



**HAL**  
open science

## 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**

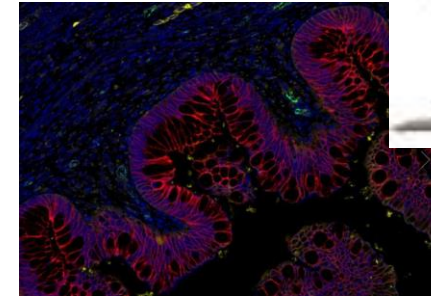
**<https://hal.inrae.fr/hal-02788711>**

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**



**Martin Beaumont**

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

Chargé de recherche  
Equipe NED (Nutrition et Ecosystèmes Digestifs)  
UMUR GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage)  
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. Méta-protéomique

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

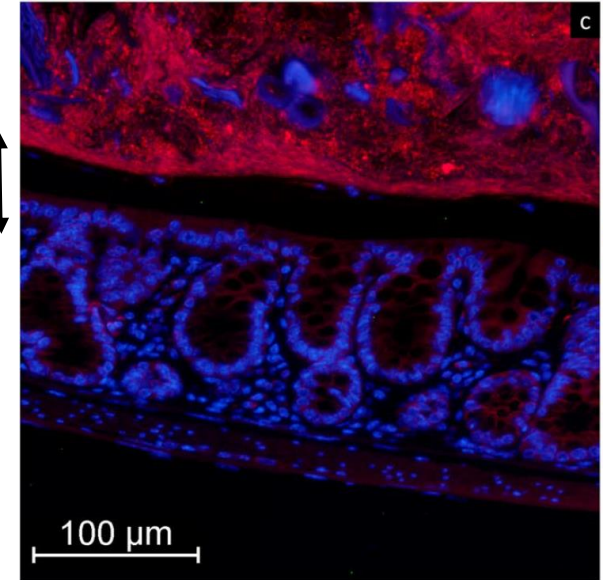
4.4. Limites et améliorations attendues dans le futur

5. Avantages et Limites actuelles des approches OMIC

Bactéries

Mucus 20  $\mu\text{m}$

Noyaux



Kamphuis, *Sci Reports*, 2017



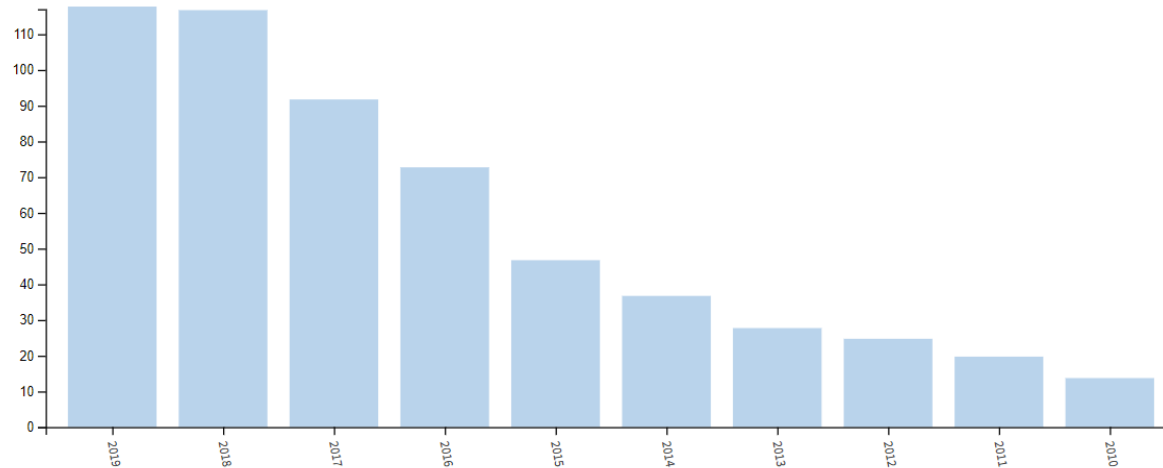
# 1. Limite des approches descriptives par séquençage de régions variables du 16S



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

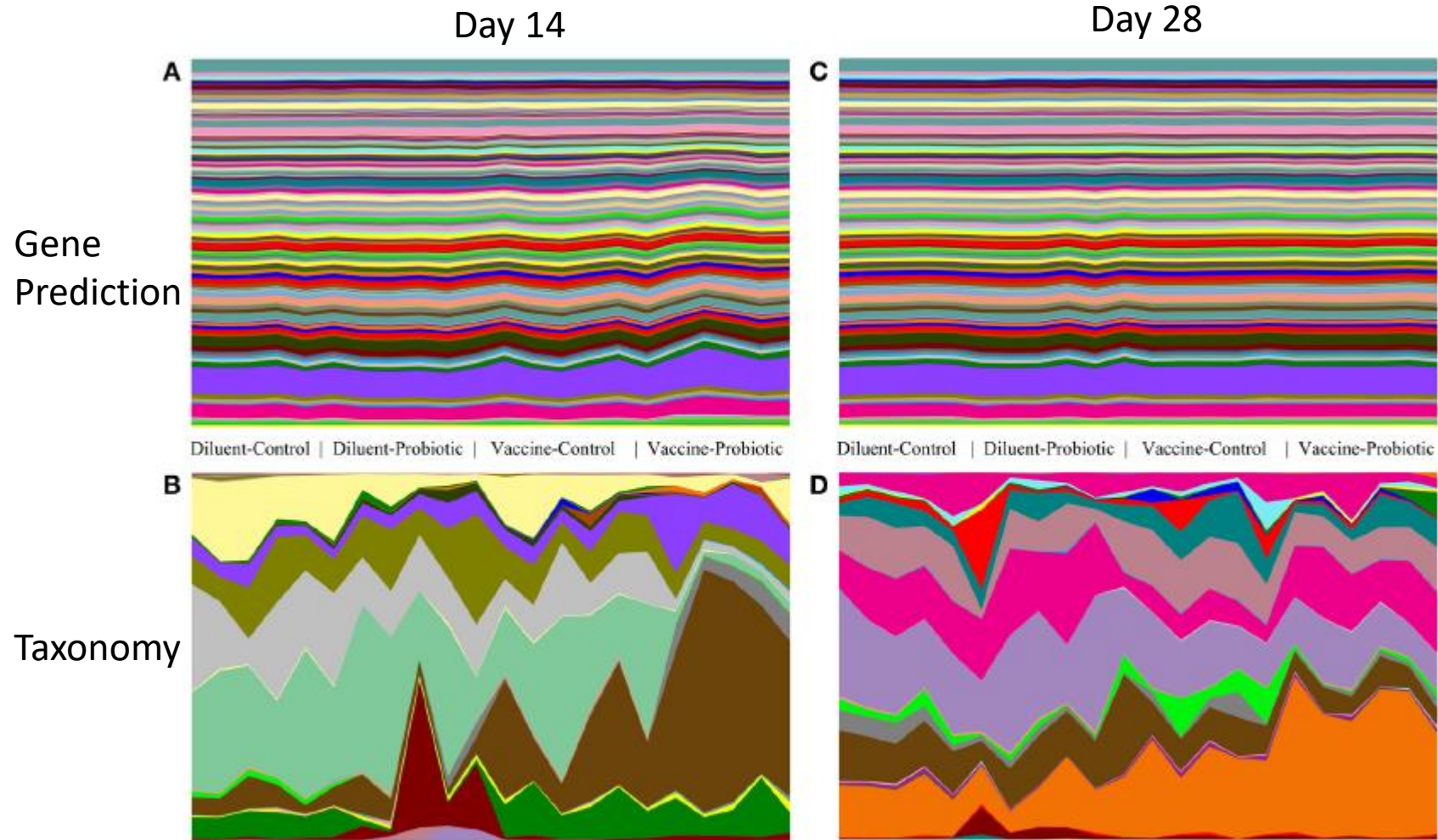
Falentin, H., et al. (2019). "Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding." Cahier des Techniques de l'Inra 97: 23 pages.

**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**



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**.

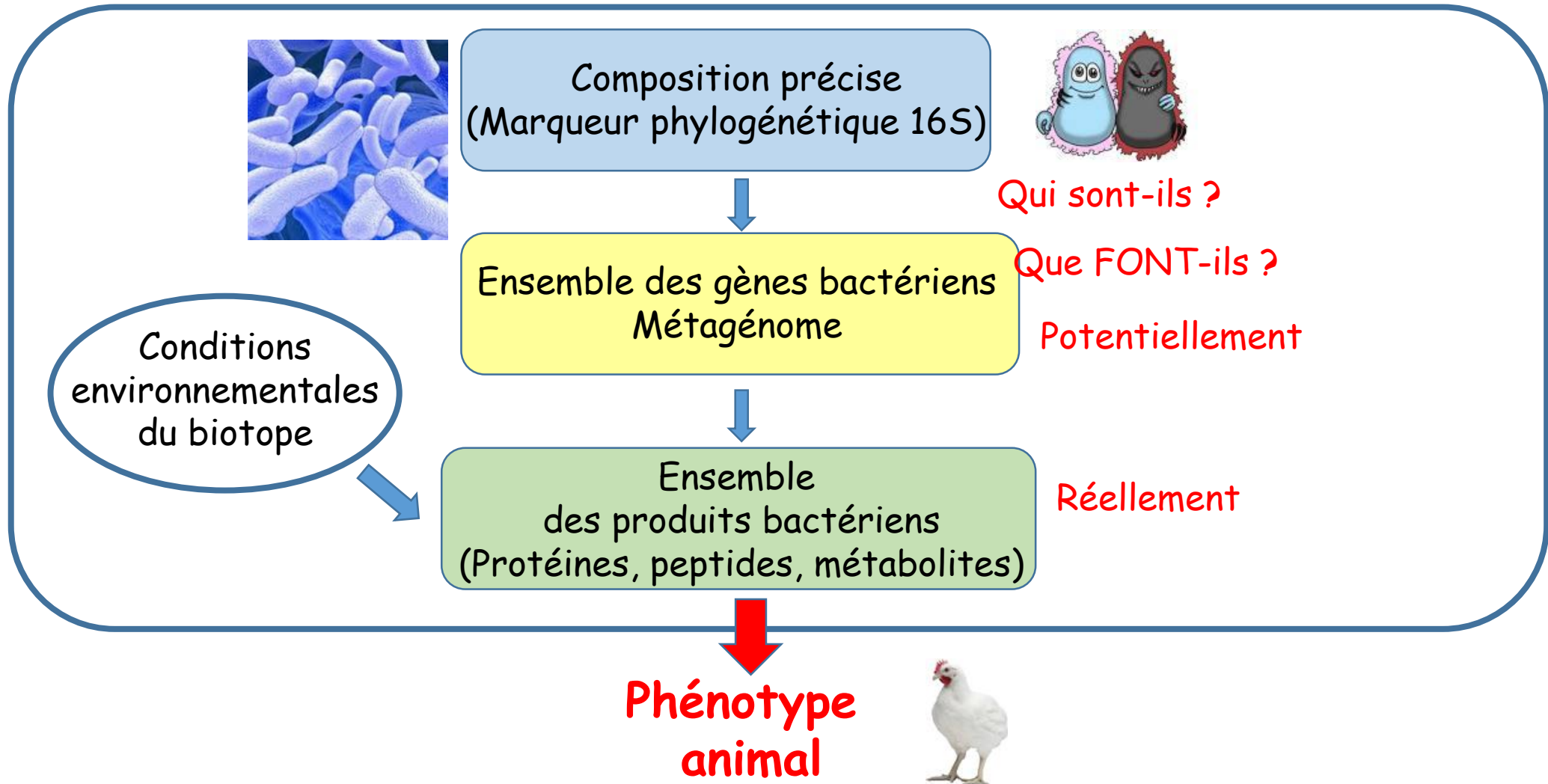
Relative abundance tables for taxa and gene group were assembled and used to generate area charts of all samples at days 14 and 28.

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.

## 2. Du microbiote à ses effets sur l'Hôte

### Microbiote digestif : Composition et FONCTIONS



## 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)

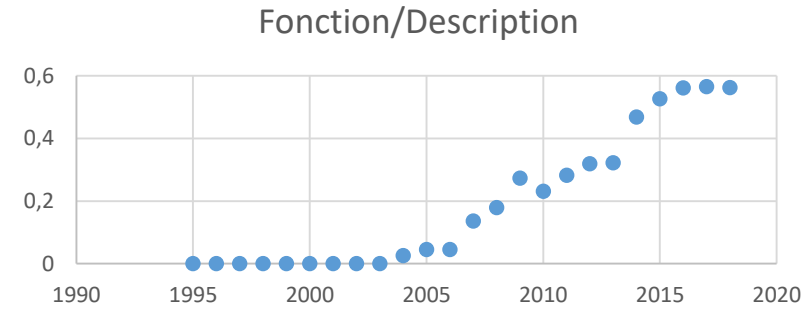
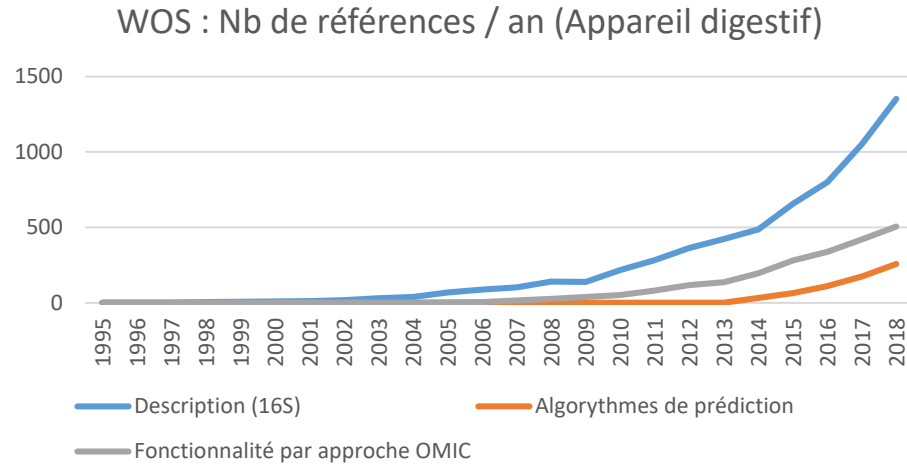


MetaChick (2015-2017)

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



7

### 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)

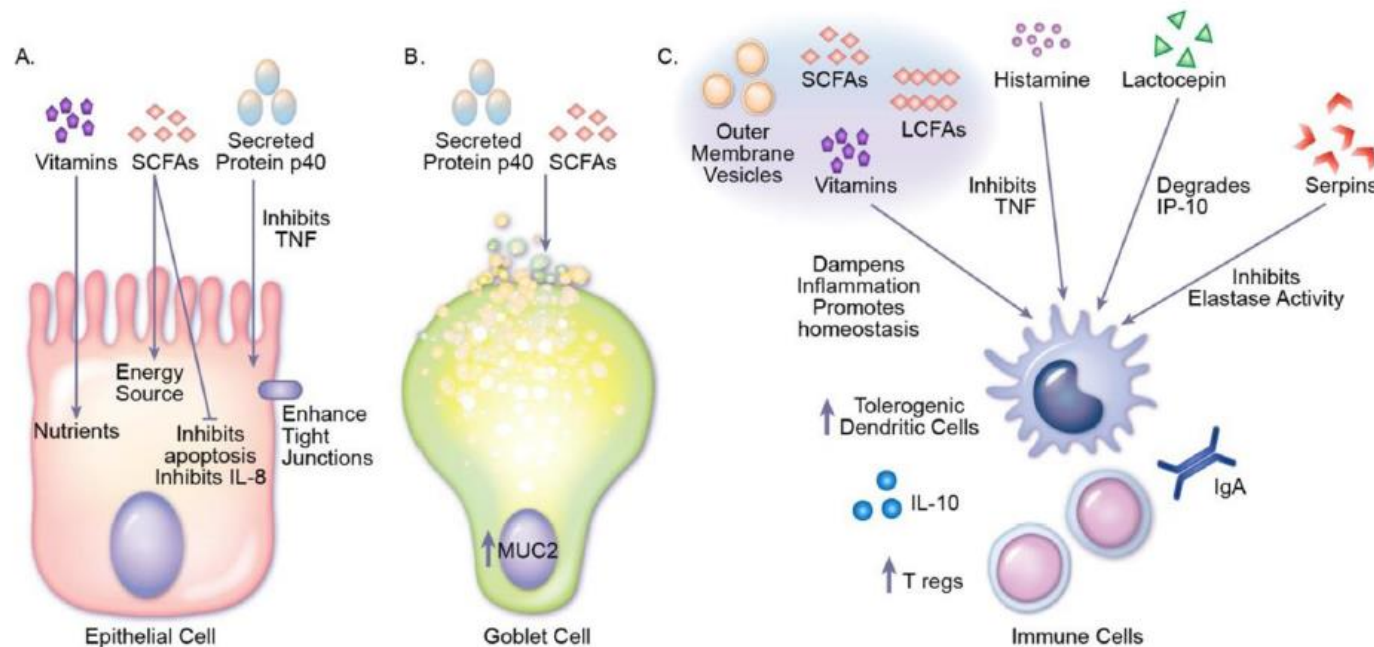


## Importance des **produits bactériens** dans la relation microbiote / hôte

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

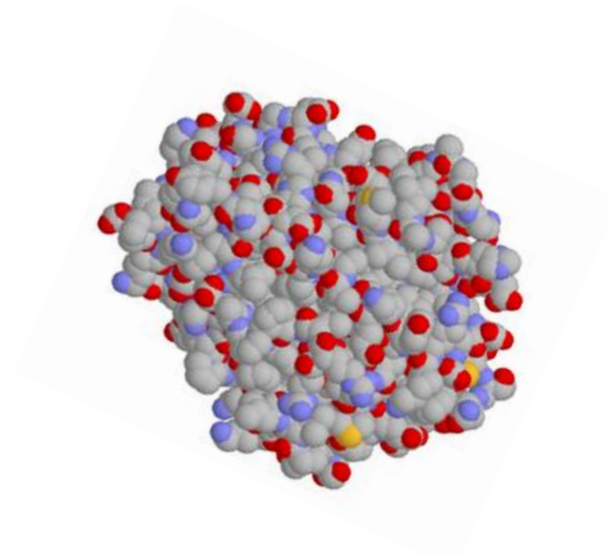
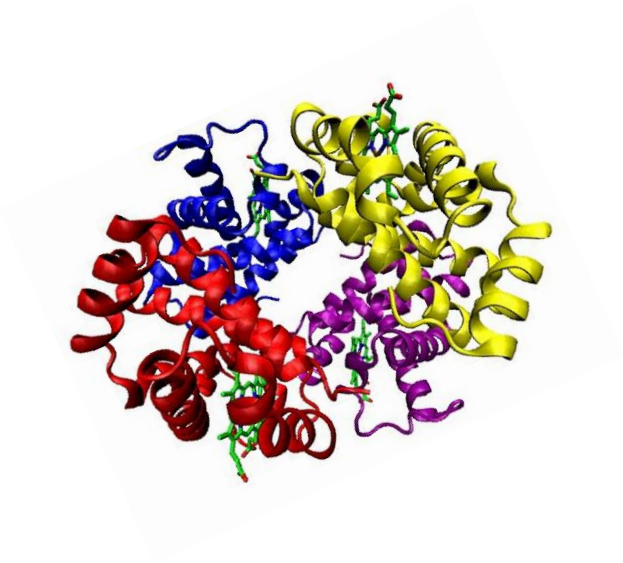
Ex : The **production of cellulases** by **microbial cells** is governed by **genetic** and **biochemical controls** including induction, catabolite repression, or end product inhibition.

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



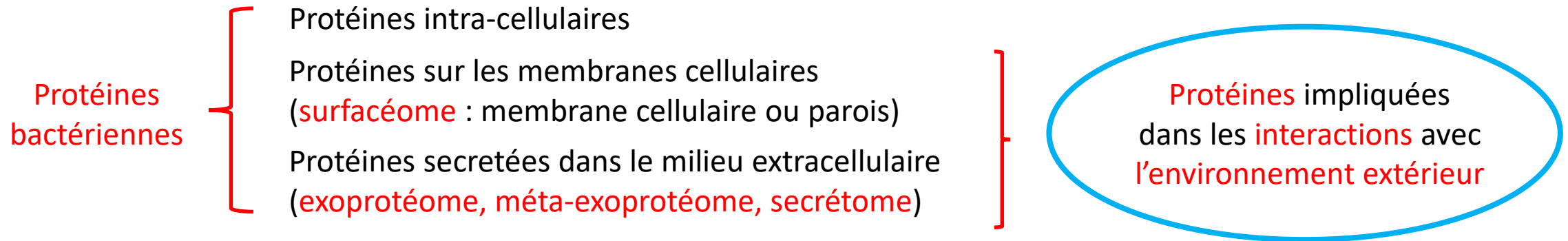
Mechanisms by which commensal secreted **products** beneficially modulate the host

### 3. Méta-protéomique



**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**



**Avantages** Indicateur du phénotype réel

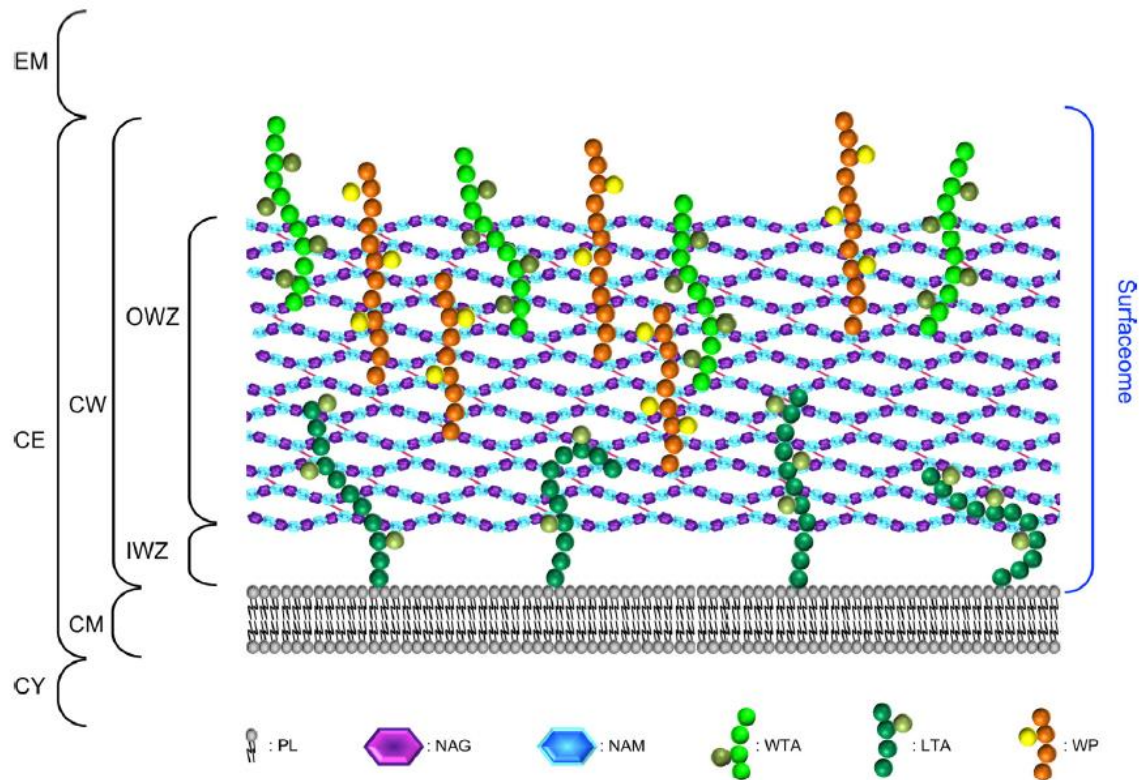
Permet de connaître l'expression des protéines par les membres individuels du microbiote

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



The **CM** is composed of phospholipids (PLs),

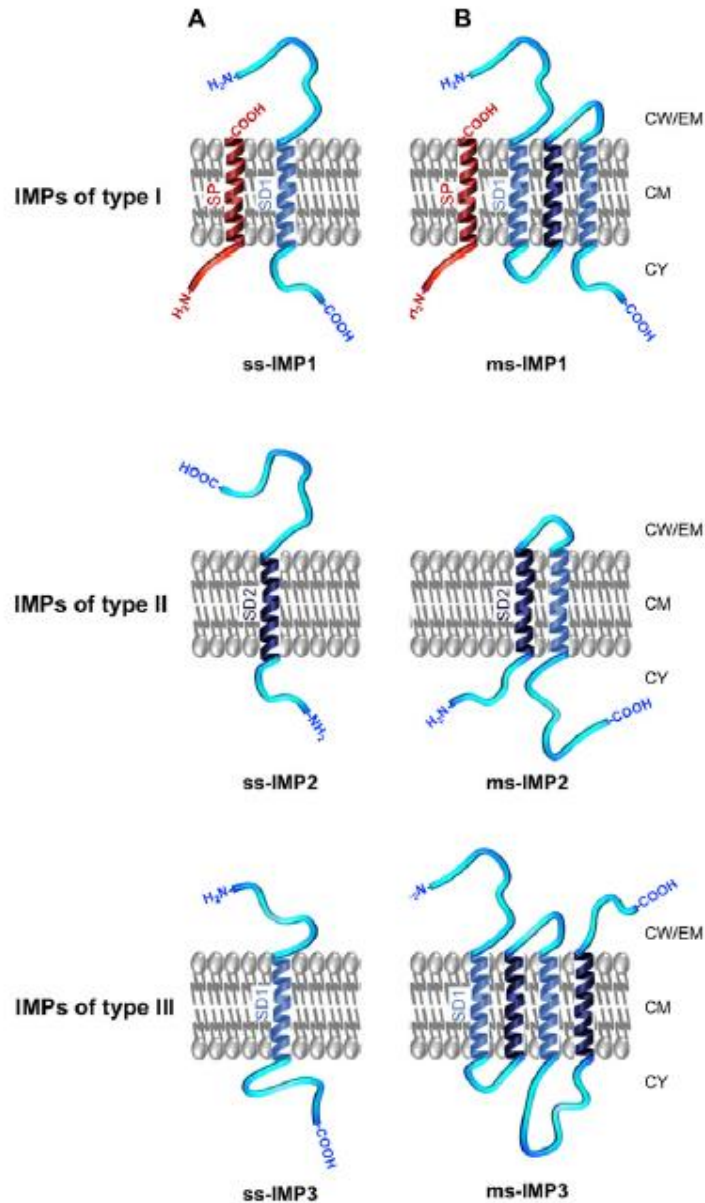
The **CW** : subdivided into the **inner wall zone (IWZ)** and the **outer wall zone (OWZ)**.

