



**HAL**  
open science

**Etude de la sphère digestive et de son fonctionnement dans un objectif d'optimisation de ses fonctions et des performances de croissance : Méthodes d'analyses existantes et applicables actuellement.**

Irène Gabriel, Isabelle Bouvarel, Christine Leterrier

► **To cite this version:**

Irène Gabriel, Isabelle Bouvarel, Christine Leterrier. Etude de la sphère digestive et de son fonctionnement dans un objectif d'optimisation de ses fonctions et des performances de croissance : Méthodes d'analyses existantes et applicables actuellement.. 2013. hal-03369788

**HAL Id: hal-03369788**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03369788>**

Preprint submitted on 3 Oct 2022

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

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

# Etude de la sphère digestive et de son fonctionnement dans un objectif d'optimisation de ses fonctions et des performances de croissance

Méthodes d'analyses existantes et applicables actuellement

**Irène Gabriel (URA)**  
**Isabelle Bouvarel (ITAVI)**  
**Christine Leterrier (UMR-PRC)**



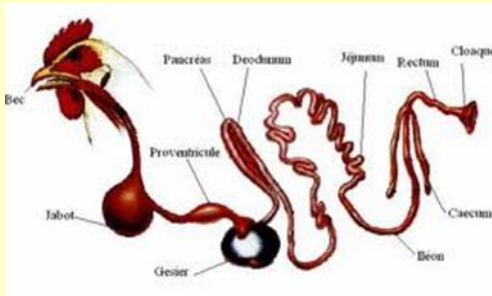
*INRA Centre Val de Loire*  
*37 380 NOUZILLY*  
*FRANCE*

*Comité Thématique ALIMENTATION des volailles de l'UMT-BIRD;*  
*Groupe Microbiote digestif - 14/05/13 - Nouzilly*

# Etude de la sphère digestive et de son fonctionnement dans un objectif d'optimisation de ses fonctions et des performances de croissance

Méthodes d'analyses existantes  
et

Applicables actuellement



**Irène Gabriel (URA)**



# Objectifs

## 1. Etudes des relations entre

Phénotype (Performances de croissance / digestion)  
et  
Marqueurs biologiques\* (MB)

\* Mesure la moins biaisée possible

## 2. Etudes des **relations causales** entre performance et MB

Composition des biotopes digestifs  
Physiologie digestive

(Aliment / Microbiote / Digestion)

## 3. Proposer des solutions pour **optimiser** les performances

# Nouveaux outils d'étude d'écosystème microbien digestif (bactérien)

Composition  
bactérienne

Ensemble des  
gènes bactériens

Ensemble des  
produits bactériens

# Composition du microbiote digestif bactérien

## MÉTHODE PAR CULTURE : Comptages

Aérobies / anaérobies

Non cultivable (70-90%)



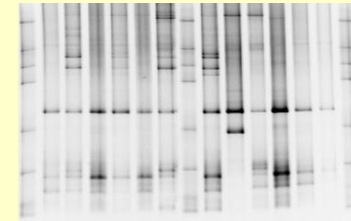
## MÉTHODES MOLÉCULAIRES

Empreintes moléculaires : TTGE, DGGE, RFLP, CE-SSCP ... (1 à 0,1%)

Quantification de groupes ciblés (qPCR, FISH, ...)

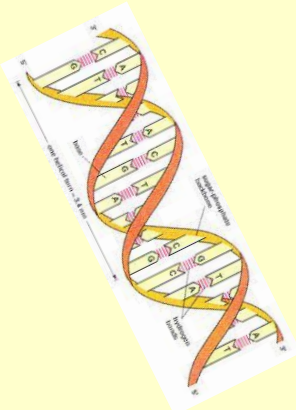
Clonage / séquençage Méthode Sanger

Pyroséquençage d'une région de l'ADNr 16S (0,1%)



TCT AGA GAC GCT CTC CCA AAC ACT GAA  
 GCC AGT GGA CCA ACA ACA CAC TCC TAG GAA ATT  
 CCG GCA CTC ACC GCA GTC COT TCT GAT ACA GCG  
 ACA AAT CCA CTA GTC COT GTA CAA CAT AGG TCA  
 CAA ACC AGA TCT AGC ATA GAG TCT TTC TCC  
 AGG TCA GAG TCT AGC ATA GAG TCT TTC TCC  
 GCG CGG GGT CCA GCT GTG ACC ATT ATG ACC  
 GTG GAT AAC CCA GCT TCC ACC ACG AAT AAG  
 CAT AAG CTA TTT GCA GTG TGG AAG ATC ACT  
 TAT AAA GAT ACT CTC CAG TTA CGG AGG AAA  
 TTG GAG TTC TTC ACC TAT TCT

# Composition détaillée



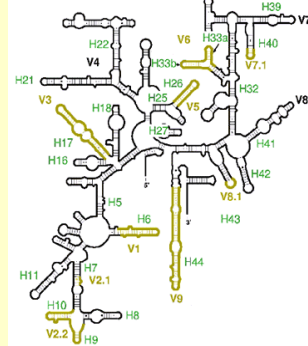
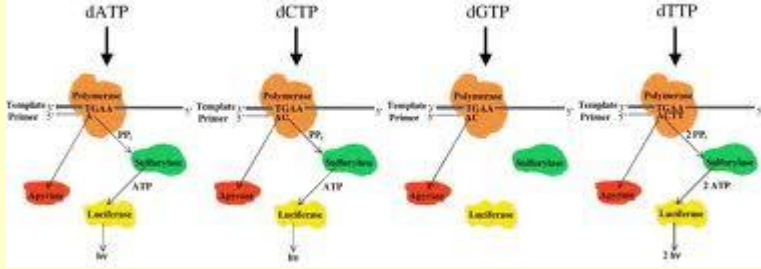
## Pyroséquençage de régions de d'ADNr 16S

➔ Identification de familles ... genres ... espèces



5S  
 23S  
 16S

➔ Marqueur du microbiote



# Principe de la méthode

Différentes étapes

Extraction ADN bactérien / Purification

Adaptée aux matrices digestives étudiées

Amplification d'une région variable (PCR) / Purification

Choix de la région variable : consensus sur V3-V4

Pyroséquençage

Entreprise de séquençage / Plateforme publique

Analyses bio-informatiques

Assignation taxonomique à des bactéries connues (BD)

