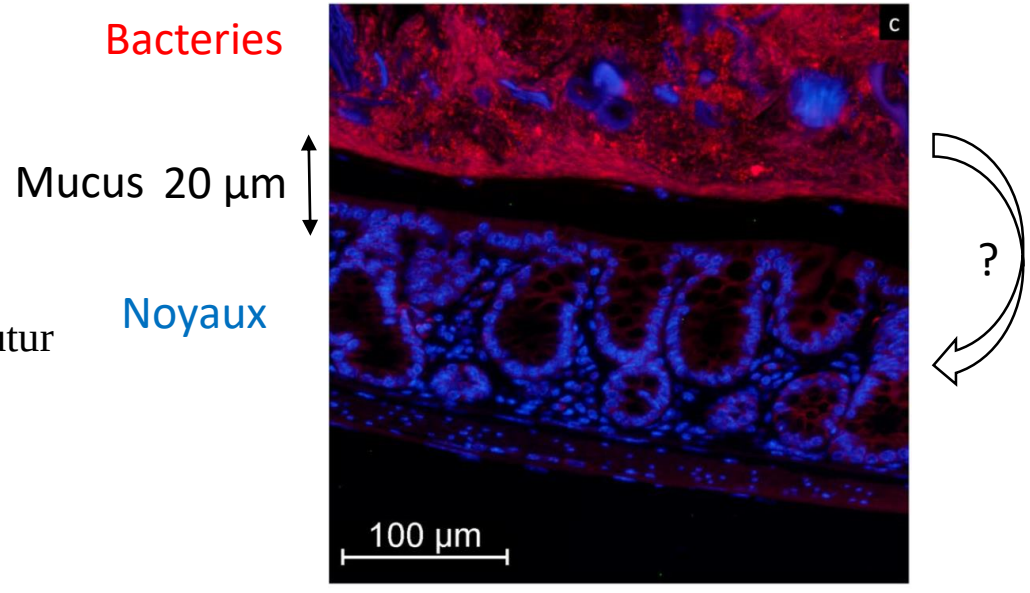
2. Du microbiote à ses effets sur l'Hôte

3. Métaprotéomique
   - 3.1. Définition, Principe
   - 3.2. Méthodes d'approche
   - 3.3. Applications dont en volailles
   - 3.4. Limites et améliorations attendues dans le futur



4, Métabolomique
   - 4.1. Définition, Principe
   - 4.2. Méthodes d'approche
   - 4.3. Applications
     - Homme : très nombreuses études
     - Lapin dont lien avec l'hôte (animal, organoïdes)
     - Volailles
   - 4.4. Limites et améliorations attendues dans le futur

5. Avantages et Limites actuelles des approches OMIC



Kamphuis, Sci Reports, 2017



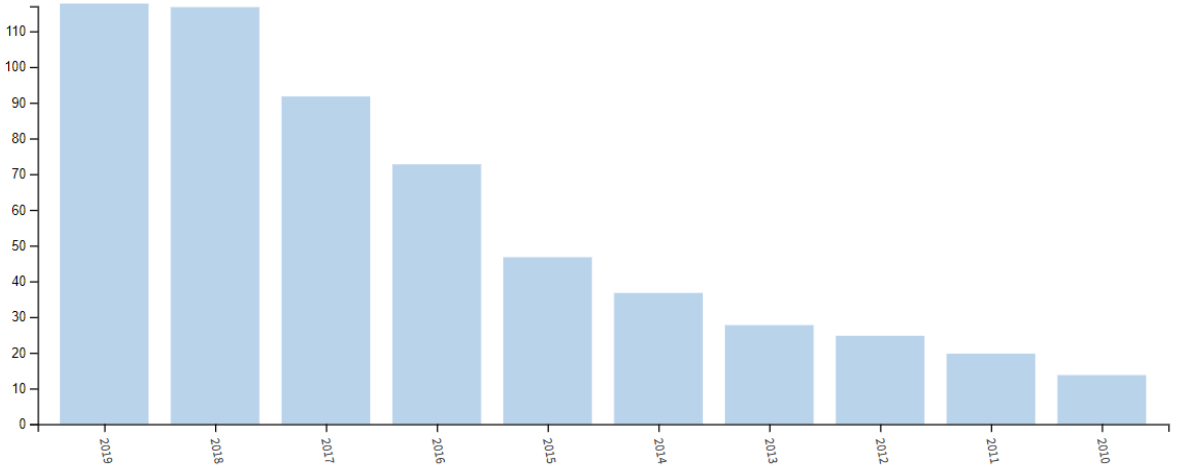
1. Limite des approches descriptives par séquençage de régions variables du 16S



Métagénomique ciblée

L'essentiel des travaux en volaille

Description de la composition du microbiote par séquençage de régions variables du 16S



Dépend de la région variable (V3-V4, V4-V5, …)

Biais : Extraction / Amplification / Séquençage

Falentin, H., et al. (2019). "Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding." Cahier des Techniques de l'Inra 97: 23 pages.

Problème

Compositions différentes → Fonctions similaires

Compositions similaires → Fonctions différentes

Ballou et al (2016) : caeca, 14 et 28 j, 6 anx / groupe

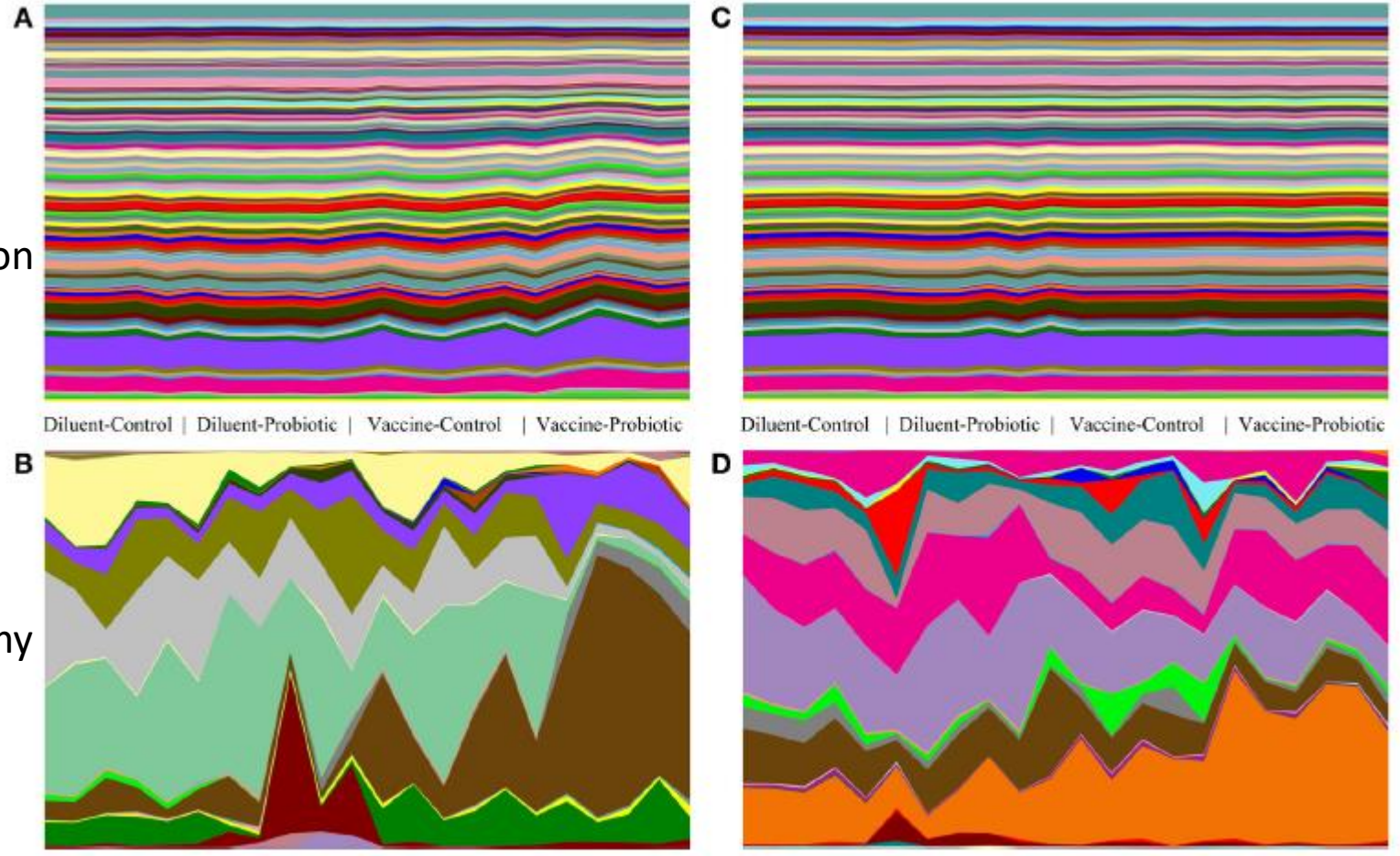
Etude de l'effet d'un vaccin anti-salmonelle et d'un probiotique à 14 et 28 j

Résultats : Les modifications de genes prédits sont nettement moins importantes que les modifications au niveau taxonomique

Day 14 Day 28

Gene Prediction

Taxonomy



Comparison of taxonomic and gene-group abundance trends at days 14 and 28.
Relative abundance of taxonomic groups and predicted abundance of functional gene groups demonstrate the stability of gene-group abundances relative to changes in taxonomic groups.
Relative abundance tables for taxa and gene group were assembled and used to generate area charts of all samples at days 14 and 28.

The relative abundance of every identified taxonomic or functional gene group is shown for each sample;
(A) predicted gene groups at day 14,
(B) taxonomic groups at day 14,
(C) predicted gene groups at day 28,
(D) taxonomic groups at day 28.

Microbiote digestif : Composition et FONCTIONS



Composition précise
(Marqueur phylogénétique 16S)



Qui sont-ils ?

Ensemble des gènes bactériens
Métagénome

Que FONT-ils ?

Potentiellement

Conditions
environnementales
du biotope

Ensemble
des produits bactériens
(Protéines, peptides, métabolites)

Réellement

Phénotype animal



Métagénomique

Objectif

Refers to the analysis of genomic DNA for mixtures of (often unknown) species.
Its purpose can be to assess the taxonomic composition of a mixed microbial community or to elucidate the functional potential of its members.

Inconvénient

Potentiel
Couteux (Séquençage, Traitement de données)



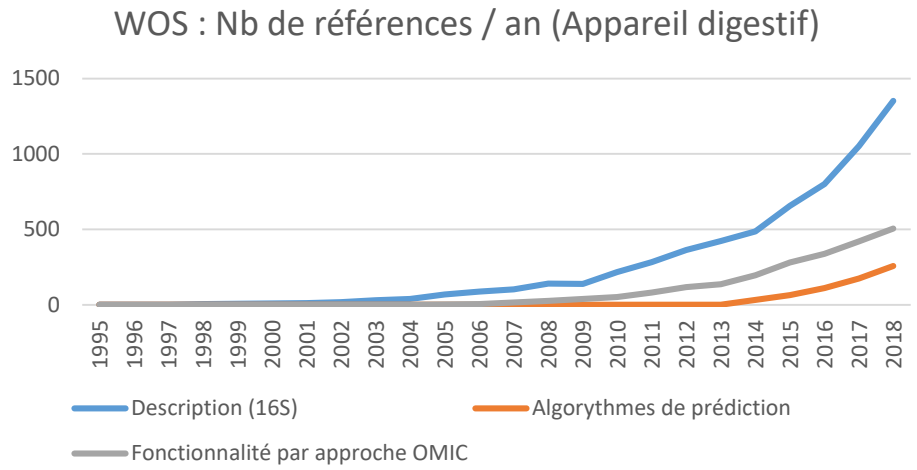
INRA SCIENCE & IMPACT

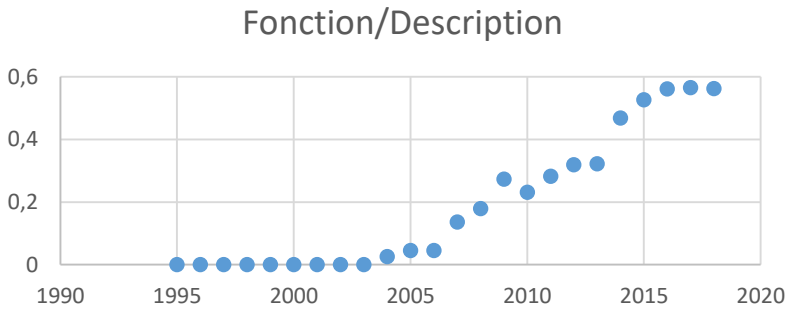
MetaChick (2015-2017)

Huang, P., et al. (2018). "The chicken gut metagenome and the modulatory effects of plant-derived benzylisoquinoline alkaloids." Microbiome 6.



Méthodes de Prédiction de fonctions





Différentes méthodes

Picrust (Langille et al , 2013)
Tax4Fun (Asshauer et al, 2015)
Piphillin (Iwai, S., et al. 2016)
…

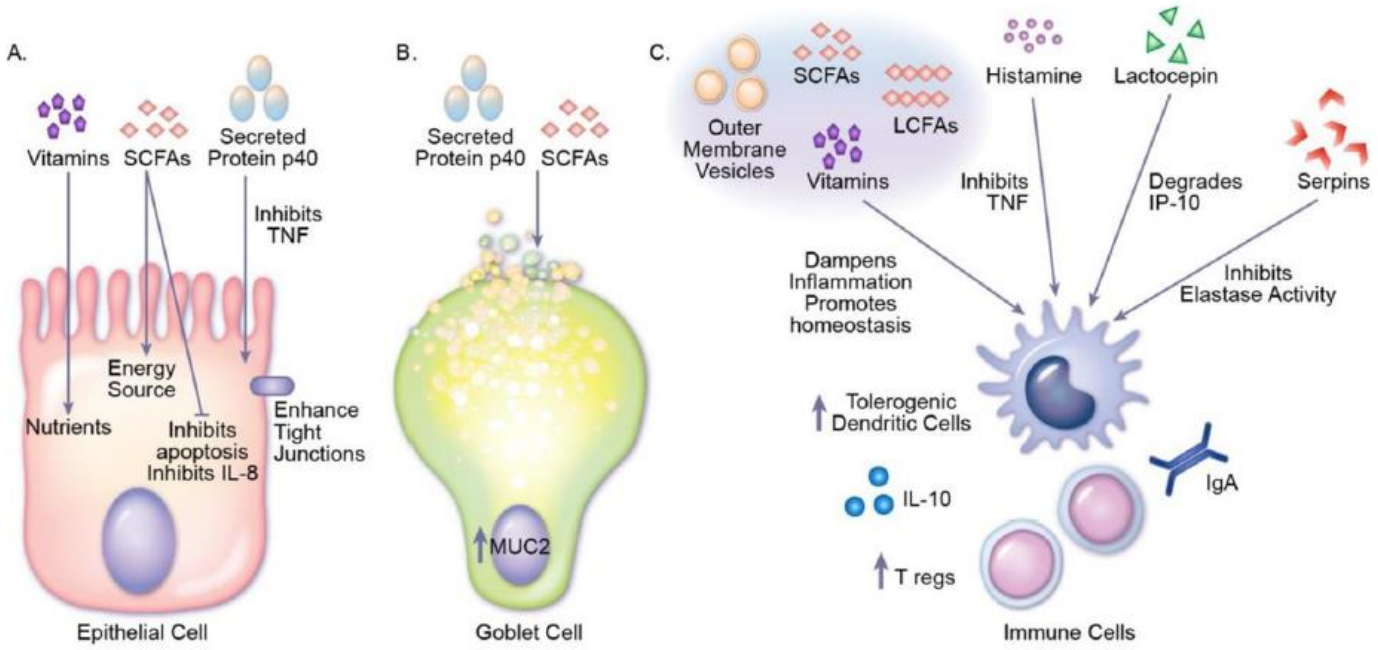
Prédiction
mais les résultats peuvent être meilleurs que des résultats de Métagénome de faible qualité (pas assez de séquences / ech)

Importance des produits bactériens dans la relation microbiote / hôte

Métagénome et prédiction de fonction d'après les gènes : insuffisant

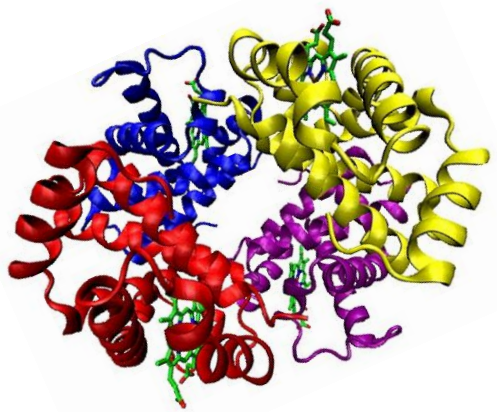
Ex : The production of cellulases by microbial cells is governed by genetic and biochemical controls including induction, catabolite repression, or end product inhibition.

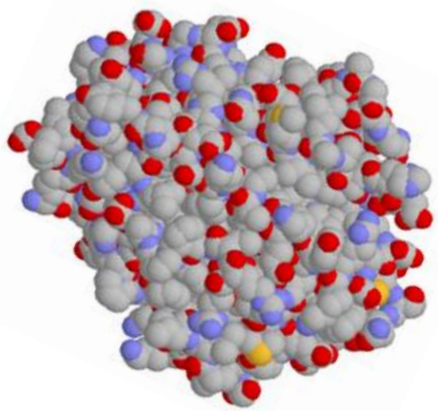
Engevik, M. A. and J. Versalovic (2017). "Biochemical Features of Beneficial Microbes: Foundations for Therapeutic Microbiology." Microbiol Spectr 5(5).



Mechanisms by which commensal secreted products beneficially modulate the host

3. Métaprotéomique





Objectif

Métaprotéomique : Caractériser l'activité microbienne en analysant le protéome de mélanges d'espèces bactériennes

Protéines bactériennes d'intérêt pour l'étude des interactions Microbiote / Hôte

Protéines bactériennes

- Protéines intra-cellulaires
- Protéines sur les membranes cellulaires (surfacéome : membrane cellulaire ou parois)
- Protéines secretées dans le milieu extracellulaire (exoprotéome, méta-exoprotéome, secrétome)

→ Protéines impliquées dans les interactions avec l'environnement extérieur

Avantages

Indicateur du phénotype réel

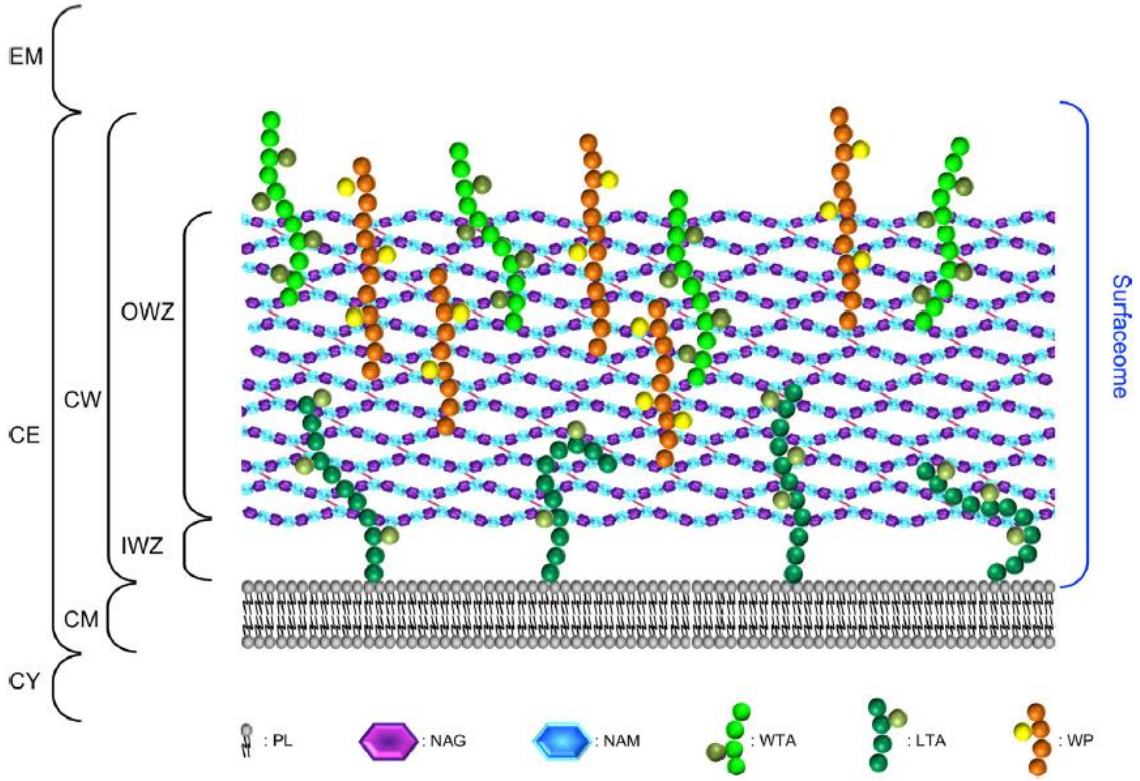
Permet de connaitre l'expression des protéines par les membres individuels du microbiote

Doit permettre un choix raisonné pour les moyens de modification de la composition du microbiote (probiotiques, alimentation, additifs alimentaires, conditions d'élevage, …) dans le but de sélectionner positivement les bactéries désirées et réduire / éliminer les bactéries néfastes

Surfacéome

Cell envelope of parietal monoderm bacteria (archetypal Gram-positive bacteria)

The cell envelope (CE) : a biological membrane acting as selective permeable barrier, i.e., the cytoplasmic membrane (CM) and a cell wall (CW) providing some resistance to mechanical stresses (e.g., internal turgor pressure) but also somehow acting as a philtre;
CY, cytoplasm; EM, extracellular milieu



Desvaux et al (2018)

The CM is composed of phospholipids (PLs),

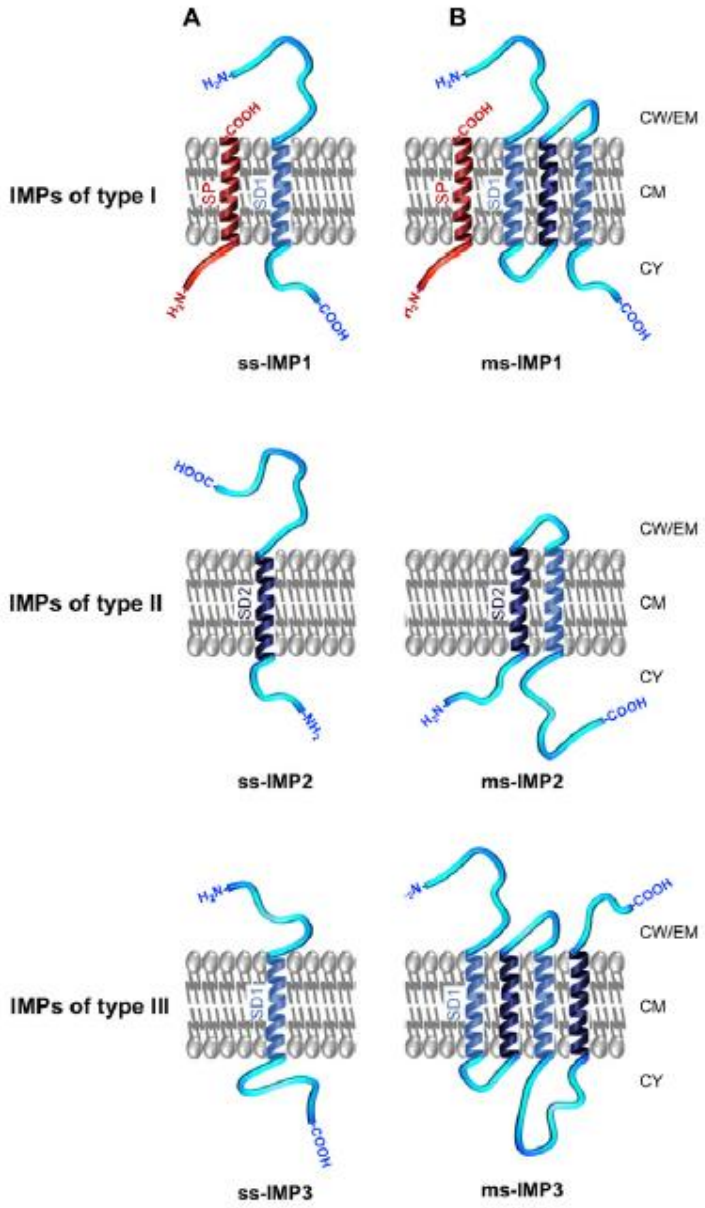
The CW : subdivided into the inner wall zone (IWZ) and the outer wall zone (OWZ).

The OWZ constitutes the main CW fabric. It is composed of N-acetylglucosamine (NAG) and N-acetylmuramic acid (NAM), both constituting the peptidoglycan (PG) with which wall teichoic acids (WTAs), and wall polysaccharides (WPs) are anchored. Lipoteichoic acids (LTAs) are anchored to the CM and protrude from the CM.

The IWZ is a thinner zone of low density most certainly devoid of most cross-linked polymeric CW network, except LTAs and some proteins, e.g., lipoproteins.

In addition to the proteins present both at the CM and CW and that are not depicted here for clarity (see other Figures), these different macromolecular molecules exposed on the external side of the CM constitute the surfaceome in parietal monoderm bacteria.