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  $\alpha$ -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.

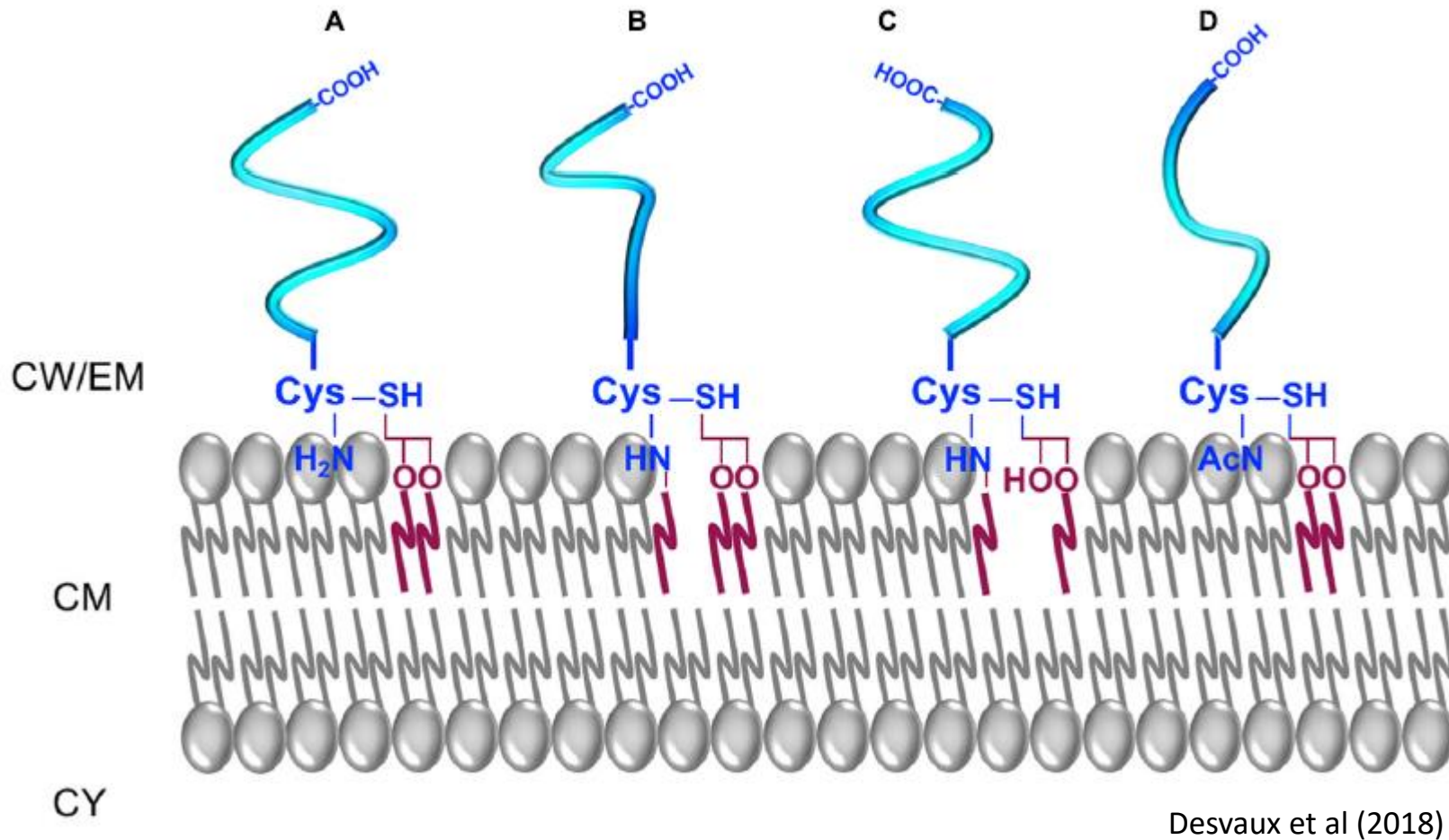
A **ss-IMP of type I** (ss-IMP1) possesses a cleavable N-terminal signal peptide (SP; depicted in red) and are actually anchored to the CM by a SD1 (TMD with a Cin–Nout topology). A **ss-IMP of type II** (ss-IMP2) is anchored to the CM by a SD2 (TMD with a Nin–Cout topology). Like for a ss-IMP1, a **ss-IMP 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.

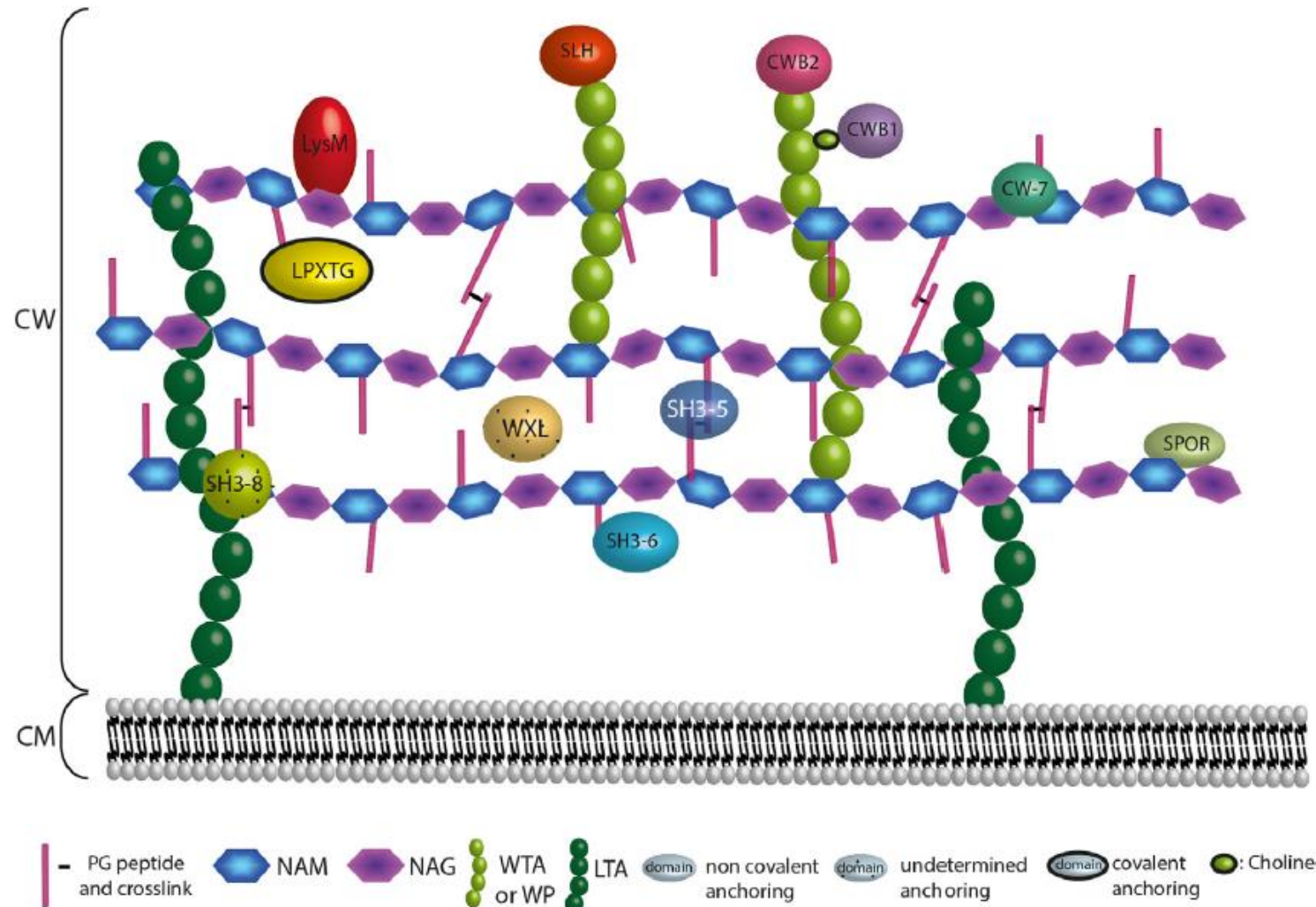
Except for the TMDs, other regions of the IMPs can be in contact with the IWZ but also the OWZ or the extracellular milieu.

The different forms of lipoproteins in parietal monoderm bacteria



- (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)



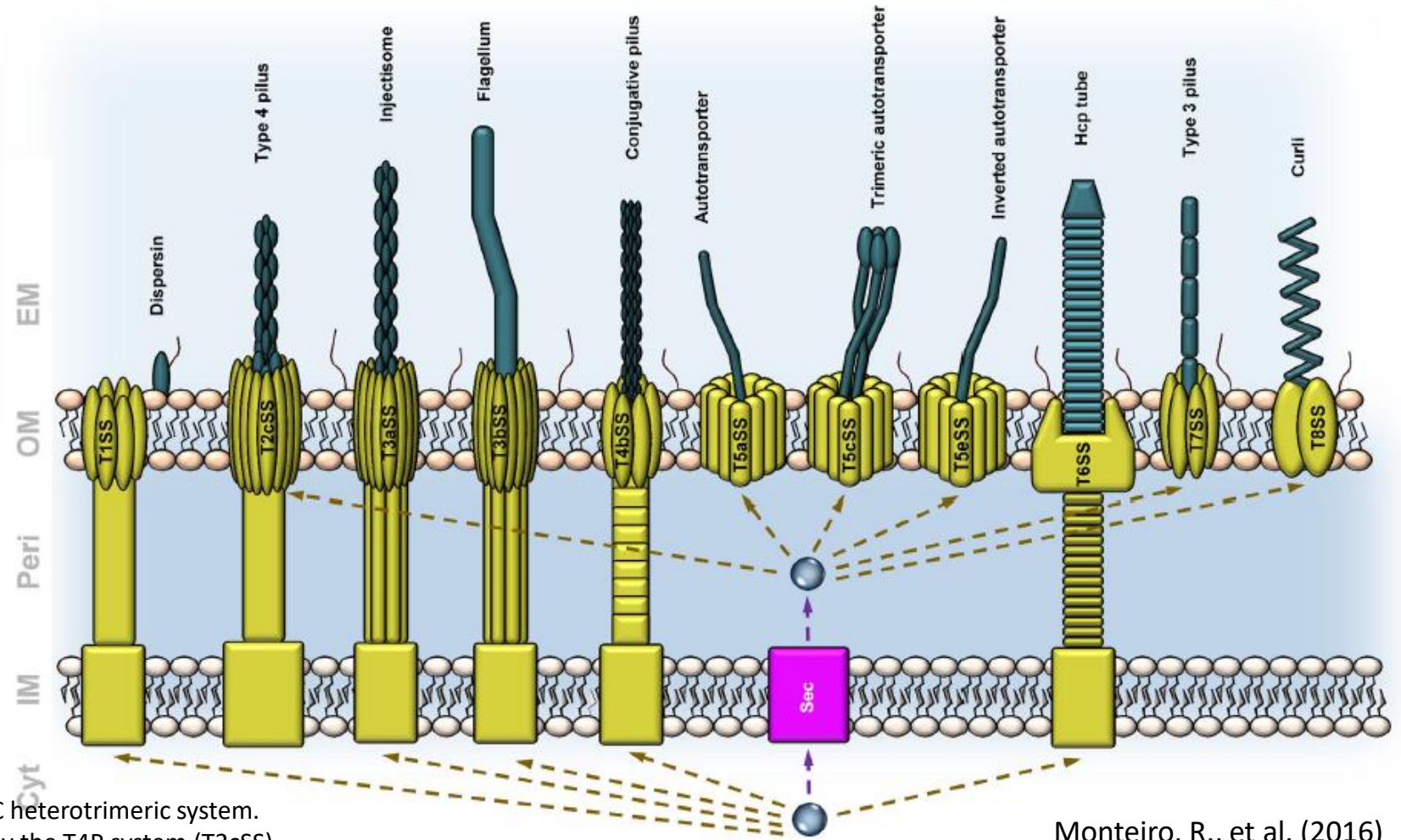
Anchoring localization of **protein domains** interacting with the CW. The localization of the **CW proteins** depends on their domains. Domains are interacting covalently or not at the bacterial CW through interaction with surface structures that are the PG, the WTAs, the WPs or the LTAs. LPXTG **proteins** 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

# 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-ToIC 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.

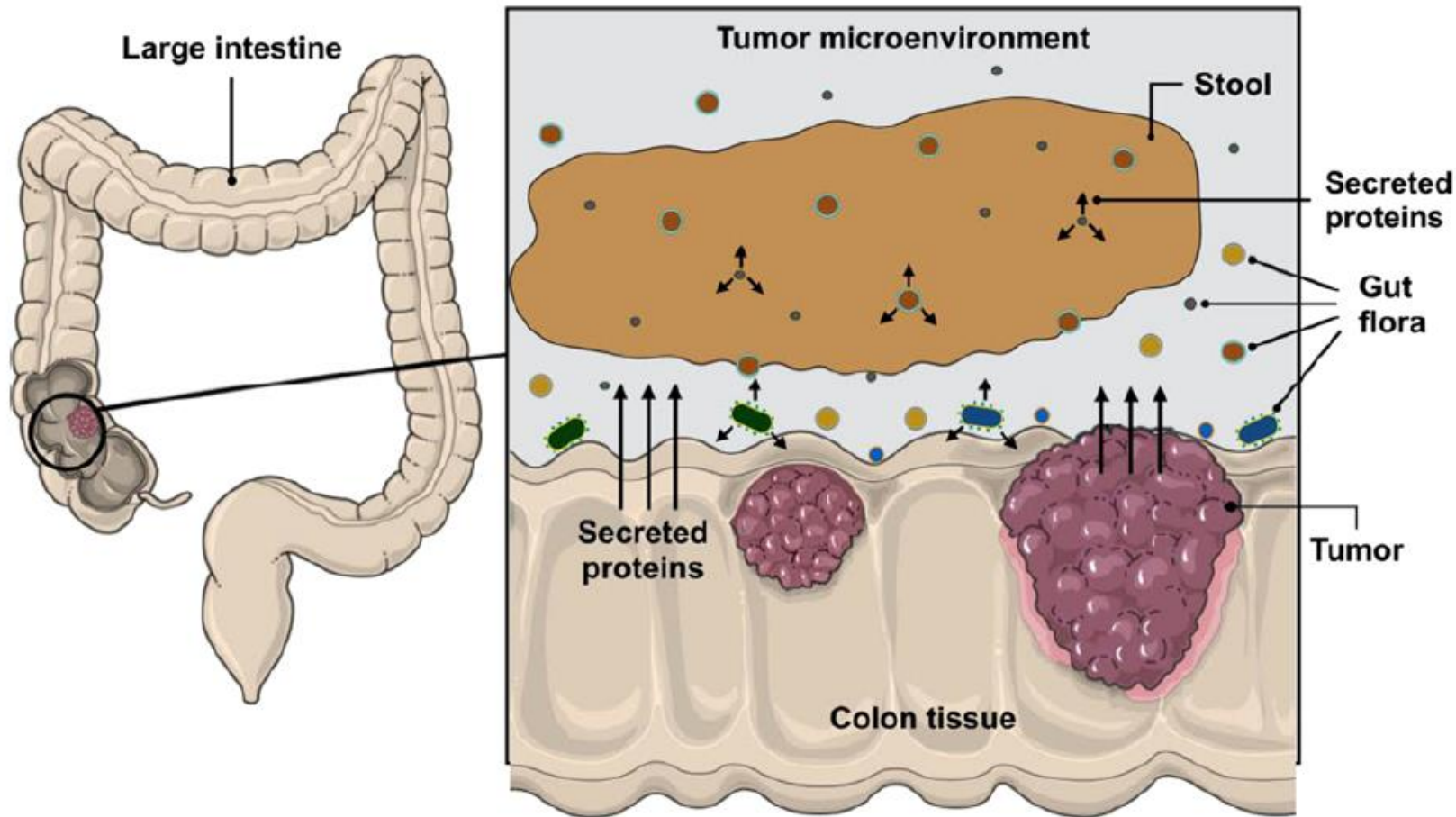
T7SS: type VII protein secretion system or the CU pathway.

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 sécrétées par le **microbiote** et les **tissus de l'hôte** (sains et non sains)

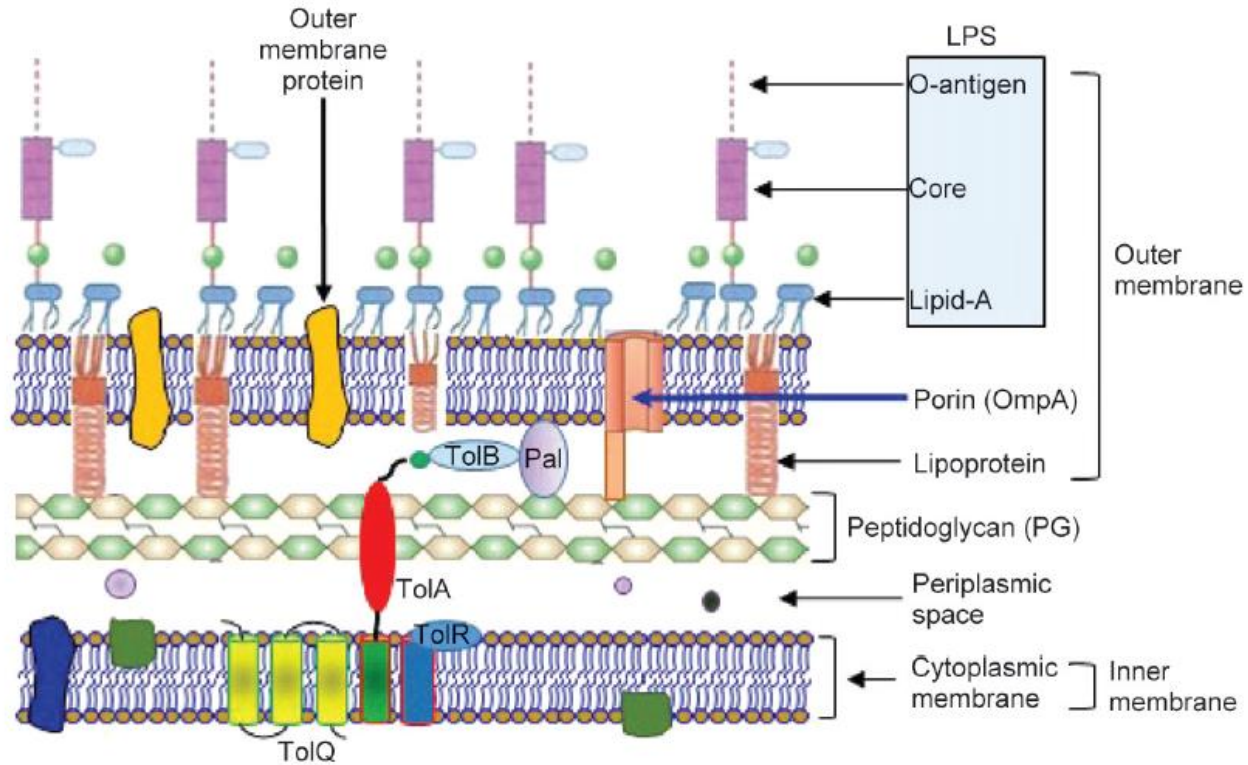


Stool samples as the fundamental source of **secreted proteins** for microbiome secretome studies.