Etude de diversité avec l'ensemble des OTU ... long

Traitements biostatistiques



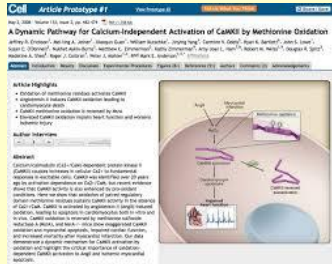
OTU : Operational Taxonomic Unit



# Travaux sur le microbiote digestif chez les oiseaux d'élevage



Principalement : poulet  
Aussi poule, canard



- Qu et al 2008 (USA, Australie)
- Callaway et al 2009 (USA)
- Danzeisen et al, 2011 (USA)
- Hume et al, 2011 (USA)
- Kim et Mundt, 2011 (USA)
- Nakphaichit et al, 2011 (Thaïlande)
- Nordentoft et al, 2011 (Danemark)
- Lee et al 2011 (République de Corée)

- Hume et al, 2012 (USA)
- Lei et al, 2012 (Chine)
- Moon et al 2012 (Nlle Zélande, Japon)
- Singh et al, 2012 (USA, Corée)
- Stanley et al, 2012 (CSIRO, Australie)
- Zhao et al 2013 (USA; Chine)
- Videnska et al, 2013 (République tchèque)
- Vasai et al 2013 (France, JRA)



# Microbiote caecale et performances de croissance

RJ Moore CSIRO (Stanley et al 2012) : Pyroséquençage du 16S

25% bon FCR et 25% mauvais FCR  
24 animaux / groupe

Extraction ADN : Yu et Morrison (2004)  
Séquence variable : V1-V3  
Pool de 2 échantillons (PCR)

**Effet bénéfique** sur le FCR    Bacteroides fragilis (1 OTU)  
Clostriales (3 OTU)

**Effet néfaste** sur le FCR (20 OTU)    Spiroplasma platyhelix  
Lactobacillus crispatus  
Clostridiales

Stanley D, Denman SE, Hughes RJ, Geier MS, Crowley TM, Chen H, Haring VR, Moore RJ. 2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. Appl Microbiol Biotechnol 96:1361-1369

# Microbiote fécale et performances de croissance

Singh et al (2012) : Univ Agric d'Anand en Inde (Equipe de CG Joshi)

Phylum	high FCR	low FCR	Classe	high FCR	low FCR	Ordre	Famille (2)	high FCR	low FCR		
<b>Proteobacteria (3)</b>	48.04 %	49.98 %	Alphaproteobacteria			Rhizobiales	Rhizobiaceae	x 13			
			Deltaproteobacteria			Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae		x 14		
			Gammaproteobacteria		+	Vibrionales	Vibrionaceae (4)	x 330			
						Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	x 25.4			
						Enterobacteriales	Enterobacteriaceae		x 9		
					Betaproteobacteria			Burkholderiales	Comamonadaceae	x 37	
					Epsilonproteobacteria	+		Campylobacterales	Campylobacteraceae (5)	x 189.4	
<b>Firmicutes</b>	26.17 %	36.23 %	Bacilli	+							
			Clostridia		+	Clostridiales	Incertae Sedis XIII	x 14			
							Ruminococcaceae		x 17.7		
<b>Bacteroidetes</b>	18.62 %	11.66 %	Flavobacteria	+		Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	x 94.3			
			Bacteroidia			Bacteroidales	Prevotellaceae		x 16		
							Rikenellaceae		x 13		
<b>Fusobacteria</b>	6.78%	0.46%	Fusobacteria	+		Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	x 11.4			
<b>Synergistetes</b>	0.05%	1.38%	Synergistia			Synergistales	Synergistaceae		x 37.3		
<b>Lentisphaerae</b>	0.01%	0.08%	Lentisphaeria			Victivallales	Victivallaceae		x 17		
<b>unclassified bacteria (1)</b>	15.77 %	14.29 %									

4 animaux

Extraction de l'ADN : Stool Mini Kit de Qiagen

PCR de la région V1-V5

# Possibilités à l'INRA

Méthodologie  
fiable

## Extraction ADN bactérien / Purification

Méthode URA / ISP adaptée aux matrices digestives de poulet

## Amplification d'une région variable / Purification

Choix de la région variable : consensus sur V3-V4  
Scot Dowd (Texas, USA)

## Pyroséquençage

Entreprise de séquençage ( 454 : Scot Dowd, Texas, USA)  
Plateforme INRA (MiSeq, SIGENAE, GenoToul de l'INRA de Toulouse)

## Analyses bio-informatiques (SIGENAE\*, Plateforme GenoToul, INRA Toulouse)

Assignment taxonomique à des bactéries connues (BD)  
Etude de diversité avec l'ensemble des OTU ... long

## Traitements biostatistiques

URA : Christelle Hennequet

# Microbiote digestif Et Effet sur l'Hôte ?

Microbiote bactérien étudié par l'ADN bactérien

Bactéries viables ? / Bactéries actives ?

Effet des bactéries dépend de la souche → Approche métagénomique  
Σ Gènes bactériens : potentiel

Expression des gènes bactériens est fonction de l'environnement

Le microbiote digestif : ce n'est pas que des bactéries

	Intestin grêle (Kim et Mundt, 2011)	Caeca (Danzeisen et al, 2011)	
Bactéries	92%	97,1%	Parmis les séquences assignées (50%)
Archées	0,4%	2,1%	
Eucaryotes	4,2%	0,5%	
Virus	3,8%	0,3%	

Effet sur l'hôte ?

GÉNÉTIQUE

ENVIRONNEMENT

Milieu d'élevage

Alimentation  
(dont additifs)

Fonctionnement  
digestif

Biotope digestif

COMPOSITION DU  
MICROBIOTE BACTÉRIEN

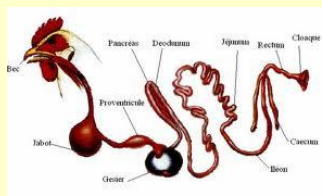
Efficacité  
digestive

Produits

Métabolites (PM < 1 000 g/mol)