Integral membrane proteins (IMPs)



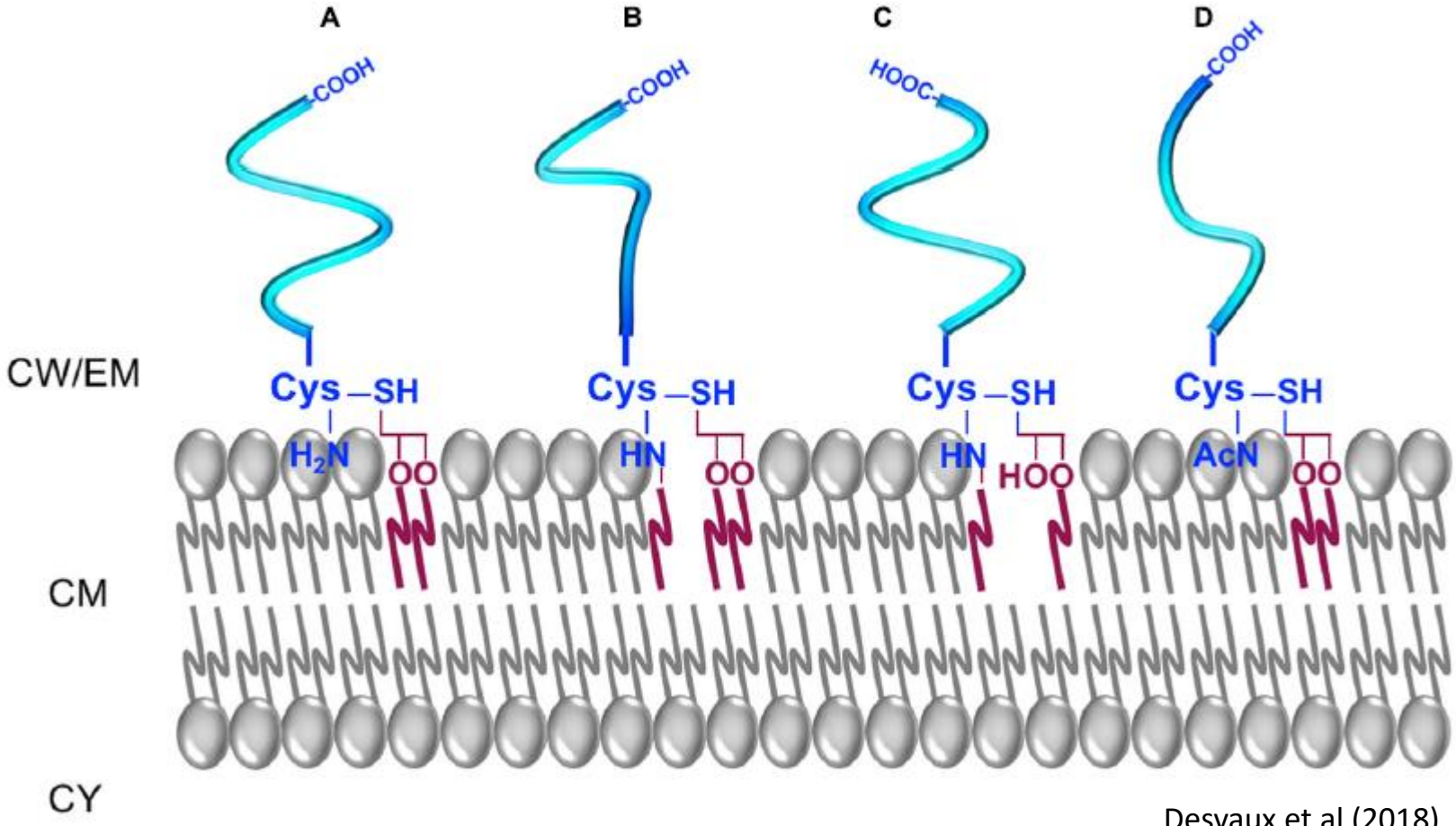
Topology and nomenclature of integral membrane proteins (IMPs).

IMPs are primarily categorised into
(A) single-spanning IMPs (ss-IMPs) and (B) multi-spanning IMPs (ms-IMPs).

Indeed, IMPs are anchored to the CM via hydrophobic transmembrane a-helical peptide domains (TMDs); when a TMD has a Nout–Cin topology, it is called a signal domain of type I (SD1; depicted in light blue), whereas a TMD with Nin–Cout topology is called a signal domain of type II (SD2; depicted dark blue) (White and von Heijne, 2004). In ss-IMPs, only one TMD is present, whereas at least two TMDs are present in ms-IMPs.
Whenever ss-IMPs or ms-IMPs, they are further subcategorised into three types.
A ss-IMP of type I (ss-IMP1) possesses a cleavable N-terminal signal peptide (SP; depicted in red) and are actually anchored to the CM by a SD1 (TMD with a Cin–Nout topology). A ss-IMP of type II (ss-IMP2) is anchored to the CM by a SD2 (TMD with a Nin–Cout topology). Like for a ss-IMP1, a ss-IMP of type III (ss-IMP3) is anchored to the CM by a SD1 but it did not originally exhibit a SP.
For ms-IMPs, the classification is similar and based on the most N-terminal TMD anchoring the ms-IMP to the CM. As such, a ms-IMP of type I (ms-IMP1) has a cleavable SP followed by a SD1. A ms-IMP of type II (ms-IMP2) has a SD2 as the most N-terminal TMD. A ms-IMP of type III (ms-IMP3) has a SD1 as the most N-terminal TMD (and no cleavable SP).
Of note, the TMD of a cleavable SP actually corresponds to a SD2; as such, a SD2 in IMPs of type II can be referred as an uncleavable SP. In ms-IMPs, a SD1 necessarily alternates with a SD2 along the polypeptide chain, and vice versa.
Except for the TMDs, other regions of the IMPs can be in contact with the IWZ but also the OWZ or the extracellular milieu.

Desvaux et al (2018)

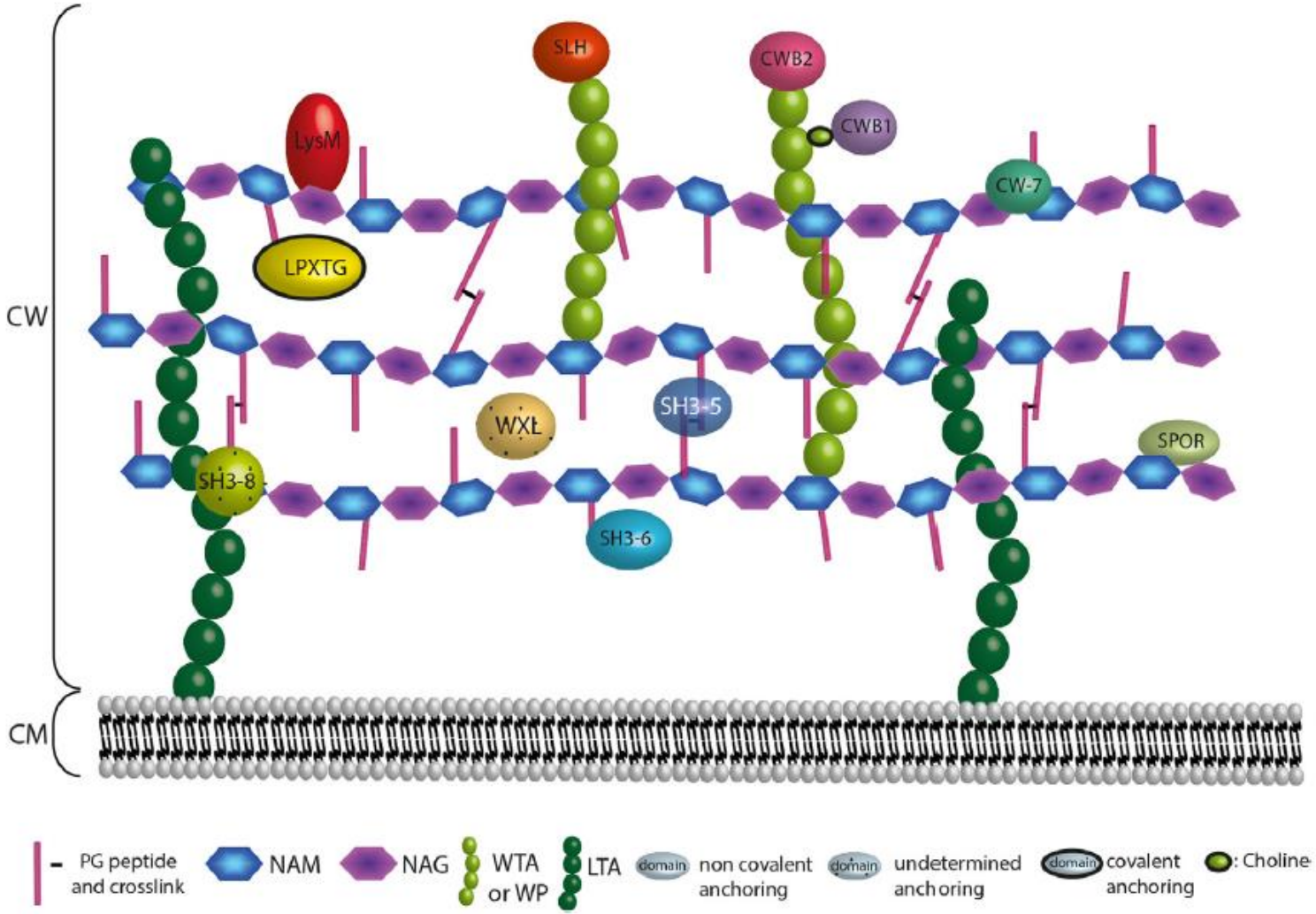
The different forms of lipoproteins in parietal monoderm bacteria



Desvaux et al (2018)

(A) A diacyl-lipoprotein contains an N-acyl-S-diacylated cysteine residue
(B) A N-acylated-triacyl-lipoprotein contains an N-acyl-S-triacylated cysteine residue.
(C) A lyso-lipoprotein contains an N-acyl-S-monoacyl-glyceryl-cysteine.
(D) A N-acetyl-form contains a N-acetyl-S-diacyl-glyceryl-cysteine

Proteins of the cell wall (CW)



Anchoring localization of protein domains interacting with the CW. The localization of the CW proteins depends on their domains. Domains are interacting covalently or not at the bacterial CW through interaction with surface structures that are the PG, the WTAs, the WPs or the LTAs. LPXTG proteins are covalently attached to the A2pm or K residue of the PG. Proteins harbouring a LysM, SH3 of type 5 (SH3-5), SH3 of type 6 (SH3-6), SPOR, or CW-7 domain interact non-covalently with the PG. WXL interacts with PG but the precise anchoring region is undetermined. Proteins possessing a CWB2 or SLH domain are localised at the WTAs or WPs extremities, whereas proteins harbouring a CWB1 domain interact with the WTAs through a choline. For SH3 of type 8 (SH3-8), the CW target remains controversial

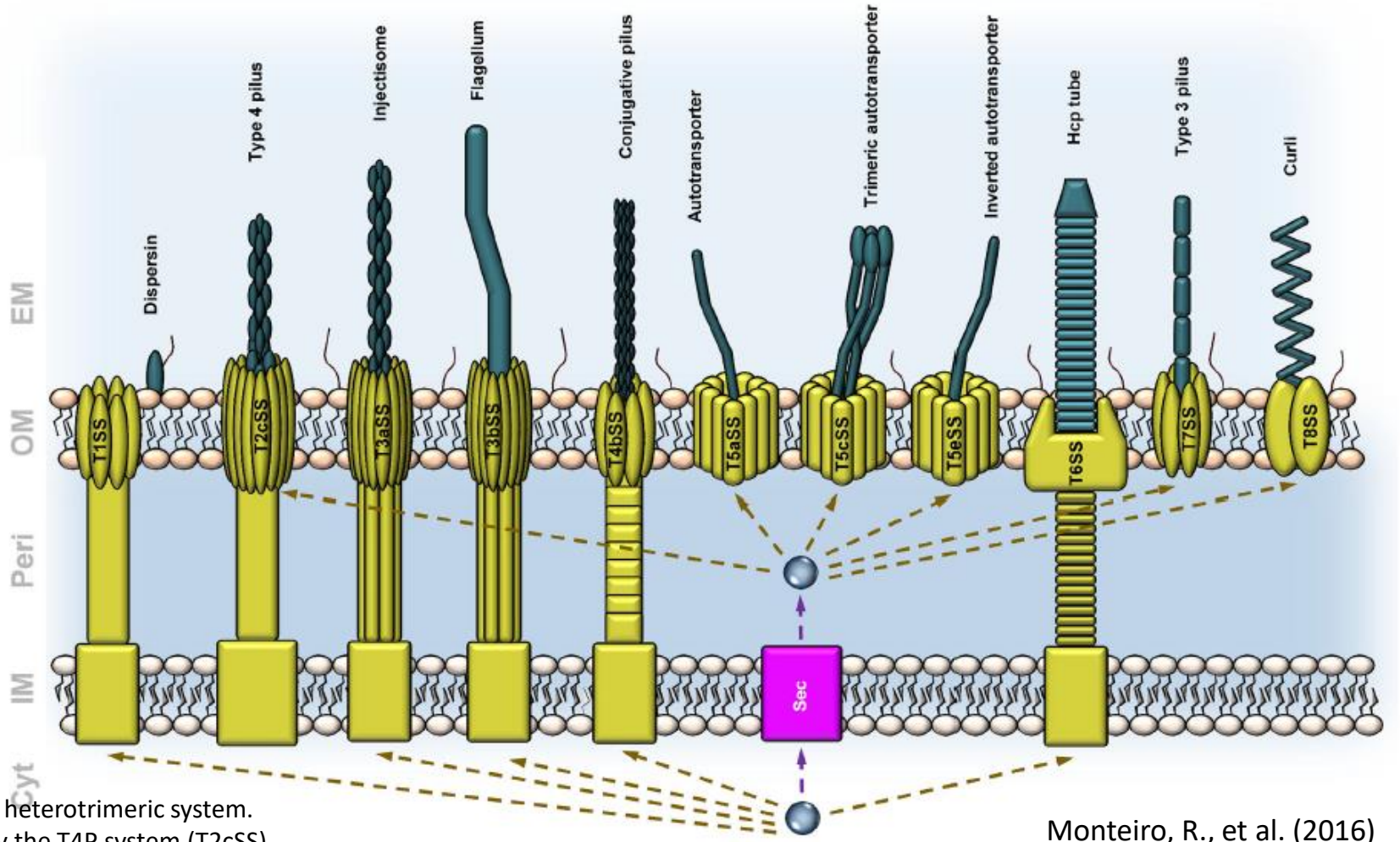
Desvaux et al (2018)

Secrétome

Overview of the complement of the secretome associated with the surface colonisation factors in STEC

STEC : Shiga toxin-encoding Escherichia coli

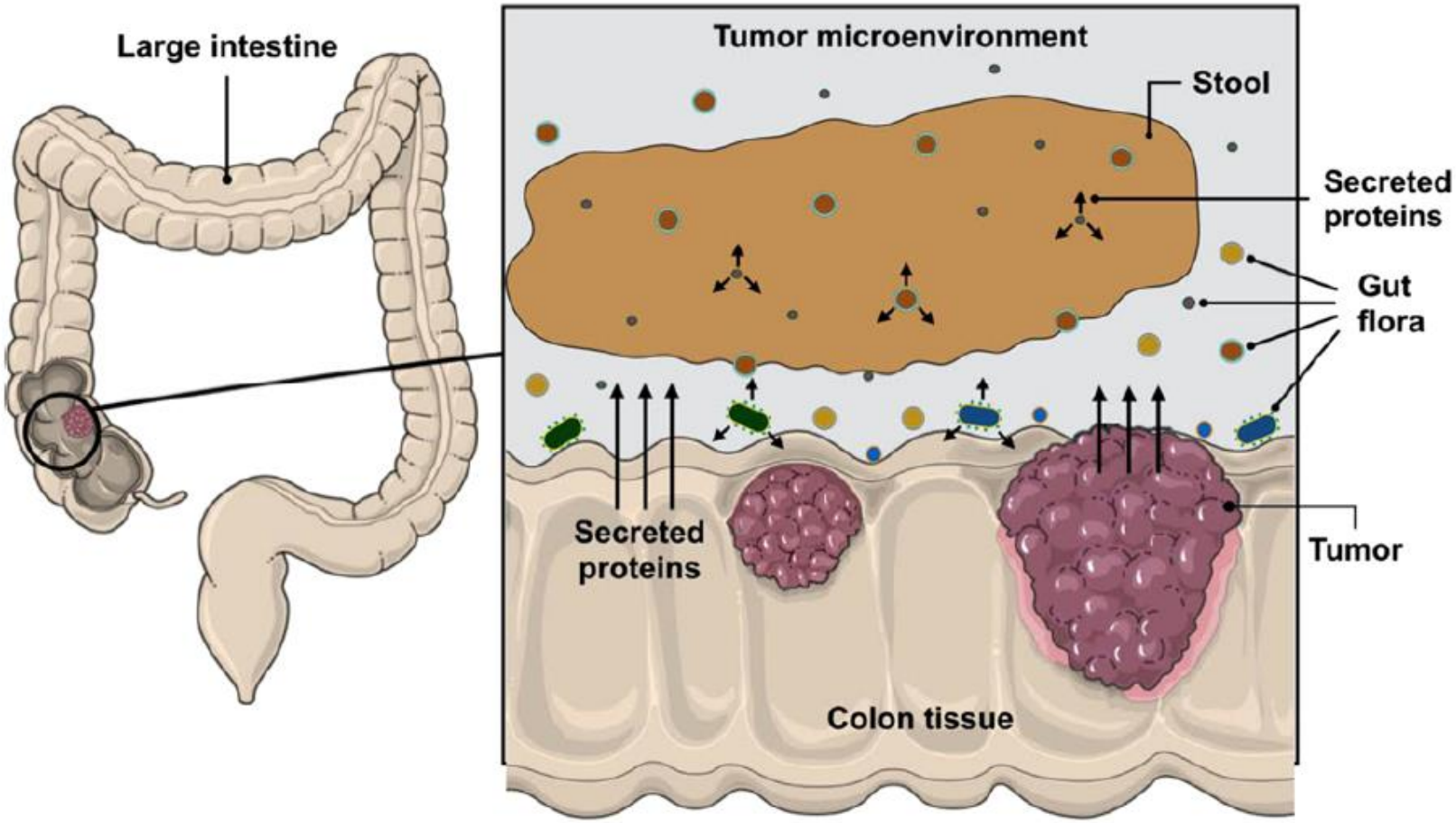
Protein export systems (coloured in violet)
Protein secretion systems (coloured in green)
Their cognate effectors directly involved in surface colonisation (coloured in blue)



Monteiro, R., et al. (2016)

T1SS: type I protein secretion system or the ABC-MFP-TolC heterotrimeric system.
T2SS: type II protein secretion system or the SDP, especially the T4P system (T2cSS).
T3SS: type III protein secretion system, including the injectisome (T3aSS) and flagellar (T3bSS) systems.
T4SS: type IV protein secretion system, especially the conjugative Tra system (T4bSS).
T5SS: type V protein secretion system, especially including the autotransporter (T5aSS), trimeric autotransporter (T5cSS) and inverted autotransporter (T5eSS) systems.
T6SS: type VI protein secretion system.
T7SS: type VII protein secretion system or the CU pathway.
T8SS: type VIII protein secretion system or the ENP pathway.
Cyt, cytoplasm; IM, inner membrane; Peri, periplasm; OM, outer membrane; EM, extracellular milieu

Secrétome : mélange de protéines secrétées par le microbiote et les tissus de l'hôte (sains et non sains)

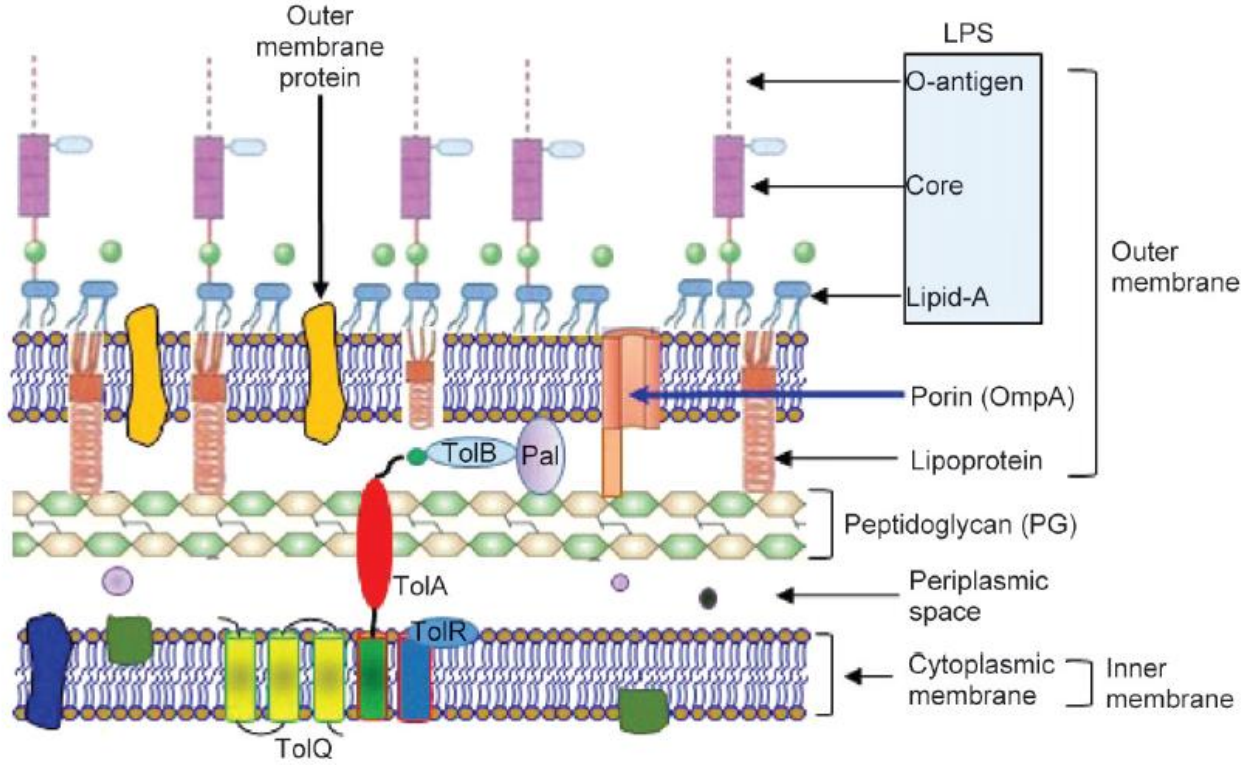


Azlan et al (2019)

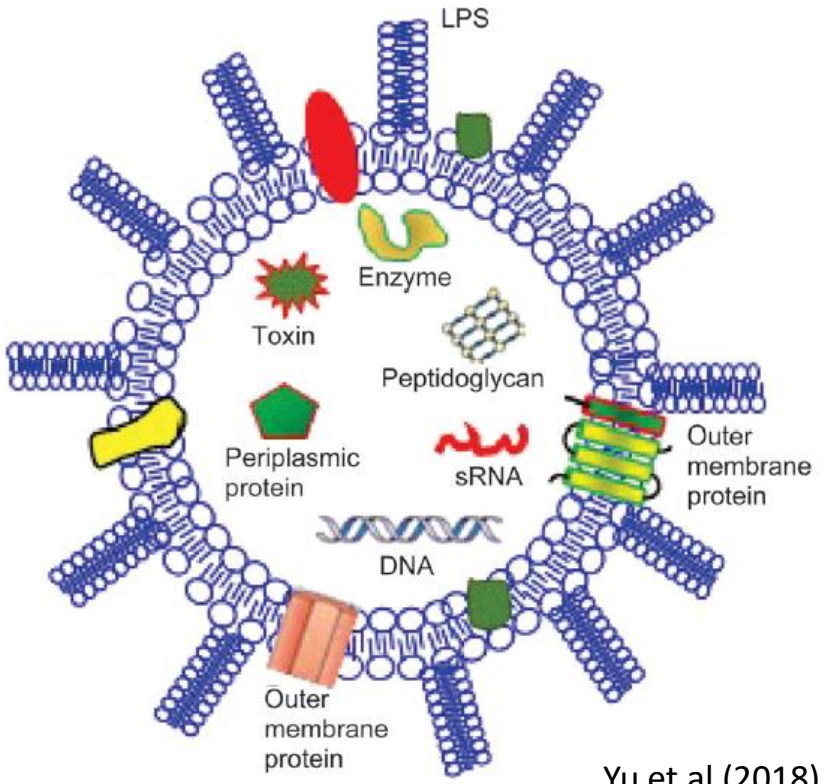
Stool samples as the fundamental source of secreted proteins for microbiome secretome studies.

In the colon tumor microenvironment, the gut flora, tumor, and normal tissues secrete abundance of proteins into the lumen and consequently bathe the stools thus becoming one of the best candidate sample to be studied for microbiome secretome

Outer membrane vesicles and their proteins (OMVs)



Yu et al (2018)



Yu et al (2018)

The architecture of the Gram-negative cell envelope.

The envelope consists of an outer membrane (OM), an inner membrane (IM), and a periplasm between the two membranes, which contains a thin layer of peptidoglycan (PG).

Composition of outer membrane vesicles (OMVs).

Generally, OMVs contain outer membrane components (ie, OM-anchored lipoproteins, OM phospholipids and LPS), periplasmic proteins (ie, autolytic enzymes), peptidoglycan, and virulence factors (ie, toxins in pathogenic bacterium-derived OMVs), DNAs and small non-coding RNAs (sRNAs).

Analyse métaprotéomique : Différentes étapes

Choix des protéines bactériennes ciblées

Ex : Protéines extra-cellulaires et membranaires spécifiques

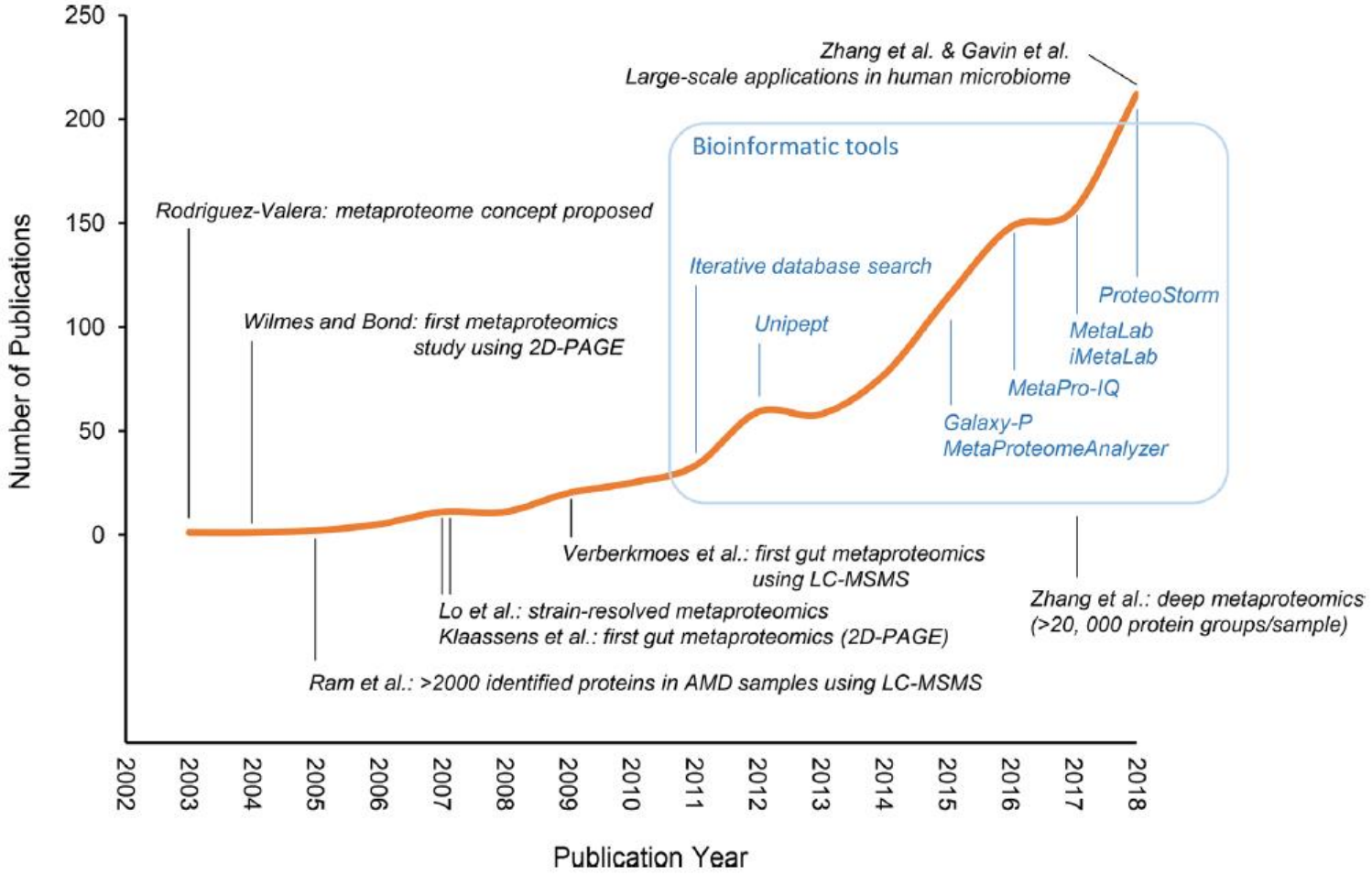
Analyse protéomique

Digestion trypsique
Séparation des peptides
Analyse des peptides

Analyse bio-informatique des séquences des peptides

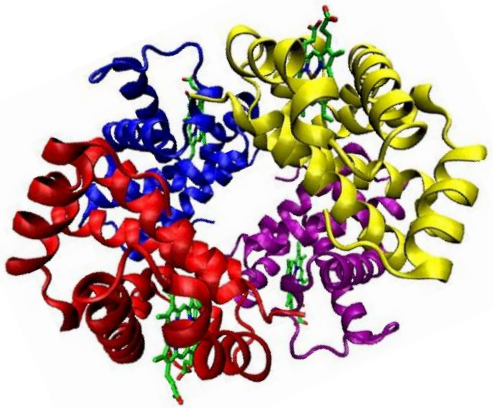


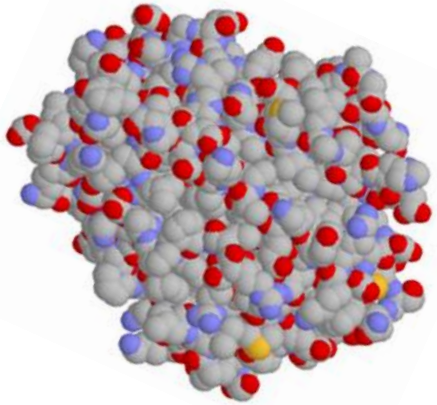
Utilisation : Faible, mais en développement exponentiel …



Lay-of-the-land of metaproteomics and its applications in human microbiome studies (2003−2018)

Zhang, X. et Figeys, D. (2019)





3.2. Application en volailles





Actuellement : 3 articles publiés



Première étude publiée

Poule (18 sem)
Féces
1 pool de 30 anx

Tang Y, Underwood A, Gielbert A, Woodward MJ, Petrovska L. 2014. Metaproteomics analysis reveals the adaptation process for the chicken gut microbiota. Appl Environ Microbiol 80:478-485.