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

Azlan et al (2019)

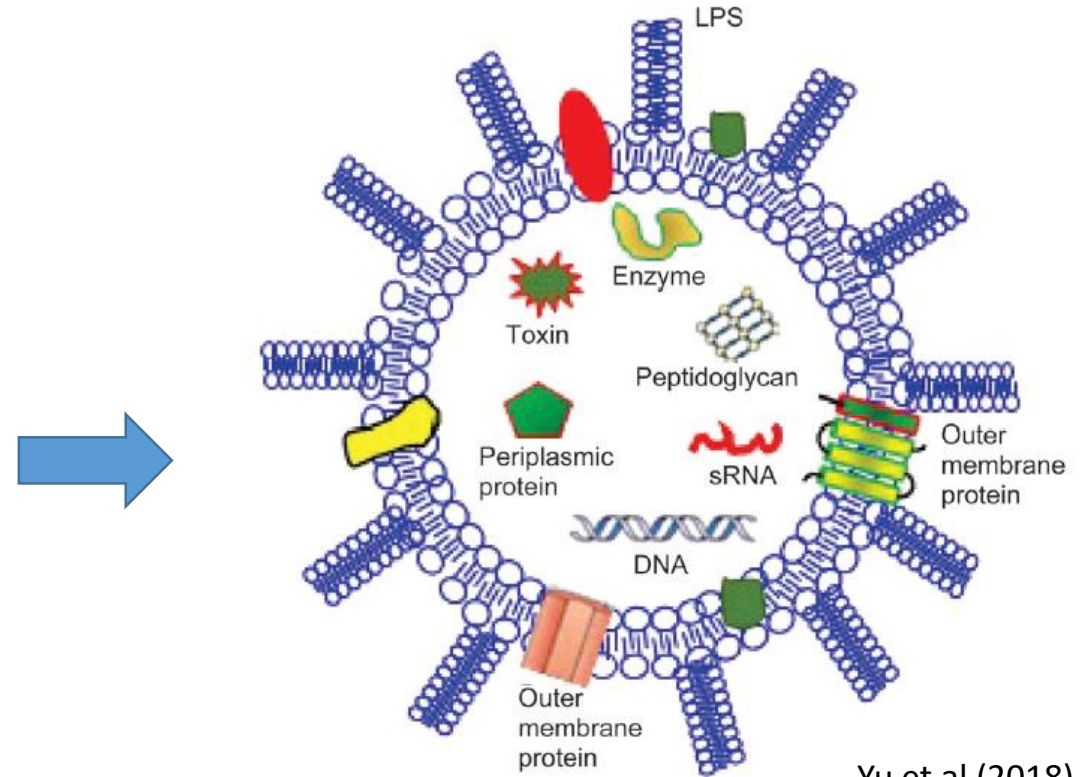
## Outer membrane vesicles and their proteins (OMVs)



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).



Yu et al (2018)

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 métabotéomique : Différentes étapes

### Choix des protéines bactériennes ciblées

Ex : Protéines extra-cellulaires et membranaires spécifiques

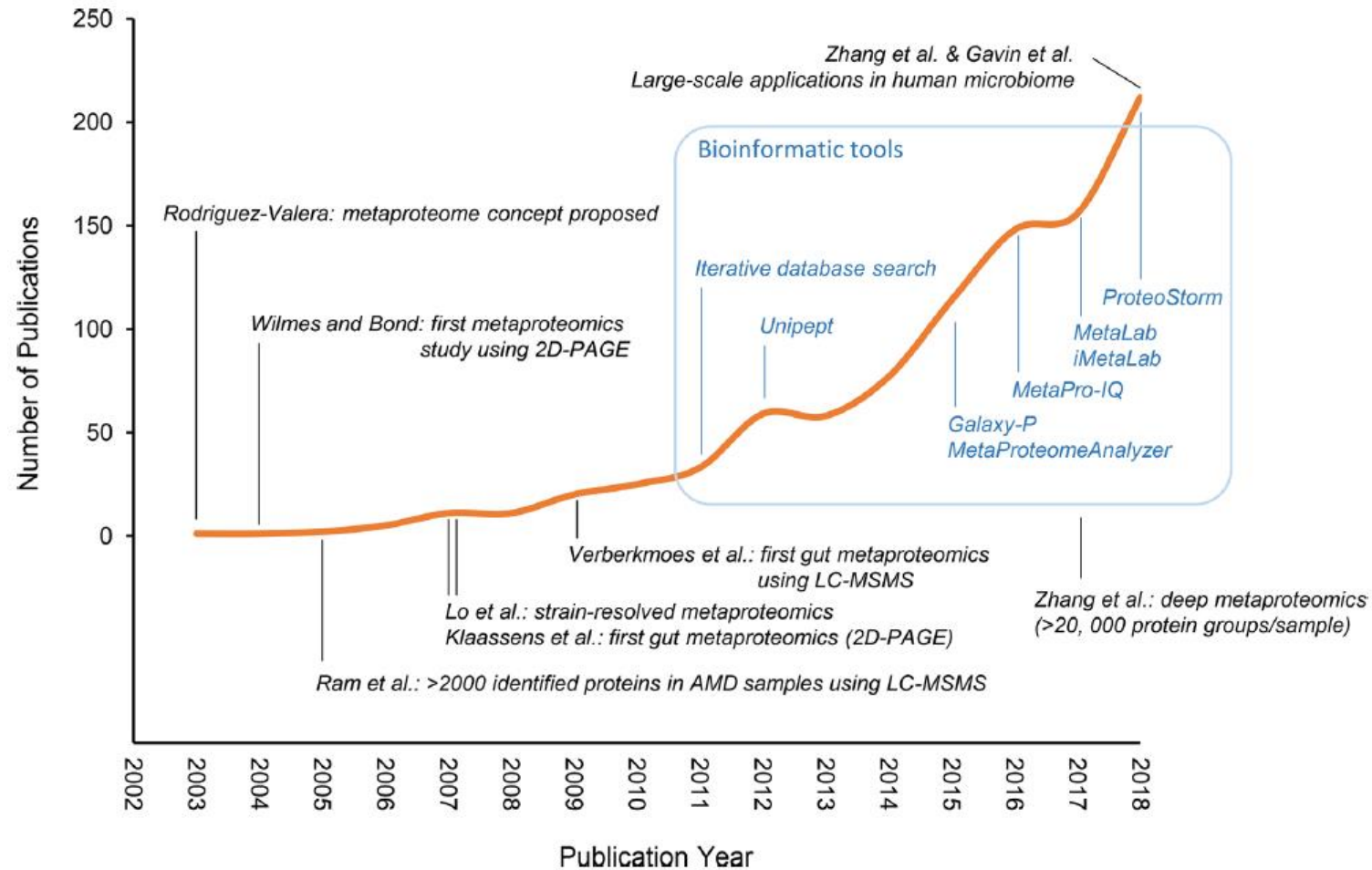
### Analyse protéomique

Digestion trypsique  
Séparation des peptides  
Analyse des peptides

### Analyse bio-informatique des séquences des peptides

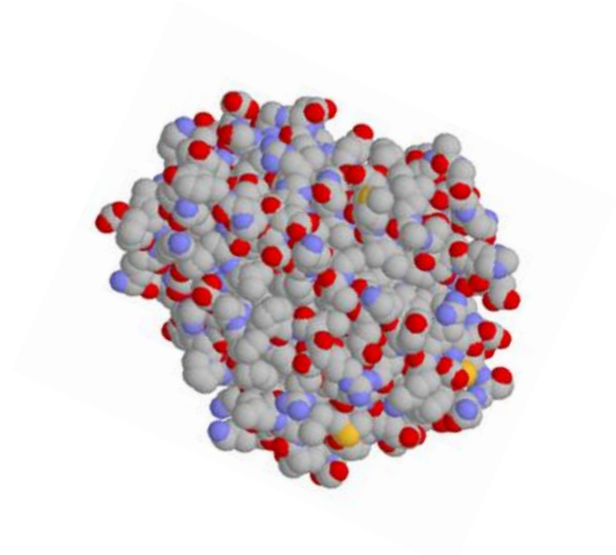


Utilisation : Faible, mais en développement exponentiel ...



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

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



### 3.2. Application en volailles



## Actuellement : 3 articles publiés



### Première étude publiée

Poule (18 sem)  
Fèces  
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., Rodehutschord, 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** Fèces (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)

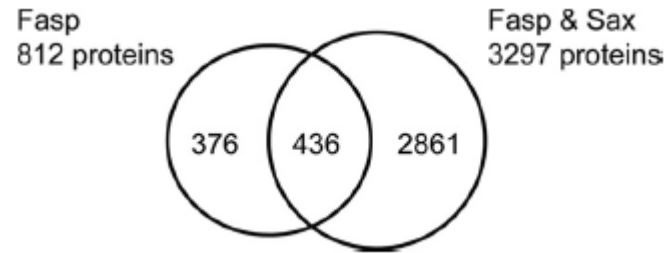
Hydrolyse des cellules bactériennes (sonication)



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

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

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

96%

<sup>a</sup> 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
<i>Lactobacillus</i>	380	11
<i>Clostridium</i>	155	4
<i>Streptococcus</i>	66	2
<i>Bacteroides</i>	65	2
<i>Bacillus</i>	54	2
<i>Plasmodium</i>	52	1
<i>Prevotella</i>	44	1
<i>Eubacterium</i>	41	1
<i>Ruminococcus</i>	39	1
<i>Escherichia</i>	34	1
<i>Enterococcus</i>	34	1
<i>Tetrahymena</i>	33	1
<i>Turicibacter</i>	24	1
<i>Vibrio</i>	23	1
<i>Staphylococcus</i>	20	1

31%

Région V4-V5  
 Bactéries  
 + Archées



TABLE 3 Most frequently identified proteins

Protein	No. of identifications	Reference(s) <sup>a</sup>
60-kD 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

<sup>a</sup> 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.

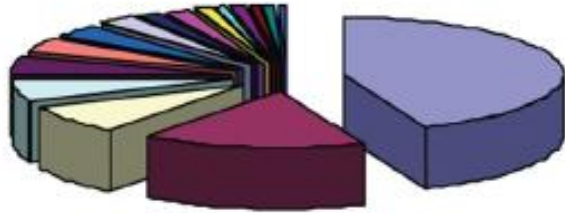
## Identification de protéines non microbiennes (malgré les étapes de lavages)

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**.

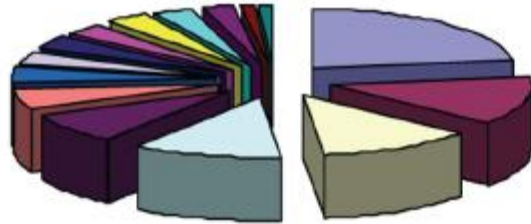
## C Biological process



- 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., Rodehutsord, 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 métabolisme 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 issu 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

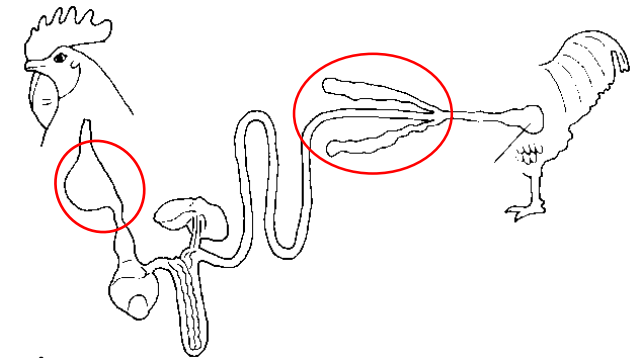
### Protéines microbiennes : protéines des cellules bactériennes

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)



## 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

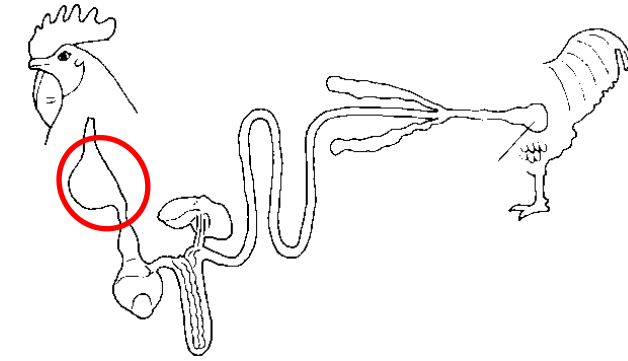
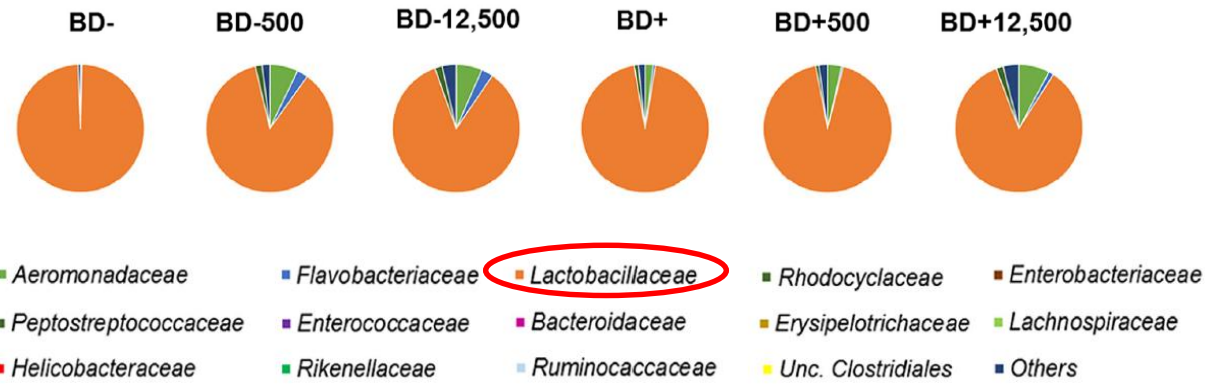
	Protéines bactériennes	Protéines de l'hôte (1)
Jabot	381	248
Caeca	1 719	405

3,1% en commun

(1) Malgré le protocole 'cellules procaryotes'

## Microbiota taxonomy using pyrosequencing data

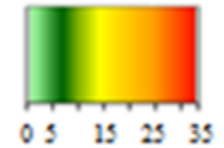
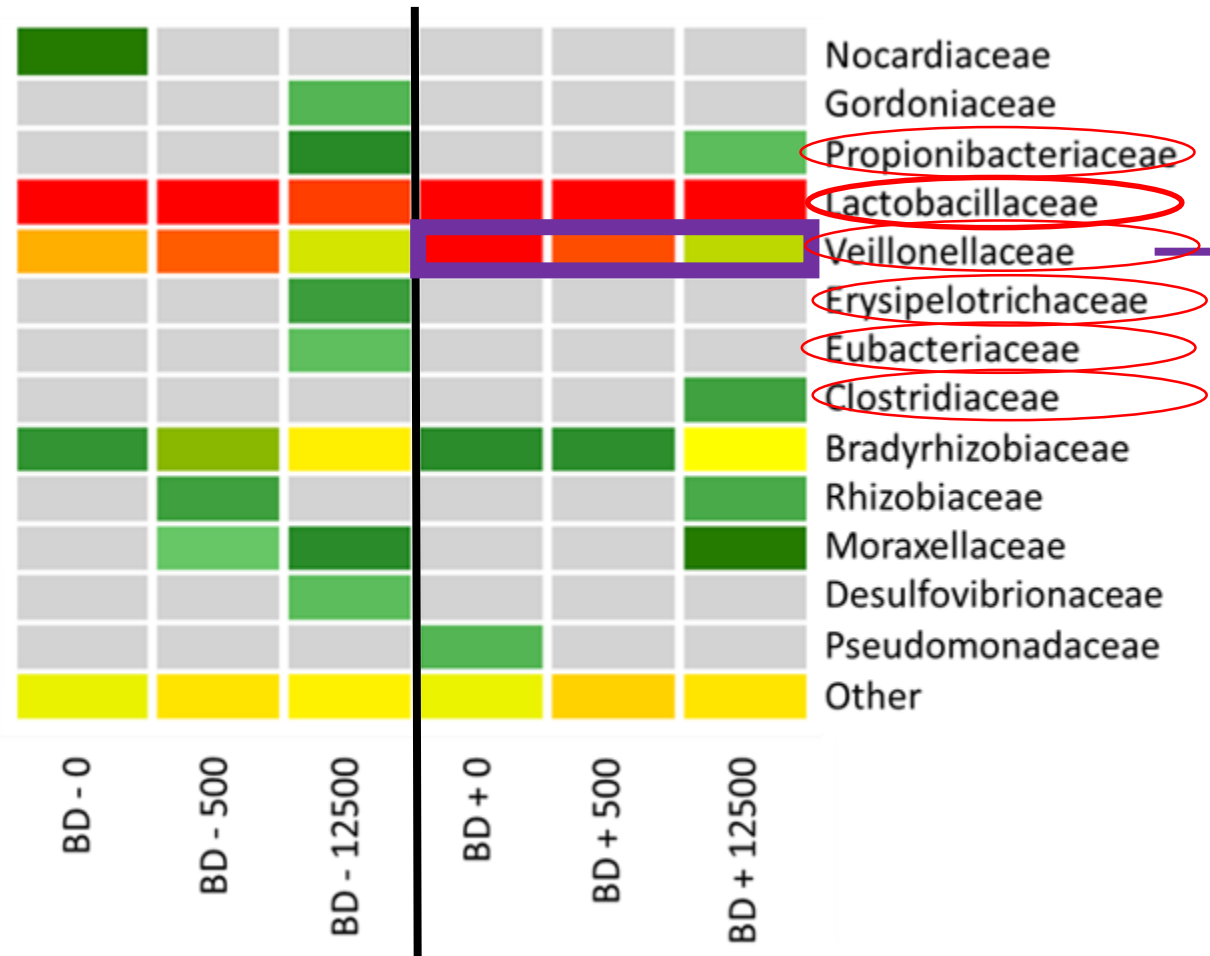
Witzig et al (2015)  
1 pool de 3 pools de 4 anx



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

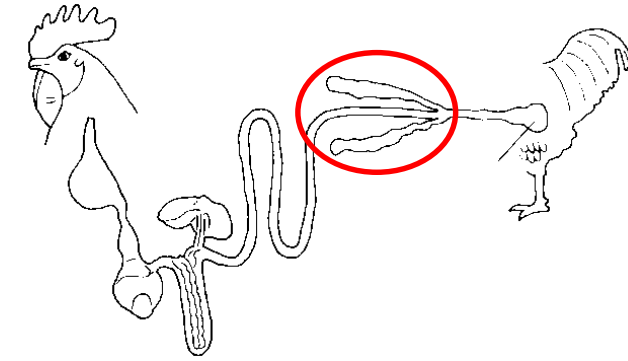
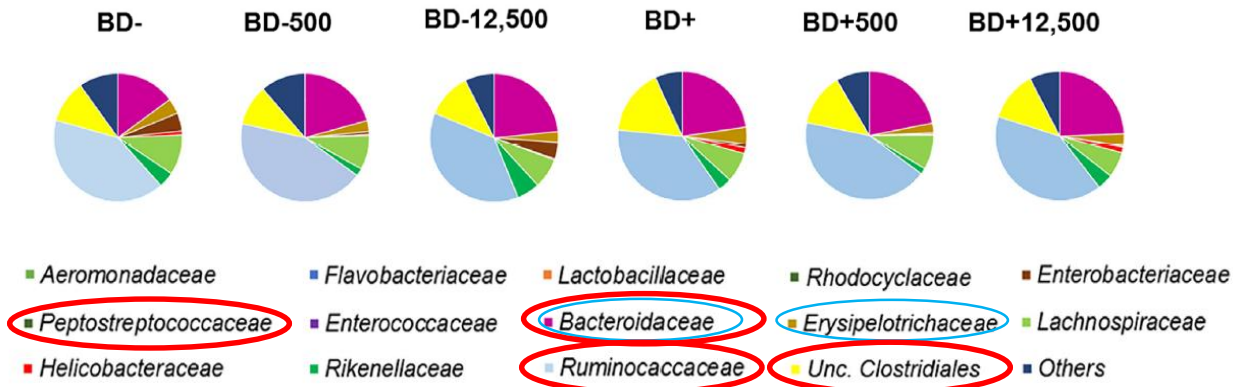


Associated to fiber digestion and SCFA production

Grey background is assigned to non-detected families

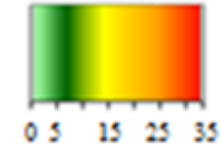
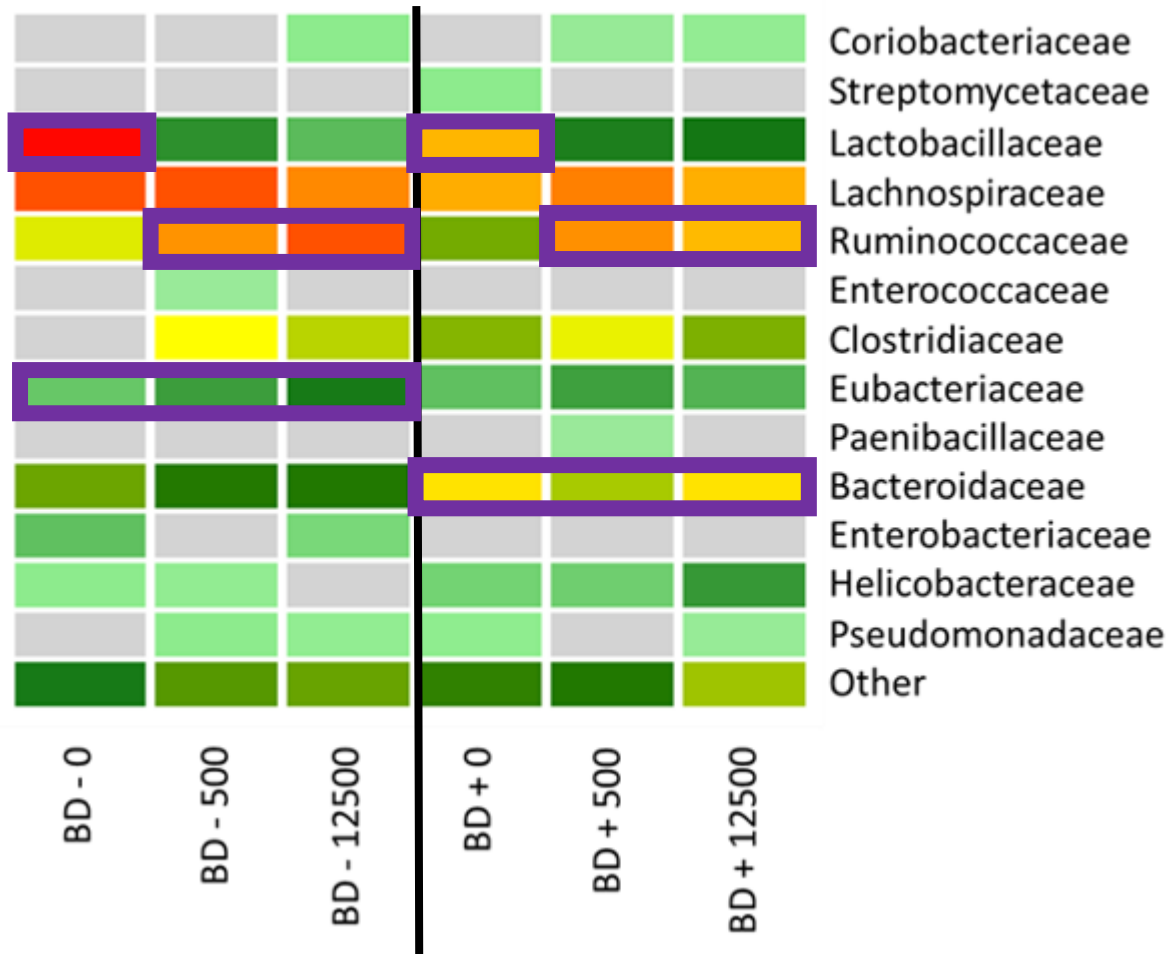
# Microbiota taxonomy using pyrosequencing data