Protéines

PHÉNOTYPE



Ensemble des métabolites  
dont les produits bactériens

# Métabolome idéal

Métabolites (PM < 1 000 g/mol) avec action sur l'Hôte

Origine : Hôte / Aliment / Microbiote

## CIBLES

Appareil  
digestif

Animal

Métabolites des  
contenus digestifs

Métabolites  
sanguins

Métabolites  
urinaires

Métabolites  
exhalés

Oiseau :  
Mélanges dans  
les caeca

Métabolites  
volatils

Métabolites totaux ou volatils

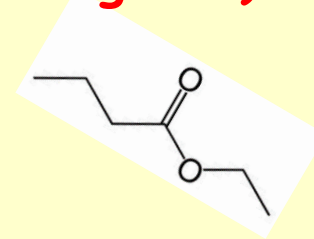
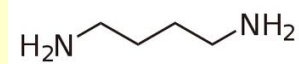
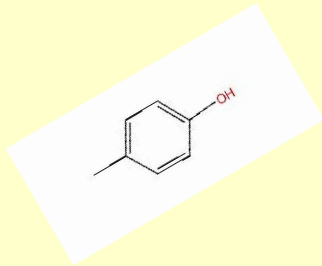
Métabolites 'marqueurs' d'états physiologiques



# Fonctionnement digestif

## Analyse des métabolites digestifs

Métabolites digestifs (PM < 1 000 g/mol)

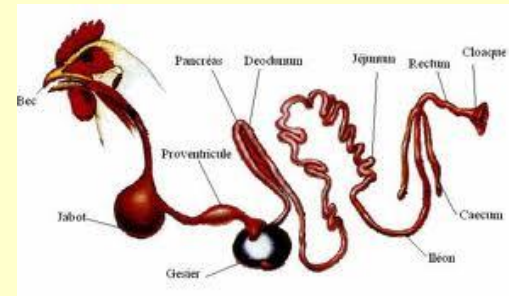


Métabolites digestifs (PM < 1 000 g/mol)

MP et les produits de leur digestion

Produits **bactériens** ± modifiés par la digestion

Produits endogènes ± modifiés par la digestion

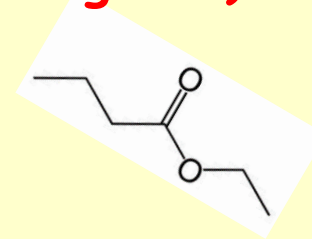
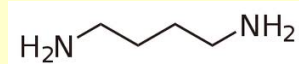
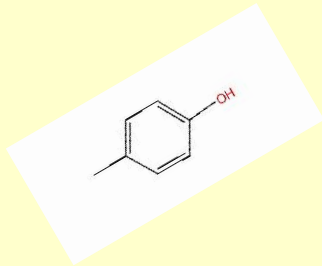


FONCTIONNEMENT  
DIGESTIF

# Fonctionnement global

## Analyse des métabolites sanguins

Métabolites sanguins (PM < 1 000 g/mol)



Métabolites sanguins (PM < 1 000 g/mol)

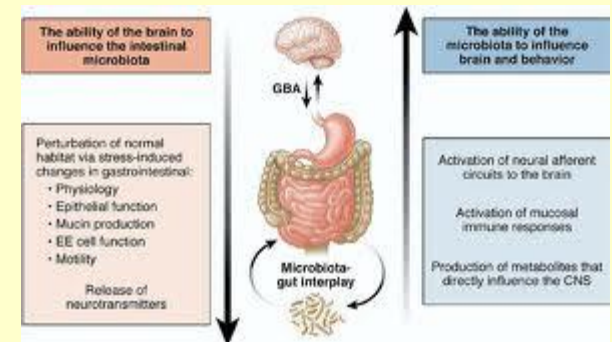
Produits absorbés

Métabolites endogènes (produit par l'épithélium intestinal)

Métabolites **bactériens** ± modifiés par le métabolisme animal



FONCTIONNEMENT  
GLOBAL DE L'ANIMAL



# Méthodes d'analyse des métabolites

- (1) Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse
- (2) Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire

# Méthodes d'analyse

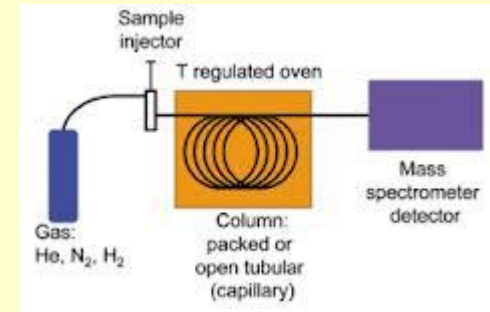
## Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

CG-MS / CL-MS

### Principe

Etape 1 : Séparation des métabolites

Etape 2 : Identification



### Avantages

Sensibilité élevée

Très bonne résolution

Détection d'une grande gamme de métabolites\*

### Inconvénients

Implique de faire un choix à priori pour la séparation

Pour la GC-MS, nécessite d'effectuer une dérivation (une étape de +)

Faible reproductibilité

Pas de quantification absolue (mais relative)

Des problèmes d'identification

Echantillon détruit

\*Si dans les bases de données : Métabolites bactériens ?

# Méthodes d'analyse

## Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire $^1\text{H}$

### Principe

**RMN** : Propriété de certains noyaux atomiques possédant un **spin nucléaire** (par exemple  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{129}\text{Xe}$ ...), placés dans un champ magnétique. Lorsqu'ils sont soumis à un **rayonnement électromagnétique** (radiofréquence), le plus souvent appliqué sous forme d'impulsions, les noyaux atomiques peuvent absorber l'énergie du rayonnement puis la relâcher lors de la **relaxation**. L'énergie mise en jeu lors de ce **phénomène de résonance** correspond à une **fréquence très précise**, dépendant du **champ magnétique** et d'autres **facteurs moléculaires**.

La **spectroscopie de RMN** est une technique :

- quantitative
- non-destructive
- non-invasive
- robuste
- très reproductible

Elle fournit des informations détaillées sur les structures moléculaires de composés purs ou dans des **mélanges complexes**. Elle permet la détection simultanée d'un **large éventail de métabolites**.