Yue Tang ; Liljana Petrovska
Veterinary Laboratories Agency, Addlestone, Surrey, United Kingdom

Poulets
Caeca
5 ages
2 à 3 anx / age

Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sebkova, A., Sisak, F., Rychlik, I., 2016. Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken caecal microbiota. Appl Environ Microbiol., 82(5): 1569-1576.

Ivan Rychlik
Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Poulet
Jabot, caeca
2 x 3 aliments
2 pools de 4 anx

Tilocca, B., Witzig, M., Rodehutscord, M., Seifert, J. (2016). "Variations of Phosphorous Accessibility Causing Changes in Microbiome Functions in the Gastrointestinal Tract of Chickens." Plos One 11(10).

Jana Seifert
Institute of Animal Science, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

Première étude publiée : Microbiote fécal de la poule (Tang Y et al 2014)

Tang Y, Underwood A, Gielbert A, Woodward MJ, Petrovska L. 2014. Metaproteomics analysis reveals the adaptation process for the chicken gut microbiota. Appl Environ Microbiol 80:478-485.

Yue Tang ; Liljana Petrovska
Veterinary Laboratories Agency, Addlestone, Surrey, United Kingdom

Objectif We wished to assess the correlation between the metagenome (seq 16S) and the bacterial proteome in order to better understand the **healthy chicken** gut microbiota. Here, we performed high-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons and metaproteomics analysis of fecal samples to determine microbial gut composition and protein expression.

Conditions de l'étude

Animaux White Leghorn, 18 semaines

Conditions d'élevage dont alimentation

Salles protégées ; 2 groupes de 15 animaux
Aliment : Maïs, blé, soja (% NI) (non médicamenteux)



Echantillons digestifs Féces (NI), 1 pool de 30 animaux

Protéines microbiennes : protéines des cellules bactériennes

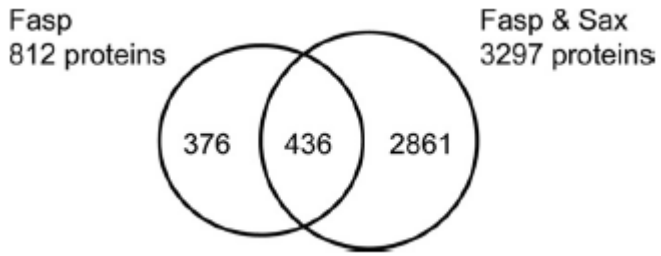
Conservation des ech post prelev : Echantillons extraits rapidement
Suspension des cellules bactériennes en vortexant (Tp P avec 0.1% de Tween 80; 4 fois)
Lavage (suspension en vortexant; 3 fois)
Hydrolyse des cellules bactériennes (sonication)

NI : non indiqué ou non identifié

Analyse protéomique

Digestion trypsique des protéines (kit Fasp; filtration sur colonne avec un seuil de 30 kDa)
± Fractionnement des peptides (protéines de faible abondance) par échange d'anion (SAX) suivi d'un dessalage
Séparation des peptides par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS/MS)
Identification des spectres (Mascot, NCBI)
Protéines redondantes, origine des protéines (UniProtKB)
Analyse ontologique (Gene ontology and KEGG pathway; iProXpress)

Résultats



Venn diagram of the number of shared proteins determined by both the Fasp ± SAX method

→ 3 673 protéines
Dont protéines redondantes
→ 3 487 protéines
799 genres bactériens

Région V4-V5
Bactéries
+ Archées

TABLE 1 Bacterial families and order identified by 16S rRNA sequencing

Bacterial family or order[a]	No. of sequences	% of total sequences
Clostridiales	2,422	25
Bacteroidaceae	2,206	21
Lactobacillaceae	2,011	19
Enterococcaceae	551	5
Porphyromonadaceae	1,383	13
Eubacteriaceae	487	5
Ruminococcaceae	314	3
Lachnospiraceae	205	2
Veillonellaceae	195	2
Rikenellaceae	140	1

96%

[a] Due to the resolution of 16S rRNA gene sequencing, *Clostridiales* is the order name.

TABLE 2 Numbers of proteins from bacteria and eukaryotes identified by proteomics

Bacterial genus	No. of proteins	% of total proteins identified
Lactobacillus	380	11
Clostridium	155	4
Streptococcus	66	2
Bacteroides	65	2
Bacillus	54	2
Plasmodium	52	1
Prevotella	44	1
Eubacterium	41	1
Ruminococcus	39	1
Escherichia	34	1
Enterococcus	34	1
Tetrahymena	33	1
Turicibacter	24	1
Vibrio	23	1
Staphylococcus	20	1

31%

TABLE 3 Most frequently identified proteins

Protein	No. of identifications	Reference(s)[a]
60-kDa chaperone (GroEL)	349	16, 27–30
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	279	31–33
Glutamate dehydrogenase	200	34
Elongation factor G	155	30, 35, 36
DNA-directed RNA polymerase subunit beta′	118	
Phosphoglycerate kinase	87	36
Elongation factor Tu	64	30, 37, 38
Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)	62	31
50S ribosomal protein L7/L12	57	30
Pyruvate kinase	44	36
Glucose-6-phosphate isomerase	43	
DNA-directed RNA polymerase	42	
Formate-tetrahydrofolate ligase	36	
L-Lactate dehydrogenase	23	33
Chaperone protein DnaK	18	16, 27–30
Fructose-bisphosphate aldolase	18	36
Triosephosphate isomerase	17	36

[a] References for proteins with adaptation-related functions.

Proteins implied in stress conditions :
Chaperone proteins, Proteases involved in the heat shock response, + Other stress proteins
→ May suggest that to live in the chicken gut, bacteria need to adapt to the environment
Body temperature: Chicken (39.8°C - 43.6°C) > human (37°C), pig (38.8°C)
Uric acid ?

Difficult to quantify how many of the proteins are actually used by bacteria for these functions → Gene ontology

Although pyruvate kinases were the most abundant proteins as determined by peptide counting, including 27 peptides from *Lactobacillus crispatus* JV-V01 pyruvate kinase, they were not the most frequently identified proteins in this study.

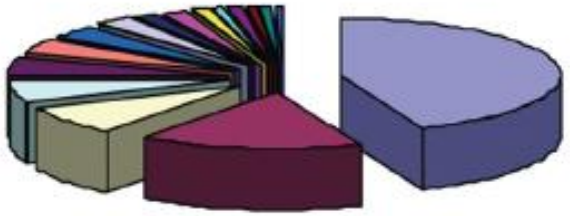
Identification de protéines non microbiennes (malgré les étapes de lavages)

Hôte : 146 protéines (Ex : mucines)

Aliment : Soja (19 glycines), riz (11 protéines), maïs (4 protéines), oignon

Rq : Régime : Maïs, Blé, Soja

A Cellular component



- GO:0005737 cytoplasm 44%
- GO:0044464 cell part 16%
- GO:0016020 membrane 8%
- GO:0043234 protein complex 7%
- GO:0005840 ribosome 5%
- GO:0030529 ribonucleoprotein complex 4%
- GO:0005576 extracellular region 4%
- GO:0009986 cell surface 3%
- GO:0005856 cytoskeleton 2%
- GO:0005634 nucleus 2%
- GO:0009536 plastid 1%
- GO:0030313 cell envelope 1%
- GO:0030312 external encapsulating structure 1%
- GO:0043190 ATP-binding cassette 1%

Gene ontology analysis of the identified proteins. The analysis was carried out with the Protein Information Resource bioinformatics tool, based on the 3,487 proteins mapped to UniProt identifications

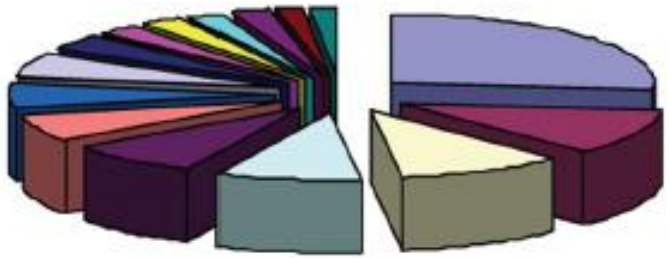
Membrane proteins : 8%

≠ Genomic sequencing analysis → 20 to 30% of membrane proteins

Protein extraction : 0.1% Tween 80

Kit Fasp; filtration sur colonne avec un seuil de 30 kDa

B Molecular function



- GO:0000166 nucleotide binding 27%
- GO:0016491 oxidoreductase activity 11%
- GO:0003676 nucleic acid binding 10%
- GO:0016740 transferase activity 9%
- GO:0016787 hydrolase activity 8%
- GO:0048037 cofactor binding 6%
- GO:0043167 ion binding 6%
- GO:0003824 catalytic activity 6%
- GO:0005515 protein binding 4%
- GO:0016829 lyase activity 3%
- GO:0005215 transporter activity 2%
- GO:0005198 structural molecule activity 2%
- GO:0016874 ligase activity 2%
- GO:0016853 isomerase activity 2%
- GO:0008233 peptidase activity 2%

As the total number exceeded 3,487, some proteins must have been defined in several functional groups.

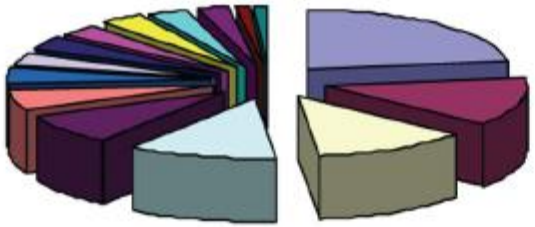
C Biological process



- GO:0005975 carbohydrate metabolic process 13%
- GO:0055114 oxidation-reduction process 13%
- GO:0006066 alcohol metabolic process 12%
- GO:0006091 generation of precursor metabolites and energy 7%
- GO:0046483 heterocycle metabolic process 7%
- GO:0006412 translation 7%
- GO:0019538 protein metabolic process 6%
- GO:0009117 nucleotide metabolic process 6%
- GO:0006457 protein folding 6%
- GO:0006520 cellular amino acid metabolic process 5%
- GO:0008152 metabolic process 4%
- GO:0006793 phosphorus metabolic process 4%
- GO:0006351 transcription, DNA-dependent 4%
- GO:0050896 response to stimulus 2%

Gene ontology analysis and pathway statistics of the identified proteins. The analysis was carried out with the Protein Information Resource bioinformatics tool, based on the 3,487 proteins mapped to UniProt identifications

D Pathway statistics



- (KEGG) 01100 Metabolic pathways 23%
- (KEGG) 01110 Biosynthesis of secondary metabolites 13%
- (KEGG) 01120 Microbial metabolism in diverse environments 12%
- (KEGG) 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis 12%
- (KEGG) 03018 RNA degradation 8%
- (KEGG) 00230 Purine metabolism 6%
- (KEGG) 00240 Pyrimidine metabolism 4%
- (KEGG) 00250 Alanine, aspartate and glutamate metabolism 4%
- (KEGG) 00330 Arginine and proline metabolism 3%
- (KEGG) 00910 Nitrogen metabolism 3%
- (KEGG) 03020 RNA polymerase 3%
- (KEGG) 00620 Pyruvate metabolism 3%
- (KEGG) 00680 Methane metabolism 3%
- (KEGG) 00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis 1%

Malgré l'abondance de protéines marqueurs de stress (Ex : GroEL), Les activités métaboliques bactériennes sont importantes

Microbiote du jabot et des caeca : Tilocca B et al (2016)

Tilocca, B., Witzig, M., Rodehutscord, M., Seifert, J. (2016). "Variations of Phosphorous Accessibility Causing Changes in Microbiome Functions in the Gastrointestinal Tract of Chickens." Plos One 11(10).

Jana Seifert
Institute of Animal Science, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany

Objectif Première étude sur l'effet de l'alimentation sur le métaprotéome du poulet

Conditions de l'étude

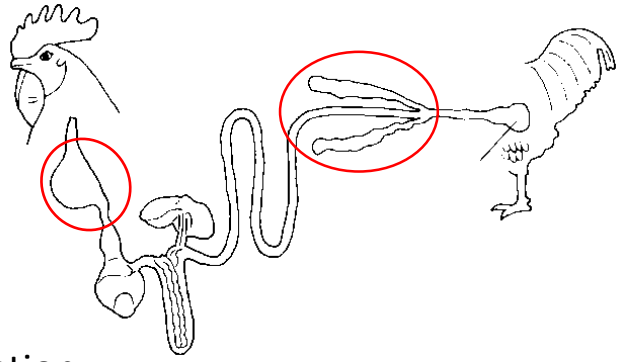
Animaux Poulet Ross 308 (mâles et femelles), 25 jours

Conditions d'élevage dont alimentation

Parquets (20 animaux / parquet, Taille (NI))

2 x 3 aliments

Régime de base maïs / soja
Phosphore issus des MP ou apport de phosphate de Ca
Phytase microbienne (0, 500 ou 12 500 U/kg)



Echantillons digestifs Jabot, caeca; 2 pools de 4 anx / traitements

Protéines microbiennes : protéines des cellules bactériennes

Conservation des ech post prelev : glace, -80°C
Suspension des cellules bact en vortexant (Tp P avec 0.1% de Tween 80), puis sonication, puis agitation à 200 g (5 fois)
Centrifugation à 15 000 g
Hydrolyse des cellules bactériennes (ultra sonication)

NI : non indiqué ou non identifié

Analyse protéomique

Purification par précipitation au TCA, puis par SDS-PAGE à 1D
Digestion trypsique dans le gel
Purification et désallage
Analyse LC-MS/MS
Approche en 2 étapes pour réduire le taux de faux positifs et améliorer l'évaluation de l'abondance
Identification des spectres (différents logiciels, NCBI)
Origine des protéines (UniProtKB)
Classification fonctionnelle en catégories COG et KEGG

Résultats

Identification des protéines

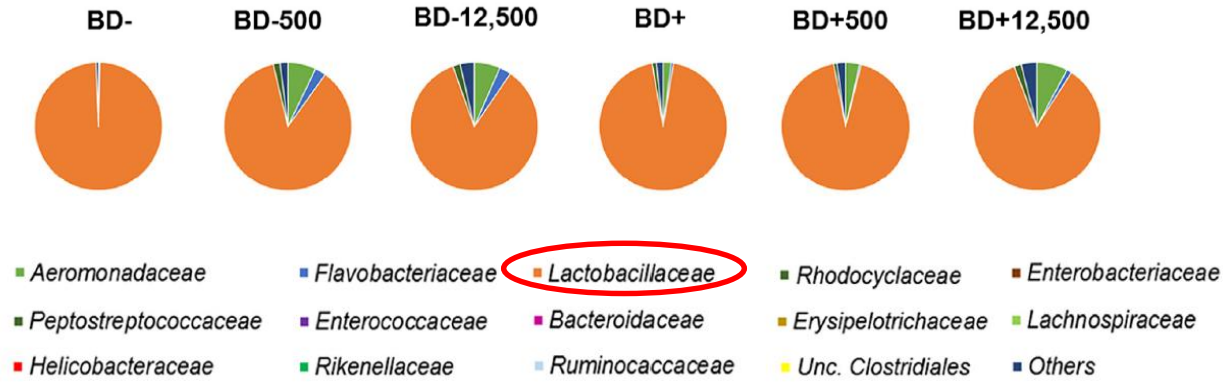
	Protéines bactériennes	Protéines de l'hôte (1)
Jabot	381	248
Caeca	1 719	405

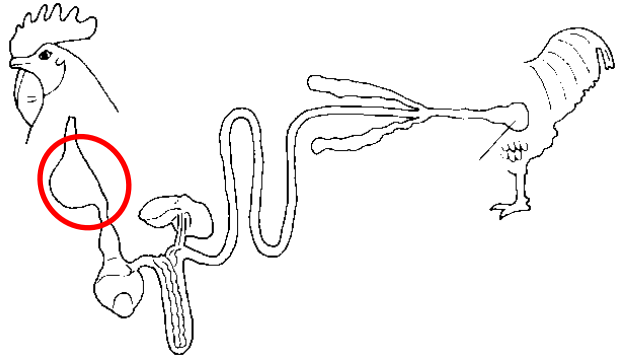
3,1% en commun

(1) Malgré le protocole 'cellules procaryotes'

Microbiota taxonomy using pyrosequencing data

Witzig et al (2015)
1 pool de 3 pools de 4 anx

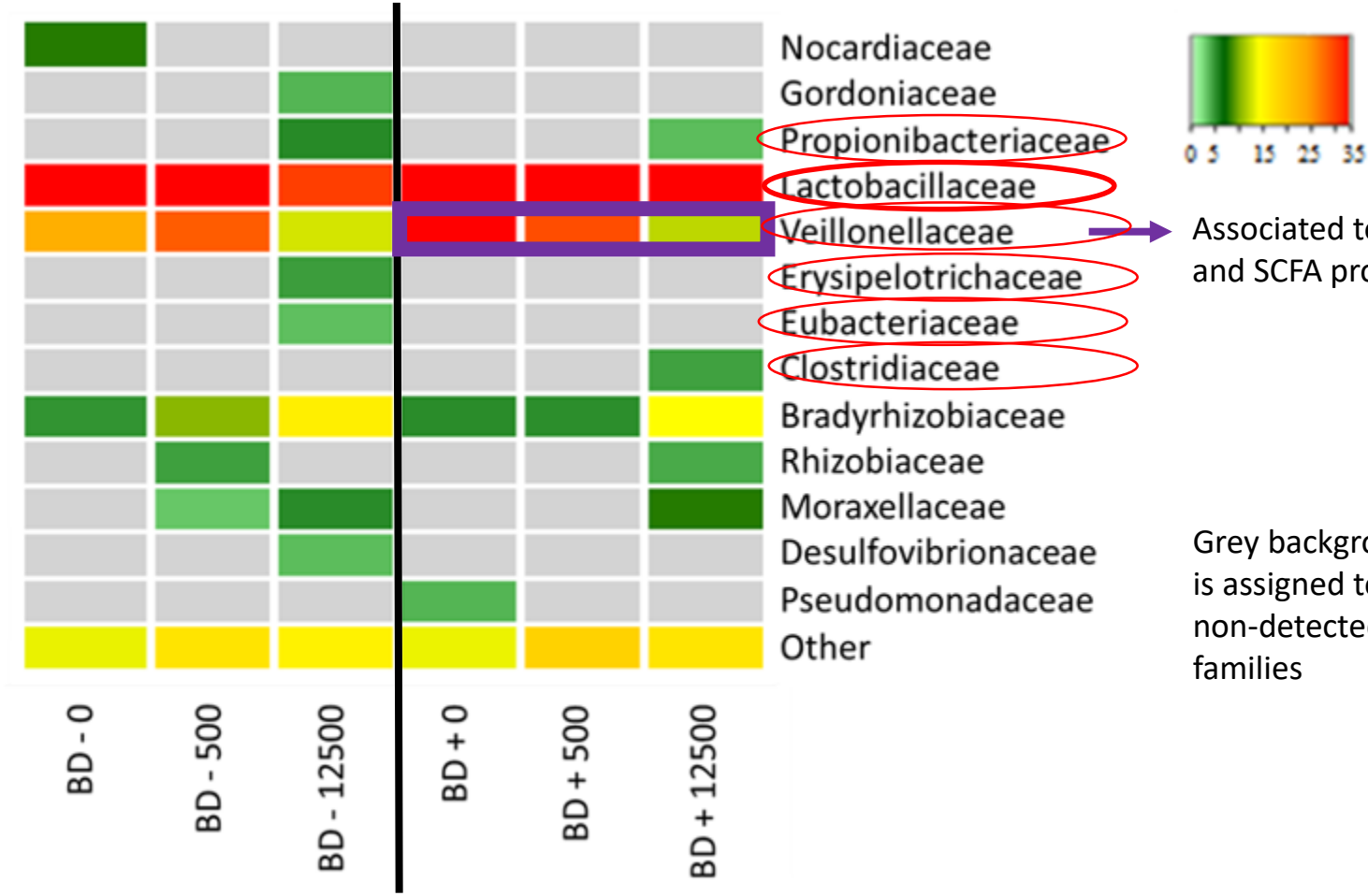




The phylogenetic composition of the bacterial proteins determined based on the abundance values of the proteins belonging to each bacterial family

Tilocca et al (2016)
2 pools de 4 anx

Only families with a cumulative abundance greater than 3% of the total were considered for phylogenetic analysis

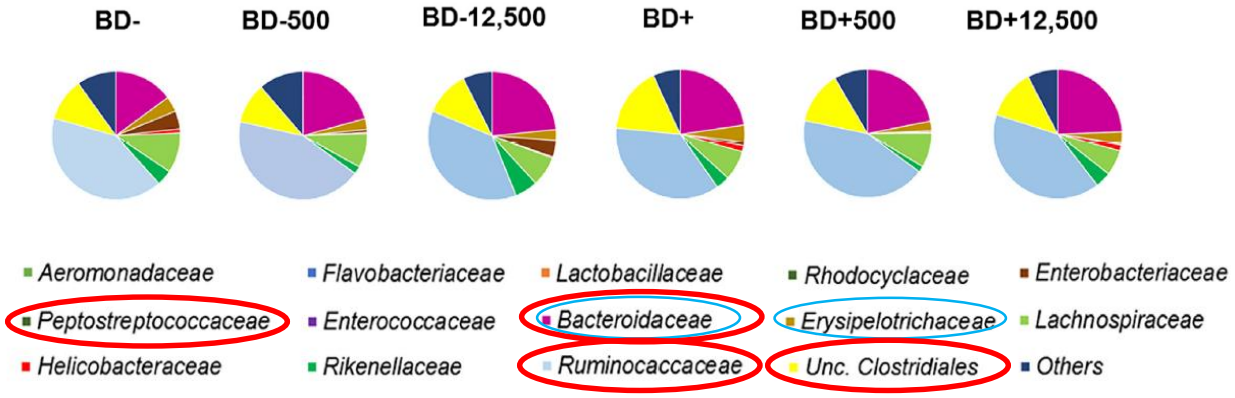


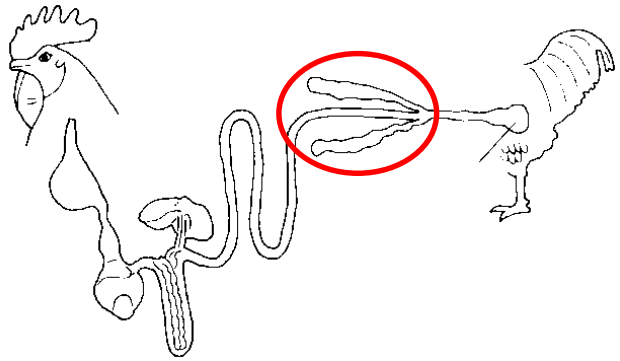
Associated to fiber digestion and SCFA production

Grey background is assigned to non-detected families

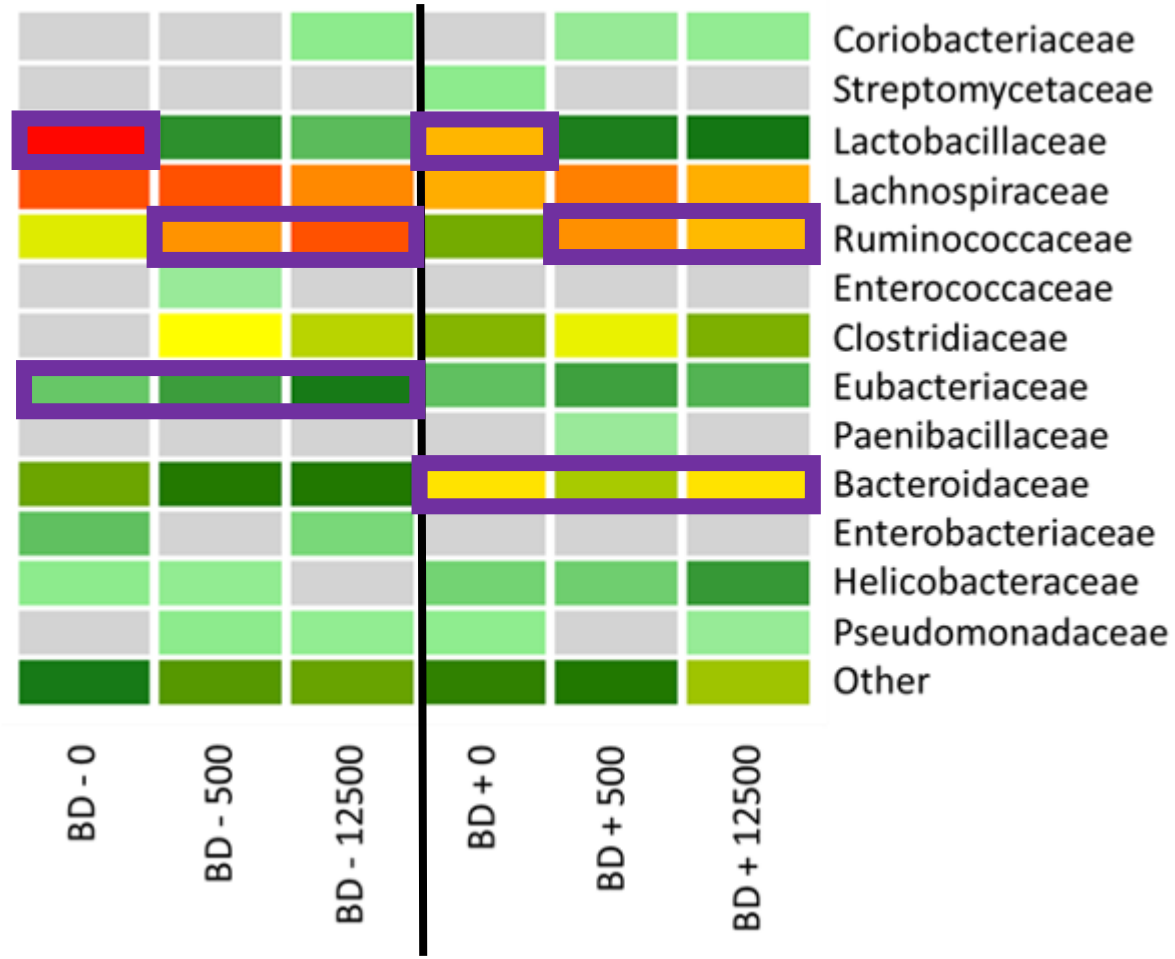
Microbiota taxonomy using pyrosequencing data