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



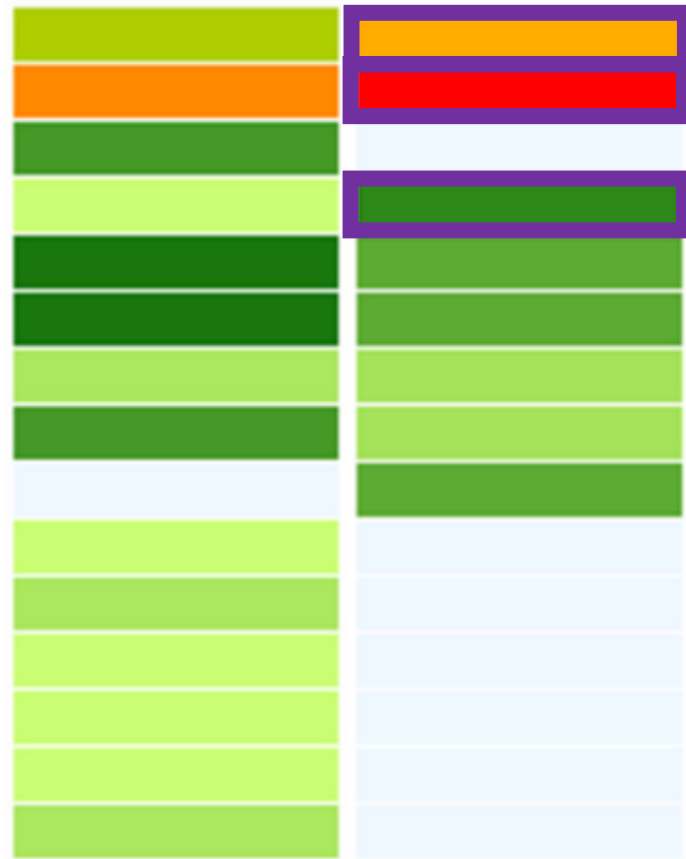
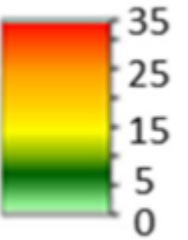
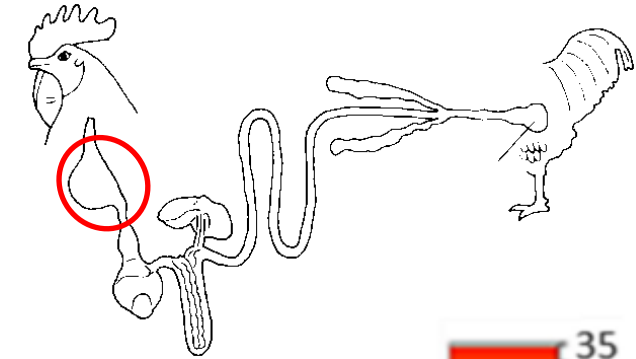
The phylogenetic composition of the bacterial proteins determined based on the abundance values of the proteins belonging to each bacterial family

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



Grey background is assigned to non-detected families

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

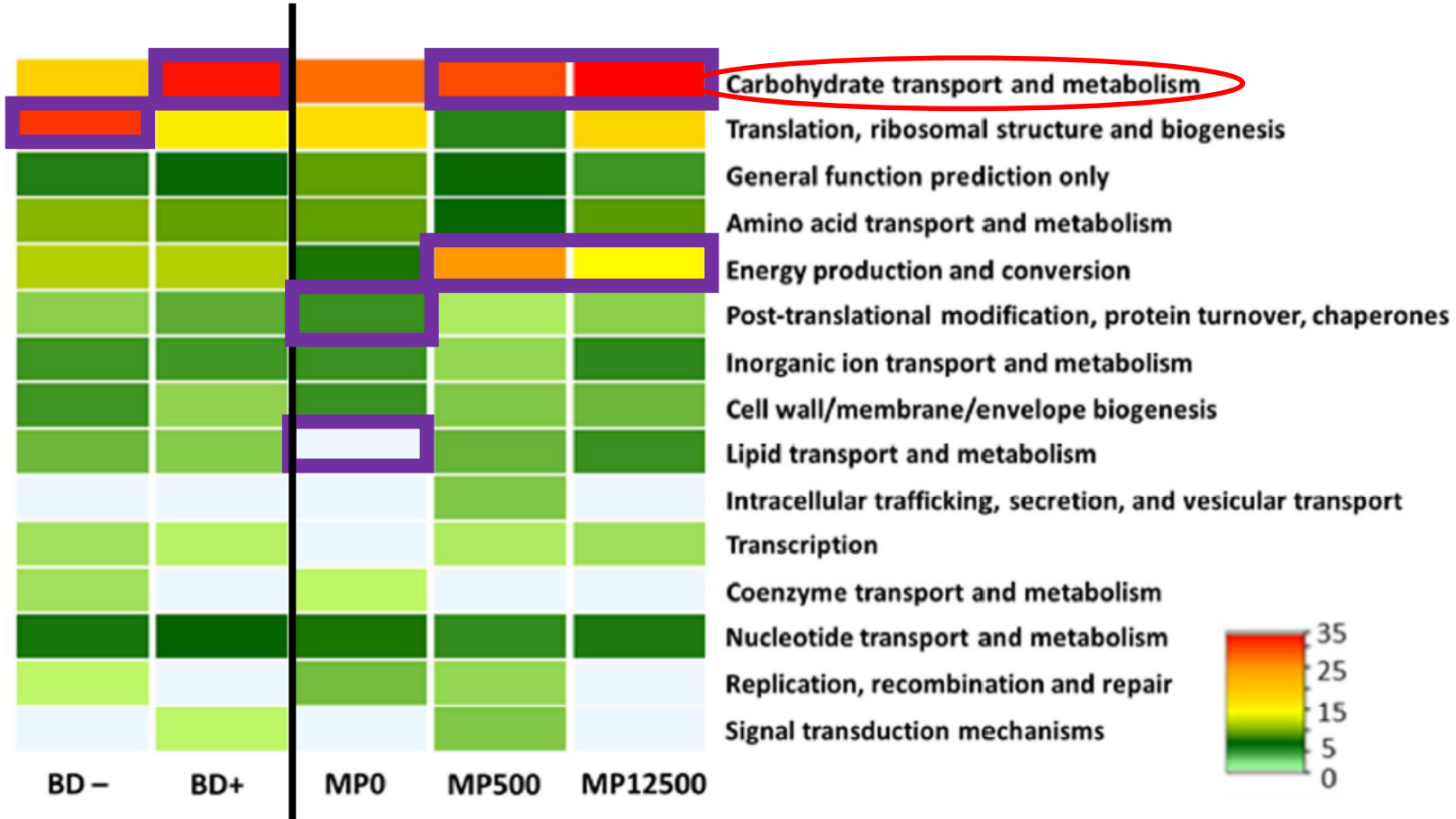
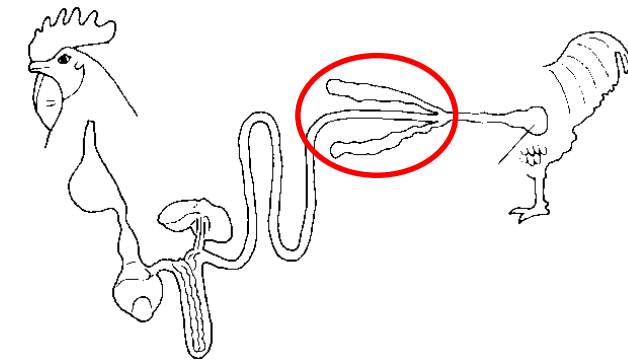
Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism

MP0

MP12500



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 échantillons 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)

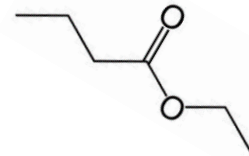
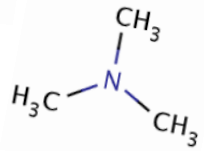
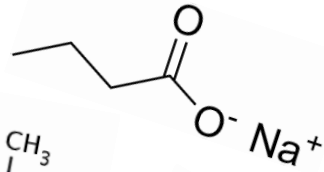
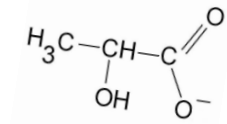
Ex : IRD : Institut de recherche pour le développement

UMR Eco&Sols, Montpellier

Equipe de Laetitia Bernard



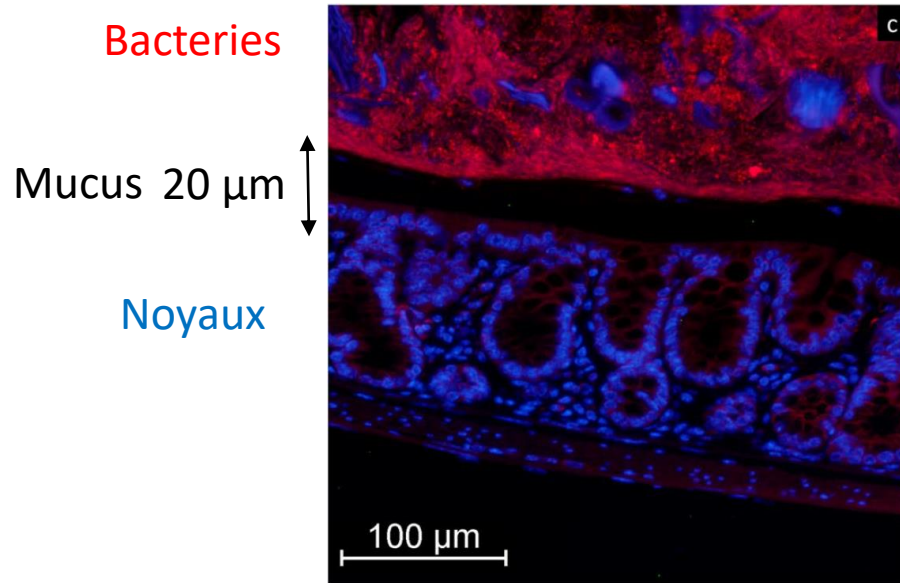
## 4. Métabolomique



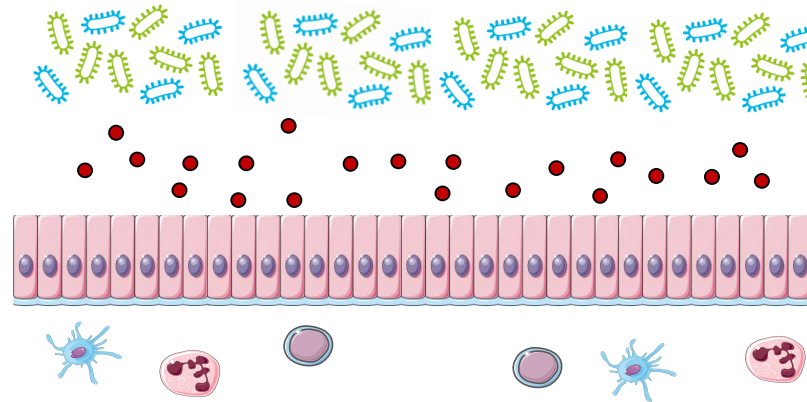
## 4.1. Définition, Principe

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 intermédiaires moléculaires clés entre le microbiote et son hôte

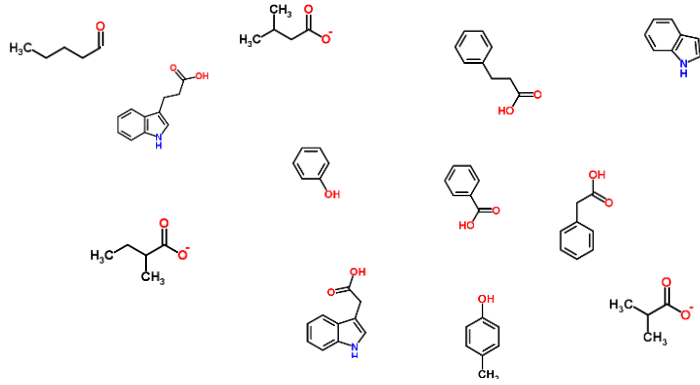
\*Métabolites:

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

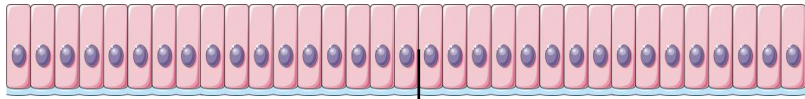
Microbiote



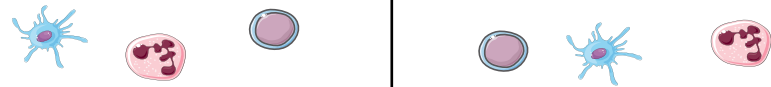
Métabolites bactériens



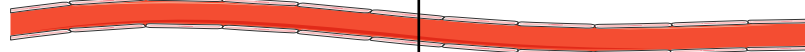
Epithelium intestinal



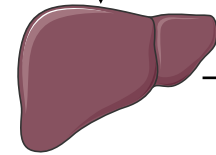
Système immunitaire associé à la muqueuse



Veine porte



Foie



Cerveau



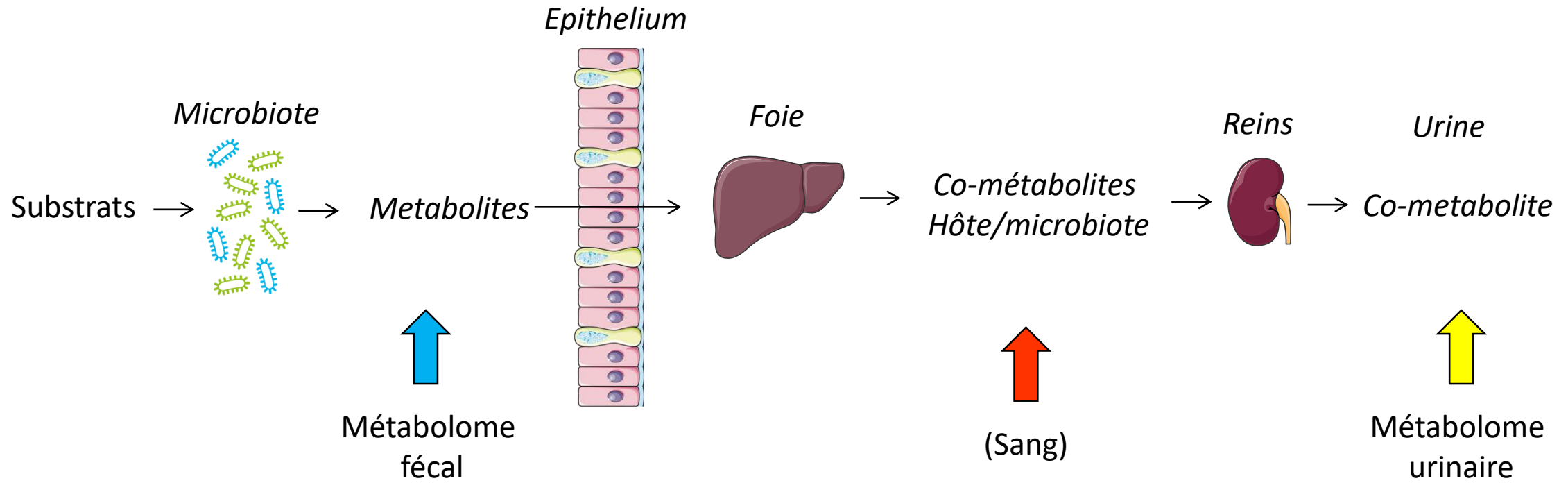
Comment étudier les métabolites produits par le microbiote intestinal ?

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

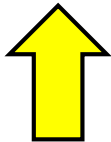
# Quels échantillons biologiques analyser pour connaître l'activité métabolique du microbiote intestinal ?



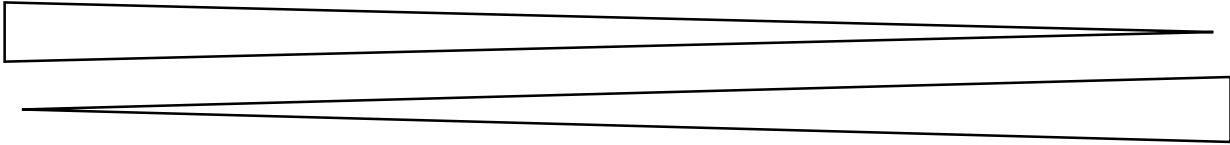
# Résonnance magnétique nucléaire (RMN)

## 4.2. Méthodes d'approche

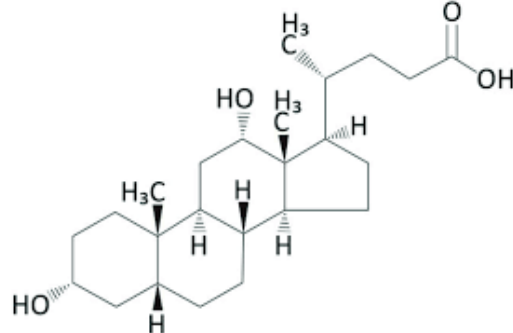
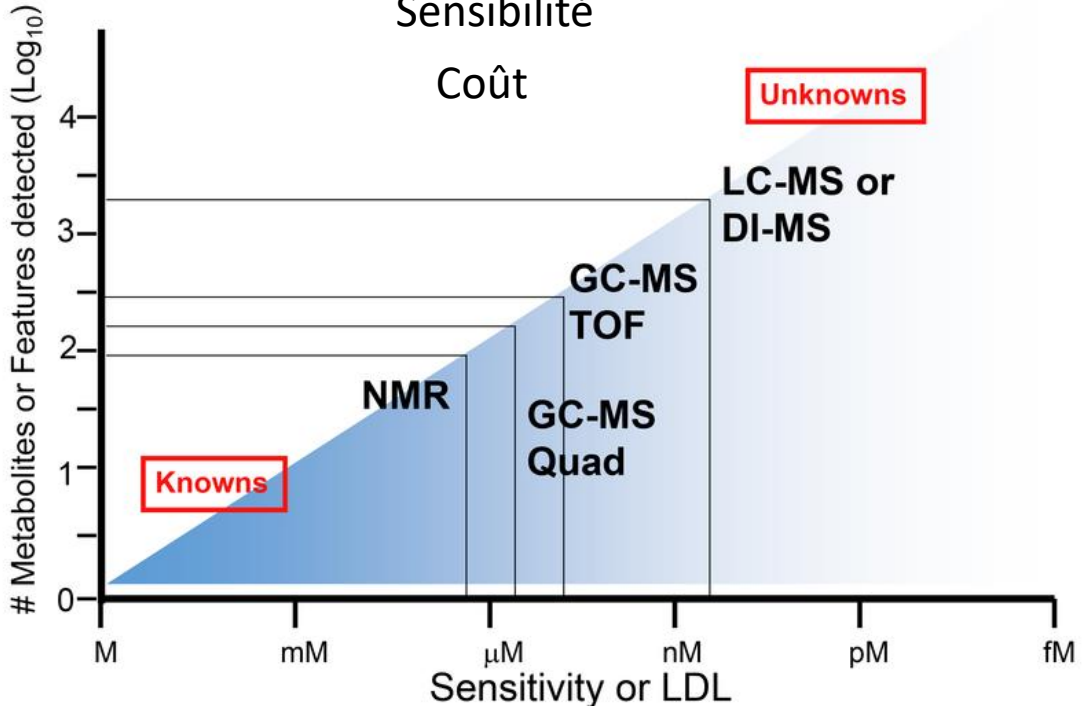
# Spectrométrie de masse (GC-MS, LC-MS)



Rapidité et simplicité de la préparation des échantillons  
Reproductibilité



Difficulté d'identification  
Sensibilité  
Coût



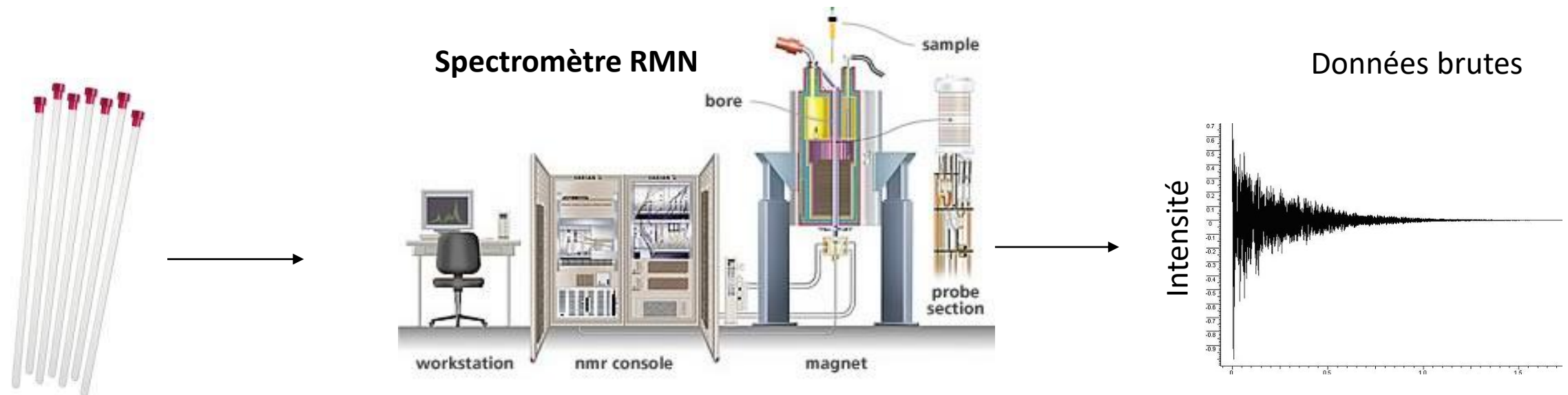
Acides biliaires secondaires (modifiés par le microbiote)

- Spécificités des classes chimiques détectées
- Complémentarité des méthodes



## 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** ( $D_2O$ : Deuterium =  $^2H$ )
- Ajout d'une molécule de référence (TSP) pour aligner les spectres
- Centrifugation
- Transfert du surnageant dans un tube RMN