# Résonance Magnétique Nucléaire



## AVANTAGES

Préparation minimale de l'échantillon (biais analytiques minimisés)

Pas d'a priori (pas de séparation par CG comme en CG-SM)

Image qualitative et quantitative

## LIMITES

**Métabolites majoritaires : RMN dite 'peu sensibles'**

Limites standards de détection et de quantification (LQ) sont respectivement de 1 et 10  $\mu\text{M}$

Baisse de ces limites d'un facteur 2 à 3 par l'utilisation de sondes de mesures cryogéniques

Métabolites : Principaux composés endogènes en mM

**Présence de superposition de signaux pour des mélanges complexes**

Echantillons digestifs

Echantillons de jéjunum et de caeca en cours d'analyse

# Procédure expérimentale (1)

Analyses RMN  $^1\text{H}$  réalisées sur un spectromètre 500 MHz avec cryosonde (Bruker)

**Minimisation du nombre d'étapes : limitation des biais analytiques**

Expérimentation animale (Elevage)

Prélèvement des échantillons (Surnageant de contenus digestifs)

- Congélation immédiate dans l' $\text{N}_2$  liquide
- Conservation à  $-80^\circ\text{C}$

ETAPES POUR L'ANALYSE PAR RMN

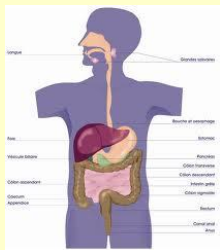
Extraction des échantillons (Wu et al, 2010)

Acquisition des données RMN

Analyses des données de RMN

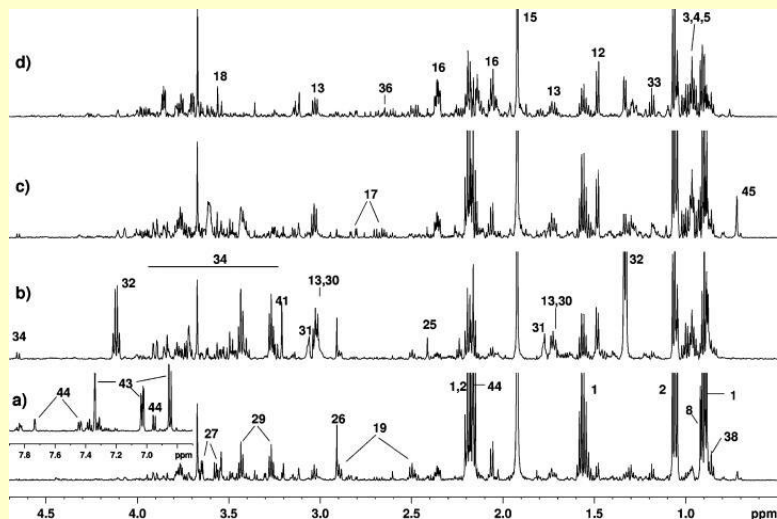
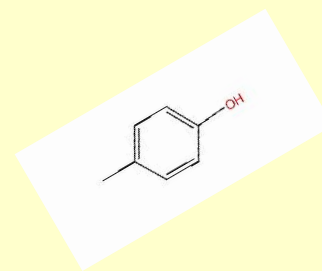
Analyses statistiques





# Chez l'Homme

Le Gall et al (2011)



Typical 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of aqueous fecal extracts from  
 (a) UC patient (inset shows aromatic region with drug and drug metabolite signals present in UC spectra)  
 (b) UC high lactate sample  
 (c) IBS patient  
 (d) control

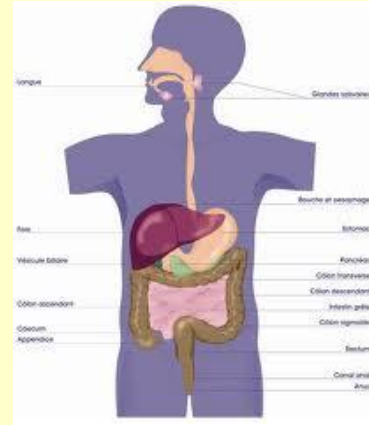
Acides gras à courte chaîne, AGCC  
 Dérivés phénoliques d' AGCC  
 Di-acide (glutarate)  
 Cétone d'acide  
 Acides aminés  
 Dérivé d'acides aminés  
 Monoamine  
 Diamine (putrécine, cadavérine)  
 Méthylamine (Di et triméthylamines)

Composants de lipides (glycérol, choline)  
 Acides biliaires  
 Alcool (éthanol)  
 Phénol (p-crésol)  
 Dérivés phénoliques  
 Nucléoside  
 Monosaccharides (C5-C6)  
 Dérivés de monosaccharides





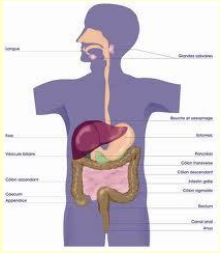
Dysbiosis  
chez le poulet



Inflammatory  
Bowel Diseases  
(IBD)

Similitude

Philipp Van Immerseel



## IBD en humaine (Inflammatory Bowel Diseases)

### Marqueurs biochimiques actuels

Sérum : Erythrocyte sedimentation rate (ESR) (Vermeire S et al, 2006)  
C-reactive protein (CRP) (Florin TH et al, 2006)

Fèces : Calprotectin, Lactoferrin (Van Assche 2011)

### Non spécifique de l'IBD

### Marqueurs métabolomiques

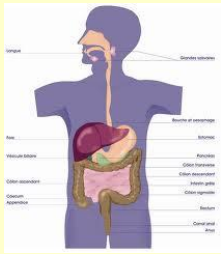
Exemple :

Maladie de Crohn (Iléon et colon)

RMN : Bezabeh et al (2001)  
Marchesi et al (2007)  
Williams et al (2009)  
Balasubramanian et al (2009)

FTMS : Jansson et al (2009)

Echantillons biologiques : Extraits fécaux  
Tissus intestinaux (biopsie)  
Urine



# IBD en humaine (Inflammatory Bowel Diseases)

Résultats avec la RMN

## Bezabeh et al (2001) : Muqueuse de colon

Modification de : Choline

Créatine

Lipides (Non ident)

AA (Lys + non ident.)