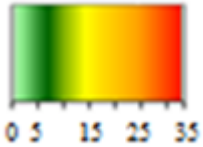
Witzig et al (2015)
1 pool de 3 pools de 4 anx





The phylogenetic composition of the bacterial proteins determined based on the abundance values of the proteins belonging to each bacterial family

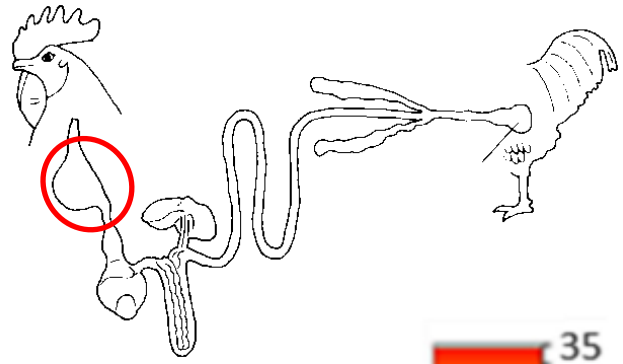


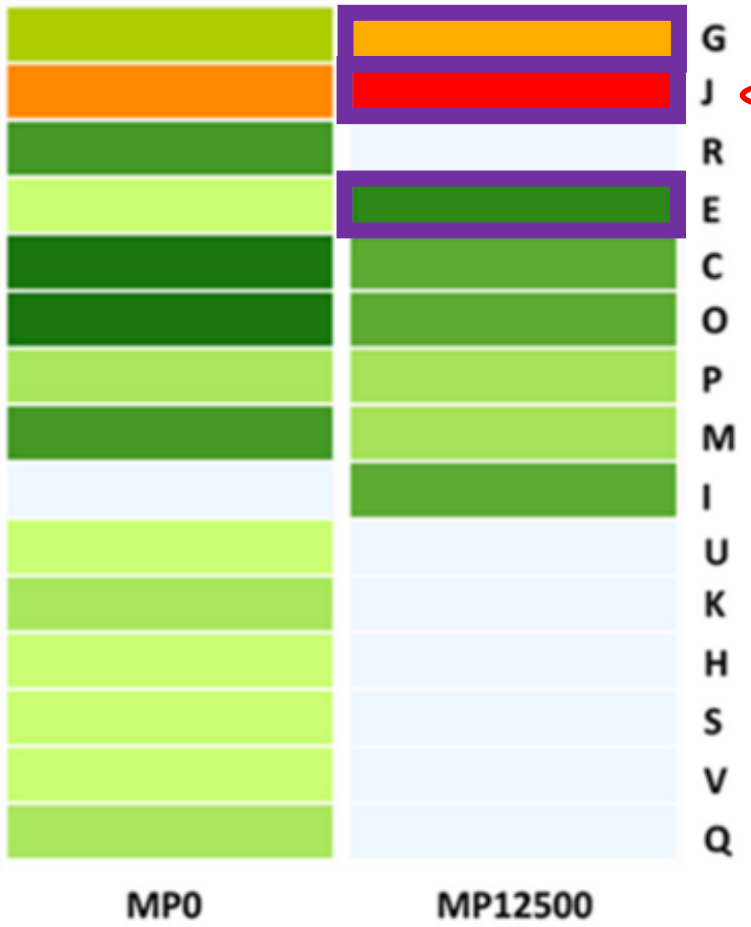


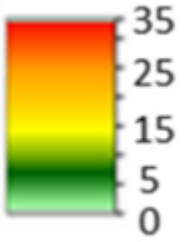
Grey background is assigned to non-detected families

Only families with a cumulative abundance greater than 1% of the total were considered for phylogenetic analysis

BD – (P issu des MP ➔ 0,45% P) ;
BD + (supplémentation phosphate ➔ 0,54 % P) ;
MP0 MP500 MP12500 (0-500-12500 U phytase/kg)
J25 – 2 pools de 4 anx (Tilocca et al., 2016)



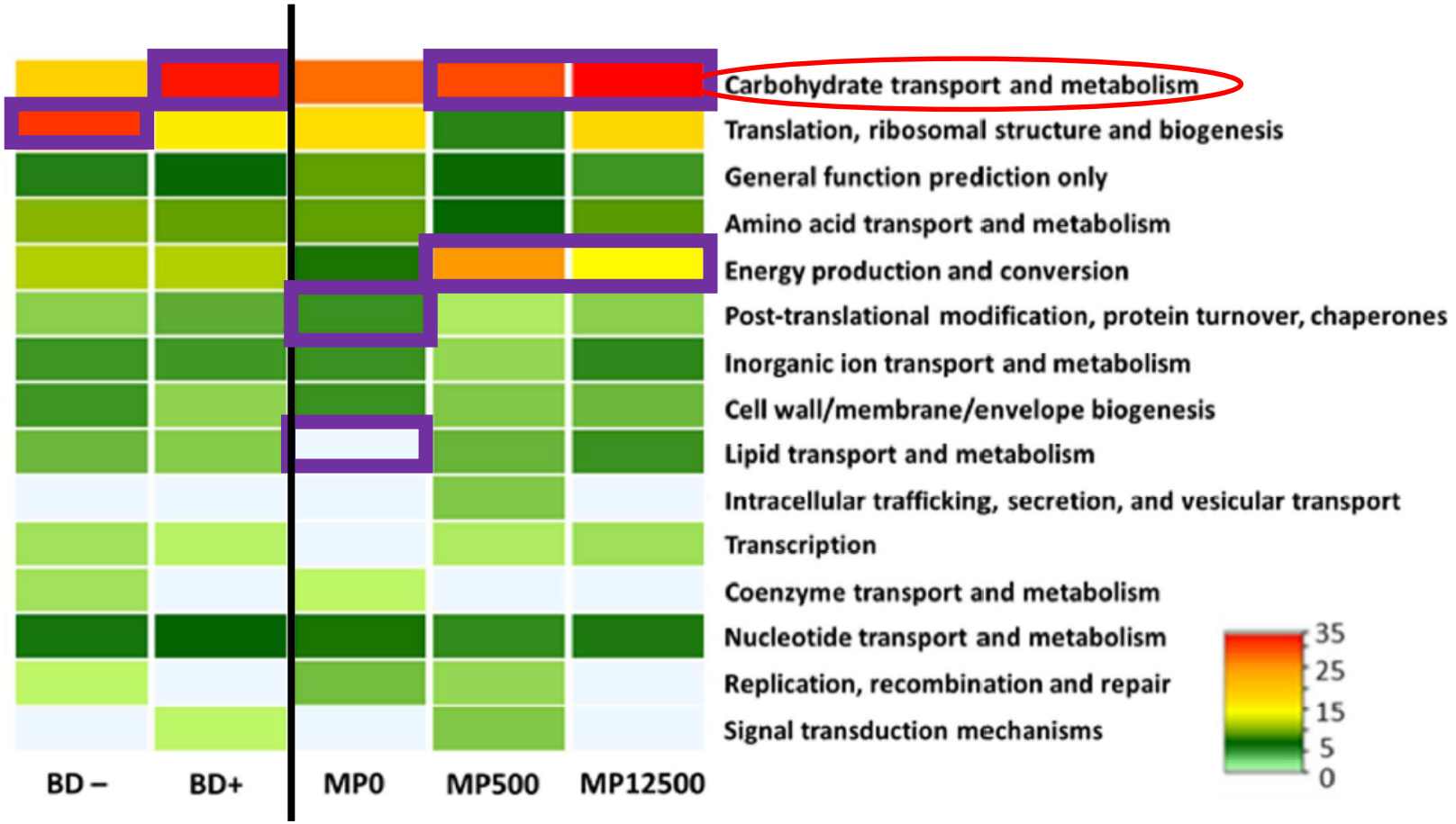


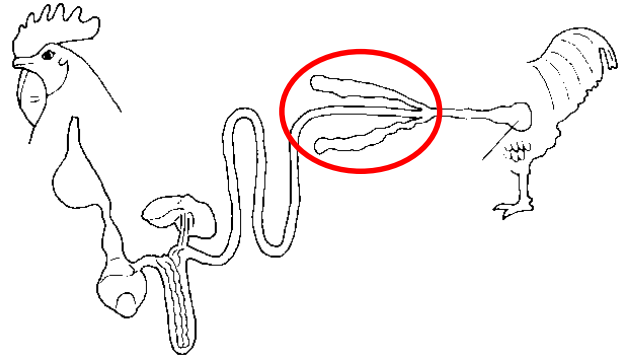


COG categories :

G: Carbohydrate transport and metabolism
J: Translation, ribosomal structure and biogenesis
R: General function prediction only
E: Amino acid transport and metabolism
C: Energy production and conversion
O: Post-translational modification, protein turnover, chaperones
P: Inorganic ion transport and metabolism
M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis
I: Lipid transport and metabolism
U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
K: Transcription
H: Coenzyme transport and metabolism
S: Function unknown
V: Defense mechanisms
Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

BD – (P issu des MP ➔ 0,45% P) ;
BD + (supplémentation phosphate ➔ 0,54 % P) ;
MP0 MP500 MP12500 (0-500-12500 U phytase/kg)
J25 – 2 pools de 4 anx (Tilocca et al., 2016)





Functional classification of cecal proteins into COG categories. Heat-Map is drawn on the basis of the relative percentages of the proteins of each statistically different treatment

L'alimentation modifie le profil fonctionnel des communautés bactériennes

3.4. Limites actuelles des approches de métaprotéomique

Protéines de différentes origines

Microbiennes, Alimentaires, Hôte
Masque les protéines microbiennes de faibles abondances

Très nombreuses protéines microbiennes dans les contenus digestifs

Ex pour des échanillons fécaux :

+ de 21,000 taxa, + de 63 000 000 protéines microbiennes uniques (Wilmes et al., 2015)

Prérequis : Méta-génome ?

Oui pour les microbiote très complexe comme le sol
Pas indispensable pour le microbiote digestif (Armengaud 2016)

Améliorations en cours et attendues dans le futur

Préparation des protéines pour enrichir en protéines microbiennes (Xiong, W., et al. 2015)
Identification des protéines (Tanca, A., et al. 2016; Tang, H. X., et al. 2016)
Adaptation des méthodes quantitatives (Gillet, L. C., et al. 2012)
…

Plateforme de métaprotéomique

Laboratory «Innovative technologies for Detection and Diagnostics» Li2D (CEA-Marcoule; associé à l'INRA)

Plateforme Progenomix

Responsable scientifique : Jean Armengaud (Chercheur, CEA de Marcoule)

Secrétome microbien : Méthodologie de séparation des protéines des bactéries (A développer)
Préparation de l'échantillon + Analyse par nanoLC-MS/MS : 250 € / échantillon (collaboration)
+ Analyse statistique
+ Analyse bibliographique complexe

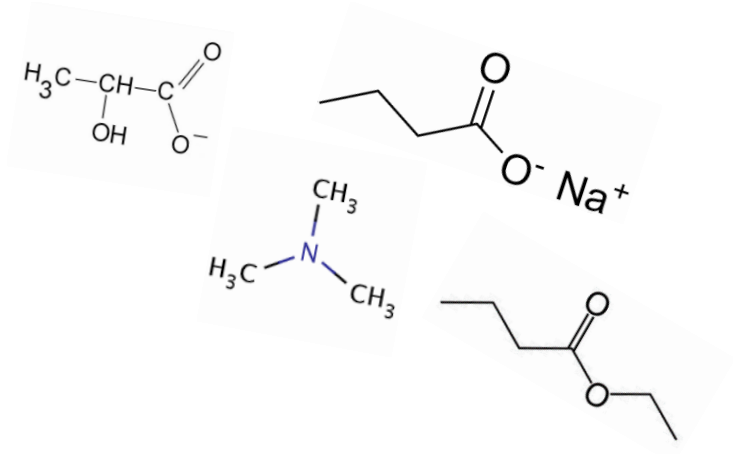
Armengaud, J., C. Duport (2017). Exoproteomics of Pathogens: Analysis of Toxins and Other Virulence Factors by Proteomics. Proteomics in Biology, Pt B. A. K. Shukla. 586: 211-227.
Armengaud, J. (2016). "Next-generation proteomics faces new challenges in environmental biotechnology." Current Opinion in Biotechnology 38: 174-182.
Pible, O., J. Armengaud (2015). "Improving the quality of genome, protein sequence, and taxonomy databases: A prerequisite for microbiome meta-omics 2.0." Proteomics 15(20): 3418-3423.
…

Recherche sur l'environnement (plantes /sol)

Ex : IRD : Institut de recherche pour le développement
UMR Eco&Sols, Montpellier
Equipe de Laeticia Bernard



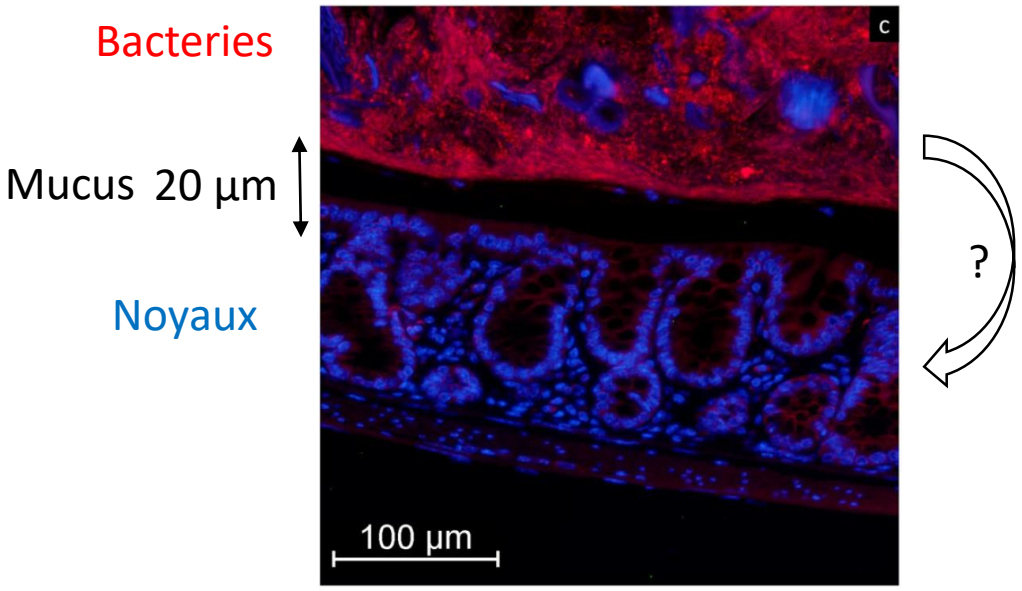
4. Métabolomique



4.1. Définition, Principe

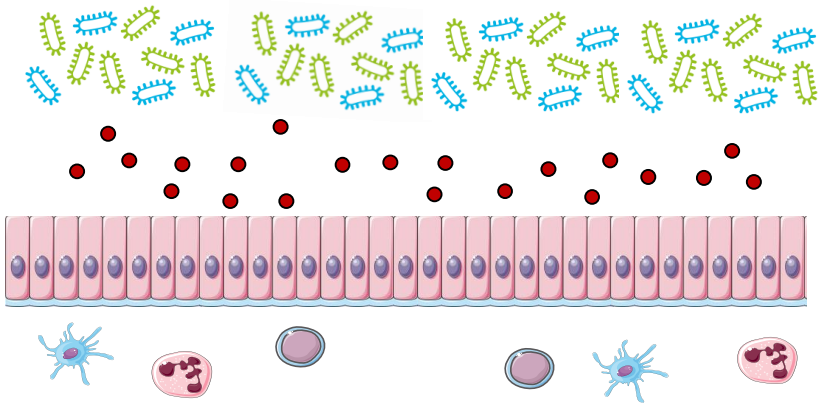
Coupe de côlon de souris

Fluorescent *in situ* Hybridisation (FISH)



Kamphuis, Sci Reports, 2017

?



Microbiote

*Métabolites bactériens**

Epithelium intestinal

Système immunitaire associé à la muqueuse

Comment le microbiote agit-t-il sur les cellules de son hôte animal ?

Les métabolites bactériens sont des intérmédiaires moléculaires clés entre le microbiote et son hôte

***Métabolites:**

- **petites molecules (<1500 Da)**
- **produits intermédiaires ou terminaux du métabolisme**

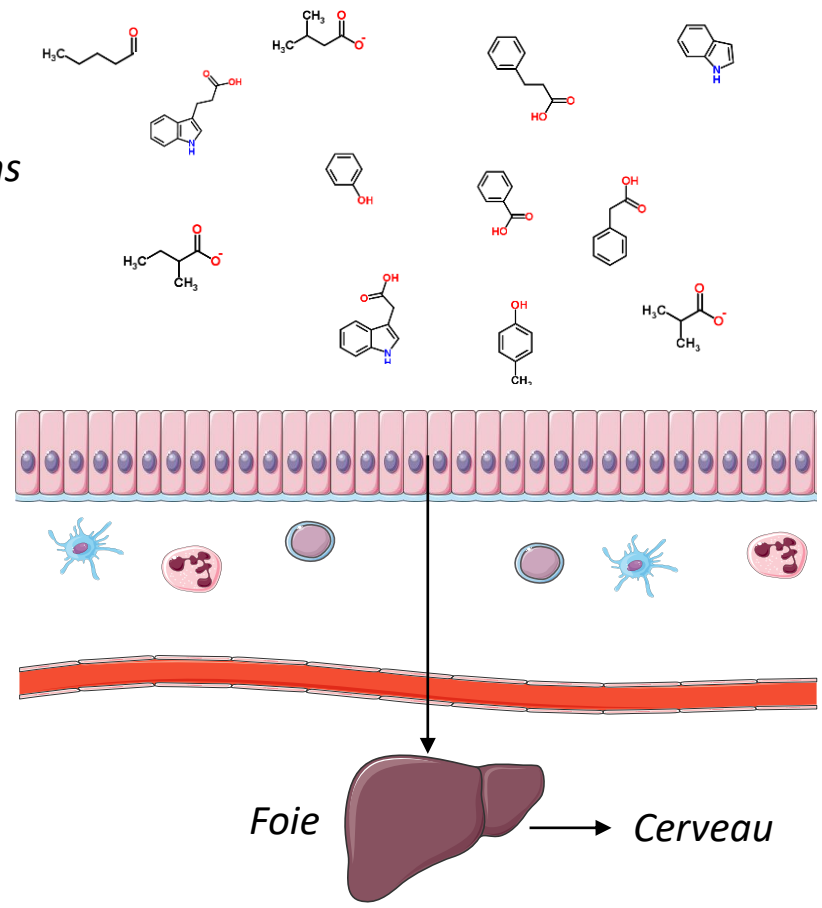
Microbiote

Métabolites bactériens

Epithelium intestinal

Système immunitaire associé à la muqueuse

Veine porte



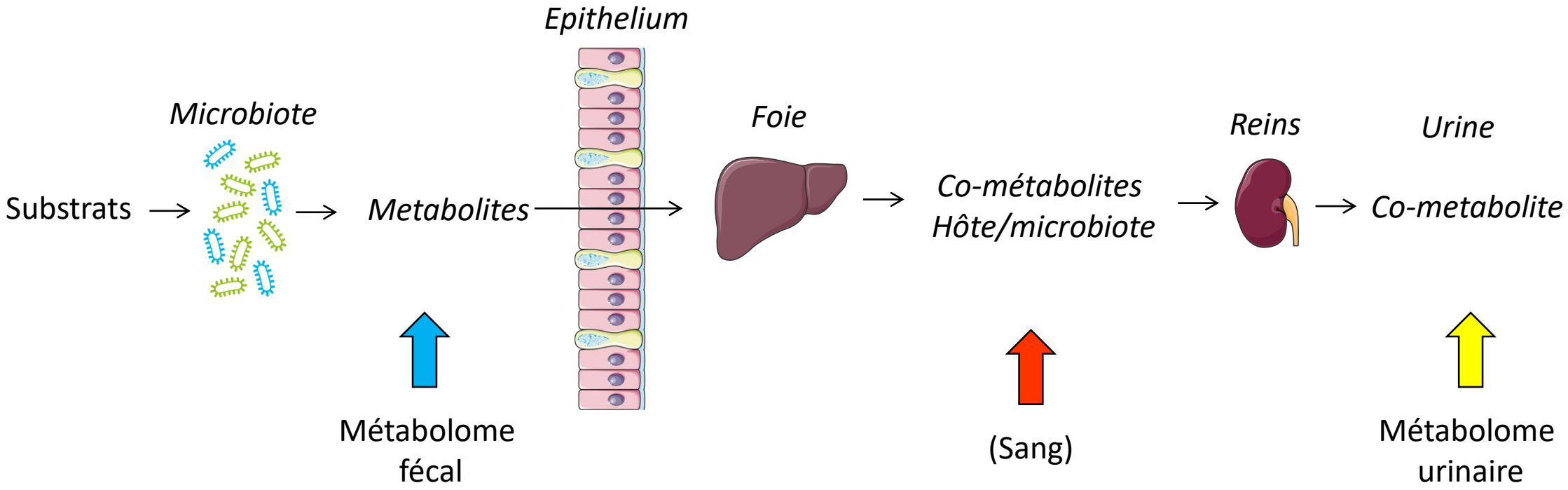
Comment étudier les métabolites produits par le microbiote intestinal ?

Métabolomique = étude du métabolome: « ensemble des métabolites d'un système biologique »

Les métabolites bactériens constituent le support de la « communication chimique » entre le microbiote et les cellules de son hôte animal

Action locale dans l'intestin mais également à distance

Quels échantillons biologiques analyser pour connaitre l'activité métabolique du microbiote intestinal ?



Résonance magnétique nucléaire (RMN)



4.2. Méthodes d'approche

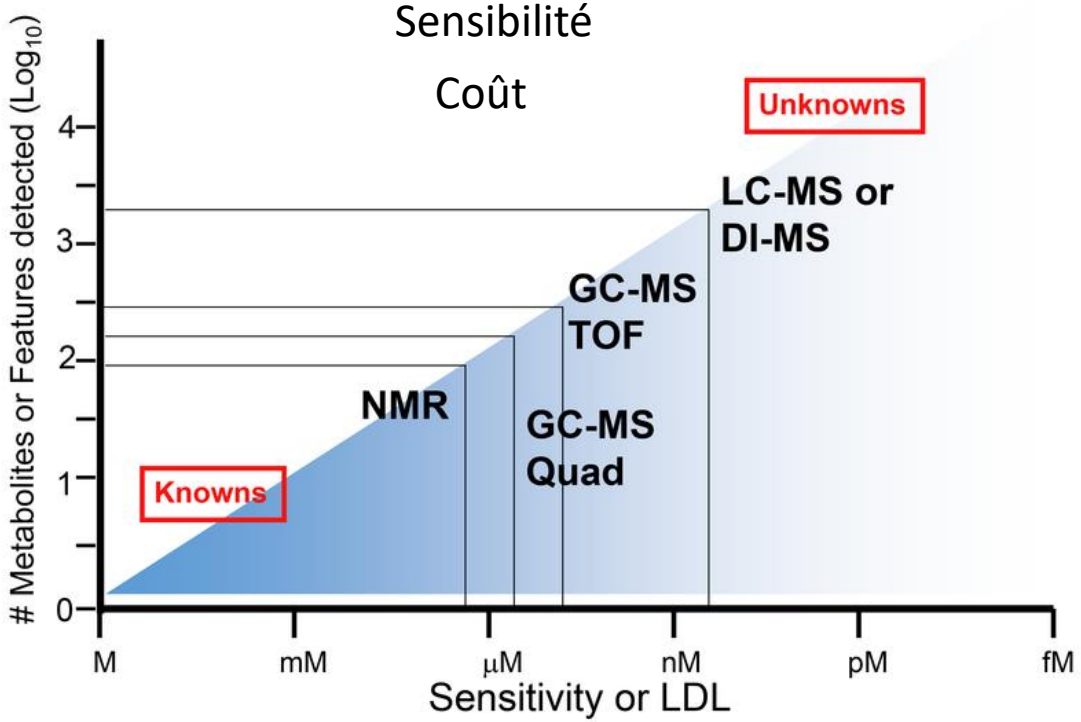
Rapidité et simplicité de la préparation des échantillons

Reproducibilité

Difficulté d'identification

Sensibilité

Coût

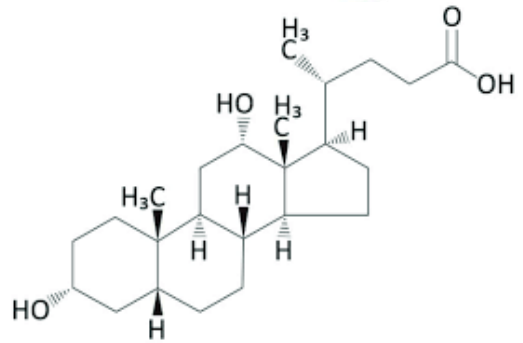


➔ Spécificités des classes chimiques détectées

➔ Complémentarité des méthodes

Spectrométrie de masse (GC-MS, LC-MS)





Acides biliaires secondaires
(modifiés par le microbiote)