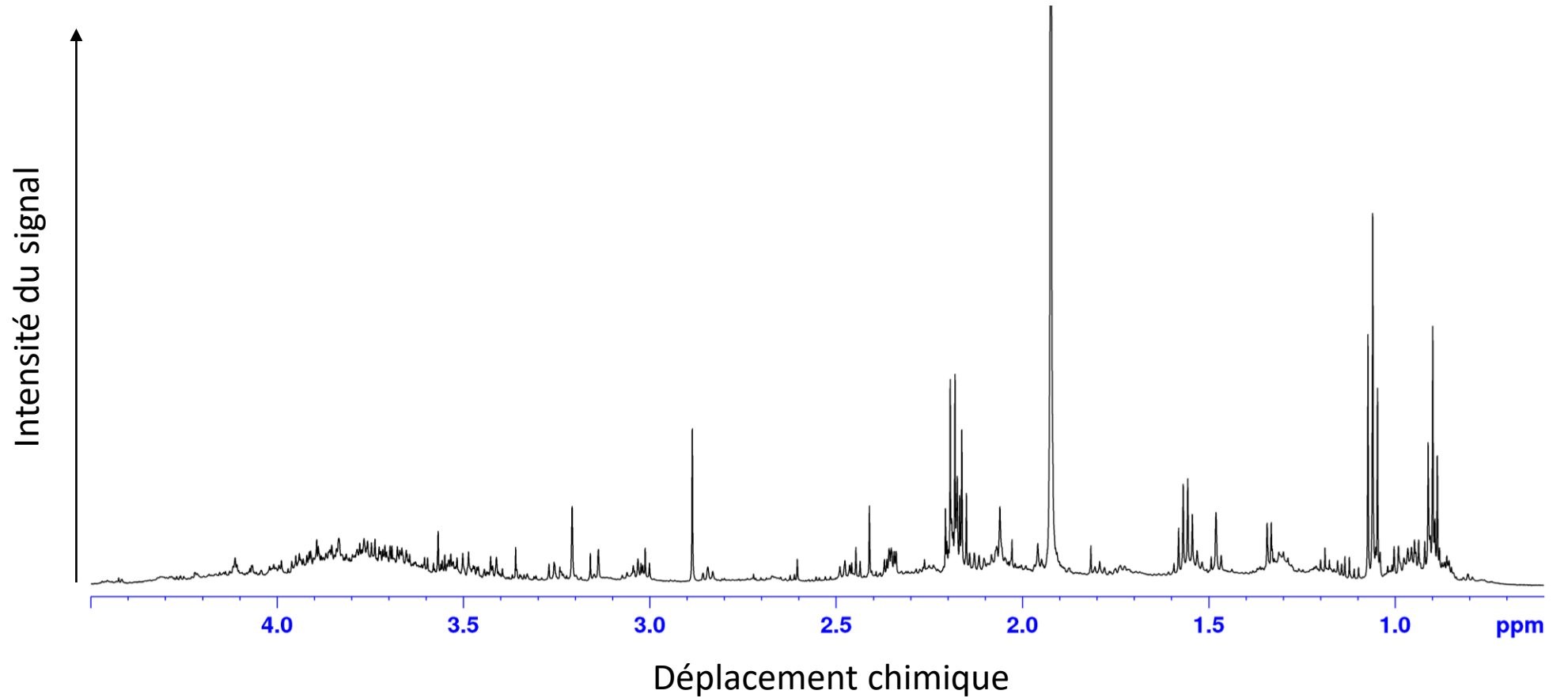
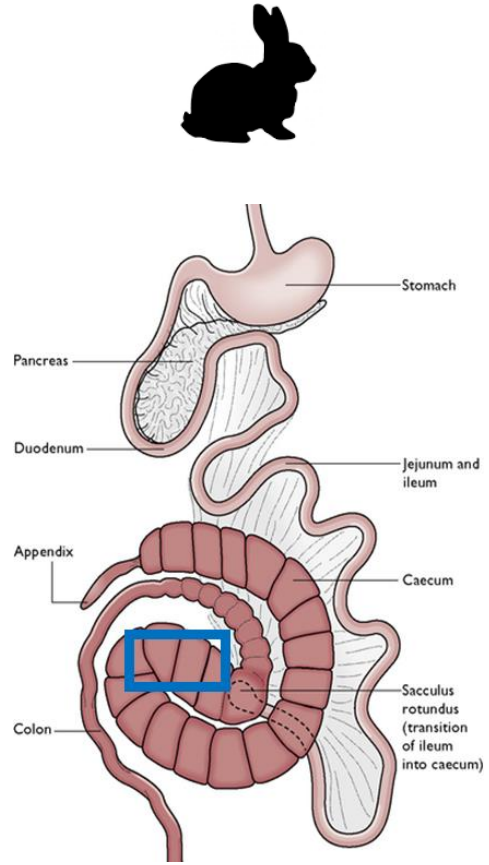


Ø 5 mm

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

Temps  
↓  
Pré-processing

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



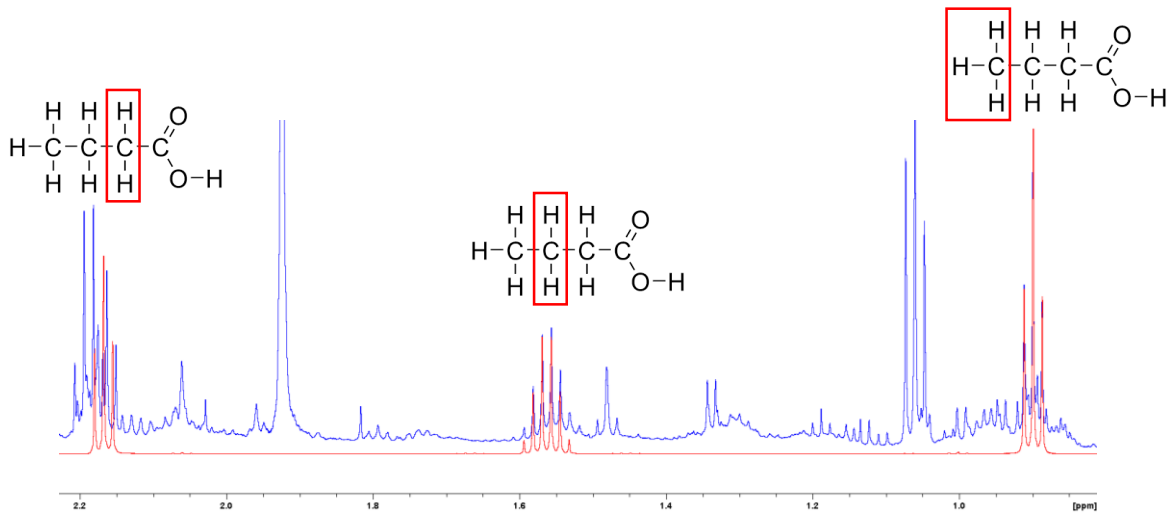
**Signaux issus de dizaines de métabolites**

**Comment identifier les métabolites correspondant aux pics ?**

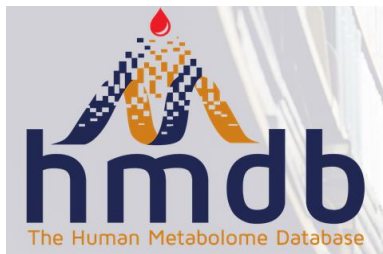
## Utilisation de standards (composés purs)

Spectre de caecum de lapin

Spectre du butyrate

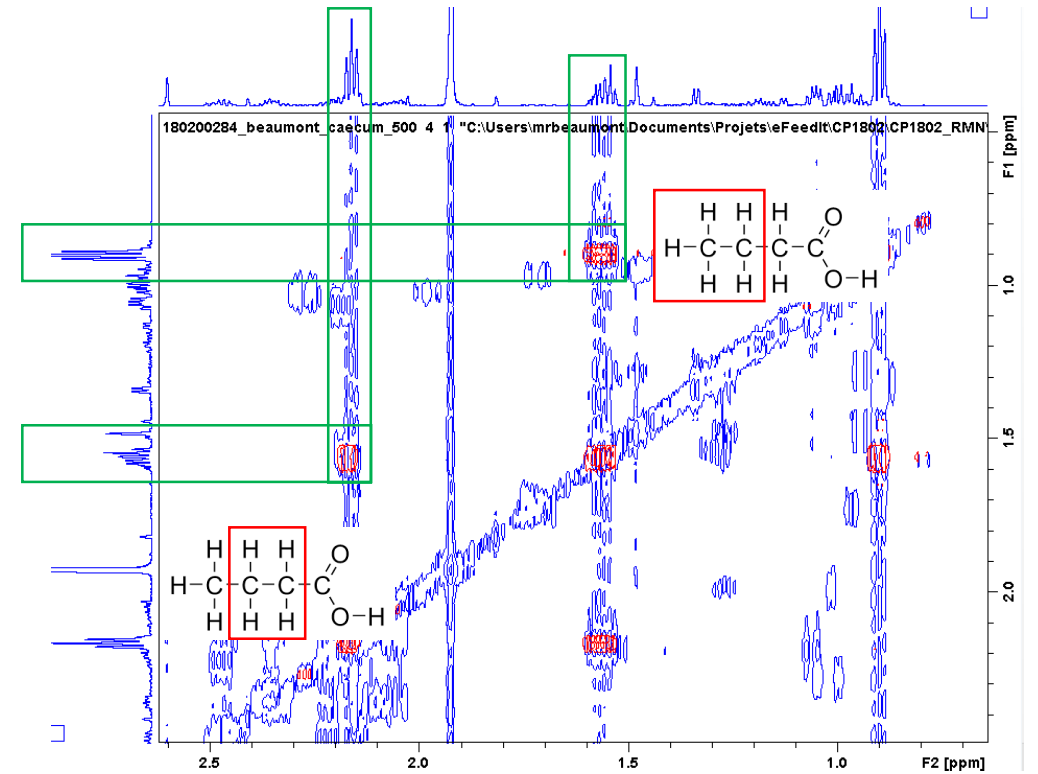


Plusieurs métabolites peuvent avoir des pics  
aux mêmes déplacements chimiques



Bases de données de spectres de références  
(2800 molécules)

## RMN en deux dimensions (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>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



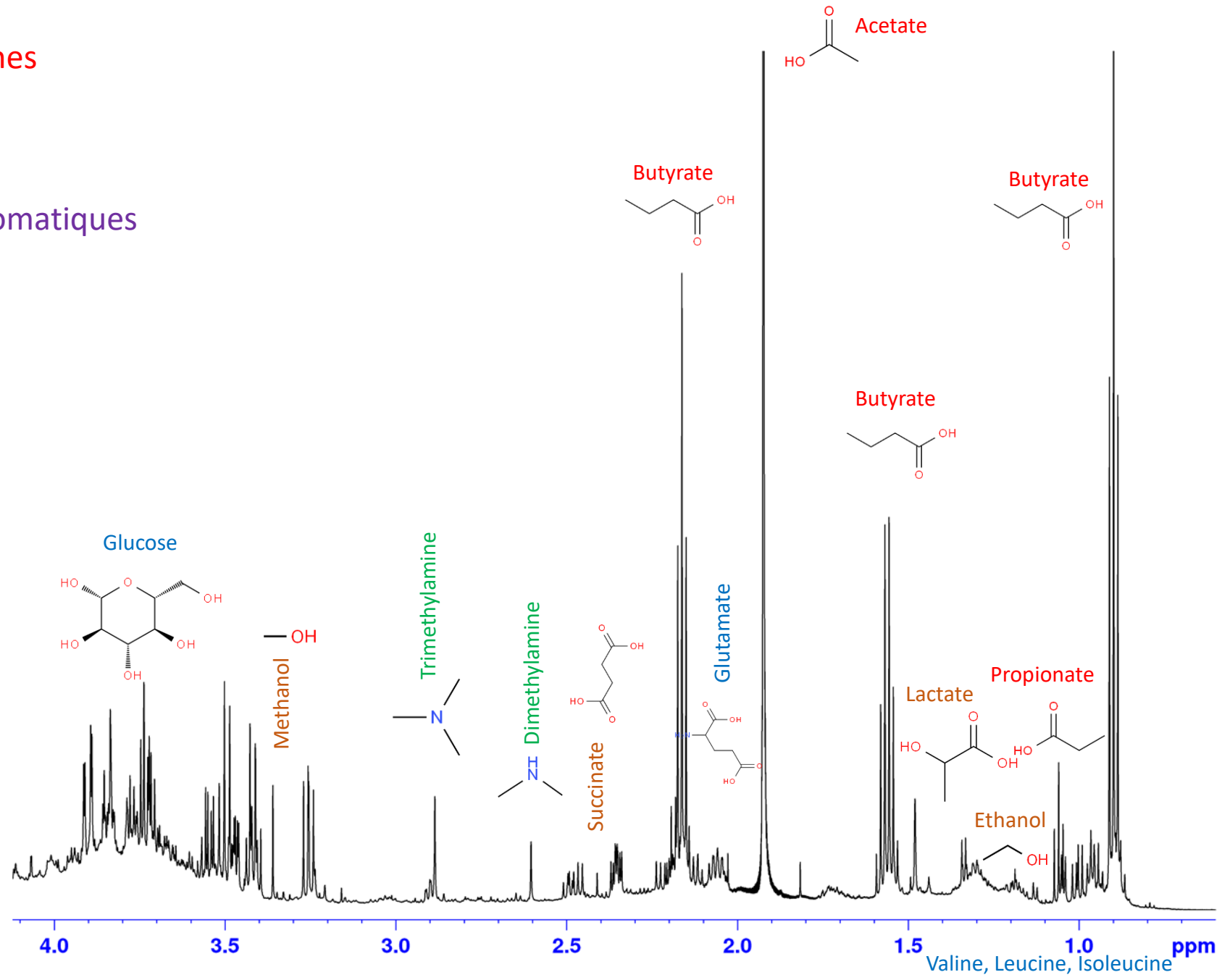
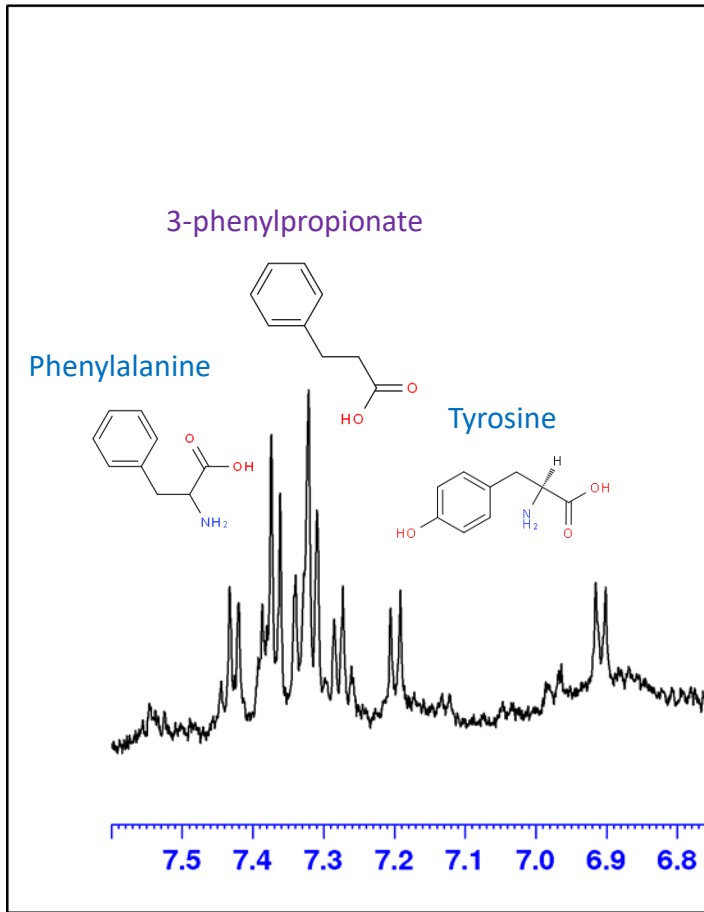
Acides gras à courtes chaînes

Amines

Produits de fermentation

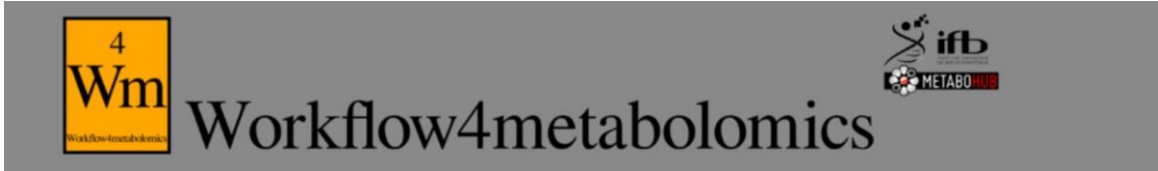
Métabolites bactériens aromatiques

Acides aminés & sucres



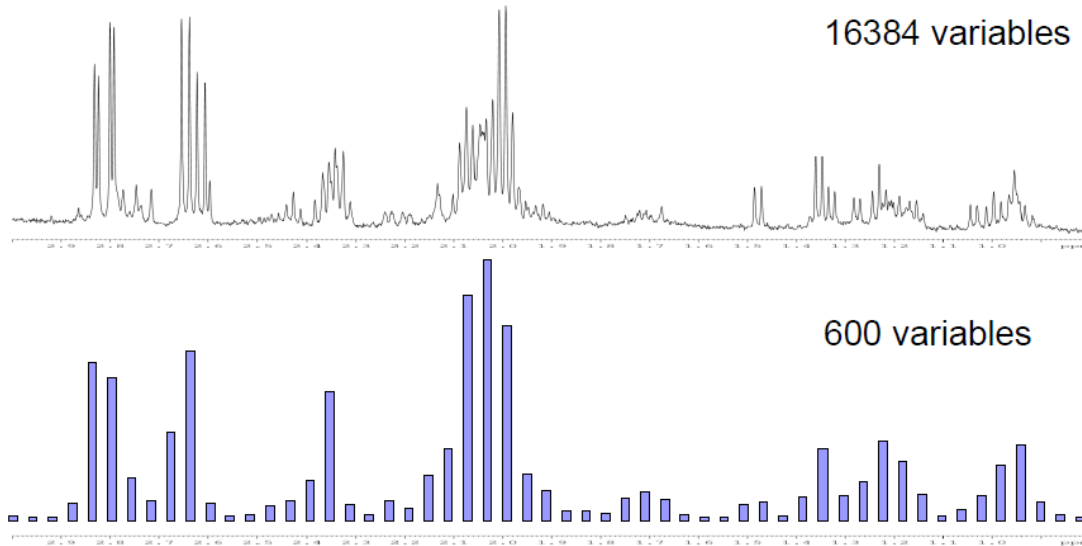
# Comment identifier les métabolites associés à un phénotype d'intérêt ?

## Traitement bioinformatique des spectres (Galaxy)



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

« **Bucketing** » (0,01 ppm)



## Matrice de données normalisées

X Buckets

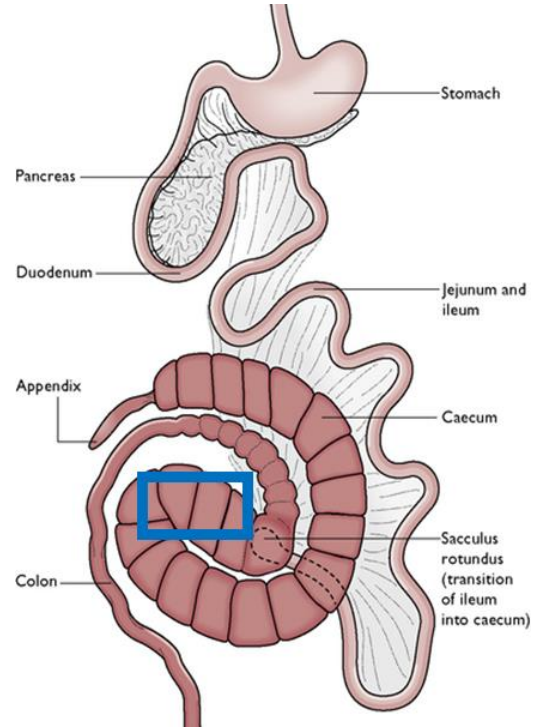
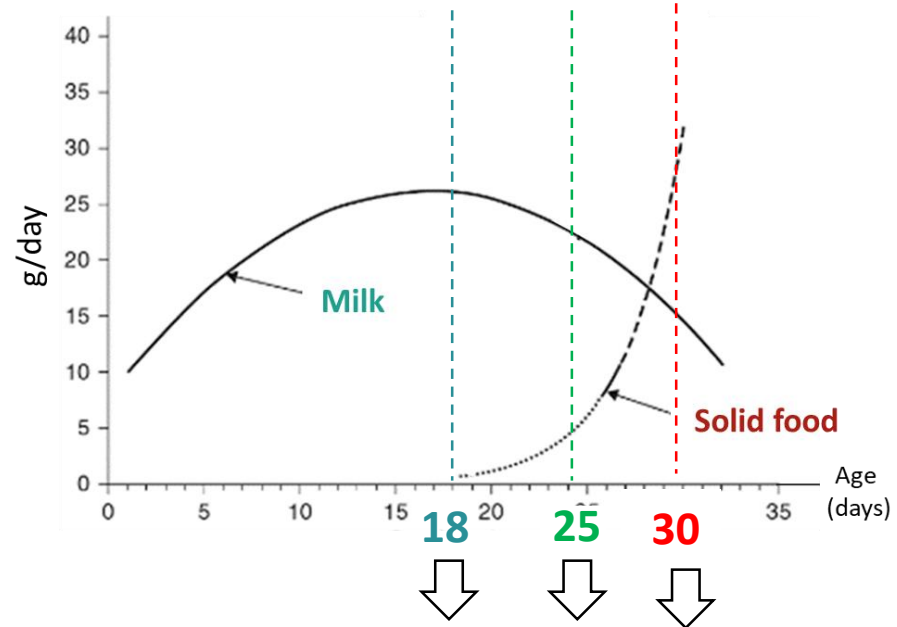
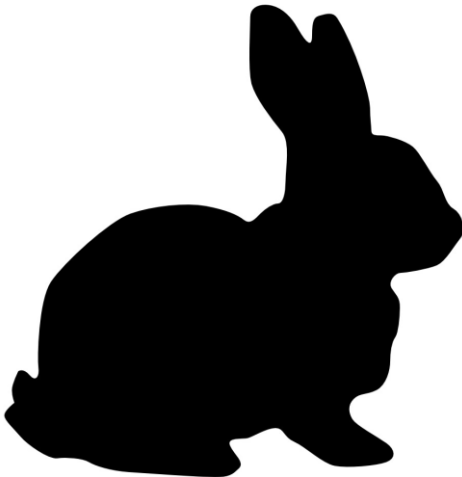
Y Echantillons