## Marchesi et al (2007) : Extrait fécaux

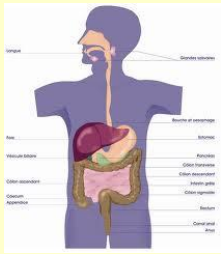
Métabol Augm : Ala, Ile, Leu, Lys, Val  
Glycérol

Métabol Baisse Acétate,  
Butyrate  
Méthylamine  
Triméthylamine

## Williams et al, 2009 : Urine

Métabol Augm Gly  
Formate  
Glycolate  
Guanidoacetate  
Méthylhistidine

Métabol Baisse 4-cresol  
sulfate  
Citrate  
Hippurate



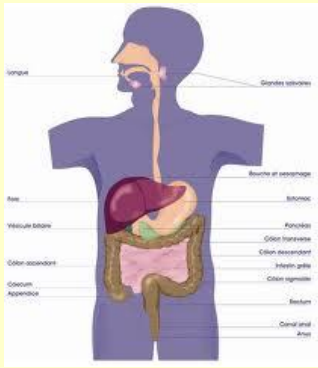
# IBD en humaine (Inflammatory Bowel Diseases)

Résultats avec la RMN

Balasubramanian et al, 2009 : Colon mucosal tissue extracts

Métabol Augm    Glucose  
                      Glycerophosphorylcholine

Métabol Baisse    Alanine  
                          Glutamine/glutamate  
                          Isoleucine/leucine/ valine  
                          Choline  
                          Formate  
                          Lactate  
                          Myoinositol  
                          Succinate



# IBD en humaine (Inflammatory Bowel Diseases)

Résultats avec la RMN

➔ Mise en évidence de marqueurs potentiels

➔ Vérifier leur spécificité

Contrôle sur des patients (malades / sains)

➔ Origine biologique de  
ces marqueurs biologiques

➔ Proposer des moyens thérapeutiques

# Métabolites digestifs chez les oiseaux

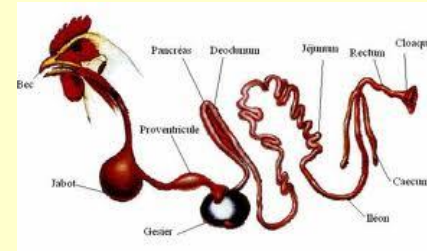
Pas de travaux publiés actuellement

(Plateforme Corsaire, CEISAM, CNRS Nantes)

## Intestin grêle

Rares données chez l'Homme ( $\neq$  fèces)  
Métabolites similaires ou différents ?

Premières analyses : **nombreux** métabolites  
(Métabolites digestifs)



Analyses  
en cours

## Caeca

**Métabolites digestifs + Métabolites urinaires**

A priori + complexe



Augmente la possibilité de trouver un marqueur

→ Séparation possible ?

Résultats  
à venir

## Fientes

Sans contenu caecal → Intestin grêle + Modification rectum

Avec contenu caecal → Contenu caecal

## 2. Etudes des **relations causales** entre performance et marqueurs biologiques

Pour optimiser les performances

**Composition des biotopes digestifs**

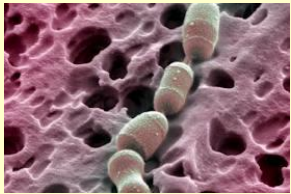
**Physiologie digestive**

(Aliment / Microbiote / Digestion)

# Caractérisation des biotopes digestifs : Facteur dont dépend le microbiote digestif

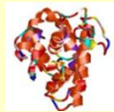
Jabot, Intestin grêle, Caeca

**Biotope :** Lieu de conditions environnementales uniformes fournissant un milieu de vie pour un groupe d'organismes

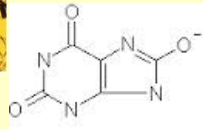
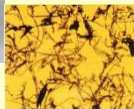
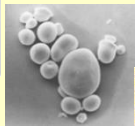


Source de nutriments  
Milieu de vie

Séparation des cellules bactériennes et de leur biotope



Composition chimique



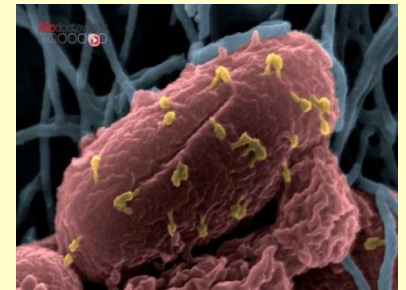
Protéines

Lipides

Amidon

Autres glucides (Fibres)

Acide urique



Données physicochimiques : pH



# Fonctionnement digestif

## FONCTIONNEMENT DE LA MUQUEUSE DIGESTIVE

### Phosphatase alcaline

Critère de maturité des entérocytes  
(Weiser, 1973; Traber et al., 1991)

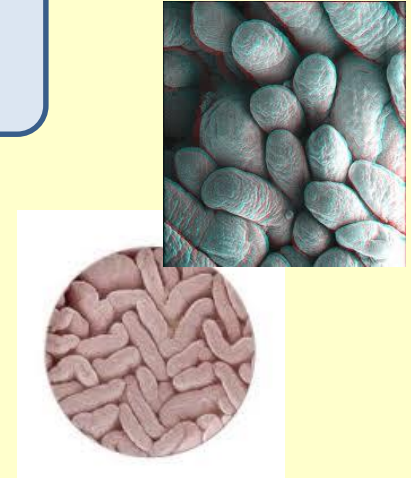
Rôle majeur dans la **santé digestive**

Intervention dans l'homéostasie et la protection intestinale (Lalles 2010)

- Régulation de **l'absorption des lipides** au niveau des entérocytes
- Participation à la régulation de la **sécrétion de bicarbonate** et du pH de surface au niveau du duodénum
- Limite le **passage transépithélial bactérien**
- **Contrôle l'inflammation** induite par des endotoxines bactériennes par déphosphorylation (Ex: action sur le LPS)

### Enzymes impliquées dans l'étape finale de la digestion

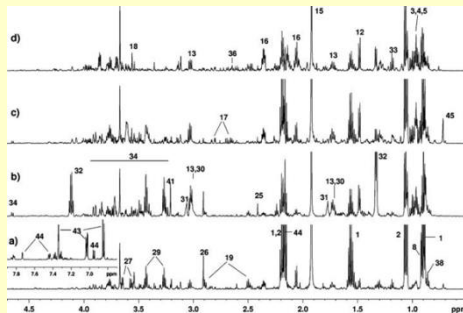
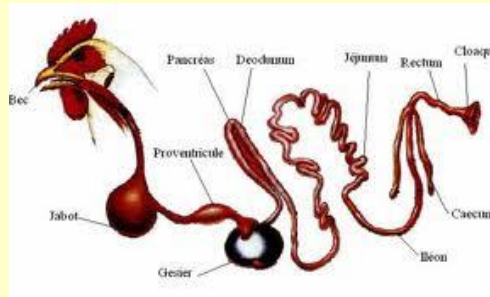
Protéines (aminopeptidase)  
Glucides (dissaccharidase)



# MERCI DE VOTRE ATTENTION



## Fonctionnement digestif



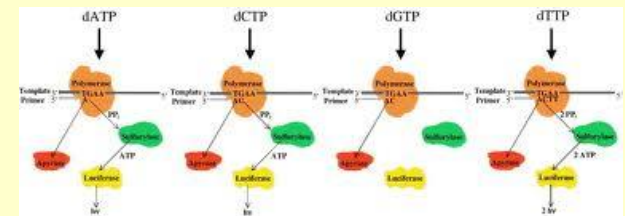
## Biotopes digestifs



5S

23S

16S



Pour plus de détails ...