LC-MS

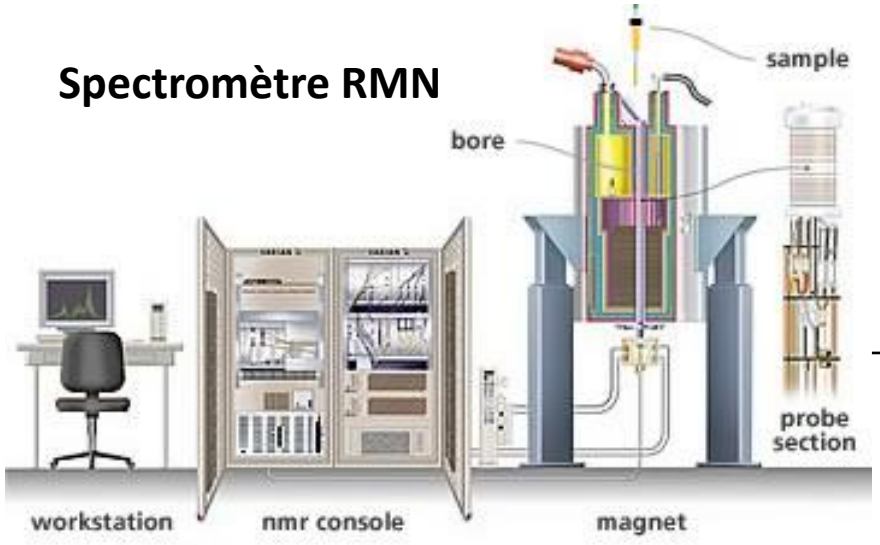
Préparation des échantillons

- Contenus digestifs : 50 mg environ
- Extraction : Méthode mécanique (billes FastPrep ou TissueLyzer)
- Solvant : Tampon phosphate (**pH 7.4**) avec de l'**eau deutérée** (D_20: Deuterium =^2H)
- Ajout d'une molécule de référence (TSP) pour aligner les spectres
- Centrifugation
- Transfert du surnageant dans un tube RMN

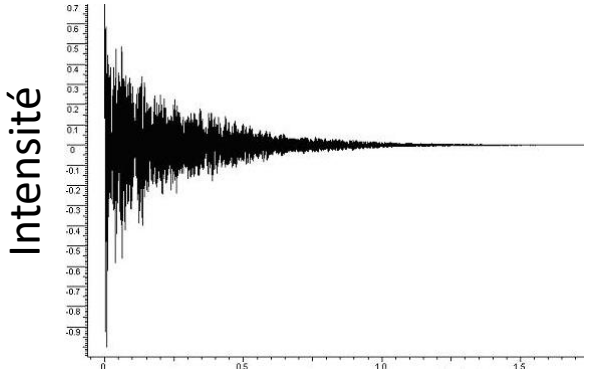


Ø 5 mm

Spectromètre RMN



Données brutes



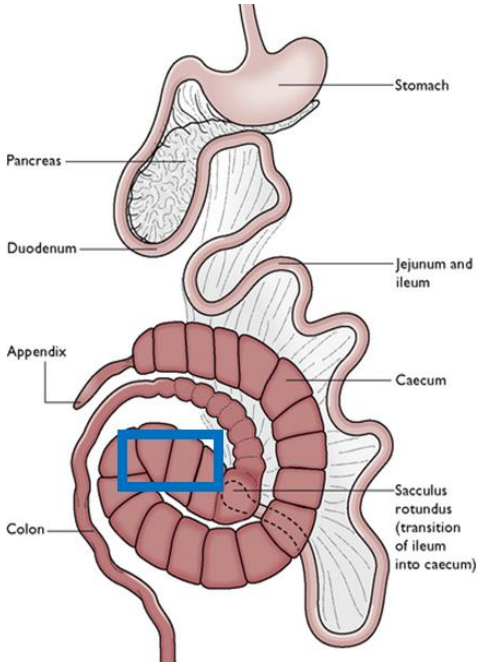
Temps

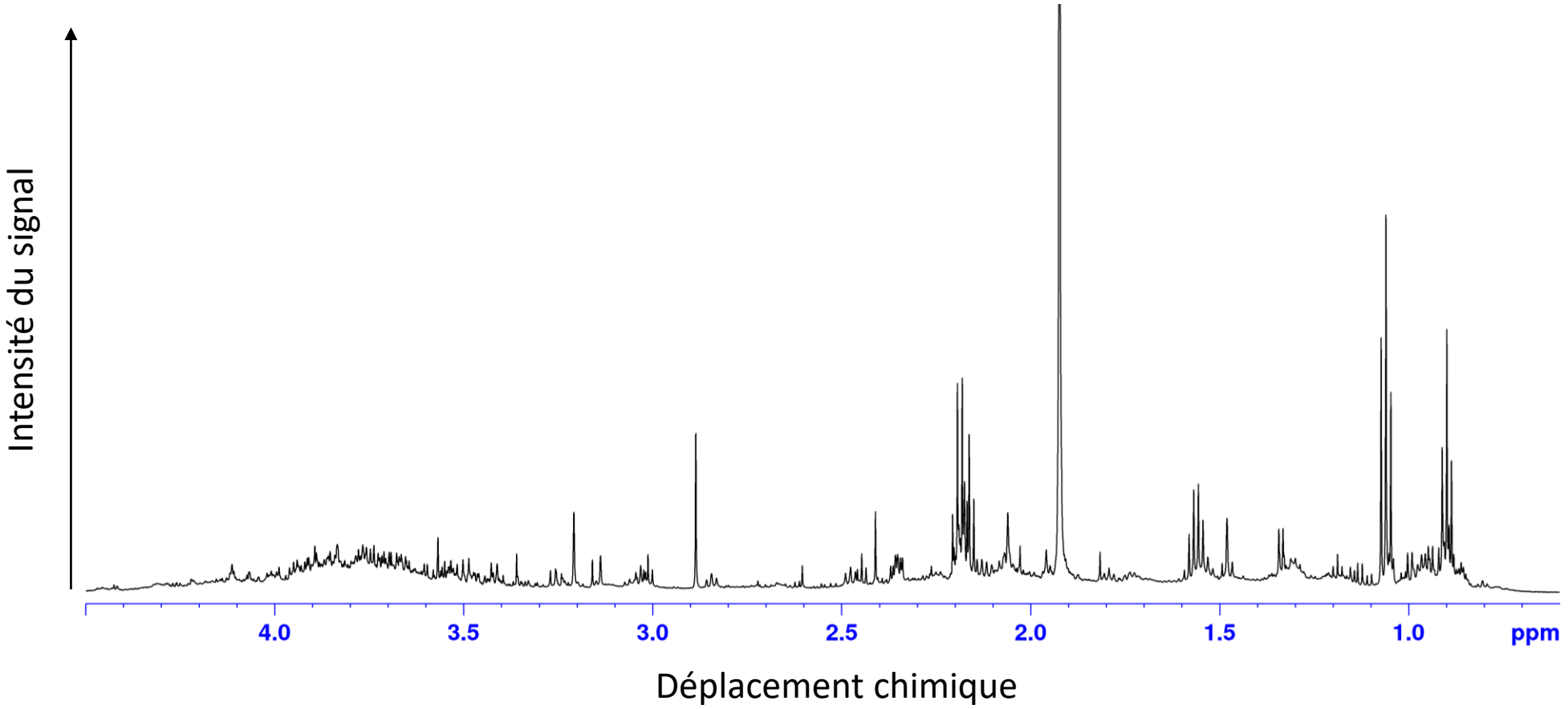
- Exposition de ^1H à un rayonnement électromagnétique : absorption d'énergie par le noyau
- Relaxation : émission d'énergie ➔ phénomène de « Résonnance magnétique nucléaire »

Pré-processing

Spectre RMN – Caecum lapin *Séquence d'impulsion de champ radiofréquence: CPMG*







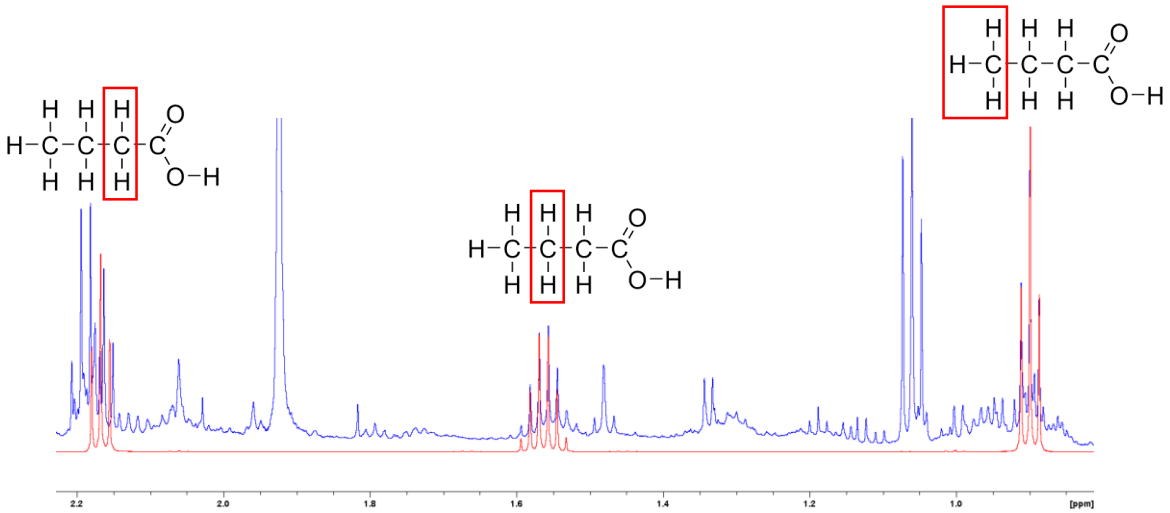
Signaux issus de dizaines de métabolites

Comment identifier les métabolites correspondant aux pics ?

Utilisation de standards (composes purs)

Spectre de caecum de lapin

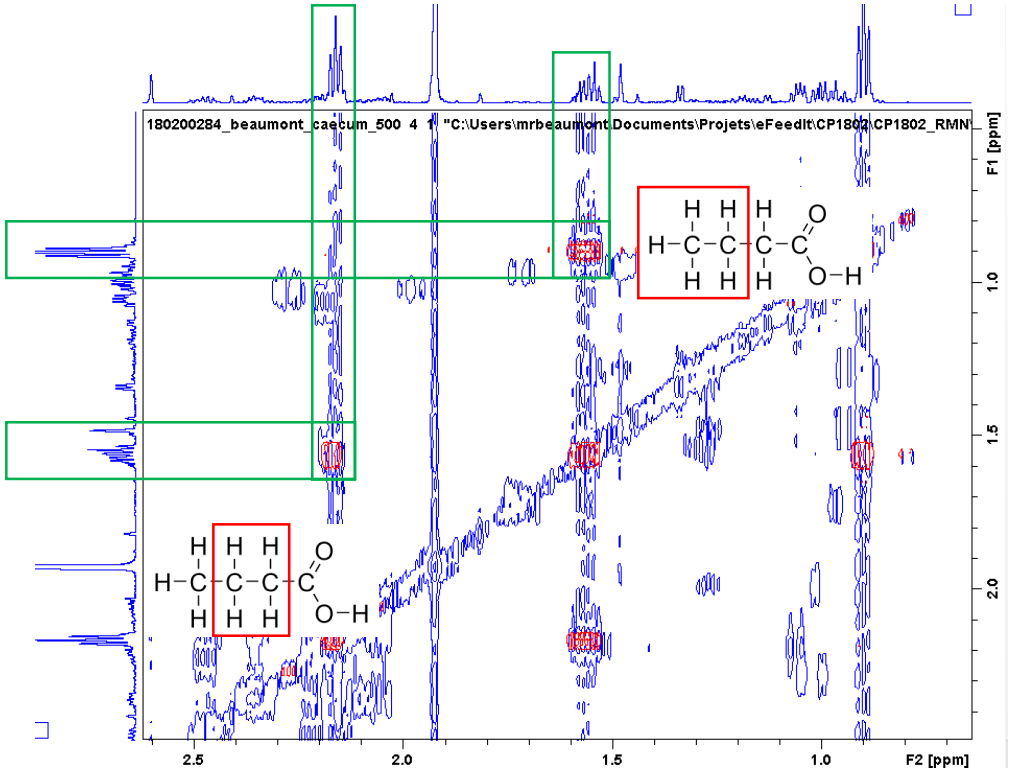
Spectre du butyrate



Plusieurs metabolites peuvent avoir des pics aux même déplacements chimiques

Bases de données de spectres de références (2800 molécules)

RMN en deux dimensions (^{1}H-^{1}H COSY)



Identification « manuelle » fastidieuse

Méthodes automatiques en développement

Lefort, G. et al., (2019) Bioinformatics
ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra

Spectre RMN – Caecum lapin



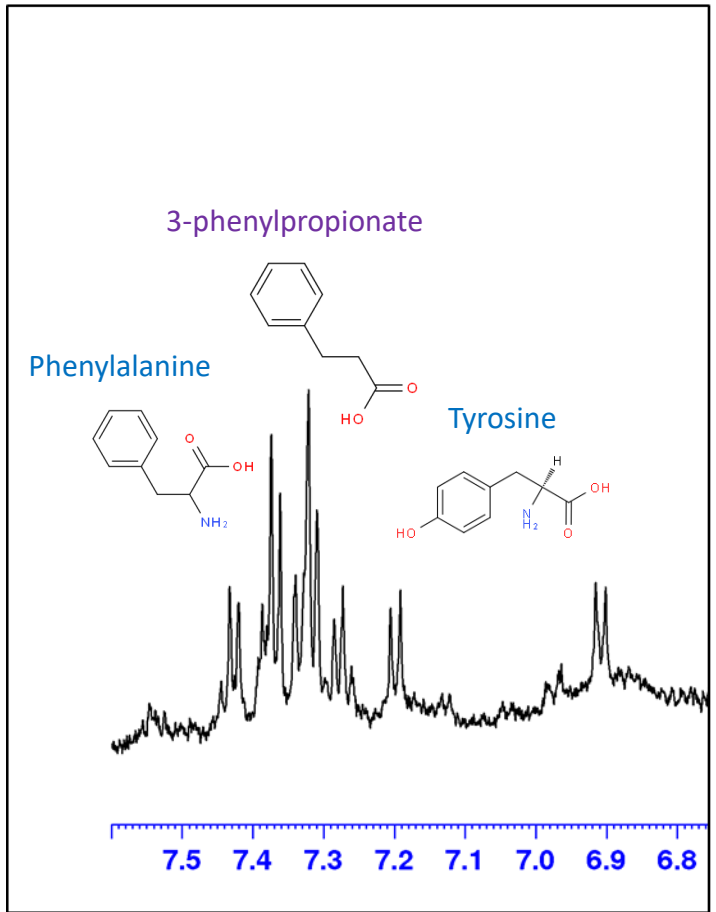
Acides gras à courtes chaînes

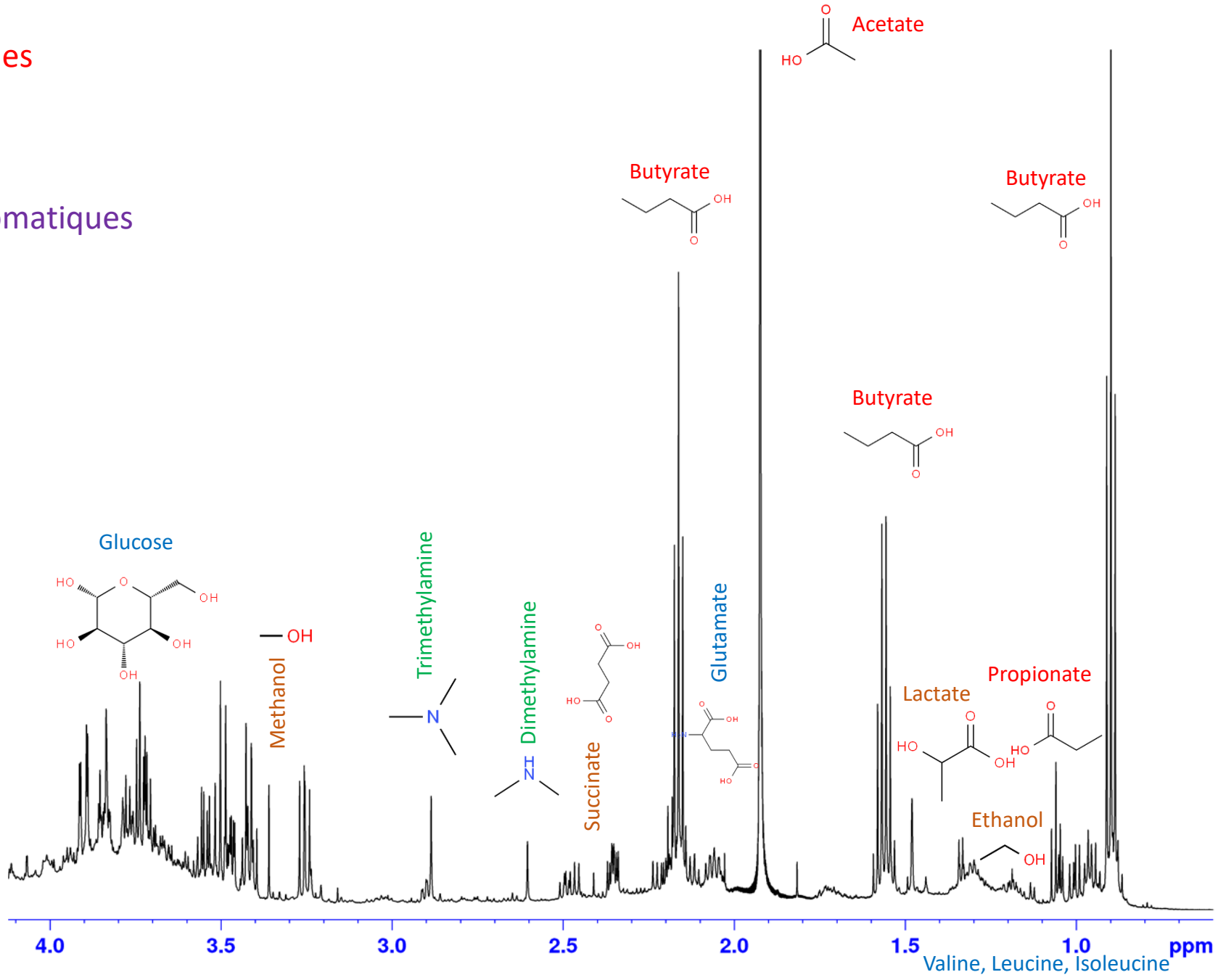
Amines

Produits de fermentation

Métabolites bactériens aromatiques

Acides aminés & sucres





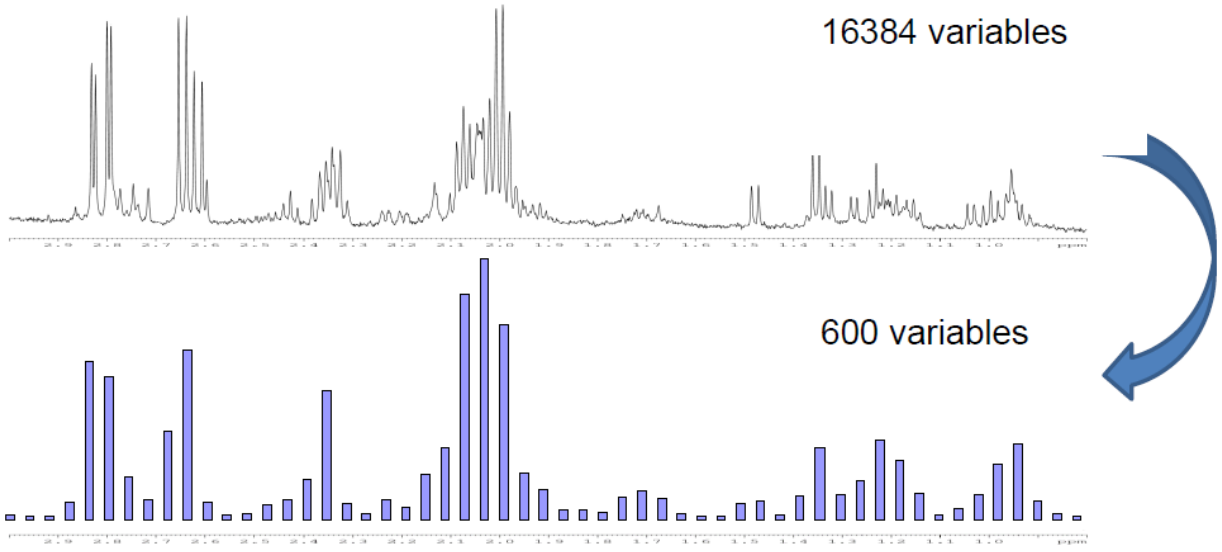
Comment identifier les métabolites associés à un phénotype d'intérêt ?

Traitement bioinformatique des spectres (Galaxy)

Workflow4metabolomics

Correction de la ligne de base, alignement des spectres, etc.

« **Bucketing** » (0,01 ppm)



Normalisation par l'aire totale du spectre : quantifications relatives !

Matrice de données normalisées

X Buckets

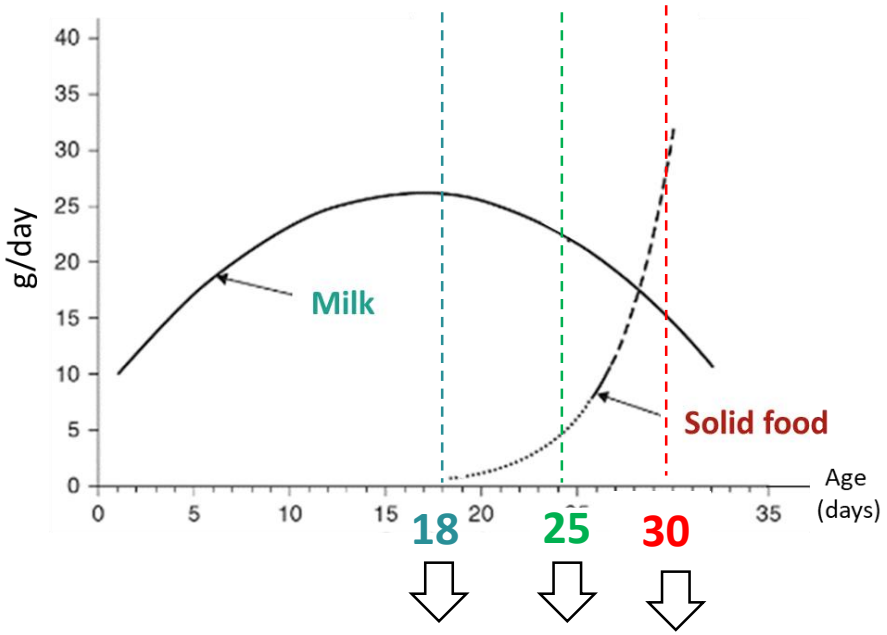
y Echantillons

Aire des buckets
(proportionel à la concentration du métabolite correspondant)

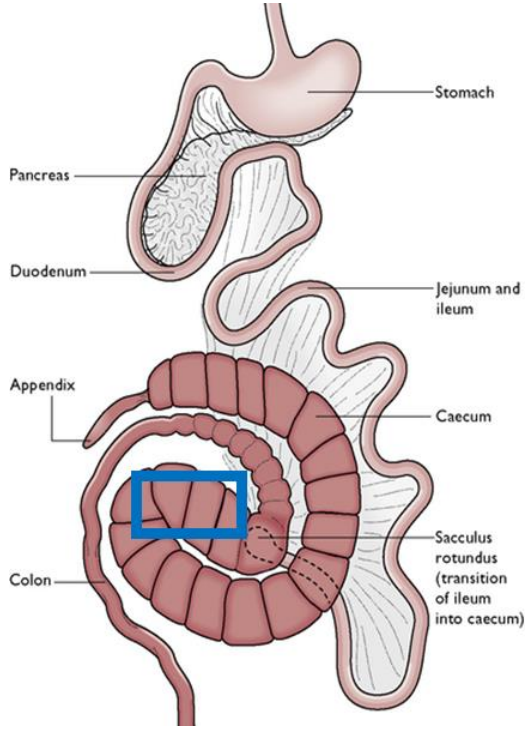
Statistiques multivariées (PCA/PLSDA)
Statistiques univariées

Exemple d'application : co-maturation du microbiote et de la barrière épithéliale lors de la transition alimentaire du sevrage





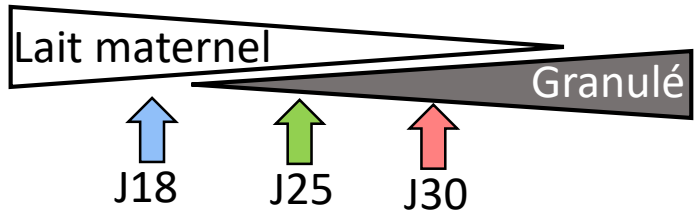
Contenu caecal et muqueuse



Microbiote — Séquençage du gène de l'ANRr 16S

Métabolites bactériens — Métabolomique RMN

Epithelium intestinal — qPCR à haut débit

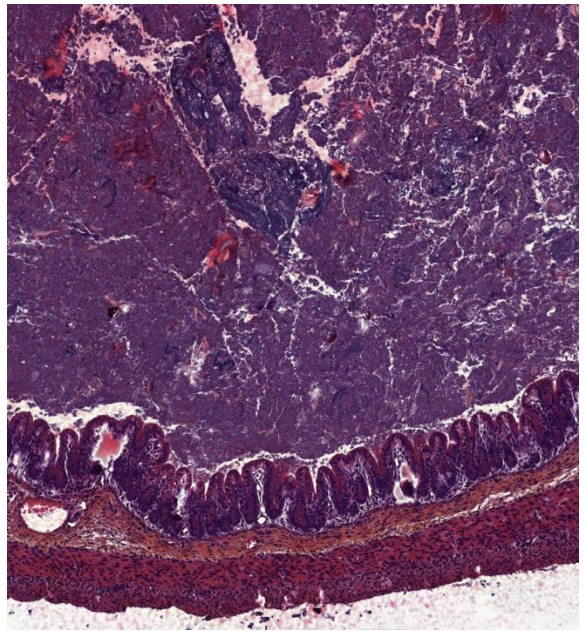


Oligosaccharides du lait

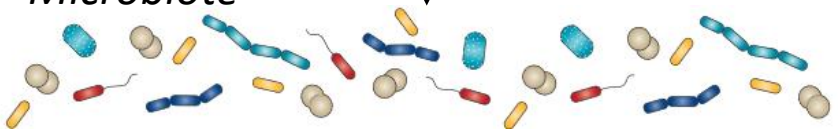
Polysaccharides végétaux

Substrats

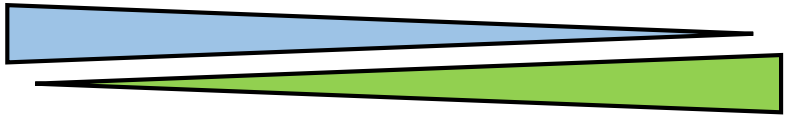
J18



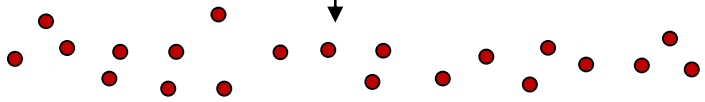
Microbiote



Bacteroidaceae



Diversité, *Ruminococcaceae*



Métabolites bactériens

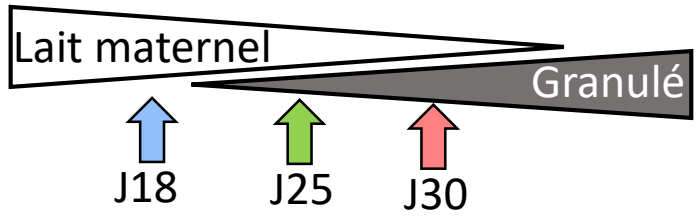
J25



L'ingestion d'aliments solides modifie les substrats disponible pour le microbiote

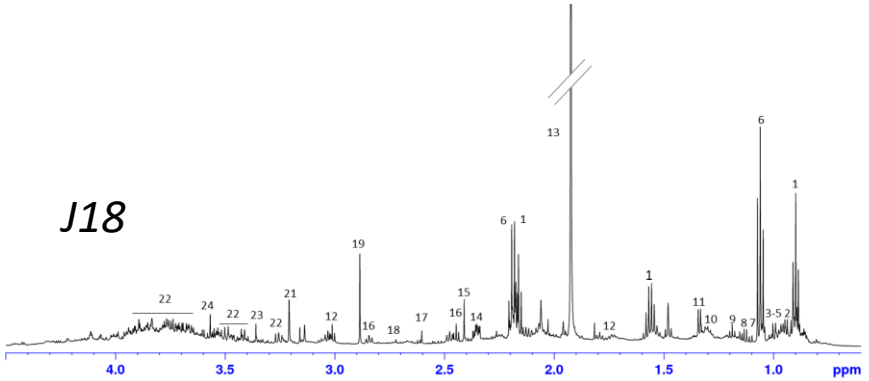
Quelles sont les conséquences pour l'activité métabolique du microbiote ?