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

**Statistiques multivariées (PCA/PLSDA)**  
**Statistiques univariées**

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

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



Contenu caecal et muqueuse

*Microbiote*

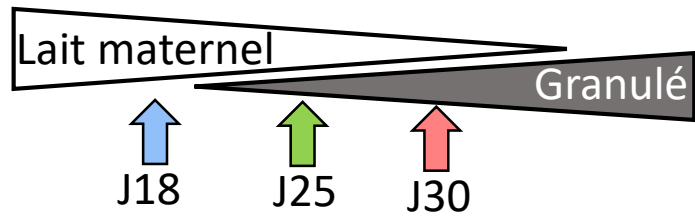
Séquençage du gène de l'ANRr 16S

*Métabolites bactériens*

Métabolomique RMN

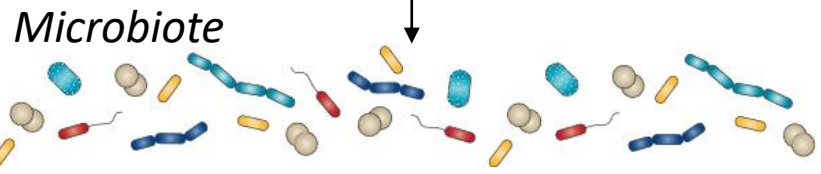
*Epithelium intestinal*

qPCR à haut débit

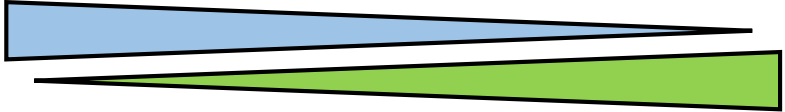


Oligosaccharides du lait      Polysaccharides végétaux

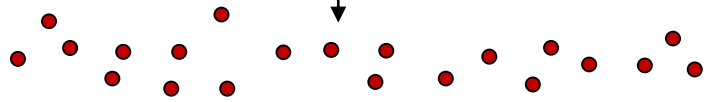
Substrats



*Bacteroidaceae*

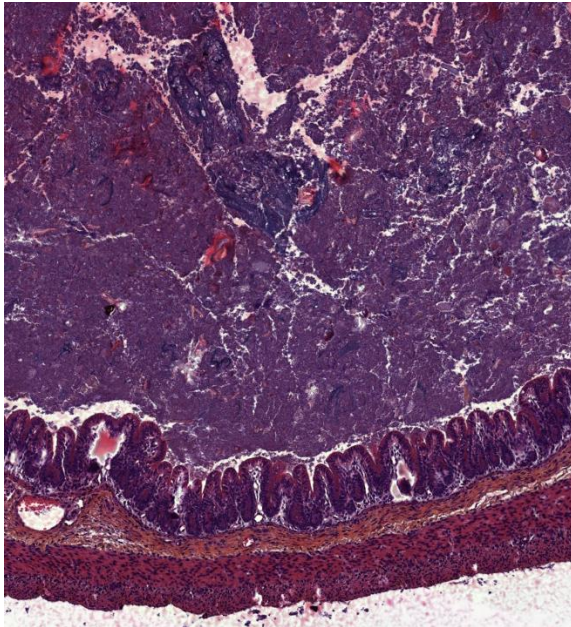


Diversité, *Ruminococcaceae*



*Métabolites bactériens*

J18

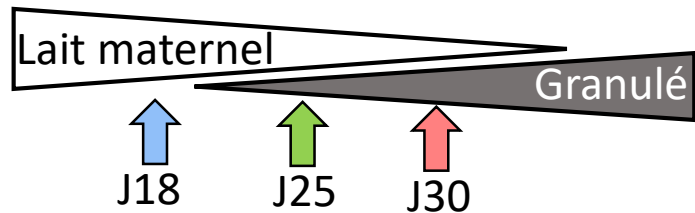


J25

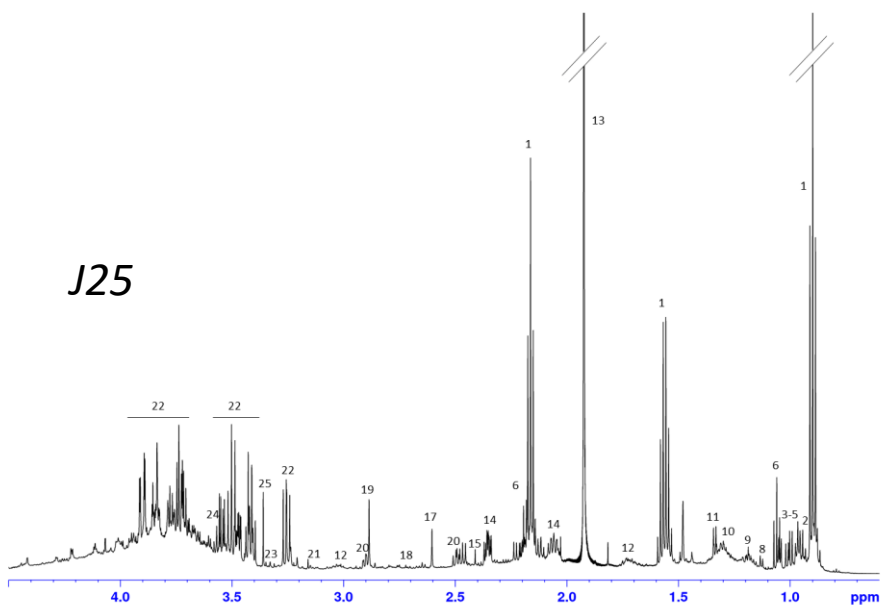
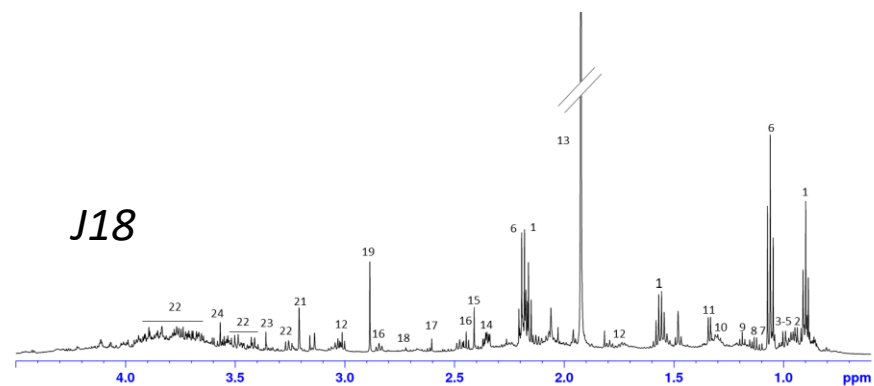


L'ingestion d'aliments solides modifie les substrats disponible pour le microbiote

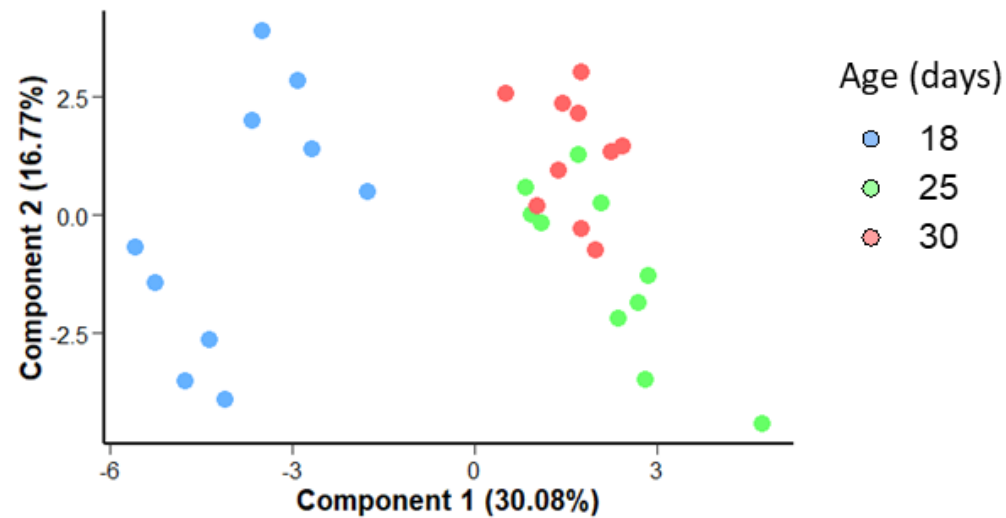
Quelles sont les conséquences pour l'activité métabolique du microbiote ?



## Métabolome du contenu caecal (métabolomique RMN + bioinformatique W4M)



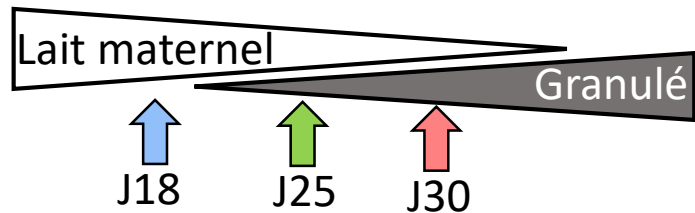
### Analyse en composante principale



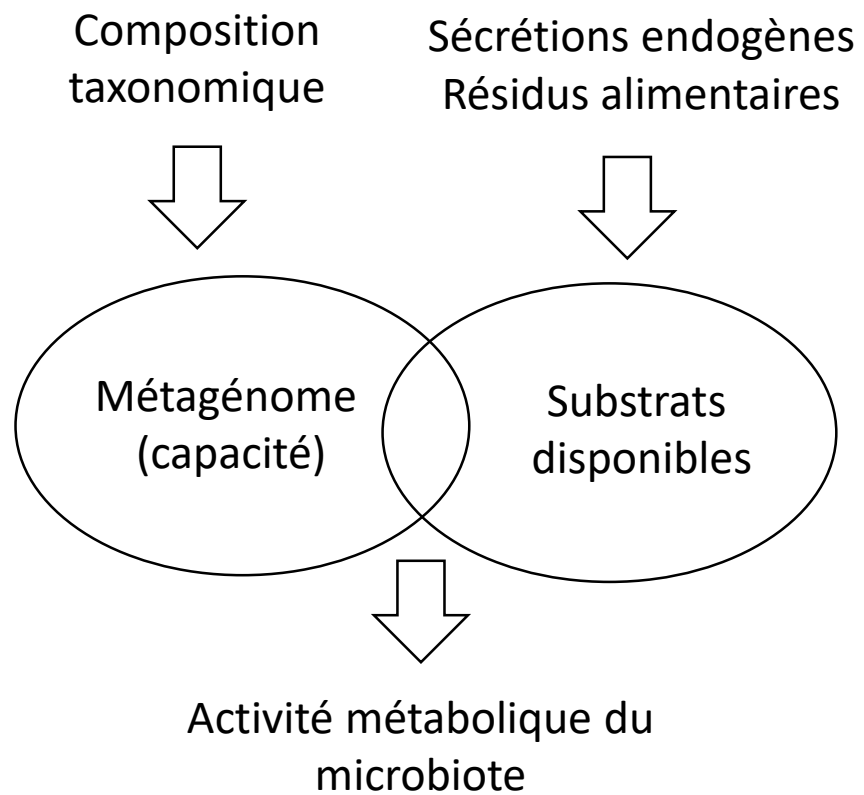
**Le métabolome caecal est modifié lors de l'ingestion d'aliments solides**

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

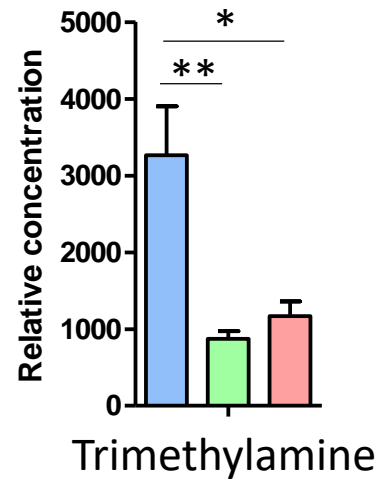
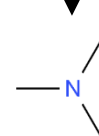
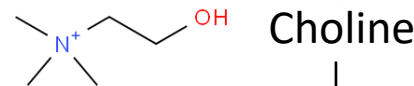
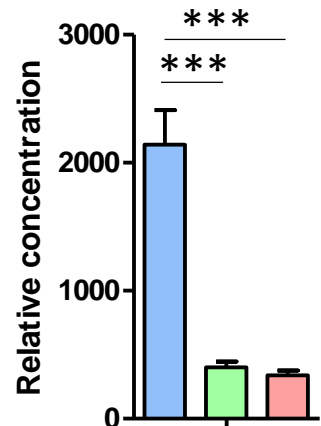




## Les substrats disponibles pour le microbiote influencent son activité métabolique

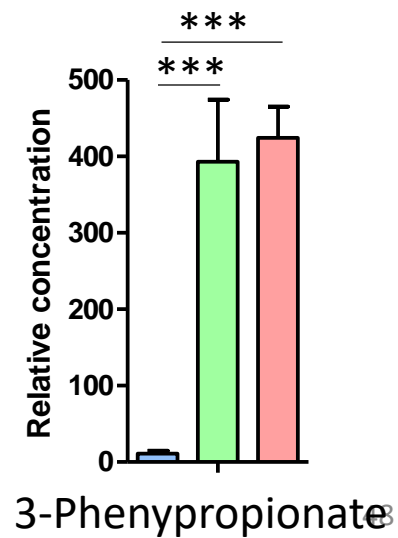
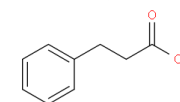


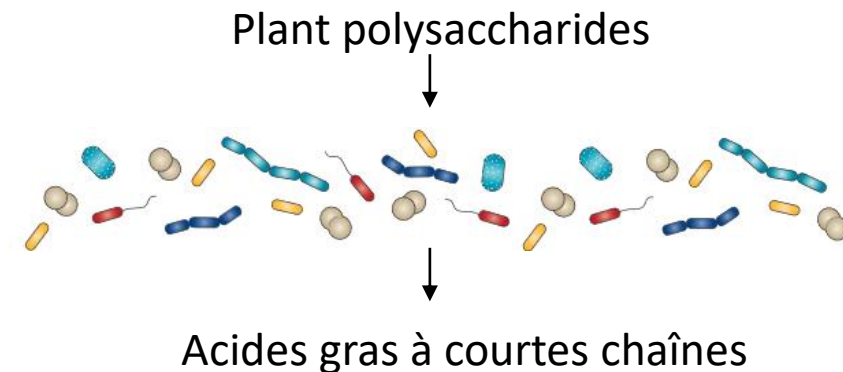
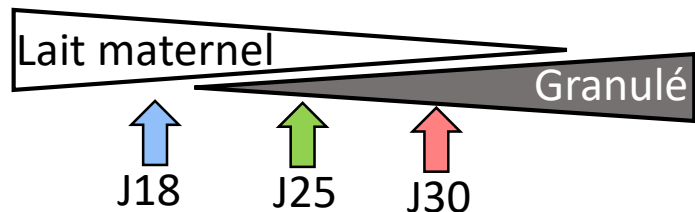
Lait maternel



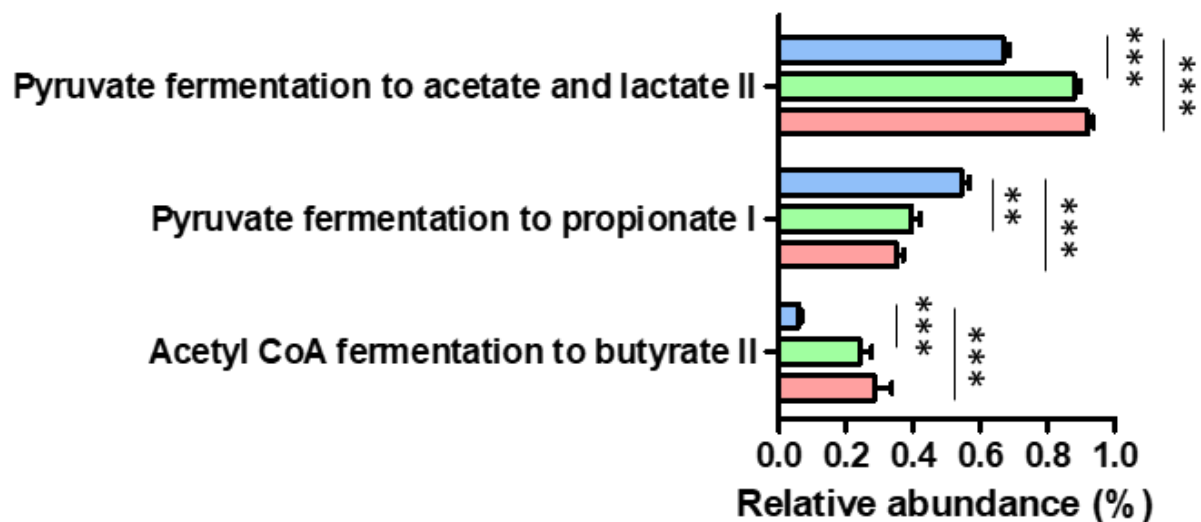
Résidus végétaux

Polyphenols

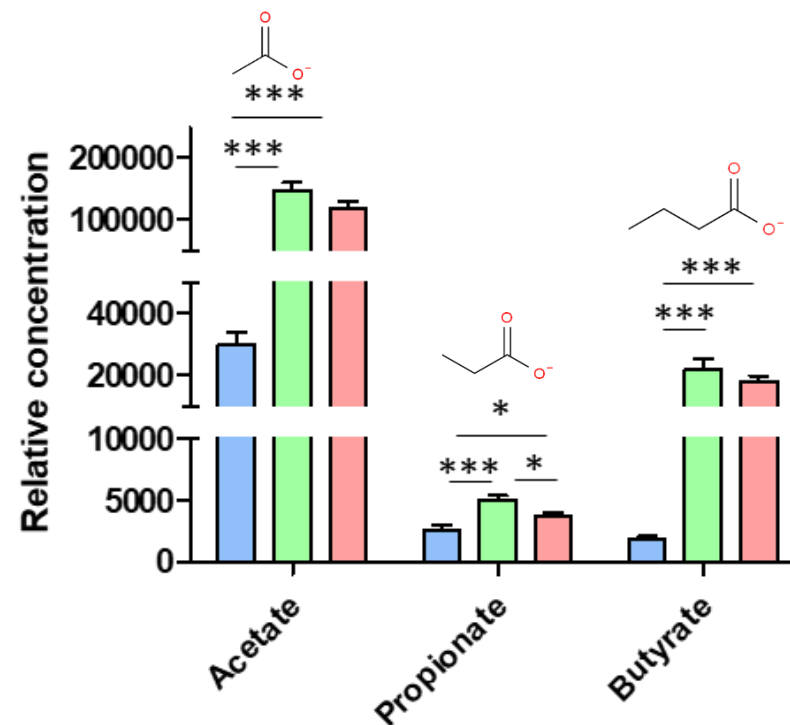




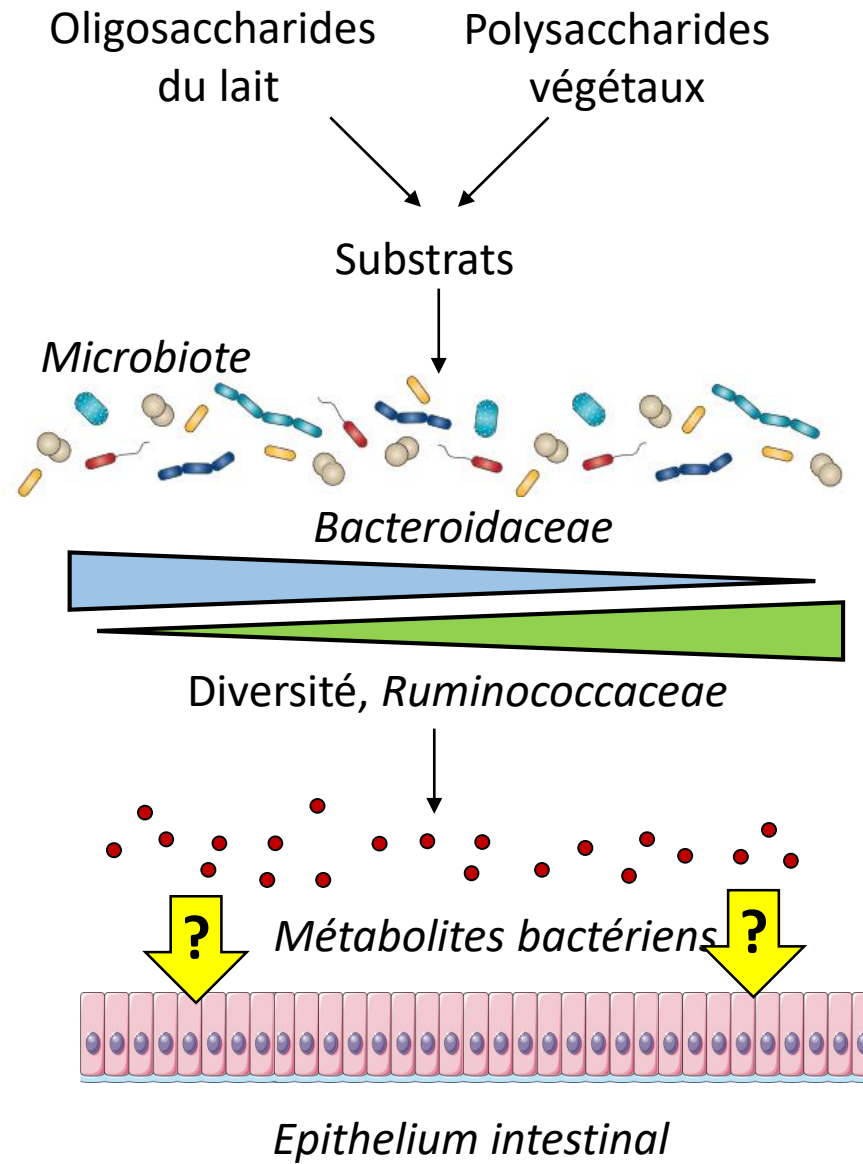
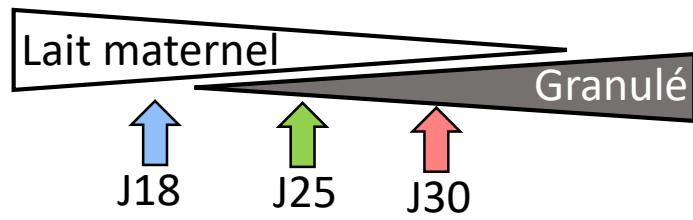
### Inférence fonctionnelle basée sur les séquences 16S (PICRUST2)



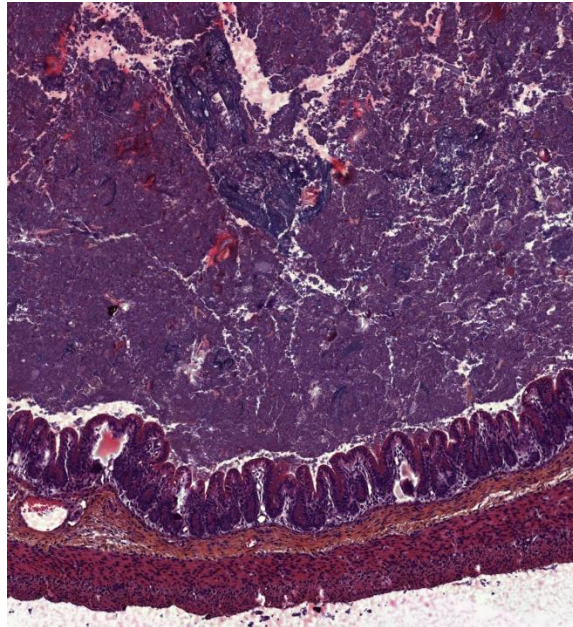
### Métabolomique



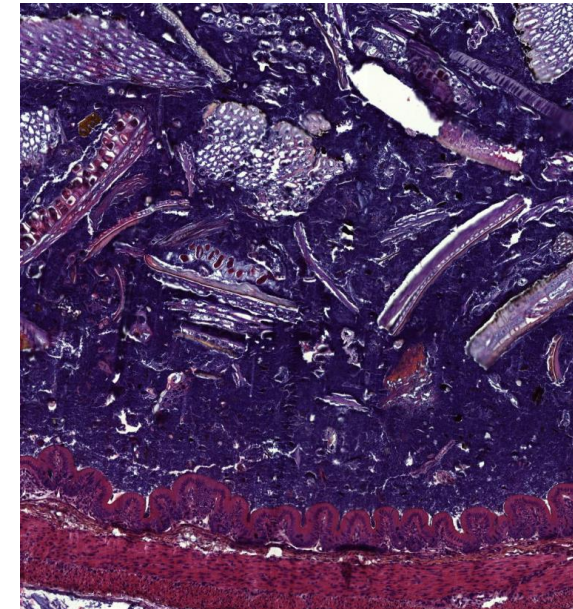
L'activité métabolique du microbiote est déterminée  
par la capacité fonctionnelle (génomique) du microbiote et par les substrats disponibles



J18

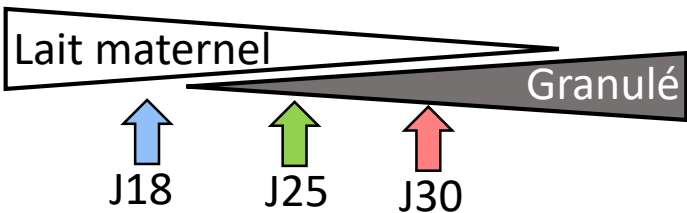


J25

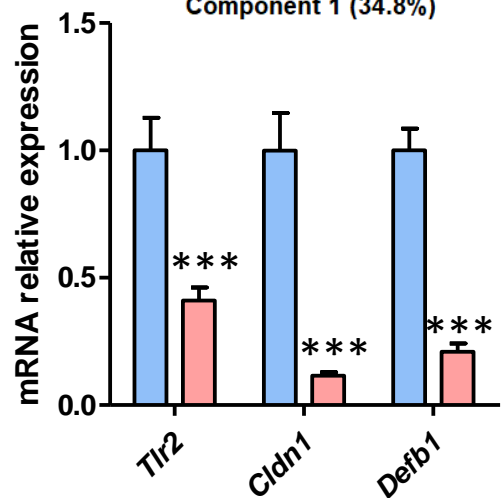
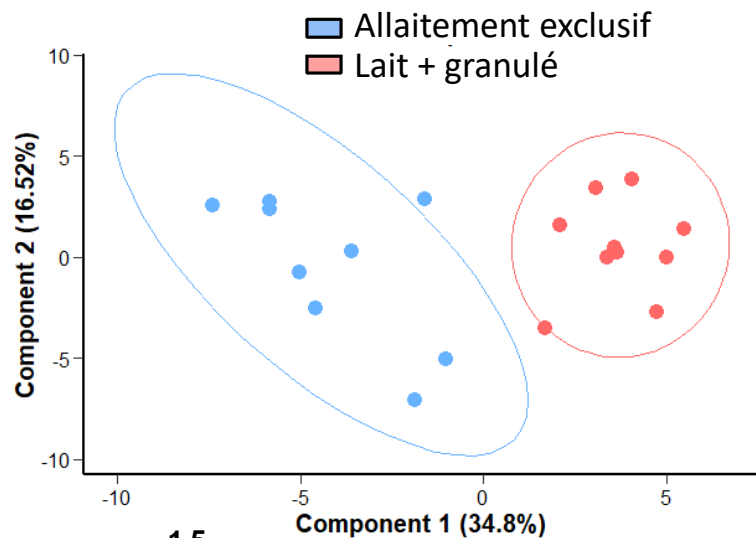


L'ingestion d'aliments solides module la composition et l'activité métabolique du microbiote

Quelles sont les conséquences pour la barrière intestinale ?