# Objectifs ciblés pour le microbiote digestif des oiseaux

Composition détaillée

Ensemble des gènes bactériens

Ensemble des produits bactériens

Catalogue

Défini à partir d'un groupe large d'animaux expérimentaux



Validation sur des animaux du terrain

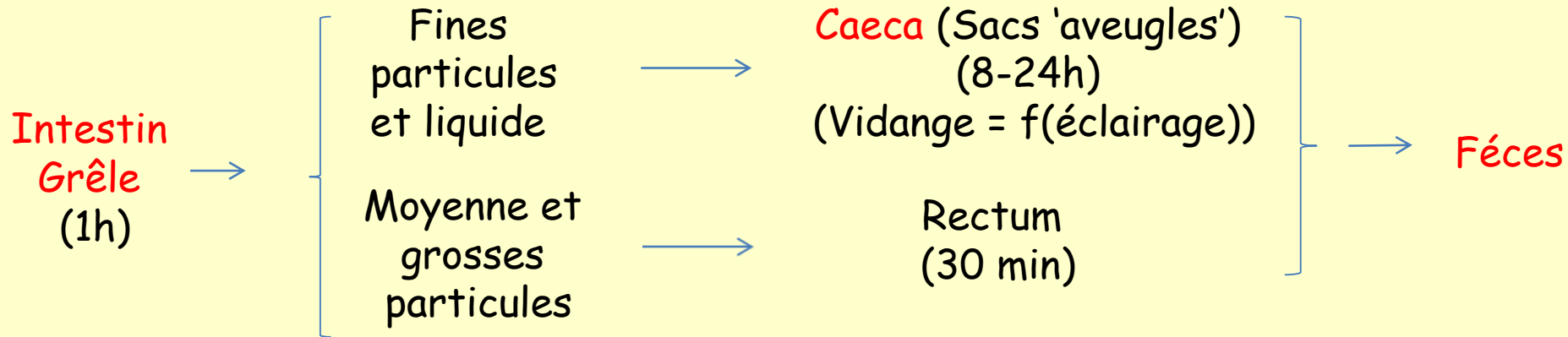
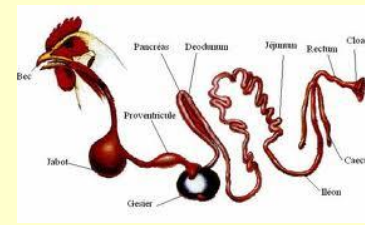
Recherche

Noyau commun ('core')

Marqueurs

Idéal / Optimal pour l'animal

# Oiseaux

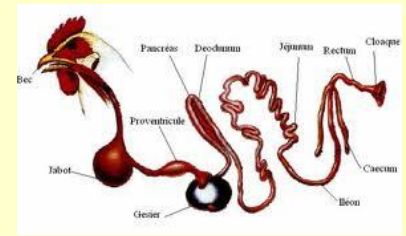


**Fèces** : Contenus d'**iléon** + contenus de **caeca** 10 à 100 fois plus concentrés en bactéries, avant passage dans le rectum (30 min)

Les **caeca** se videraient en début de rectum (en fait, peu de données et contradictions) au moment des changements de luminosité soit 2 fois par jour (Barnes, 1977; Duke, 1986 ; Klasing, 1998) voir 3 fois ou plus

- **Grande variabilité de composition** des fèces / du microbiote fécal :
- au cours de la journée
  - d'un jour à l'autre (Sekelja et al, 2012)

# Oiseaux



En pratique les études **d'écologie microbienne** chez l'oiseau :  
**Caeca** >> Intestin grêle > Jabot > Fientes\*

\* Pollution par les élevages avicoles

Pathogènes transmissibles à l'Homme (ISP, ...)

Suivi d'élevage sur le terrain, diagnostic (ANSES, GISA Whelp)

**Comprendre la physiologie de l'animal** (Prélèvements invasifs si nécessaire)

Digestion → Microbiote de l'intestin grêle

Métabolisme (Immunité), comportement → Microbiote le + riche (Caeca)

## **Intérêt du microbiote fécal**

Prélèvements non invasifs\*

Réalisation de cinétique sur les mêmes animaux

Limitation du nombre d'animaux pour les cinétiques \*

Travaux à grande échelle, phénotypage à haut débit (Génétique)

## **Problématique :**

Echantillon représentatif du microbiote digestif (intestin grêle / caeca )

\*Ethique en Expérimentation Animale / Capsule type IntelliCap (11 x 26 mm)