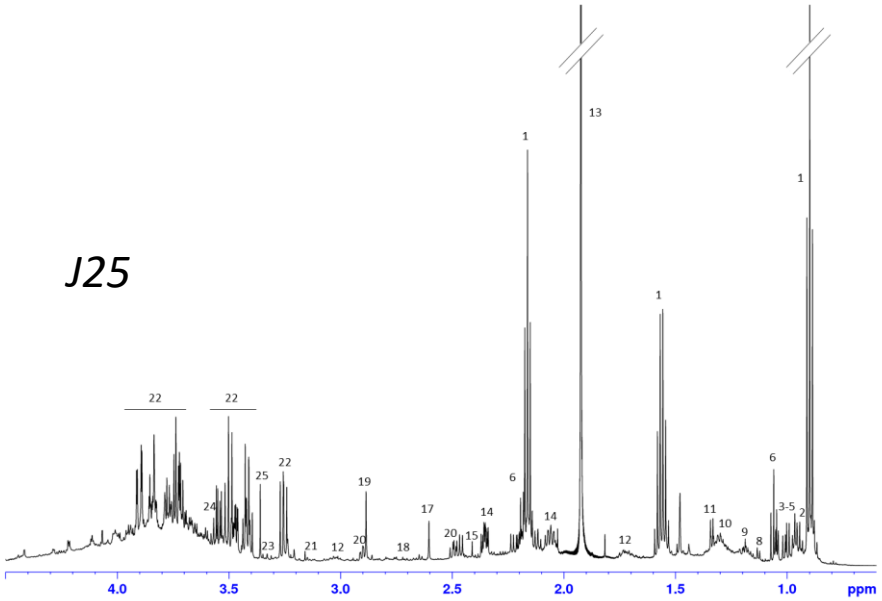




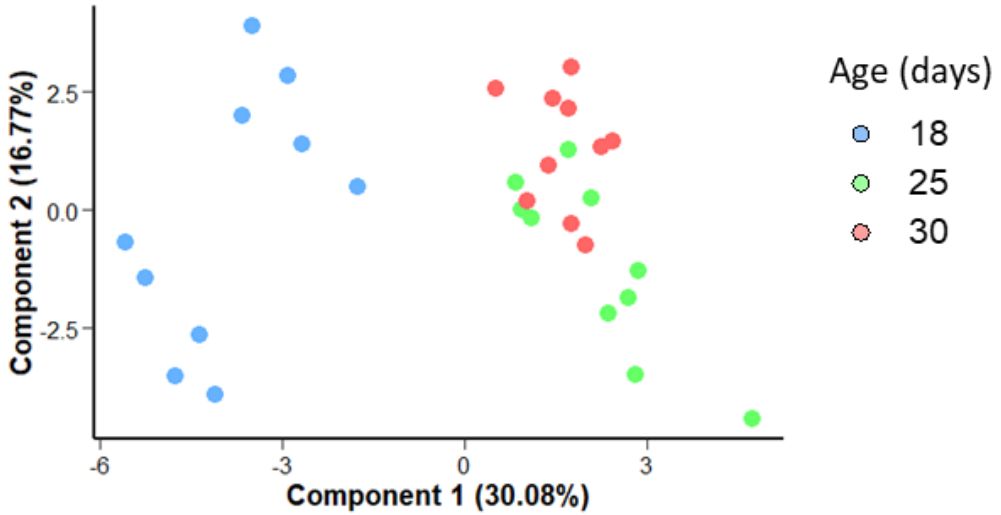
Métabolome du contenu caecal

(métabolomique RMN + bioinformatique W4M)



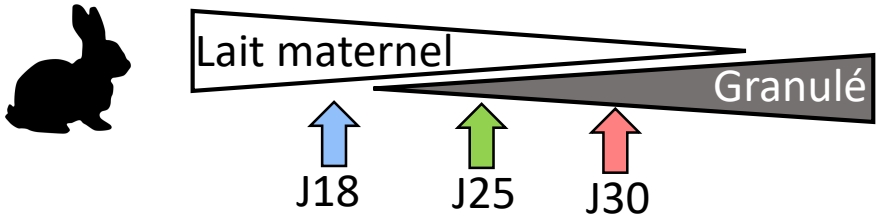


Analyse en composante principale

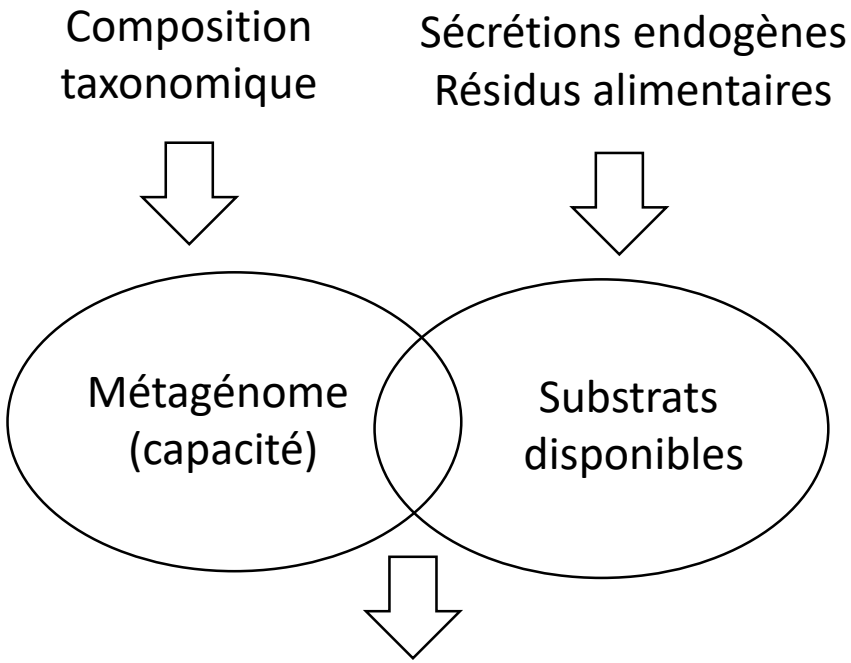


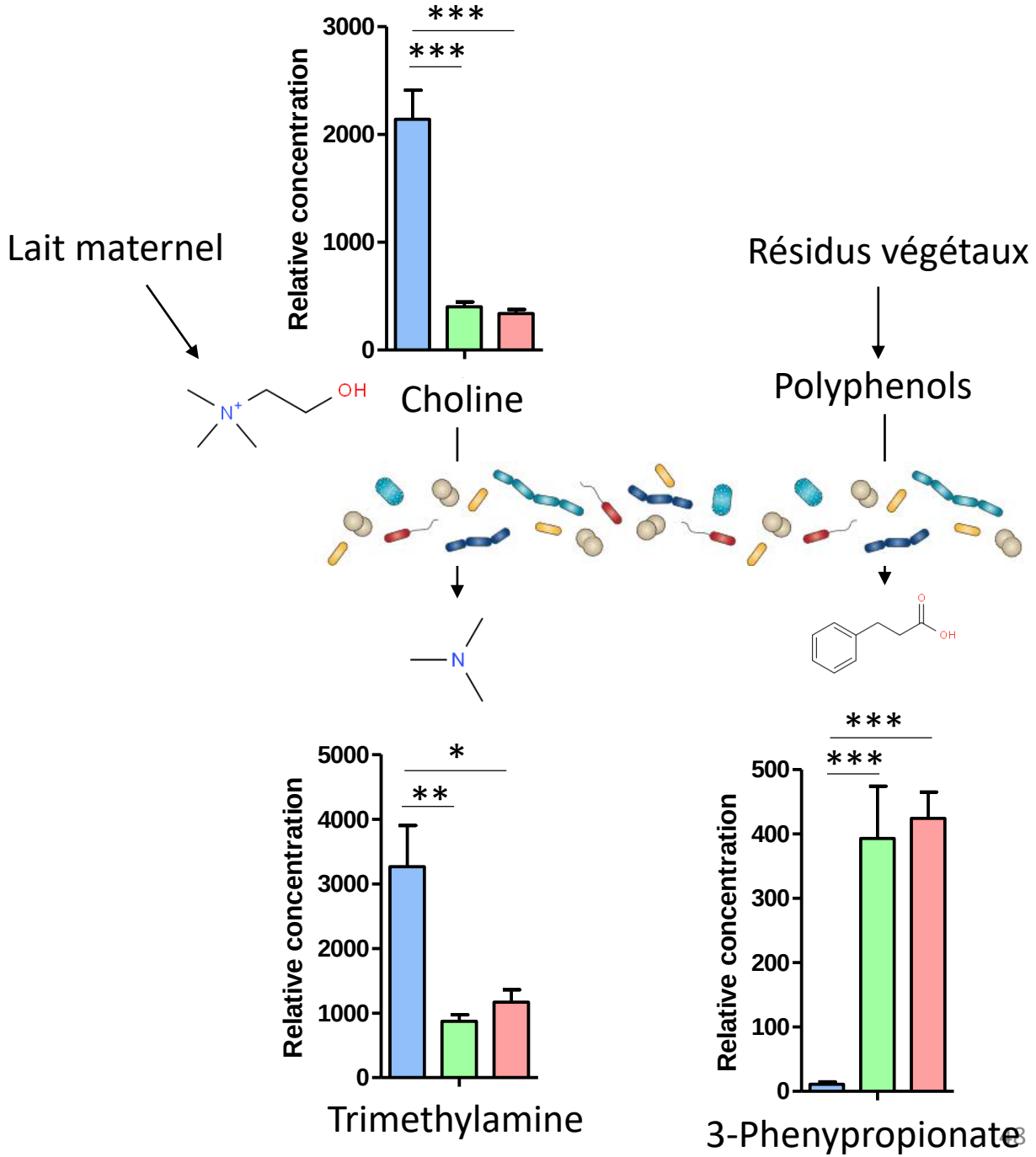
Le métabolome caecal est modifié lors de l'ingestion d'aliments solides

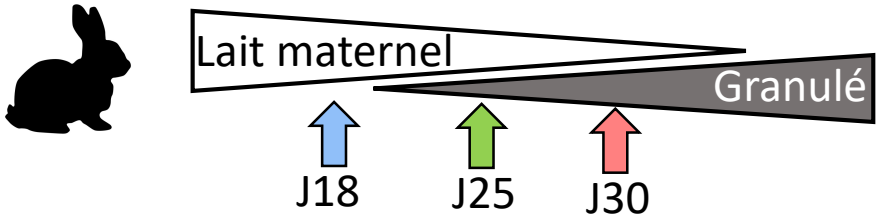
L'introduction de l'alimentation solide semble plus importante que la quantité ingérée

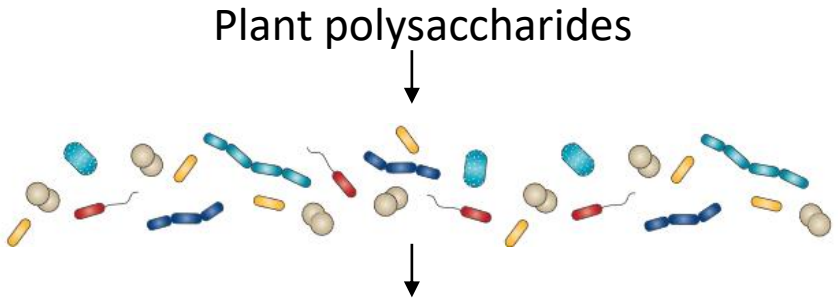


Les substrats disponibles pour le microbiote influencent son activité métabolique

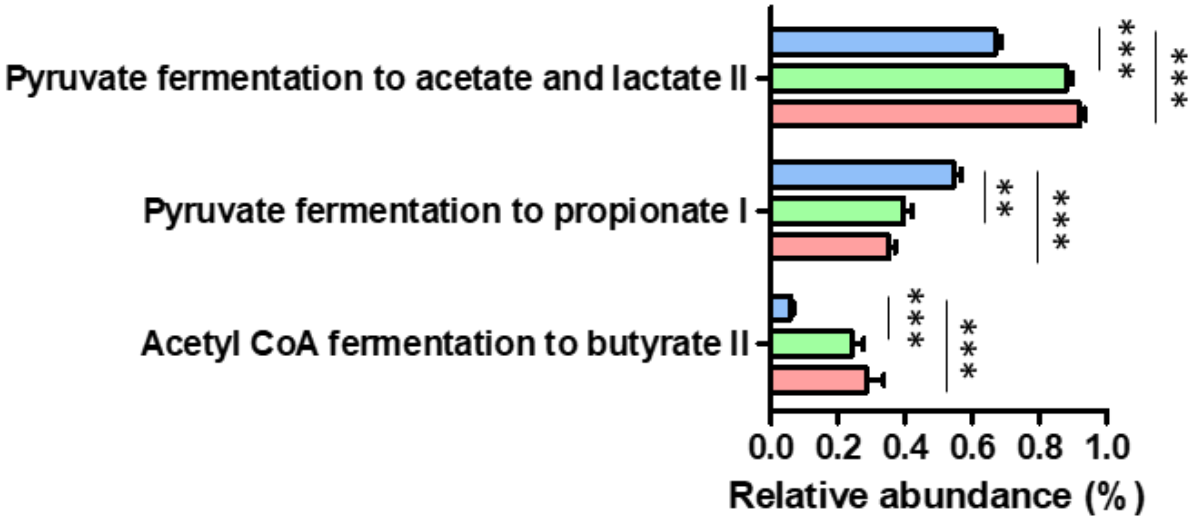




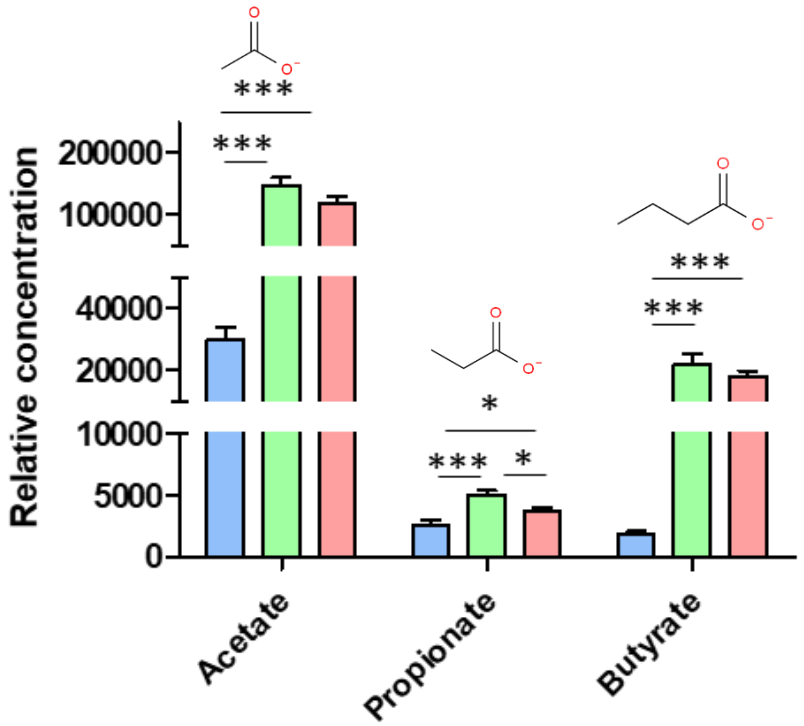




Inférence fonctionnelle basée sur les séquences 16S
(PICRUST2)

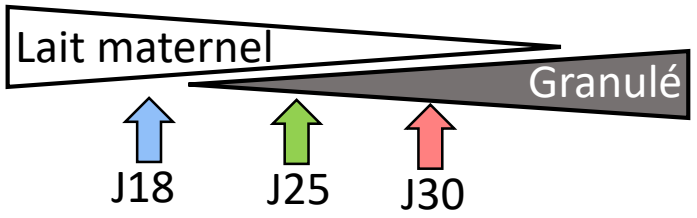


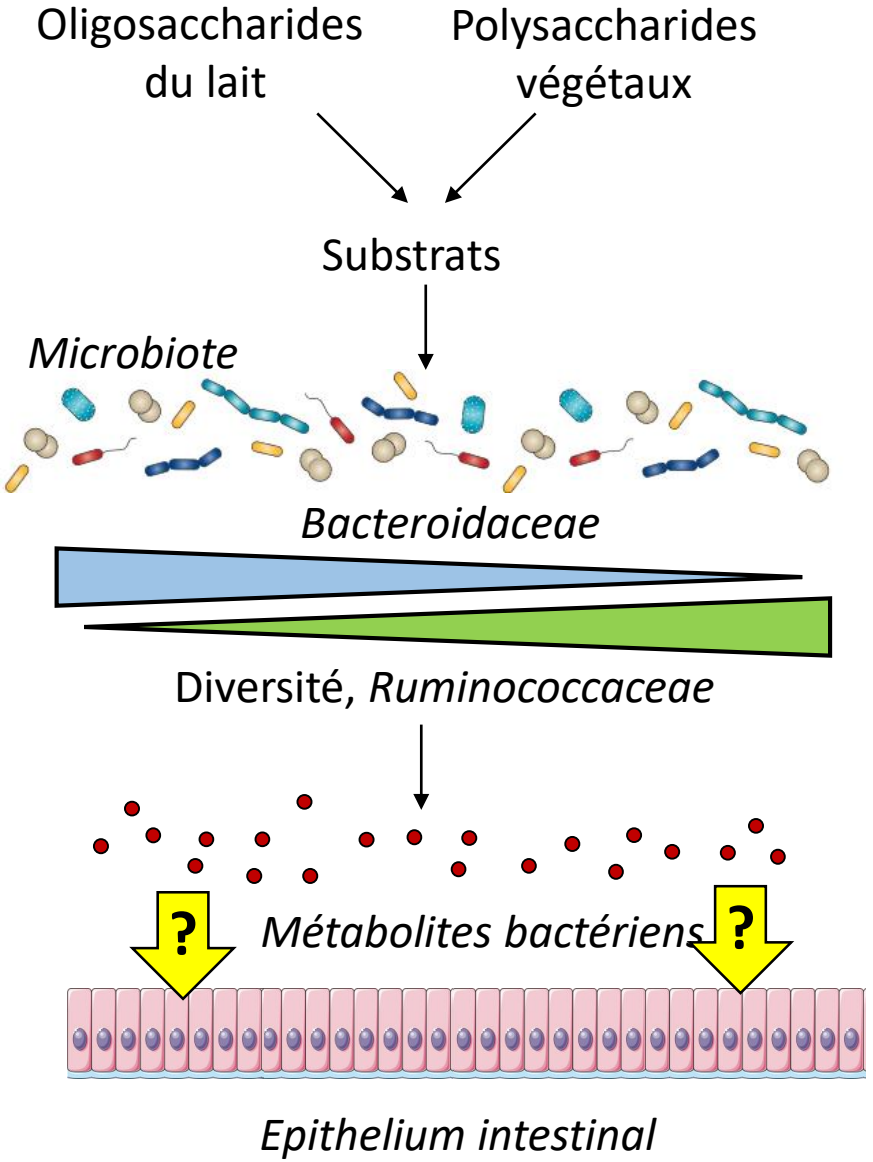
Métabolomique



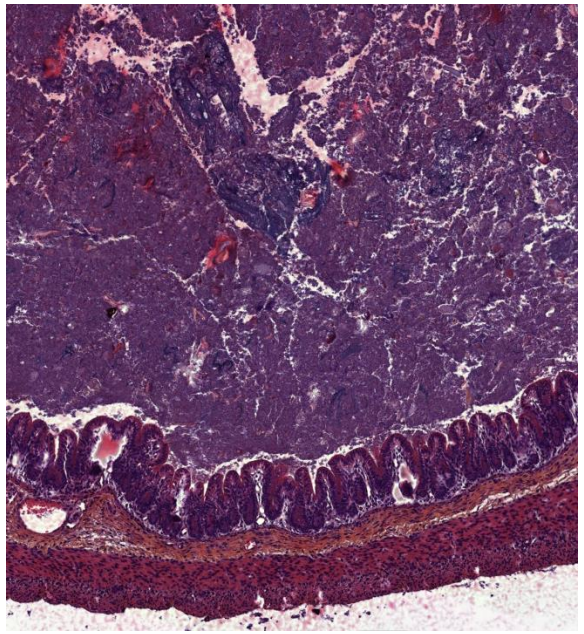
L'activité métabolique du microbiote est déterminée
par la capacité fonctionnelle (génomique) du microbiote et par les substrats disponibles







J18



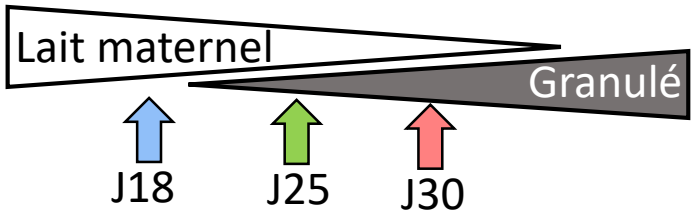
J25



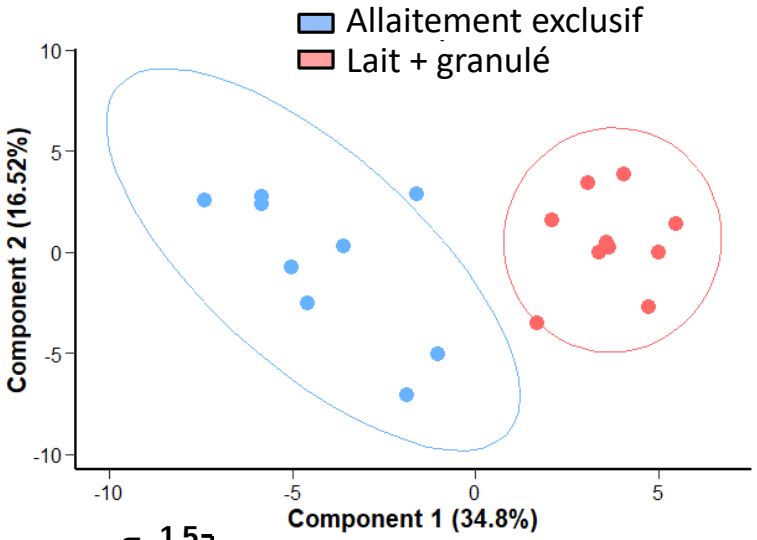
L'ingestion d'aliments solides module la composition et l'activité métabolique du microbiote

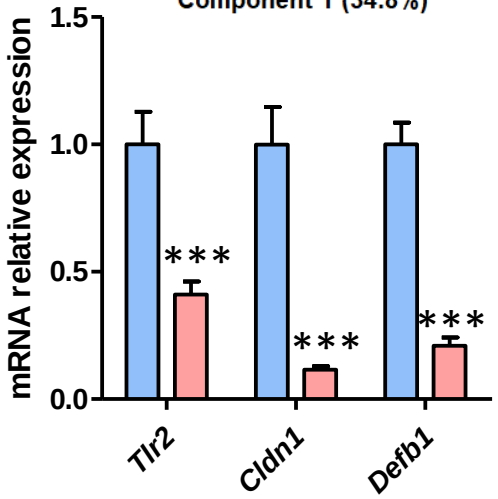
Quelles sont les conséquences pour la barrière intestinale ?