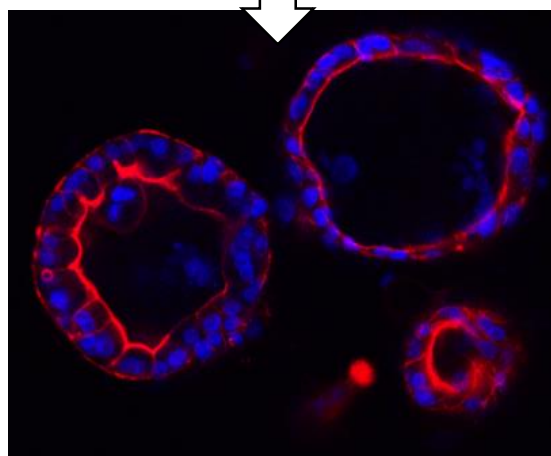


### In vivo – Caecum transcriptome



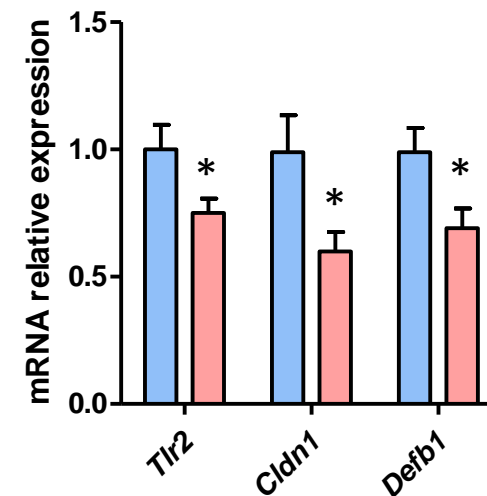
Allaitement exclusif      Lait + granulés

Surnageant stérile de contenu caecal  
(Mélange de métabolites)

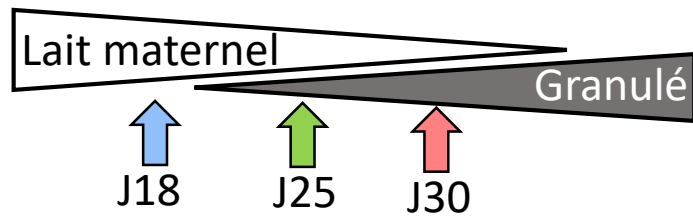


Organoïdes de caecum de lapin

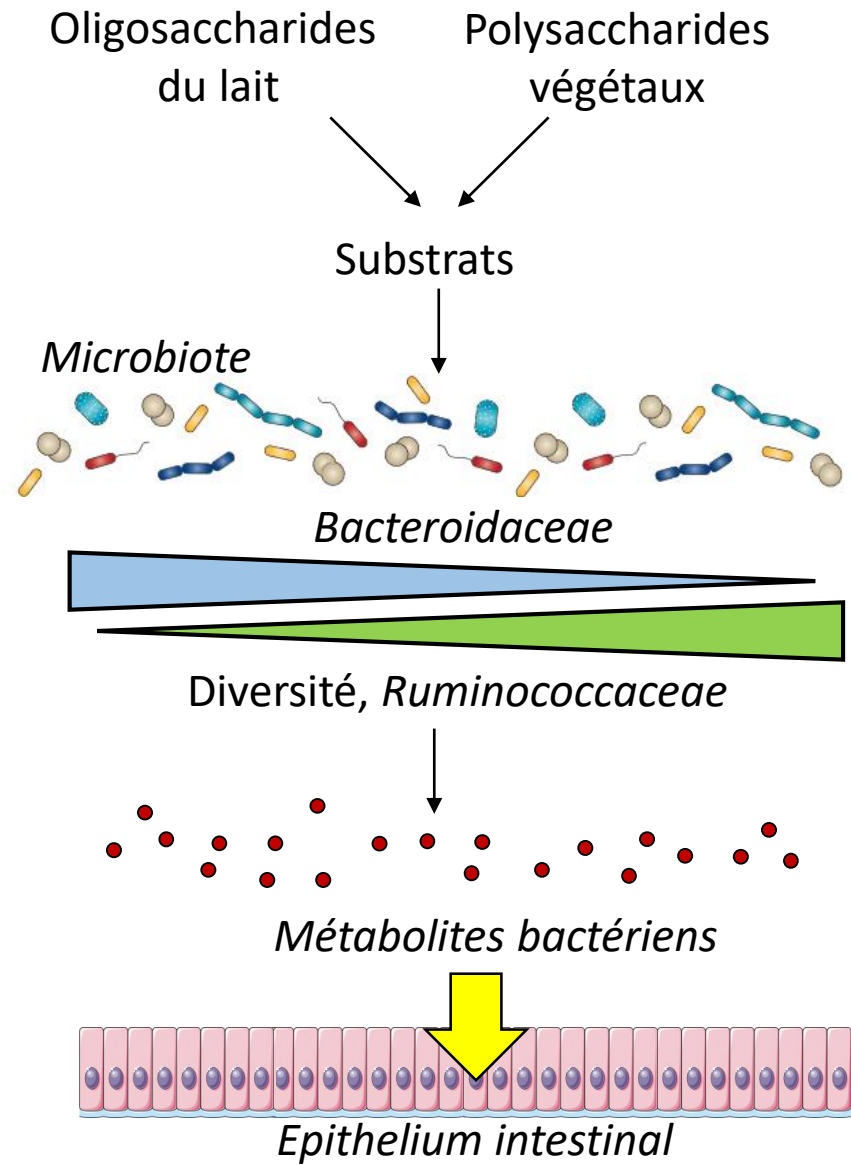
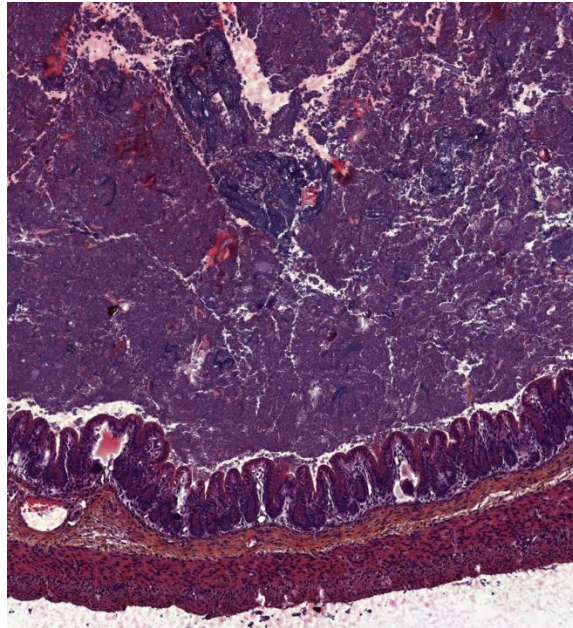
### In vitro



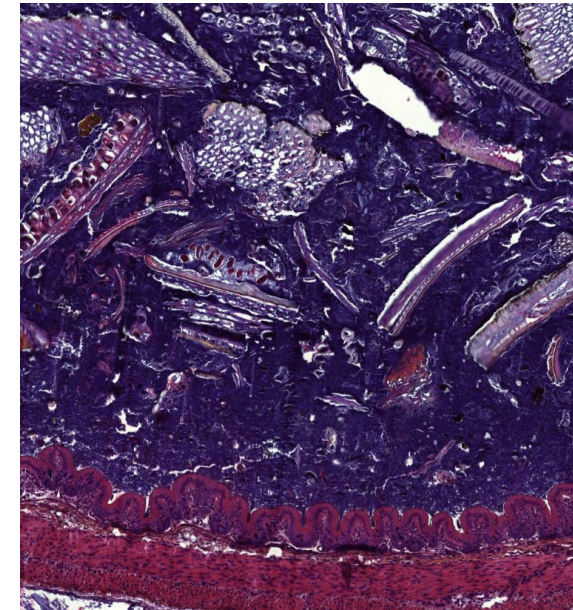
Les métabolites présents dans le caecum après l'ingestion d'aliments solides induisent des modifications d'expression de gènes similaires à celles observées *in vivo*



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 ?



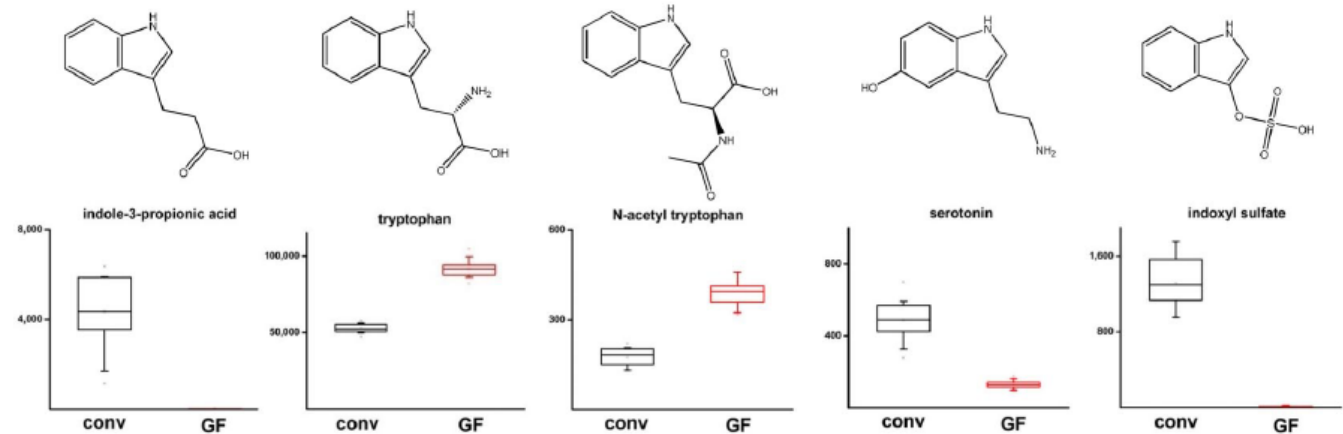
Souris axéniques  
(germ-free)



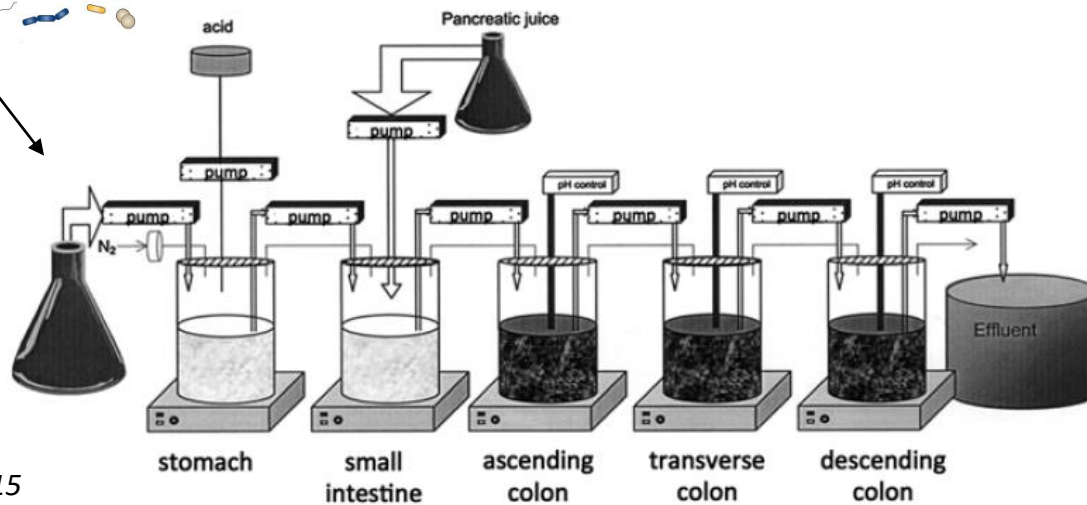
Souris  
conventionnelles

Wikoff, PNAS, 2009

## Metabolomique



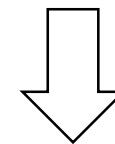
## Fermenteur *in vitro* (SHIME)



Van de Wiele, 2015

## Inférence fonctionnelle (PICRUST2)

- Métagénomique
- Méatranscriptomique
- Méaprotéomique



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

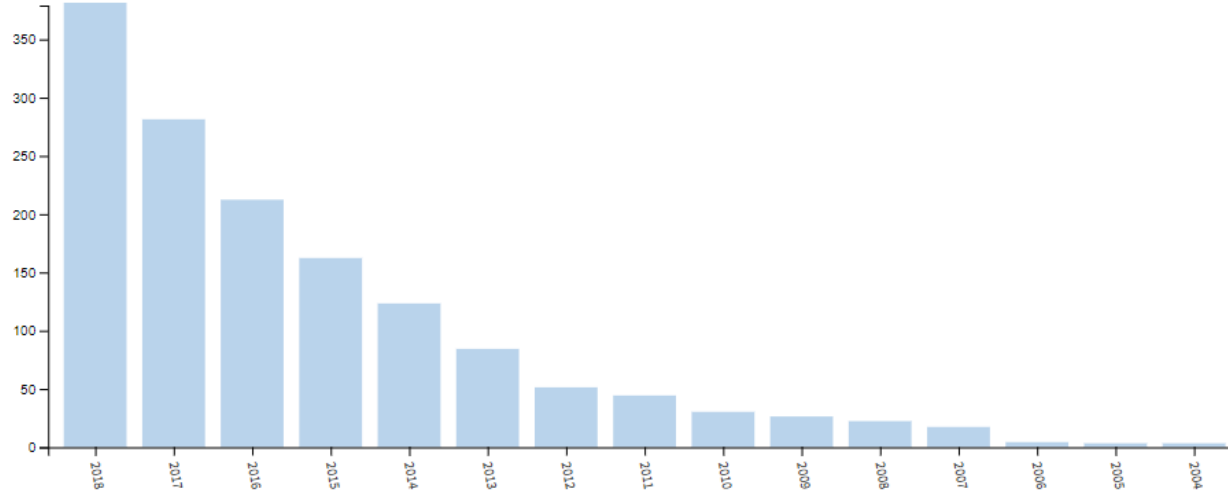
### Nature chimique

Métabolites polaires ou non polaire

### 4.3. Applications

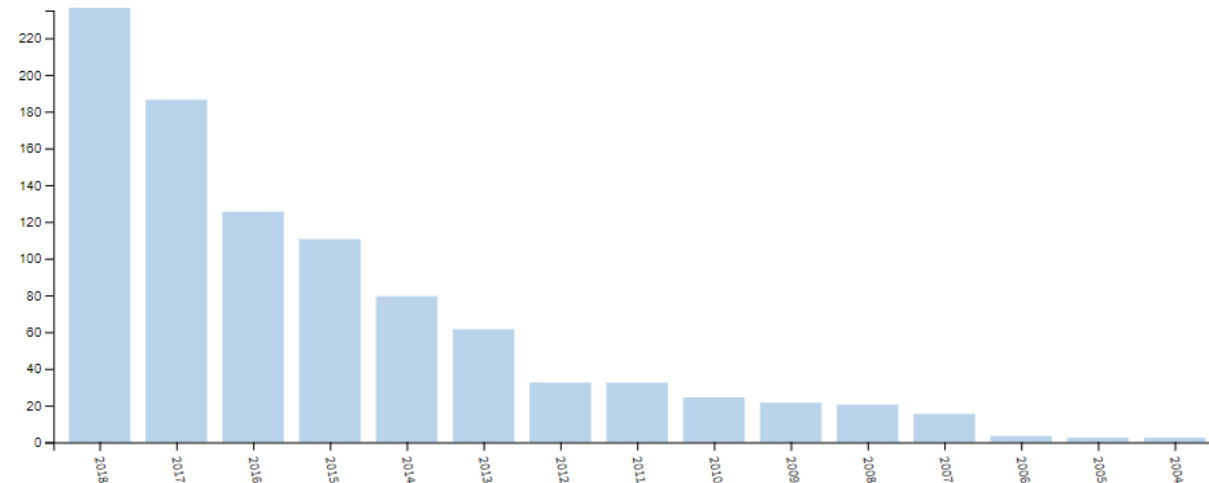
WOS: très nombreuses études

+ 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**

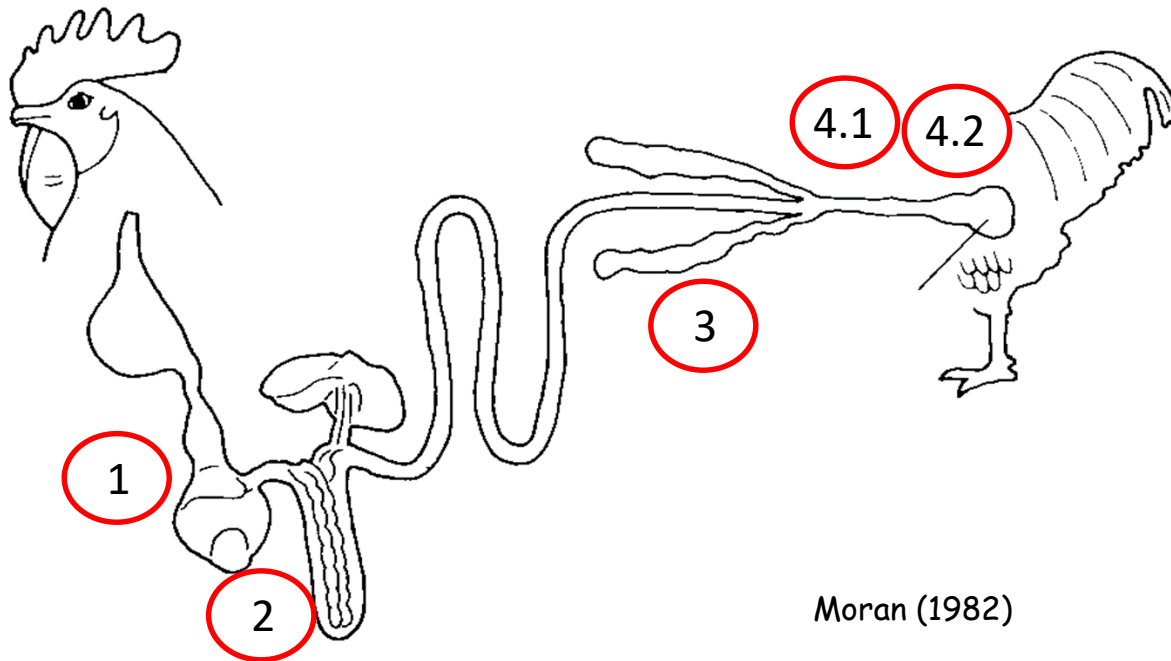
**Excreta** : Mélange fèces et urine : METAB ALIM + METAB ENDOGÈNE + **Métab Bact**

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)



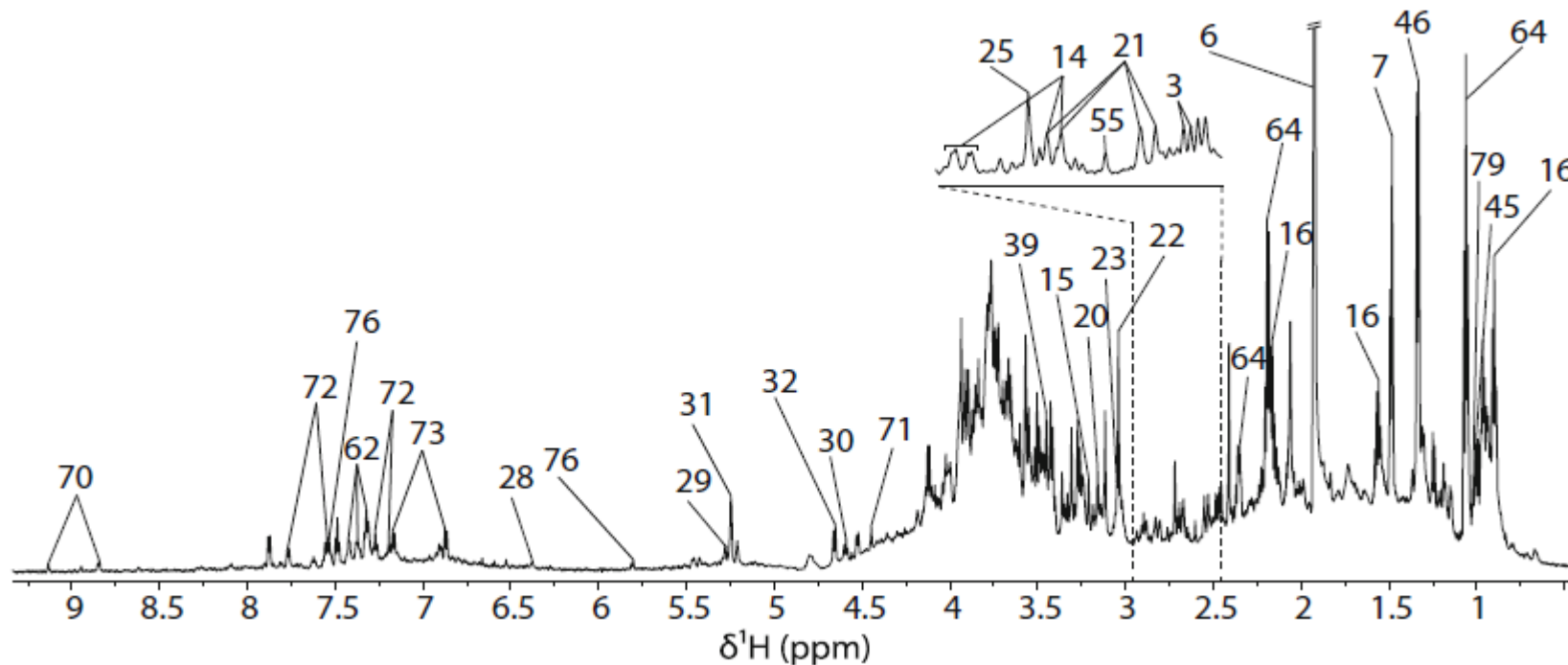
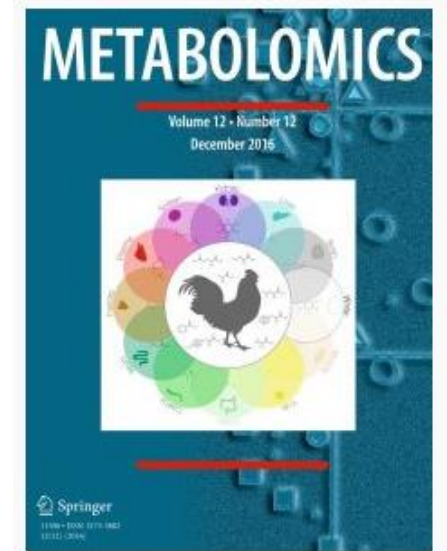