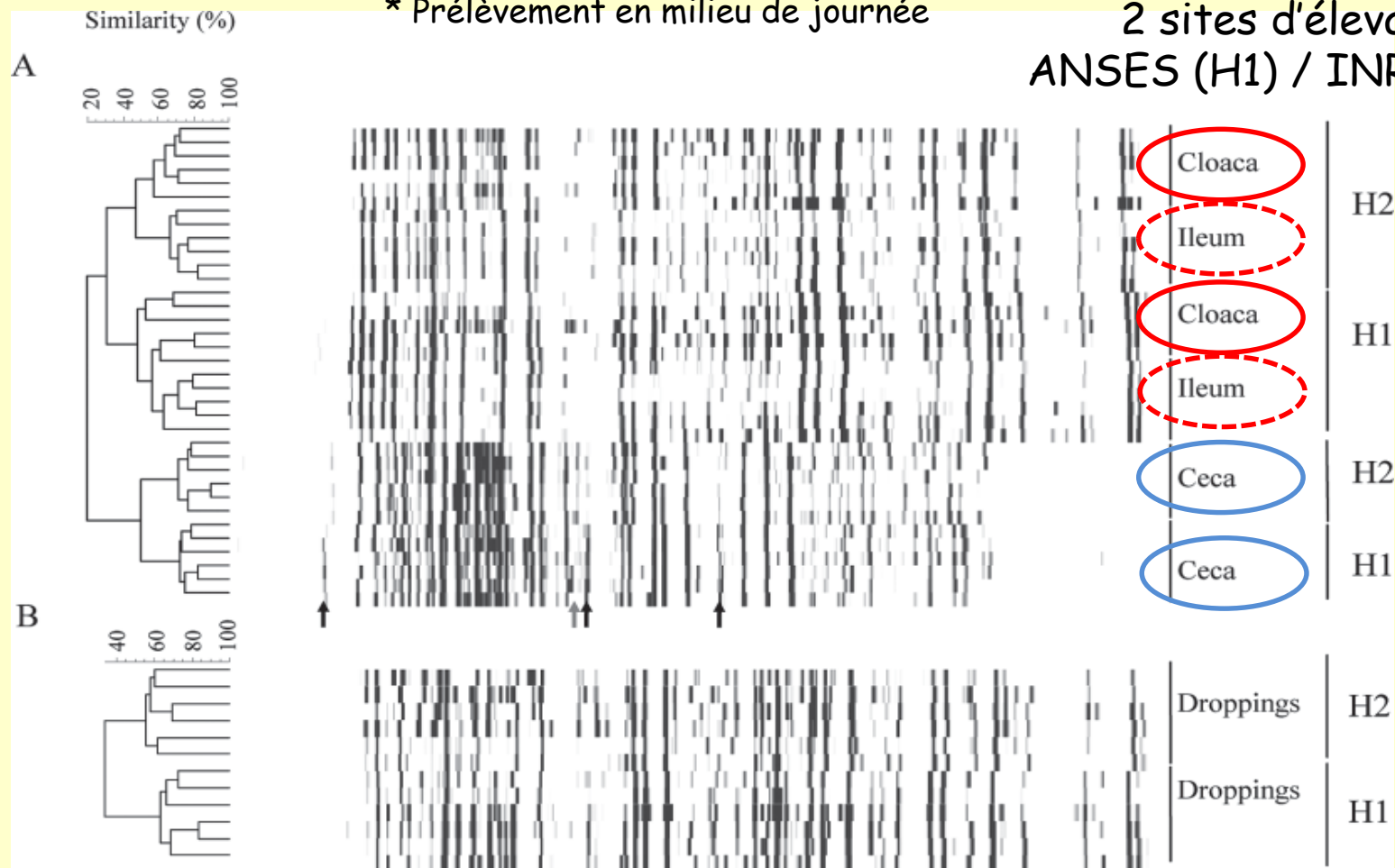
# Similitudes des microbiotes de l'iléon et du cloaque\* ( $\neq$ caeca)

Programme Européen PoultryFlorGut (Pissavin et al, 2012)

(Extraction d'ADN : Stool MiniKit; CE-SSCP)

\* Prélèvement en milieu de journée

2 sites d'élevage  
ANSES (H1) / INRA (H2)



# Plusieurs travaux avec des conditions très variables (Animaux, Analyse microbiote)

→ Résultats très variables

Souche : différente

Elevage des animaux (démarrage, suite) : mal définies

Régimes alimentaires (commercial ...) : mal définies

Age de prélèvement : très variables



Mode d'abattage : effet sur les mouvements de contenus digestifs ?

Echantillons biologique : Caeca » Intestin grêle (Jéju, iléon) = Féces

Prélèvement des échantillons : mal définies

Conservation des échantillons : mal définies

Nombre de répétitions / groupe : très faible (1 à 6; 12)

Regroupement d'échantillon : variable (individu / pool)

Extraction de l'ADN bactérien : kit commercial inapproprié, méthode mécanique

Région variable de l'ADN 16S : non optimale, V3-V4

PCR


Séquençage du 16S : 454 (MiSeq)