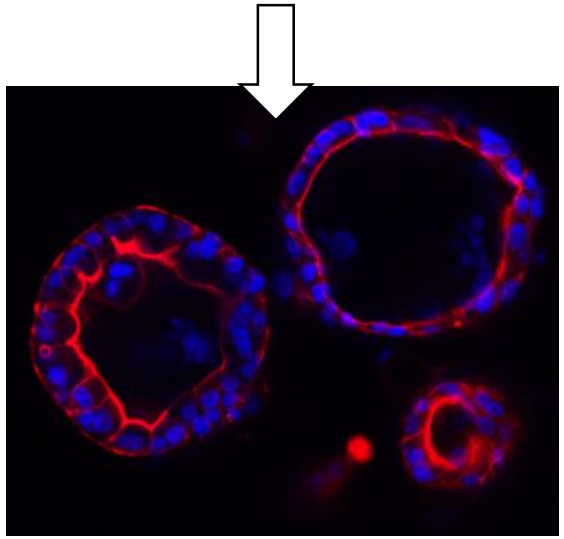
In vivo – Caecum transcriptome





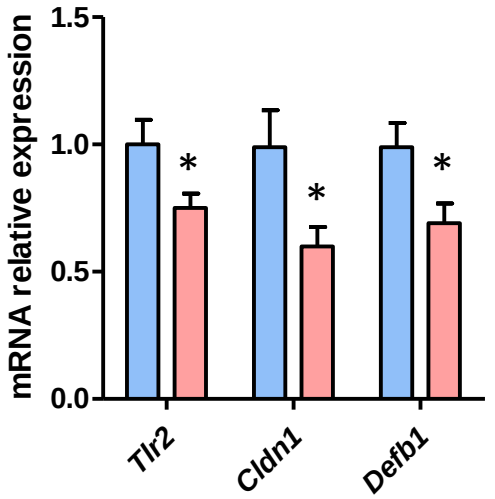
Allaitement exclusif **Lait + granulés**

Surnageant stérile de contenu caecal
(Mélange de métabolites)

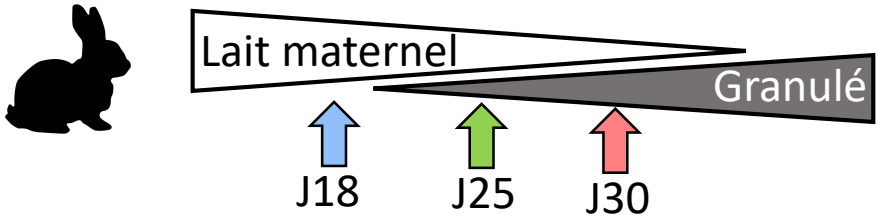


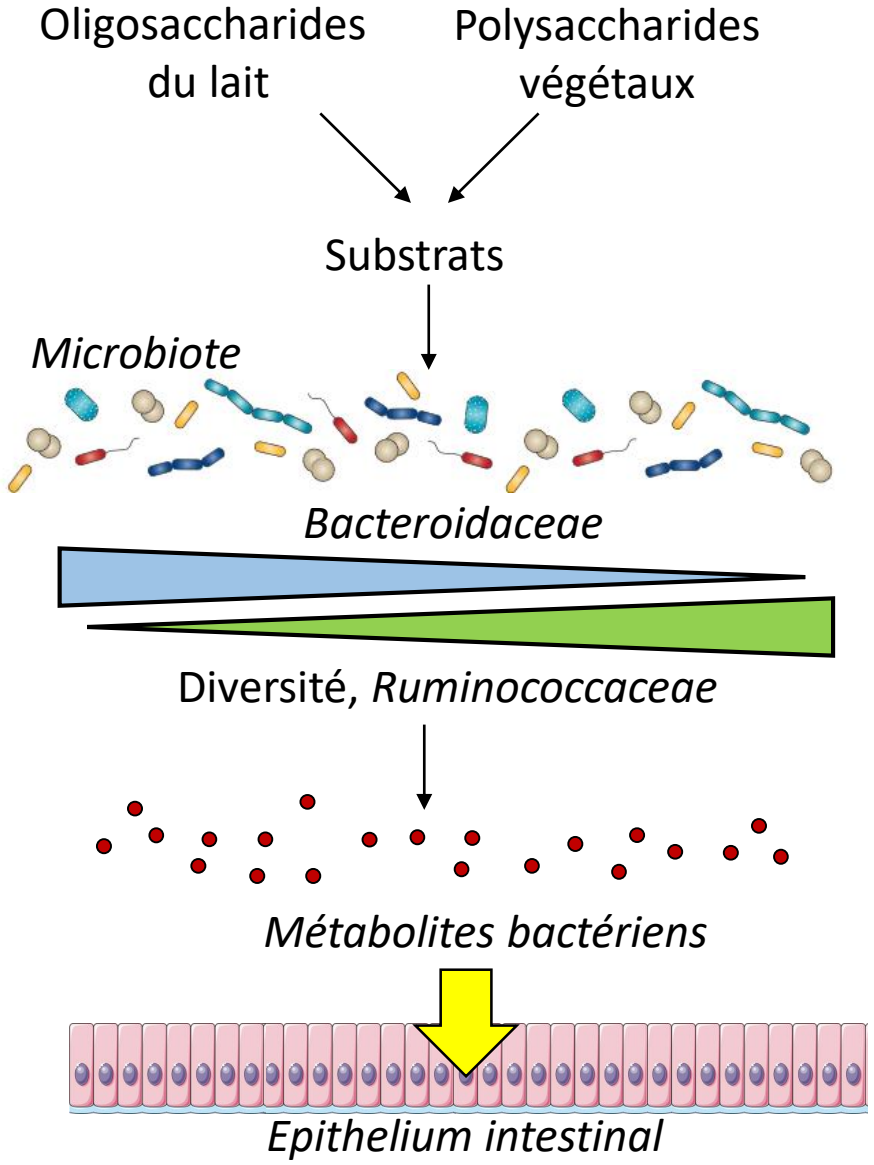
Organoïdes de caecum de lapin

In vitro

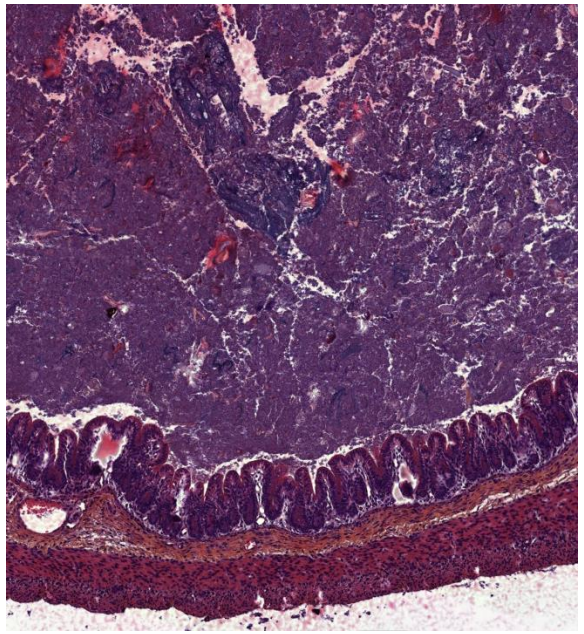


Les métabolites présents dans le caecum après l'ingestion d'aliments solides induisent des modifications d'expression de gènes similaires à celles observées *in vivo*





J18



J25



Les métabolites produits par le microbiote après l'introduction de l'alimentation solide pourraient contribuer à la maturation de la barrière épithéliale

Quels sont les métabolites impliqués ? Quels sont les mécanismes ?

Comment savoir quels métabolites sont produits par le microbiote exclusivement ?



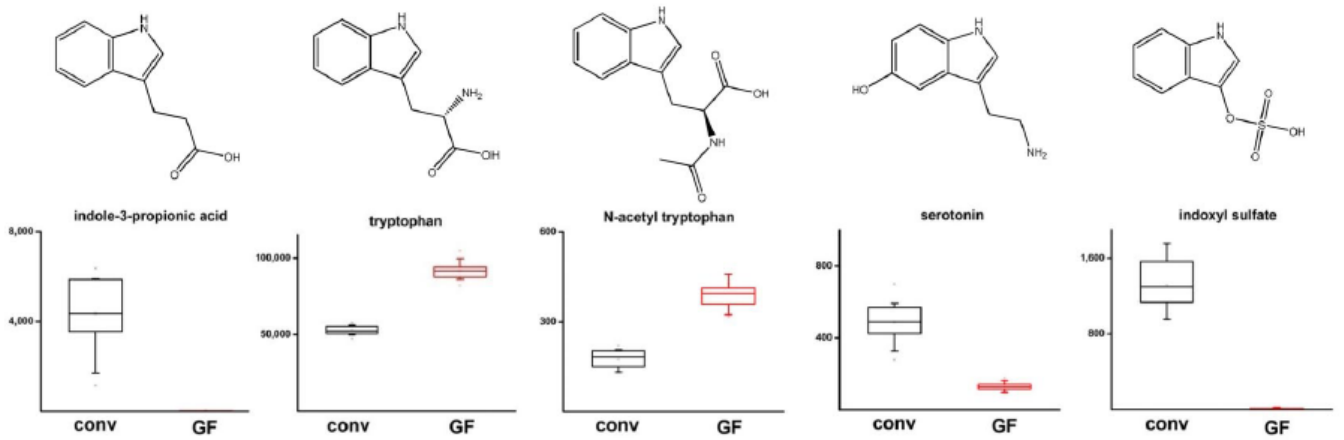
Souris axéniques (germ-free)



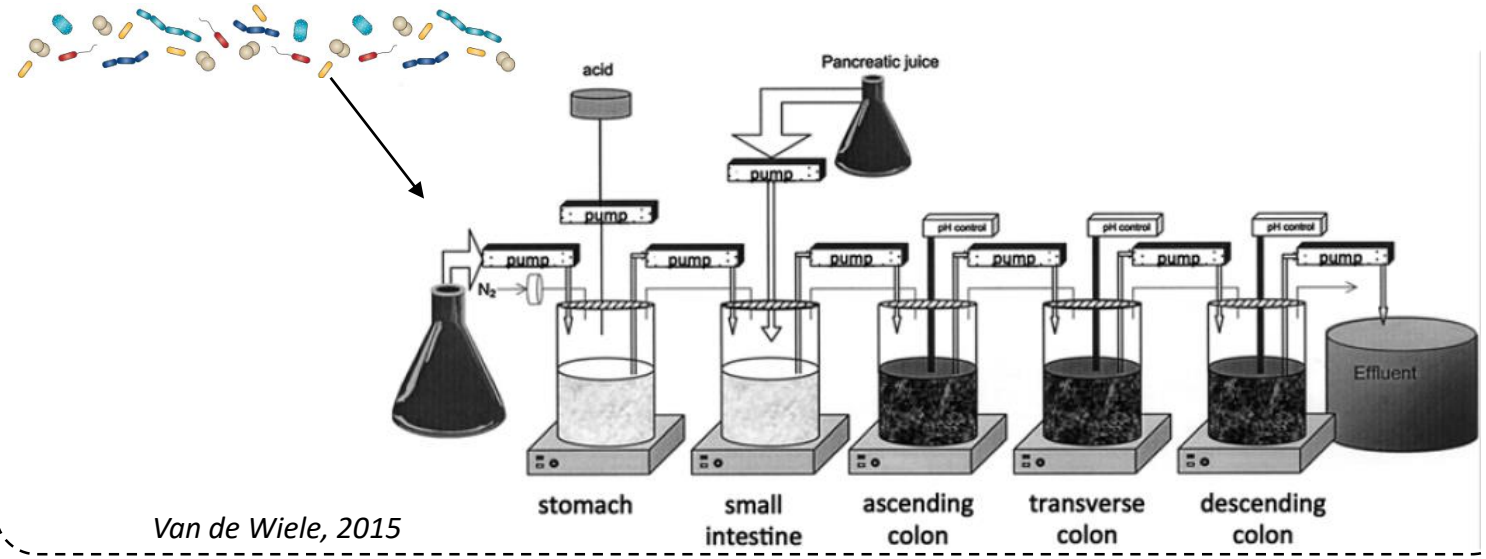
Souris conventionnelles

Wikoff, PNAS, 2009

Metabolomique



Fermenteur *in vitro* (SHIME)



Van de Wiele, 2015

Inférence fonctionnelle (PICRUST2)

Métagénomique

Métatranscriptomique

Métaprotéomique

Capacité du microbiote à produire les métabolites



Application de la métabolomique chez les volailles





Métabolites : différentes origines

Aliment et produits de leur hydrolyse
Production endogène par les cellules animales et issus de leur hydrolyse
Produits du microbiote

Métabolites digestif (Intestin Grêle) : METAB ALIM + Metab endogène + Métab Bact

Métabolites digestif (post-Intestin Grêle) : Metab alim + Metab endogène + MÉTAB BACT

Métabolites sanguins : METAB ALIM + METAB ENDOGÈNE + Métab Bact

Métabolites urinaires : METAB ALIM + METAB ENDOGÈNE + Métab Bact

Cependant, certains métabolites sont reconnus (Nicholson, 2012) comme provenant spécifiquement ou de façon largement majoritaire des bactéries

Par ailleurs, dans des contenus digestifs très riches en cellules bactériennes, comme ceux des caeca chez le poulet, les métabolites proviennent probablement en grande partie du microbiote bactérien.

Métabolites microbiens d'intérêt

Localisation cellulaire

Extra-cellulaire : Interaction Microbiote - Hôte

'Eau fécale' chez l'Homme

Intra-cellulaire : Métabolisme microbien

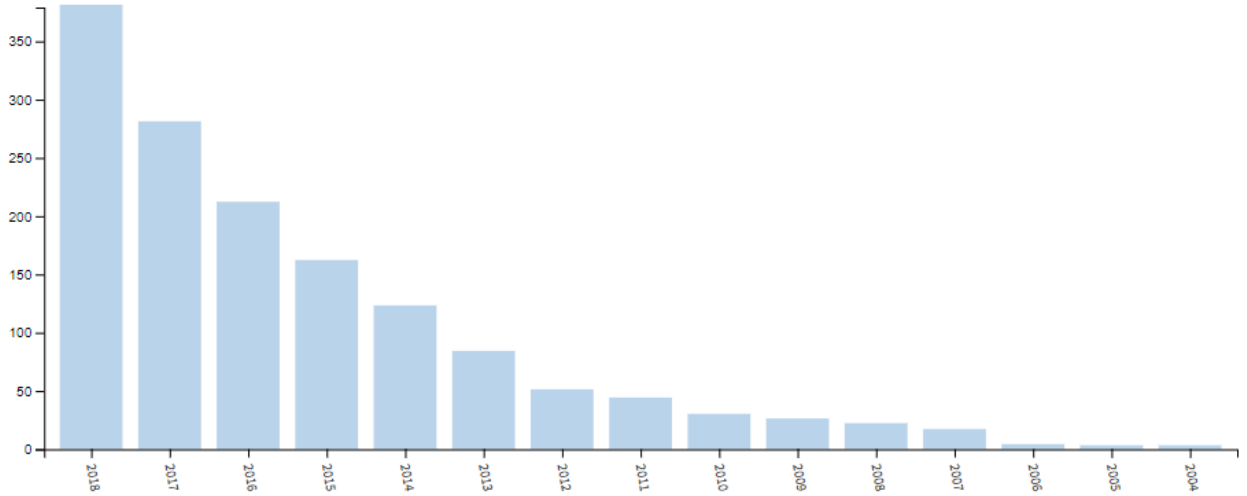
Nature chimique

Métabolites polaires ou non polaire

4.3. Applications

WOS: très nombreuses études

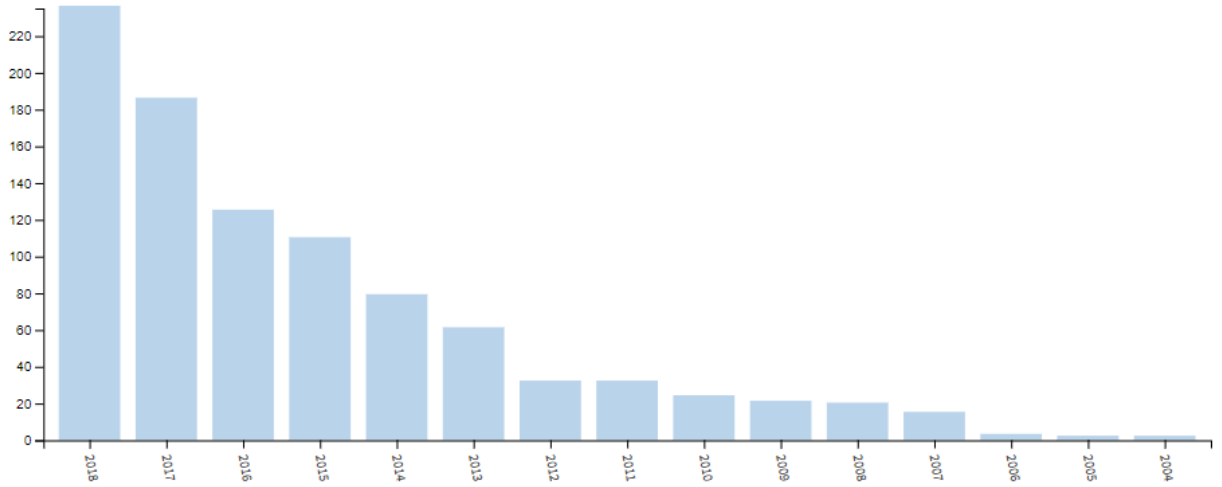
+ 350
En 2018



Chez l'Homme

+ 220
En 2018







Particularité des Volailles

Caeca : Mélange contenus d'Intestin Grêle et Urine : Metab alim + Metab endogène + MÉTAB BACT
Excreta : Mélange féces et urine : METAB ALIM + METAB ENDOGÈNE + Métab Bact

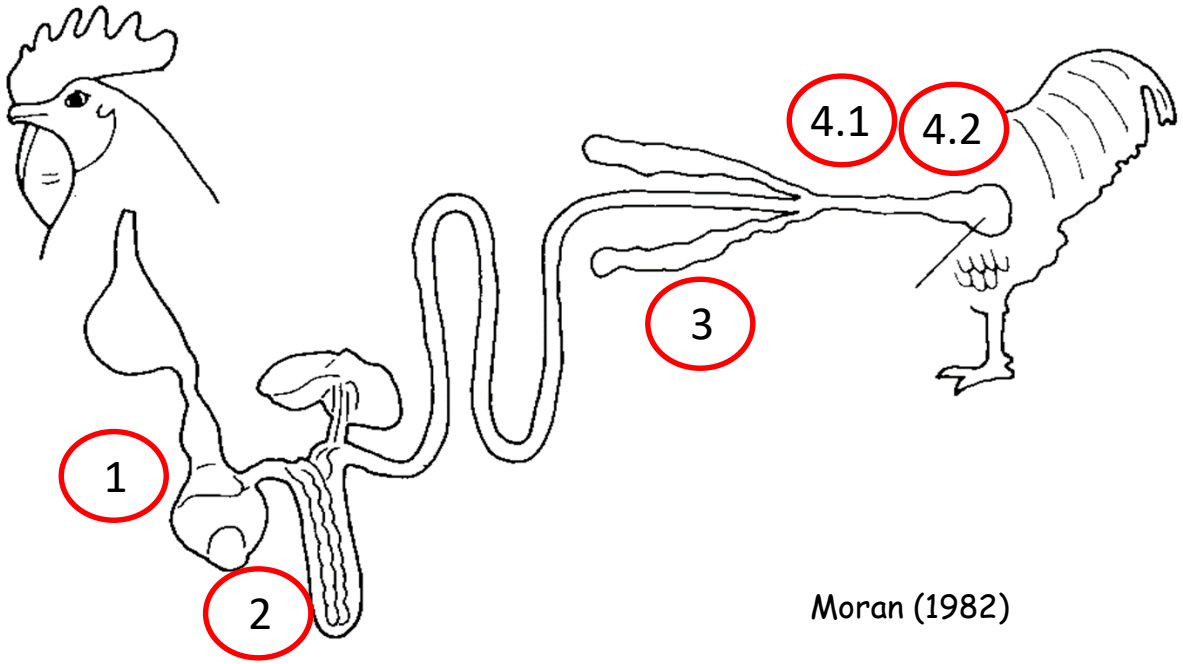
Métabolites endogènes : origine digestive et métabolisme général

Forte complexité → Séparation possible ?



Mouvements de rétropéristaltisme

Sklan et al (1978); Godwin et Russell (1997); Sacranie et al (2007, 2012)



Moran (1982)

1. Du gésier au proventricule

2. De l'intestin grêle au gésier

3. Des caeca vers l'intestin grêle

4. Du cloaque vers les caeca

   4.1. Du rectum vers les caeca
   4.2. Du cloaque vers le rectum

➡ Du cloaque au gésier



Etudes publiées et thèse

Contenus digestifs

Iléon (Bailey 2010 (thèse); Gabriel et al 2013; Beauclercq et al 2018; Gadde et al 2018)
Caeca (Bailey 2010; Gabriel et al 2015; Nothaft et al 2017; Cao et al 2018; Beauclercq et al 2018)
Colon (Le Roy et al 2016)
Incubation in vitro avec des contenus digestifs (Caeca : Rubinelli et al 2017)



Sérum

(Beauclercq et al 2018; Wang et al 2018)

Appareil digestif

Tissus intestinaux (Le Roy et al 2016)

Annexe de l'appareil digestif Foie (Nie et al 2015)

Rq : Viande (Lytou et al 2017)

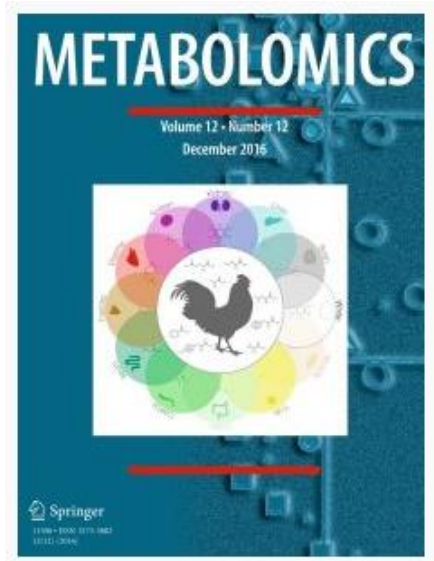


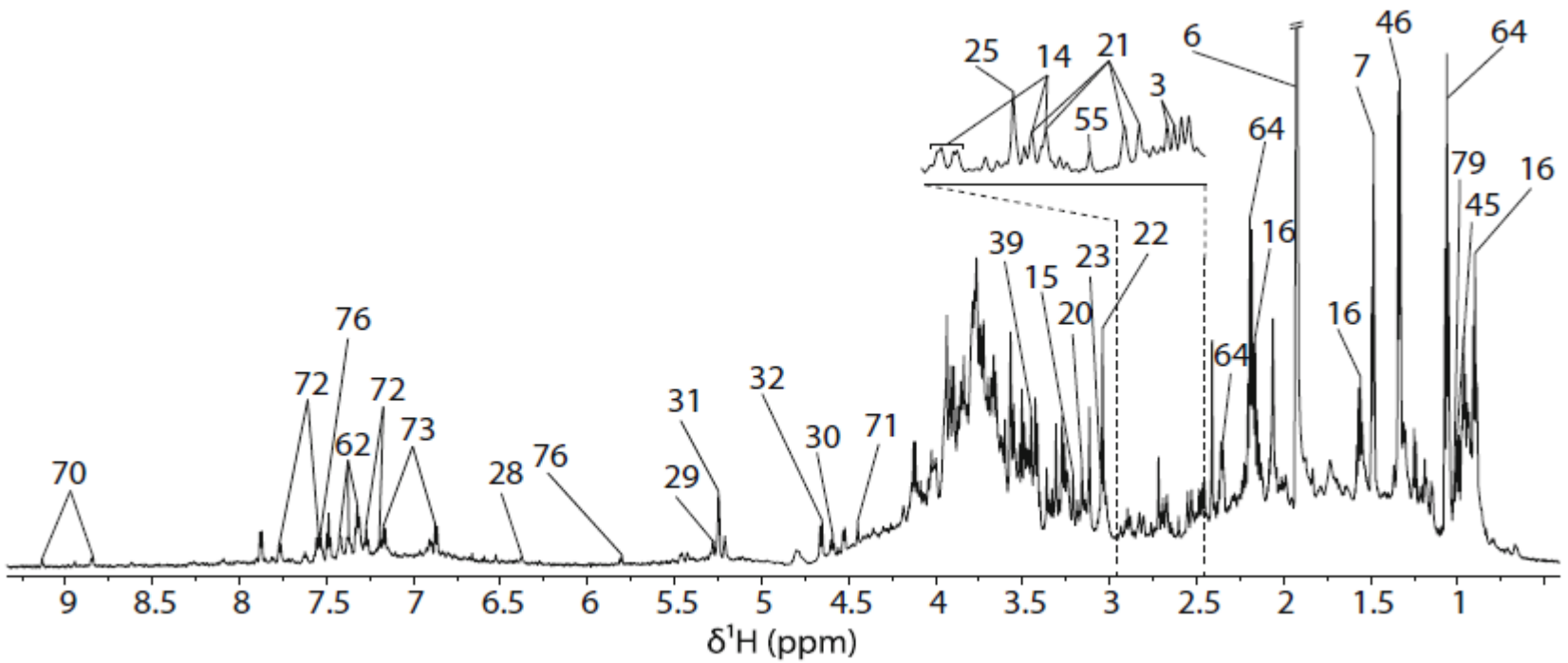
Metabolomics (2016) 12:157
DOI 10.1007/s11306-016-1105-7

ORIGINAL ARTICLE

NMR-based metabolic characterization of chicken tissues and biofluids: a model for avian research

Caroline Ivanne Le Roy[1] · Luke John Mappley[2] · Roberto Marcello La Ragione[3] · Martin John Woodward[1] · Sandrine Paule Claus[1]





Animaux :
NovoGen Brown commercial laying hens
15–16 weeks of age
Five individuals

Echantillons
Contenu de colon
Extraction avec rupture mécanique des cellules bactériennes

Analyse
RMN 1H

UMRBOA
Biologie des Oiseaux & Aviculture

Travaux chez le poulet à l'UMR-BOA

Maigres



Gras



Bon digesteurs (D+)
Mauvais digesteurs (D-)



Impact de la source énergétique alimentaire sur les métabolites digestifs microbiens chez le poulet (ANR FatInteger : 2012-14)

URA, UMR PEGASE

Protocole expérimental

Maigres



Gras



- 2 lignées expérimentales Maigre (M) et Grasse (G) (mâles)
- A partir de 22 jours jusqu'à l'abattage à 63 jours
  2 régimes isoénergétiques (3 000 kcal / kg) et isoprotéiques (19%)
  Une teneur en lipides élevée (8,0%) ou faible (2,0%), et composition identique en acides gras : haut lipides (HL) et bas lipides (BL)
  Régime haut lipides (HL) : huile de colza et soja, cellulose
  Régime bas lipides (BL) : amidon de maïs, plus de blé (40 vs. 25%)



- 1 - 21 jours d'âge : animaux élevés ensembles au sol (6.7 poulets/m2)
  21 - 63 jours d'âge : cages individuelles
- 12 animaux / lignée / régime

→ Analyses phénotypiques (Baeza et al, 2015)

Modification du métabolisme énergétique

Analyses des métabolites digestifs par approche métabolomique

CEISAM, UMR CNRS, Université de Nantes

(50 € / ech, Prestation de service)

Echantillons digestifs de poulet :

- Contenus d'intestin grêle (jéjunum)
- Contenus de caeca

Conservation des échantillons

Congelés dans l'azote liquide
et conservés à -80°C

Extraction des métabolites

Tampon phosphate; cycles de congélation / décongélation et sonication
Centrifugation durant 10 min à 13 000 rpm
Surnageants stockés à -80°C jusqu'à leur analyse

Ensemble des métabolites :
Intra et extra-cellulaires

Métabolites polaires

Analyse des métabolites : RMN ^{1}H



Spectres RMN 1H à 1D générés à 30°C (spectromètre Bruker Avance 500 avec cryo-sonde
Traitement des spectres avec le logiciel Topspin 2.1 (Bruker)
Pour chaque spectre : correction de la ligne de base; phasage des signaux ; calibration des déplacements chimiques (δ)

Reconnaissance des métabolites

Attribution des spectres aux différents métabolites : basée sur des données de la littérature

Analyses statistiques

Normalisation des données
Analyse univariée
Approche multivariée : Analyse en Composantes Principales (ACP) et Analyse Discriminante (PLS-DA)

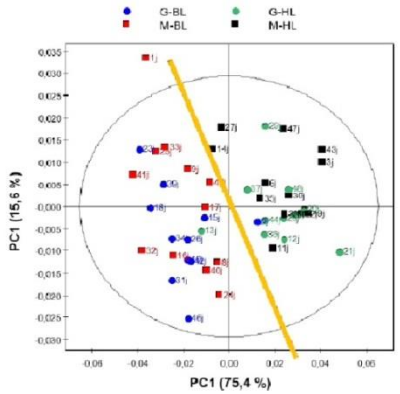
Gabriel, I., et al. (2015). Impact de la source énergétique alimentaire sur les métabolites digestifs microbiens chez le poulet. 11ème Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à foie gras, Tours, pp 565-569.