Metabolomics (2016) 12:157  
DOI 10.1007/s11306-016-1105-7

ORIGINAL ARTICLE

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

Caroline Ivanne Le Roy<sup>1</sup> · Luke John Mappley<sup>2</sup> · Roberto Marcello La Ragione<sup>3</sup> ·  
Martin John Woodward<sup>1</sup> · Sandrine Paule Claus<sup>1</sup>



### 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

## 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

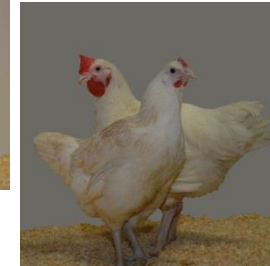
## Protocole expérimental

- ★ 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 ensemble au sol (6.7 poulets/m<sup>2</sup>)  
21 - 63 jours d'âge : cages individuelles
- ★ 12 animaux / lignée / régime
  - ➔ Analyses phénotypiques (Baeza et al, 2015)  
Modification du métabolisme énergétique

Maigres



Gras



## ➔ 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 <sup>1</sup>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 ( $\delta$ )



### **Reconnaissance des métabolites**

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

### **Analyses statistiques**

Normalisation des données

Analyse univariée

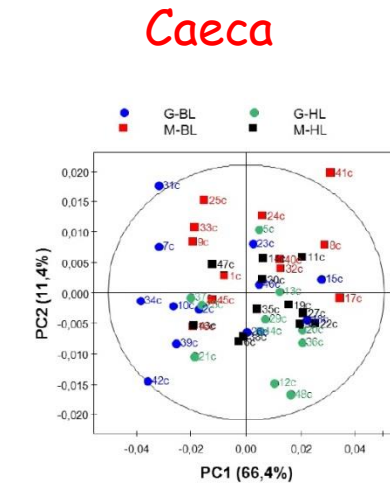
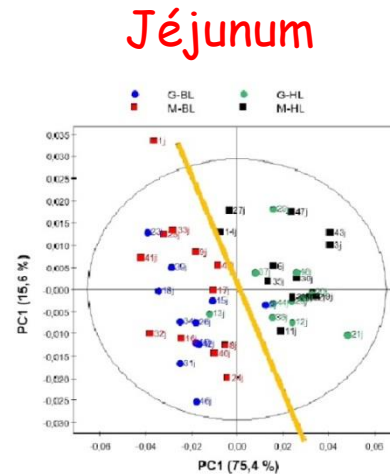
Approche multivariée : Analyse en Composantes Principales (ACP) et Analyse Discriminante (PLS-DA)



# Résultats Métabolites digestifs, dont métabolites microbiens

Variabilité inter-individuelle Très importante

Analyse en Composantes Principales

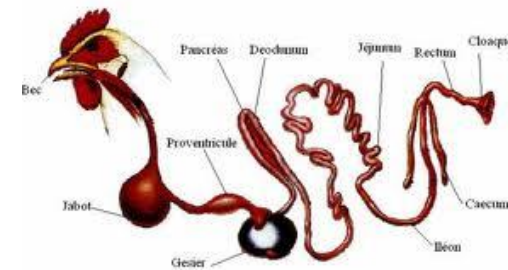


## Comparaisons des deux segments digestifs

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	Lysine
Asparagine	Méthionine
Aspartate	Phénylalanine
Glutamine	Proline
Glutamate	Thréonine
Glycine	Tryptophane
Isoleucine	Tyrosine
Leucine	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 chaîne 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 chaîne courte (AGCC)

n-butyrate  
n-valérate  
Propionate

### Dérivés d'AGCC

3-(4'-hydroxyphényl)-propionate

### Acide dicarboxylique

k-glutarate

### $\alpha$ -céto-acides

Pyruvate  
 $\alpha$ -céto-isovalérate  
 $\alpha$ -céto- $\beta$ -méthyl-valérate

### $\alpha$ -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

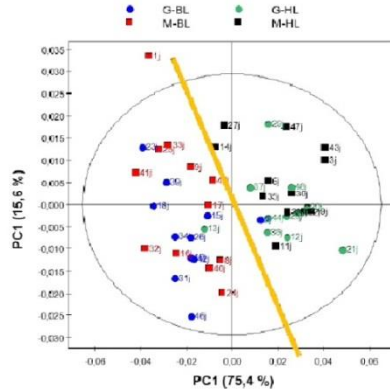
# Effets d'une modification du statut énergétique des animaux induite par leur génétique et/ou leur régime



## Dans le jéjunum

ACP

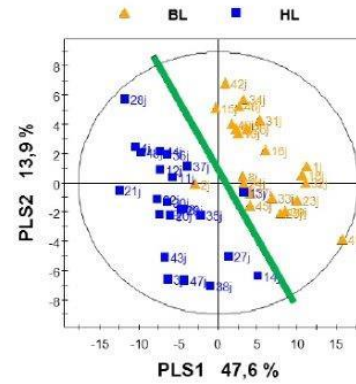
Analyse en Composantes Principales



Pas d'effet génétique

PLS-DA

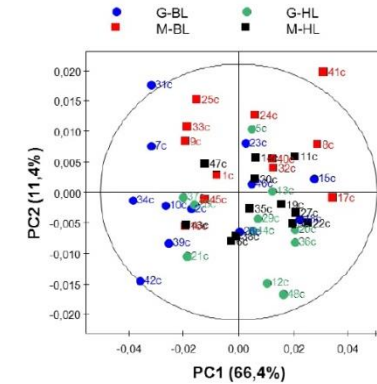
Analyse Discriminante par la méthode de régression des moindres carrés partiels



## 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)



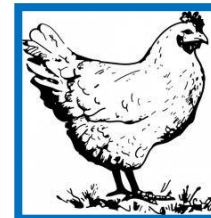
- ★ Régime alimentaire (2 943 kcal / kg; 21 % de protéines)  
De 0 à 28 Jours  
Teneur élevée en blé (52,5 %) d'une variété (Rialto)  
de forte viscosité et de forte dureté  
Teneur en lipides élevée (6%)



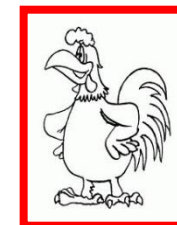
- ★ 0 - 11 jours d'âge : animaux élevés ensembles au sol (17 poussins / m<sup>2</sup>)  
11 - 28 jours d'âge : cages individuelles

- ★ 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 → Lyophilisation et stockage à -80°C

Solubilisation dans du tampon phosphate avec 10% de TSP et 0,01% de NaN<sub>3</sub>

TSP : acide triméthylsilylpropanoïque (référence interne)

**Analyse des métabolites : RMN <sup>1</sup>H**

Spectres RMN <sup>1</sup>H 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, ChemoX)

**Analyses statistiques**

UMR-BOA

Normalisation des données

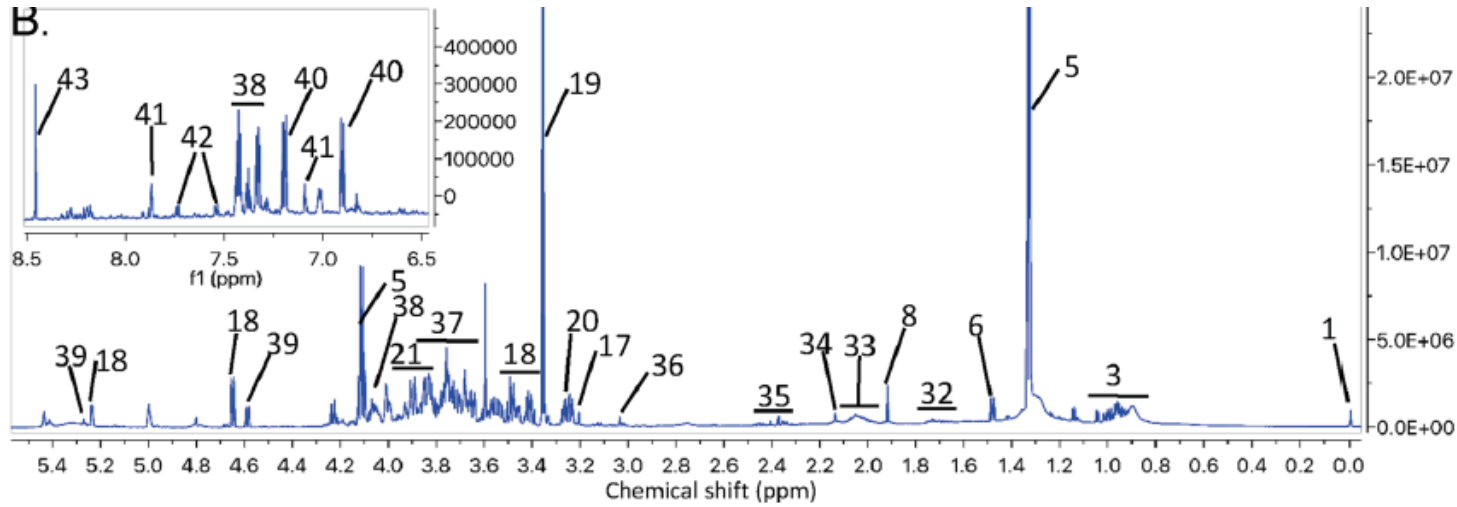
Approches multivariées



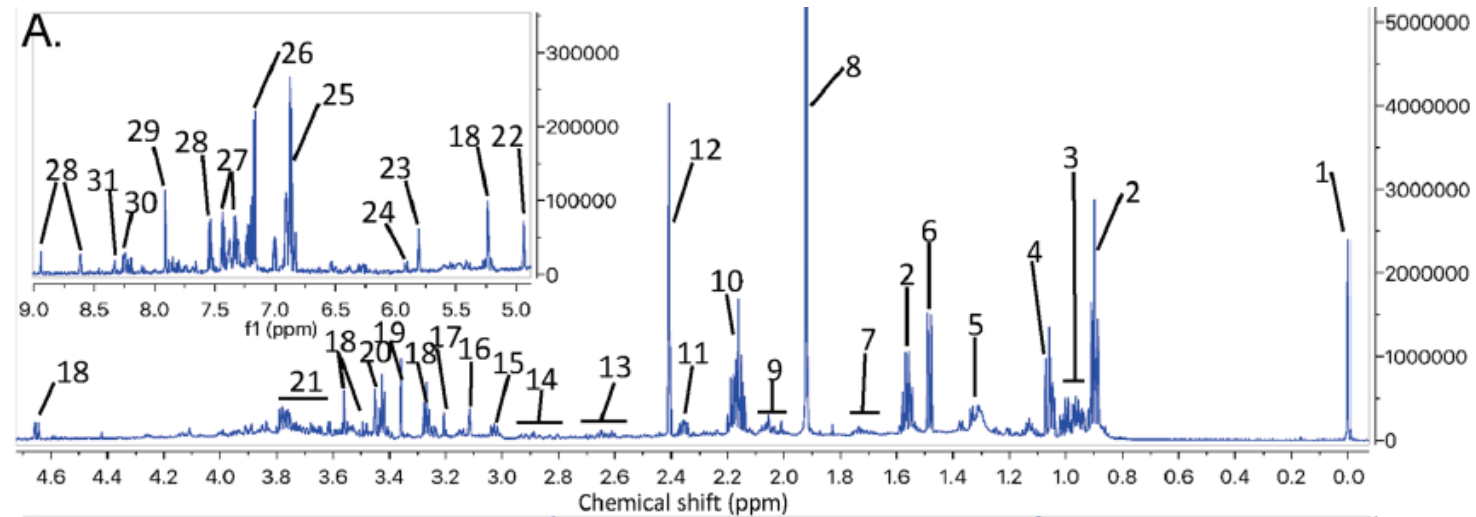
# Résultats

## 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)



Spécifiques à l'iléon distal : 6 métabolites

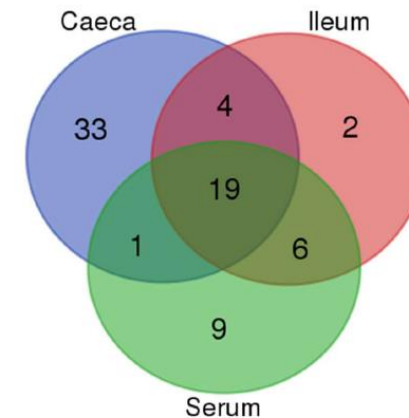
**Origine bactérienne potentielle (1)**  
Amine secondaire (diméthylamine)

Spécifiques aux caeca : 22 métabolites

**Origine bactérienne potentielle (15)**

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

## Analyse par la plateforme n°2





## 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)

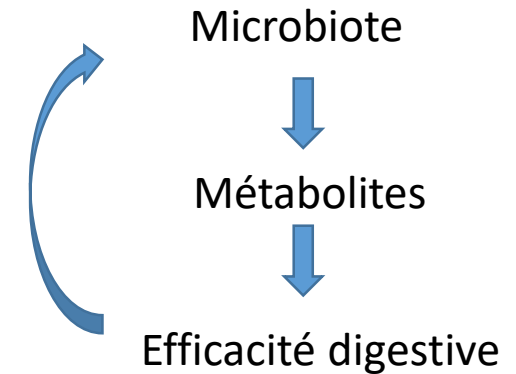
### GABA : neurotransmetteur

#### Origine

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

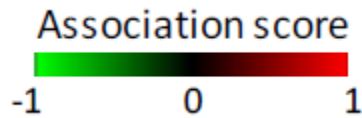
#### Effet biologique

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



## Analyse statistique n°2

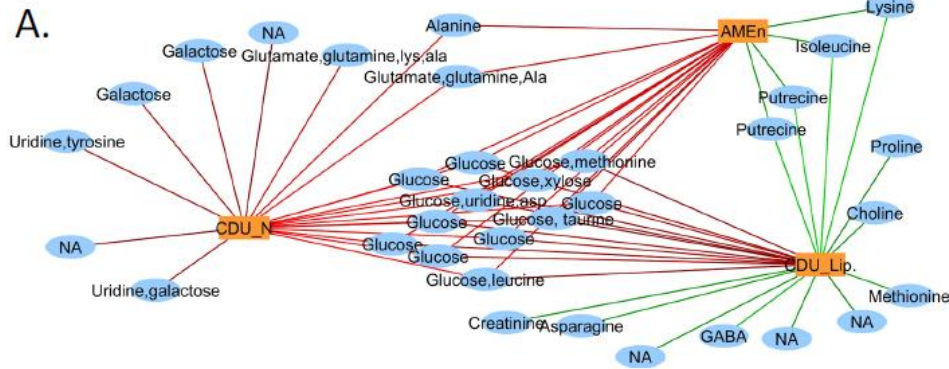
### Analyse de corrélation canonique des moindres carrés partiels



### Métabolites différenciant les D+ et D-

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

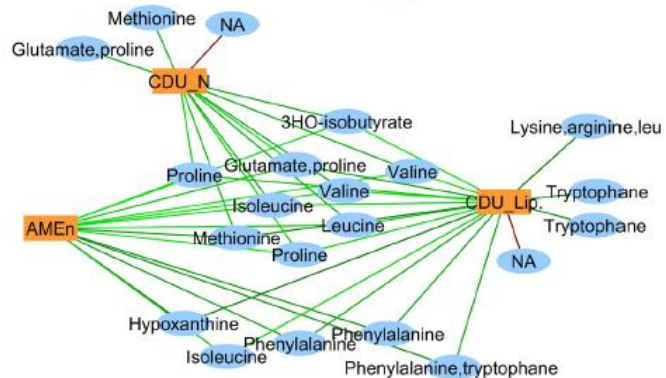
### Caeca



### Correlations fortement positives

Glucose : AMEn, Digestibilité des protéines

### B.



## Analyse statistique n°3

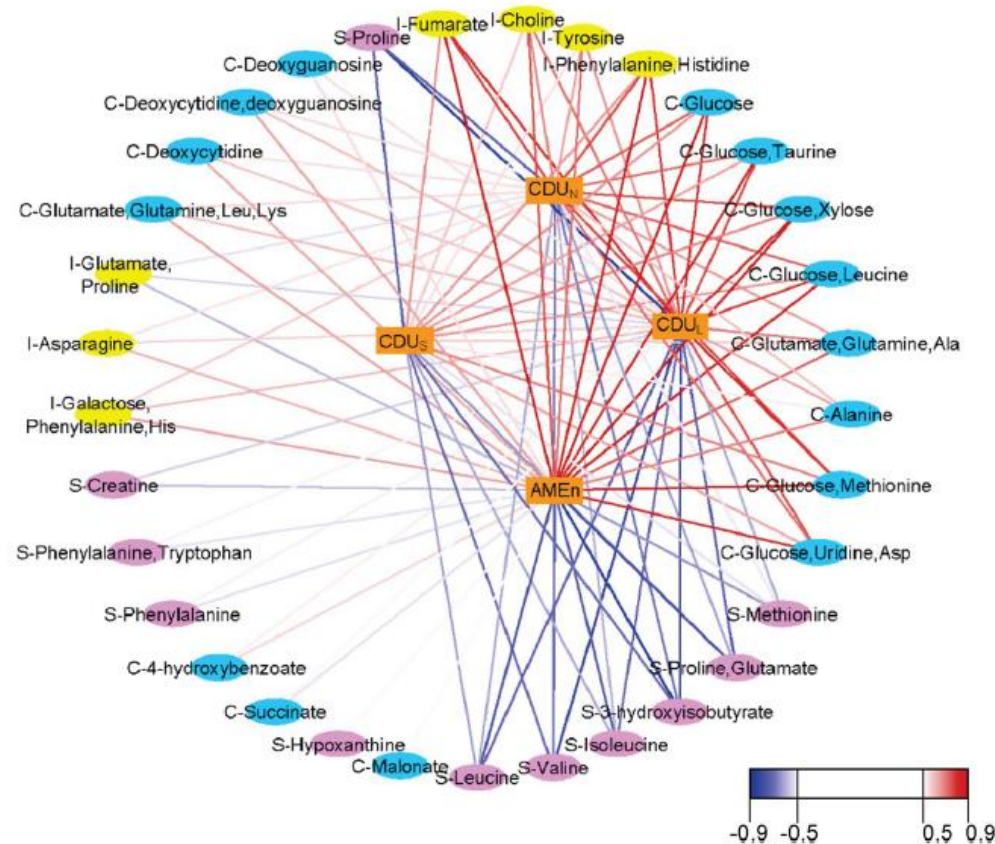
Beauchercq, S., et al. (2018). "Relationships between digestive efficiency and metabolomic profiles of serum and intestinal contents in chickens." Sci Rep 8:6678 | DOI:10.1038/s41598-018-24978-9.

### Analyse de corrélation 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  $\pm 0.5$ ).

## 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 ...

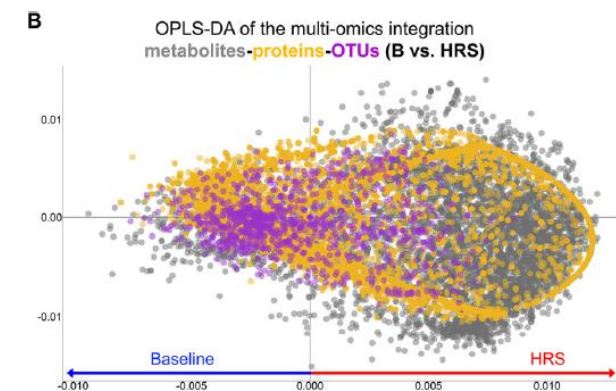
Métabolites et protéines différentiels mis en évidence

→ 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



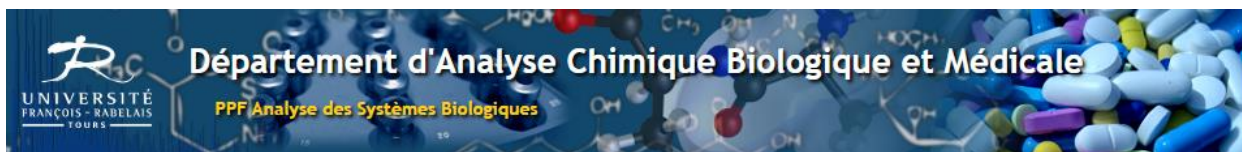
Unit « Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage »



Plateforme  
« Métabolomique »



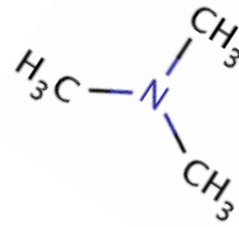
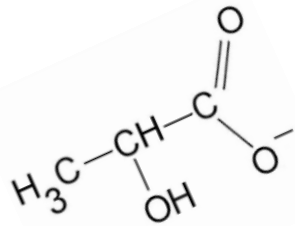
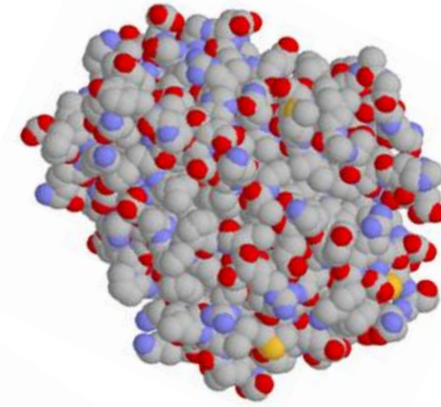
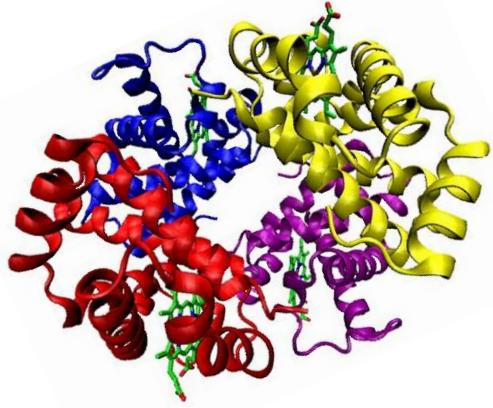
Plateforme  
« Génomique et transcriptomique »



Plateforme  
« Imagerie cellulaire »



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)