Résultats Métabolites digestifs, dont métabolites microbiens

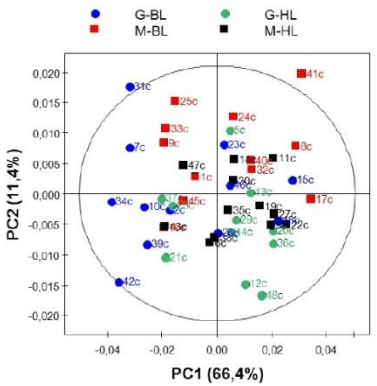
Variabilité inter-individuelle Très importante

Analyse en Composantes Principales

Jéjunum



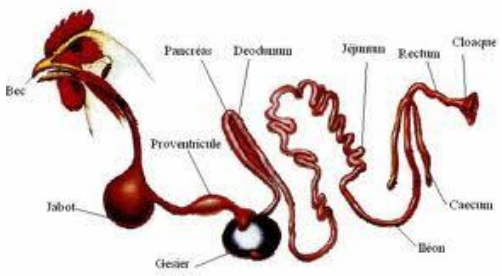
Caeca



Comparaisons des deux segments digestifs

Différence du nombre de métabolites

Jéjunum : 29 < Caeca : 41



Métabolites Communs aux deux segments
Spécifiques au jéjunum
Spécifiques aux caeca

Métabolites en commun dans le jéjunum et les caeca : 27

Acides aminés (16)

Alanine
Asparagine
Aspartate
Glutamine
Glutamate
Glycine
Isoleucine
Leucine
Lysine
Méthionine
Phénylalanine
Proline
Thréonine
Tryptophane
Tyrosine
Valine

Hexose

Glucose

Dérivé d'acides aminés

Créatine

Base azotée de l'ADN, ARN

Adénine

Vitamine B

Choline

Origine bactérienne potentielle



Nicholson et al (2012)

Acides gras à chaine courte (AGCC)

Acétate
Formate
Fumarate

Acides organiques

Lactate

Succinate

Amine secondaire

Diméthylamine

Dérivé d'acides aminés

Taurine

Métabolites spécifiques du jéjunum

Acides aminés Arginine, Histidine

Métabolites spécifiques des caeca

Origine bactérienne potentielle Nicholson et al (2012)

Acides gras à chaine courte (AGCC)

n-butyrate
n-valérate
Propionate

Dérivés d'AGCC

3-(4'-hydroxyphényl)-propionate

Acide dicarboxylique

k-glutarate

α-céto-acides

Pyruvate
α-céto-isovalérate
α-céto-β-méthyl-valérate

α-céto-acide

k-glutarate

Amine tertiaire

Tryméthylamine

Base pyrimidique

Uracile

Monosacharides

Arabinose
Galactose
Xylose

Acide aminé

Citrulline



Nombreux métabolites d'origine bactérienne potentielle dans les caeca

Diversité importante du microbiote

Effets d'une **modification du statut énergétique** des animaux induite par leur **génétique et/ou leur régime**



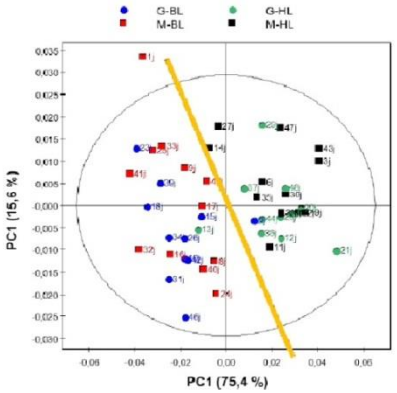




Dans le jéjunum

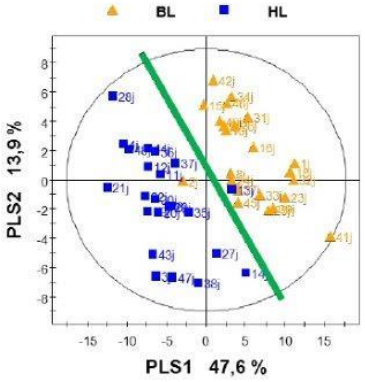
ACP

Analyse en Composantes Principales



PLS-DA

Analyse Discriminante par la méthode de régression des moindres carrés partiels

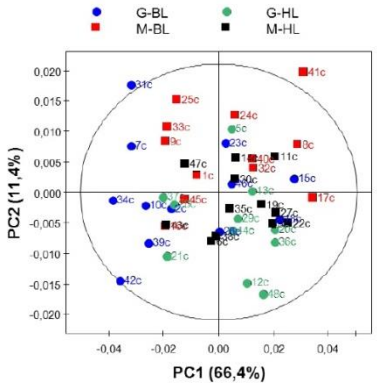


Pas d'effet génétique

Dans les caeca

Pas d'effet significatif

ACP



Effet du régime alimentaire dans le jéjunum

Le lactate peut aussi provenir de la muqueuse intestinale (Wang et al., 2005). Ex : pathologies inflammatoires de l'intestin (Hove et al., 1995).

La consommation de régimes riches en lipides peut induire des réactions inflammatoires (Ji et al., 2011)



	Haut Lipides*	Bas Lipides**
Glucose		+
Lactate	+	
Acides aminés (7)	+	

* Cellulose
**Amidon, blé

Relation entre l'efficacité digestive et les profils métaboliques du sérum et des contenus intestinaux chez le poulet

(Métaprogramme GISA Galmide 2014-15/ UE H2020 Feed-a-gene 2015-20)

URA, GABI



Protocole expérimental

★ 2 lignées expérimentales : AIL (advanced inter-cross line)
Bon digesteurs (D+) et mauvais digesteurs (D-)
213 animaux (mâles et femelles)

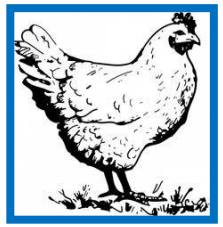
★ Régime alimentaire (2 943 kcal / kg; 21 % de protéines)
De 0 à 28 Jours
Teneur élevée en blé (52,5 %) d'une variété (Rialto)
de forte viscosité et de forte dureté
Teneur en lipides élevée (6%)



★ 0 – 11 jours d'âge : animaux élevés ensembles au sol (17 poussins / m2)
11 – 28 jours d'âge : cages individuelles

★ Sélection de 60 anx : 50% D+ et 50% D-

D+





D-

➡ Analyses phénotypiques de l'animal

Efficacité digestive (AMEn, digestibilités des lipides, des protéines et de l'amidon)
(Beauclercq et al, 2018)

Analyses des métabolites digestifs par approche métabolomique

CEISAM, UMR CNRS, Université de Nantes

Echantillons digestifs de poulet :

- Contenus d'intestin grêle (iléon distal)
- Contenus de caeca

Conservation des échantillons

Congelés dans l'azote liquide
et conservés à -80°C

Extraction des métabolites

Métabolites extra-cellulaires Métabolites polaires

Méthanol avec 4 mM of NEM sous agitation légère (Sasidharan et al, 2012)

NEM : n-ethylmaleimide; stabilisation des thiols

Centrifugation (15,000 g, 2 min, 4 °C) / Surnageants stockés à -80°C → Lyophillisation et stockage à -80°C

Solubilisation dans du tampon phosphate avec 10% de TSP et 0,01% de NaN3

TSP : acide triméthylsilylpropanoïque (référence interne)

Analyse des métabolites : RMN ^{1}H

Spectres RMN 1H à 1D générés à 25°C (spectromètre Bruker Avance 700 avec cryo-sonde

Traitement des spectres avec le logiciel Topspin 2.1 (Bruker)

Pour chaque spectre : correction de la ligne de base; phasage des signaux ; calibration des déplacements chimiques (δ)



Reconnaissance des métabolites

CEISAM, UMR CNRS, Université de Nantes
Département ACBM, PPF ASB, Université de Tours

Attribution des spectres aux différents métabolites : basée sur des données de la littérature (LMDB, Chenomx)

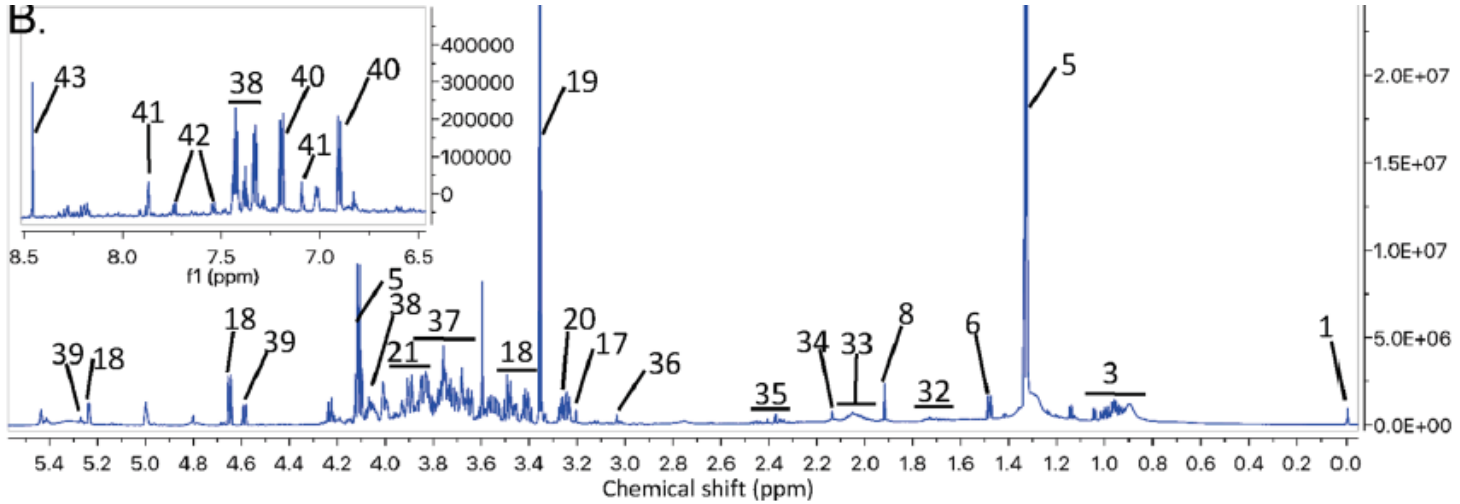
Analyses statistiques

UMR-BOA

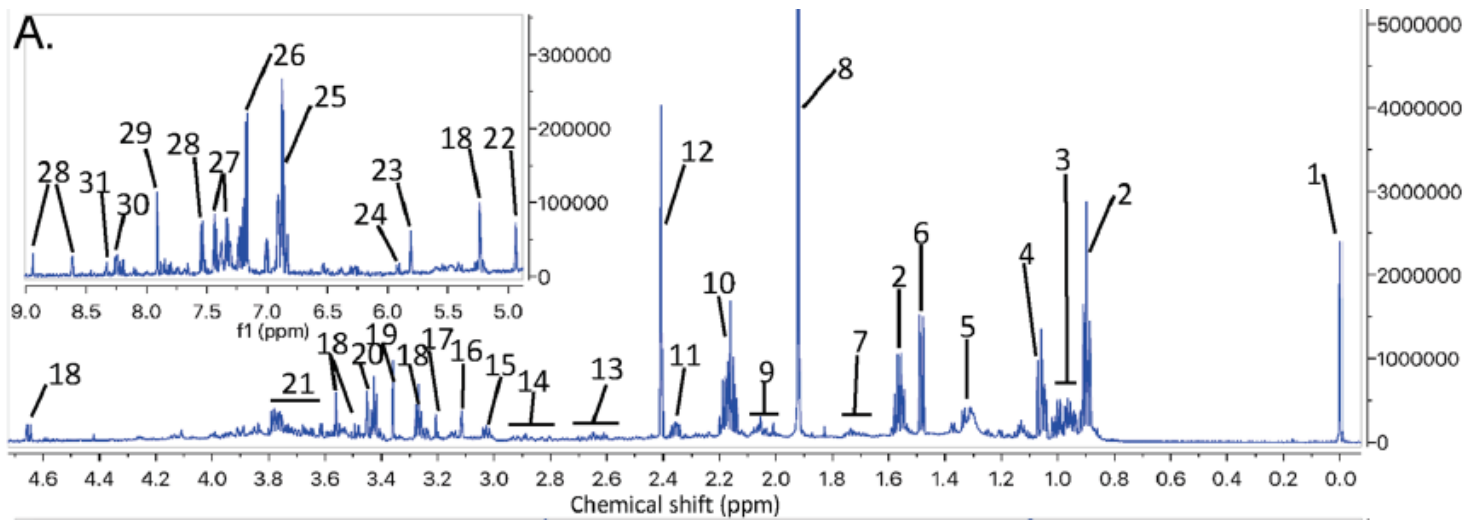
Normalisation des données
Approches multivariées

Spectres représentatifs

Iléon distal



Caeca



Analyse par la plateforme n°1

Nombre total de métabolites identifiés

Iléon distal : 30 < Caeca : 46

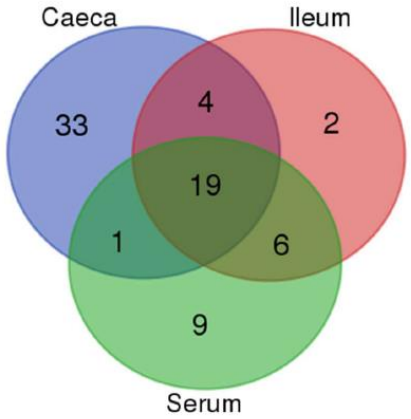
Communs aux deux segments : 24 métabolites

Origine bactérienne potentielle (6) Nicholson et al (2012)



AGCC (acétate, formate)
Acides organiques (lactate, succinate),
Dérivé d'acides aminé (taurine)
Amine tertiaire (triméthylamine)

Analyse par la plateforme n°2



Spécifiques à l'iléon distal : 6 métabolites

Origine bactérienne potentielle (1)

Amine secondaire (diméthylamine)

Spécifiques aux caeca : 22 métabolites

Origine bactérienne potentielle (15)

AGCC (butyrate, valérate, propionate)
Benzénoïdes (4-hydroxybenzoate, phenylacétate, 4-hydroxyphénylacetate, 3-hydroxyphénylpropionate)
Monosaccharides (arabinose, xylose)
α-céto-acides (3-méthyl-2-oxovalérate, 2-oxoisocaproate, α-kétoglutarate),
Polyamine (putrescine),
Dérivés d'acides aminés (GABA (acide γ-aminobutyrique), 5-aminovalérate)

Analyse statistique n°1

Corrélations Relations négatives

Origine bactérienne potentielle



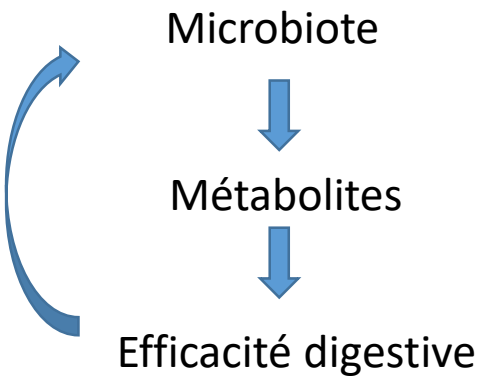
Putrescine : EMAn, digestibilité des lipides
GABA : digestibilité des lipides

Putrescine (polyamines) :

Polyamines

Origine

Issue de la fermentation d'acides aminés par le microbiote digestif (Matsumoto et Benno 2007)



Effets biologiques

Nécessaires au développement intestinal
Pourraient avoir des effets néfastes à forte dose (Vargas et al, 2012)

GABA : neurotransmetteur

Origine

Peut être produit par des bactéries intestinales (Barrett, et al. 2012)

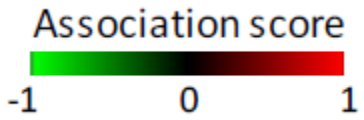
Effet biologique

Pourrait moduler la motricité digestive (Auteri et al, 2015) → Efficacité digestive

Beauclercq, S., et al. (2017). Relationship between intestinal and blood metabolome and fecal digestive efficiency in chicken. 68th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Tallinn (Estonie).

Analyse statistique n°2

Analyse de correlation canonique des moindres carrés partiels



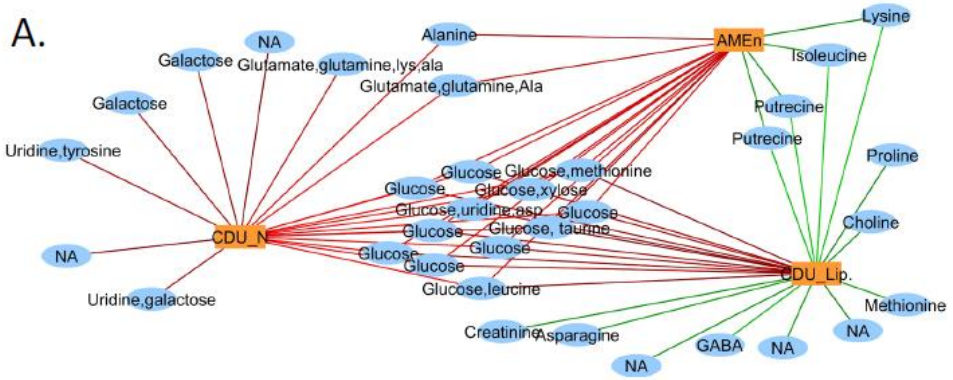
Métabolites différentiant les D+ et D-

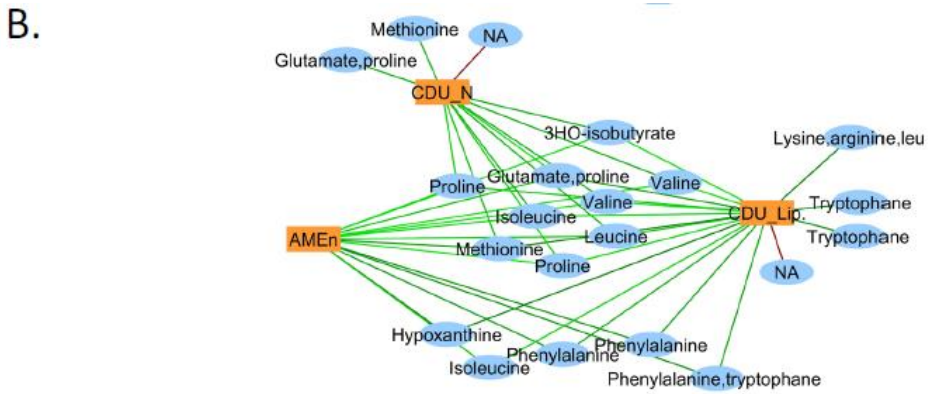
Acides aminés (lysine, isoleucine, methionine, glutamate)
Monosaccharide (glucose)

Caeca

Correlations fortement positives

Glucose : AMEn, Digestibilité des protéines





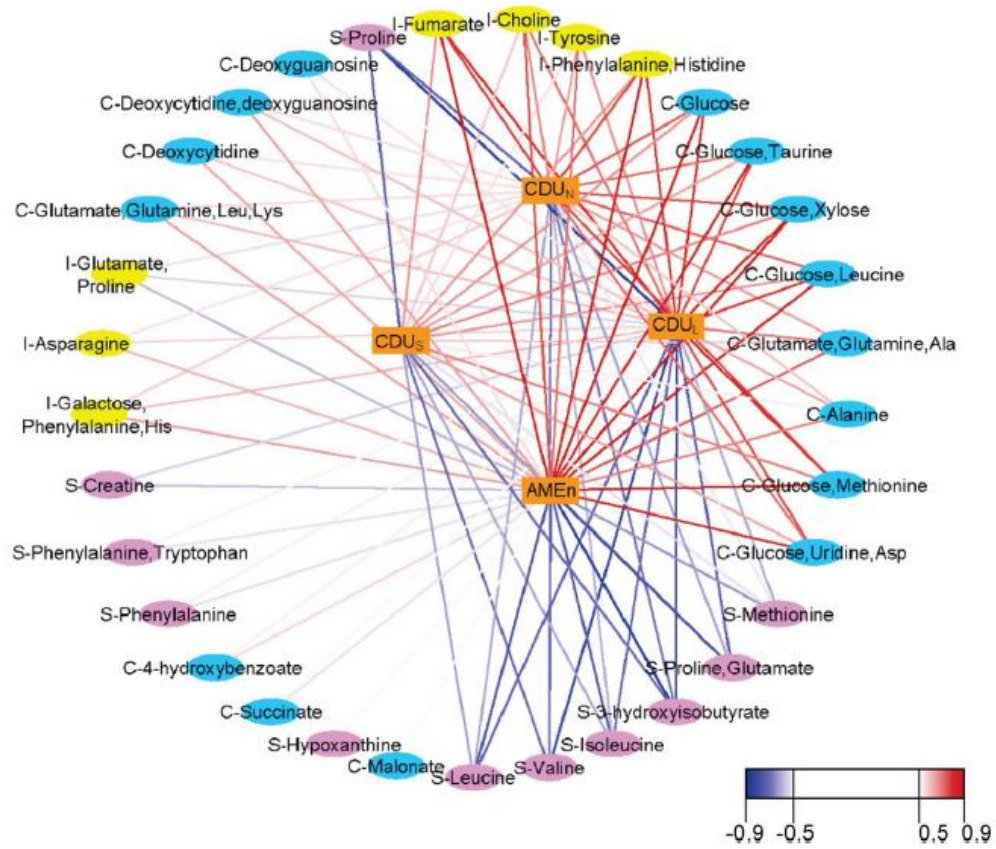
Analyse statistique n°3

Beauclercq, S., et al. (2018). "Relationships between digestive efficiency and metabolomic profiles of serum and intestinal contents in chickens." Sci Rep 8:6678 | DOI:10.1038/s41598-018-24978-9.

Analyse de correlation canonique des moindres carrés partiels (sPLS)

Association la plus forte avec AMEn

Iléon distal : fumarate
Caeca : glucose



Global metabolic network between metabolites retained by sPLS and digestive efficiency traits (coefficients of digestive use of nitrogen, starch, lipids, and metabolisable energy at 4 weeks).
This network combines metabolites from :
the ileal content (“I” or yellow node),
caecal content (“C” or cyan node),
and serum (“S” pink node).
The edges are coloured according to the association score (cut-off at ±0.5).

4.4. Limites et améliorations attendues dans le futur

Limites

Dans Heintz-Buschart, A. and P. Wilmes (2018).
Current limitations include a very large fraction of unknown metabolites (well in excess of 90% of measured features may be unknowns, even when searching metabolomic data against comprehensive databases as well as the difficulty in linking specific metabolite features to their microbial provenance

Creek, D. J., et al. (2014). "Metabolite identification: are you sure? And how do your peers gauge your confidence ? ." Metabolomics 10: 350 –353.

Améliorations futures

Advances in computational mass spectrometry, as well as in de novo metabolic network reconstruction and modelling, will allow some of these limitations to be addressed in the future

5. Avantages et Limites des approches OMIC

Résultats très dépendants des analyses bio-informatiques et bio-statistiques

Mêmes jeux de données → Résultats différents possibles

Comparaison intra-études et intra-laboratoire (même plateforme, mêmes techniques)

Comparaison entre études …

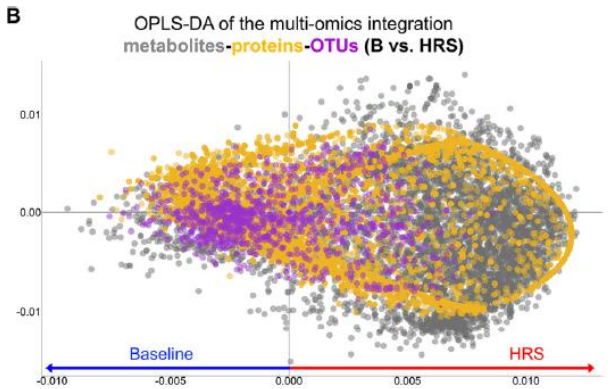
Métabolites et protéines différentiels mis en évidence

→ Hypothèses → Validations avec des modèles expérimentaux

→ Approches Multi OMIC

Given the different limitations of the single omic levels, as well as their complementary information content, the integration of multi-omic data can also help to close gaps when assessing gut microbial activity in situ by bridging genomic content to final phenotype

Heintz-Buschart, A. and P. Wilmes (2018)



Maier et al (2017)

Remerciements

A améliorer

UMR BOA – Biologie des Oiseaux & Aviculture

INRA – Science & Impact

GenPhySE

Unit « Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage »

Chimie Et Interdisciplinarité Synthèse, Analyse, Modélisation – UMR CNRS 6230 – Université de Nantes

Laboratoire CEISAM
Chimie Et Interdisciplinarité: Synthèse, Analyse, Modélisation
UMR CNRS 6230

Université de Nantes – CNRS

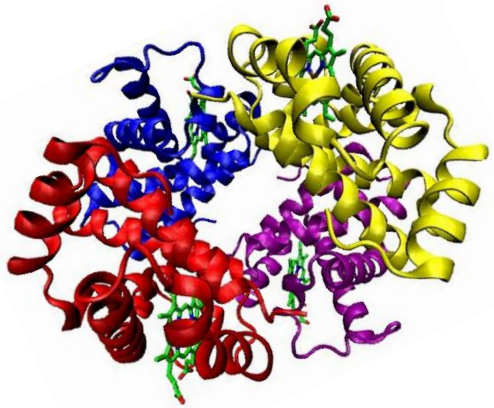
Genotoul Metatoul — *Plateforme « Métabolomique »*

Genotoul GeT — *Plateforme « Génomique et transcriptomique »*

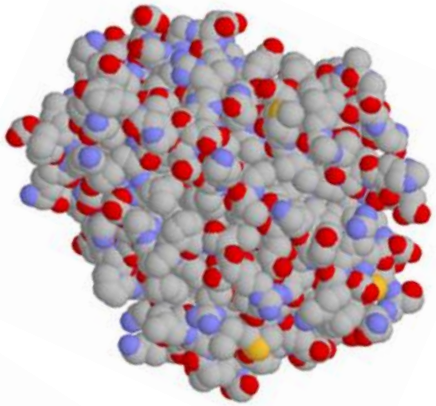
Genotoul TRI — *Plateforme « Imagerie cellulaire »*

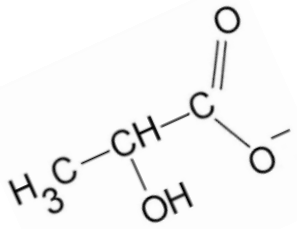
Université François-Rabelais Tours – Département d'Analyse Chimique Biologique et Médicale – PPF Analyse des Systèmes Biologiques

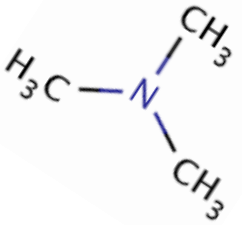
irsd – Institut de recherche en santé digestive — *Plateforme « Organoides »*











Merci de votre attention







Les fonctions microbiennes intéressent tout le monde

Objet de recherche	Département INRA	Intérêt	Localisation des Fonctions d'intérêt
Microbiote digestif : parasite (coccidies, bactéries, virus …)	ISP : SA, MICA	Produits microbiens (bactéries commensales) locaux ou circulants → Microbes (commensales et patho)	Contenus digestifs : action directe des produits microbien sur les pathogènes Circulation sanguine → Effet sur physio dig (pancréas, muqueuse intestinale) → Aide / blocage du cycle des patho dig (Ex : coccidies) Co-métabolites / idem pour les prot ? D'après description du M2 GE de l'Univ de Saclay : intervenants dans le M2 sur interactions hôte-parasite (protéomiques)
	BOA : PHASE	Produits microbiens digestif (bactéries commensales) → Effet direct (metab dig) ou indirect (metab métabolisés dans le foie, puis dans la circulation sanguine)	Contenus digestifs : Metab action locale + Metab à action à distance, sans savoir lesquels c'est et comment ils sont métabolisés dans le foie Circulation sanguine → Effet sur physio dig
Microbiote cutané ou autres environnement de l'hôte ?	ISP : dont virus SA, MICA	Produits microbiens (bactéries commensales) → Microbe (commensales et patho)	Peau : Enzymes bénéfiques (maturation de la viande) et néfastes (dégradation) Et autres produits dont métabolites (avec effet sur le pH …)
Microbiote de la viande	Oniris : MICA	Produits microbiens (bactéries commensales) → Microbe (commensales et patho)	Viande : Enzymes bénéfiques (maturation de la viande) et néfastes (dégradation)