Analyses bioinformatiques

Analyses biostatistiques

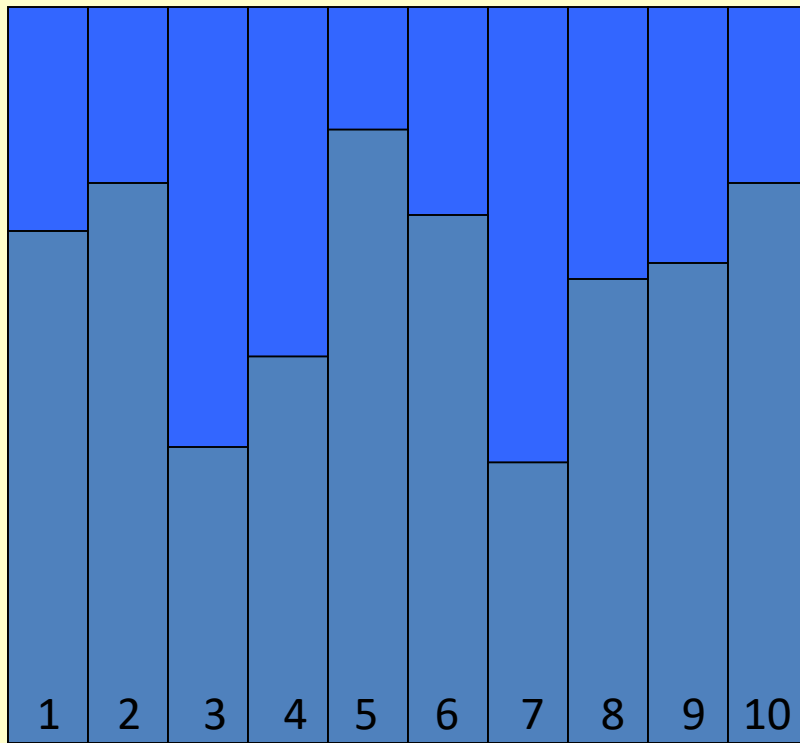


# Methods of DNA extraction

 Bacterial DNA extracted

 Bacterial DNA not extracted

Method 1

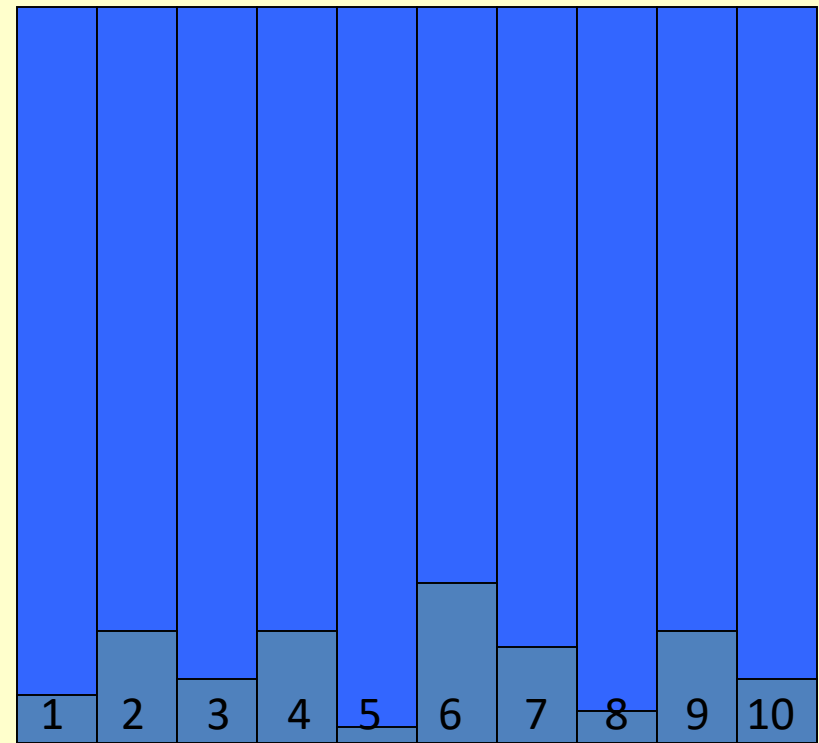


Bacterial species



Not quantitative  
Representative ??

Method 2



Bacterial species



Extraction nearly exhaustive  
Representative

# Besoin de STANDARDISATION et d'OPTIMISATION des conditions d'étude

Rq : Wei et al, 2013

Très grande variabilité  
de résultats de composition  
du microbiote du poulet  
par séquençage Sanger

# Microbiote de l'intestin grêle et performances de croissance

SARDI et Poultry CRC (Australie) (Torok et al, 2011) : T-RFLP

Différences régimes et litières	Tissus + digesta d'iléon
Effet bénéfique sur le FCR	Lactobacillus crispatus Gallibacterium anatis E. coli

Effet néfaste sur le FCR	L. salivarius L. aviarus L. crispatus
--------------------------	---

RJ Moore CSIRO (Stanley et al 2012) : pyroséquencage 16S

25% bon FCR et 25% mauvais FCR	Muqueuses du jéjunum
--------------------------------	----------------------

24 animaux / groupe

Pool de 2

Pas de différence de microbiote

# Microbiote caecale et performances de croissance

Variabilité du microbiote → Mauvaise perf

Torok et al, 2011 (T-RFLP) ; Apajalahti et al, 2012 (%G+C)

Espèces bactériennes incriminées

Streptococcus faecium (ou Enterococcus hirae) (Fuller 1984)

Clostridium perfringens (Long et al 1974; ...; Fuller 1984; ... ;Choct et al 2006; ...)

Bactéries de G+C données (McCracken et al 2006)

Animaux performants (ME/GE) : Contenu G+C ≈ 45%

Animaux peu performants : Contenu G+C ≈ 37% et +60%

Apajalahti et al (2012) :

Performance-linked

Microbial Index (PMI)

Identification de 8 OTU (non précisés)

Torok et al, 2011 (T-RFLP)

Effet bénéfique sur le FCR	Clostridiales
	Clostridia
	Lachnospiraceae
	Lachnospiraceae / Ruminococcus torques
	Lachnospiraceae / Clostridium lactatifermentans
Effet néfaste sur le FCR	Clostridiales
	Lachnospiraceae

# Microbiote digestif et performances de croissance

Zhao et al (2013)  
Singh et al (2013)  
Nakphaichit et al (2011)

Relation entre  
la composition du microbiote digestif  
et des paramètres phénotypiques  
comme la digestibilité ?

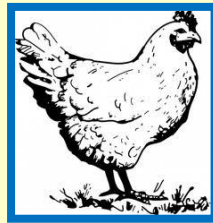
## Relation entre la composition du microbiote digestif (caeca) et la digestibilité



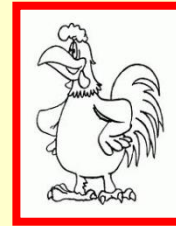
Lignées divergentes D+D-  
Croissement F2  
(144 animaux)

qPCR des grands  
groupes bactériens

D+



D-



### Bonnes digestibilités associées à

Une faible **quantité** d'E. coli

Un faible **rapport** entre E. coli et toutes les autres catégories de bactéries  
(Lactobacillus, L. salivarius, L. crispatus, C. Coccoides, C. Leptum)

### Mauvaises digestibilités associées à

Une forte **quantité** d'E. coli

De forts **rapports** E. coli / C. coccoides et E. coli / C. leptum

Une forte **proportion** de L. salivarius dans les lactobacilles

Un fort **rapport** L. salivarius / C. coccoides et L. salivarius / C. leptum

# Evaluation des coûts analytiques

Exemple concret de travaux :

- 2 état d'animaux (Témoin idéal, stressé post-éclosion)
- 4 ages (2-3j, 10j, 21 j, 35j)
- 4 régimes alimentaires (4 différents ou 2 x 2)
- 15 animaux / groupe  
soit 480 animaux

2 sites digestifs (intestin grêle, caeca / fientes intestinales, caecales)

→ 1 000 échantillons

Expérimentation animale (Animaux conv / Lignées; sol / cage)

Extraction d'ADN : 5 k€

Transport échantillon, matériel (plaques)

PCR, Pyroséquencage : 70 k€ ... (8 k€ !!!)

Bioinformatique (CDD IE 6 mois, fonctionnement) : 20k€

Biostatistique (CDD IE 6 mois, fonctionnement) : 20k€

Technique  
en pleine  
évolution

→ (55)-120 k€



# Analyse métagénomique du microbiote digestif

## $\Sigma$ gènes du microbiote

Travaux chez l'Homme : MetaHIT  
Travaux chez le porc : SusFlora

Chez l'oiseau d'élevage

Danzeisen et al. (2011)

Effet du monensin (110 g/t) sur le métagénome caecal

Enrichissement dans les

Gènes impliqués dans des systèmes de transport

Gène de type I de fimbriae (pili) (Gram Neg)

Gènes de système de sécrétion de conjugués de type IV  
(système de transfert de plasmide)

Analyse d'1 pool de 10 contenus caecaux

# Concept de départ

## MICROBIOTE IDÉAL

Microbiote conduisant à un phénotype optimal de l'animal

(Ex : Performances de croissance; Adaptabilité de l'animal ('Robustesse') ...)

Facteurs  
alimentaires



Microbiote A



Performance A

Microbiote B



Performance B

>

MICROBIOTE IDÉAL ?

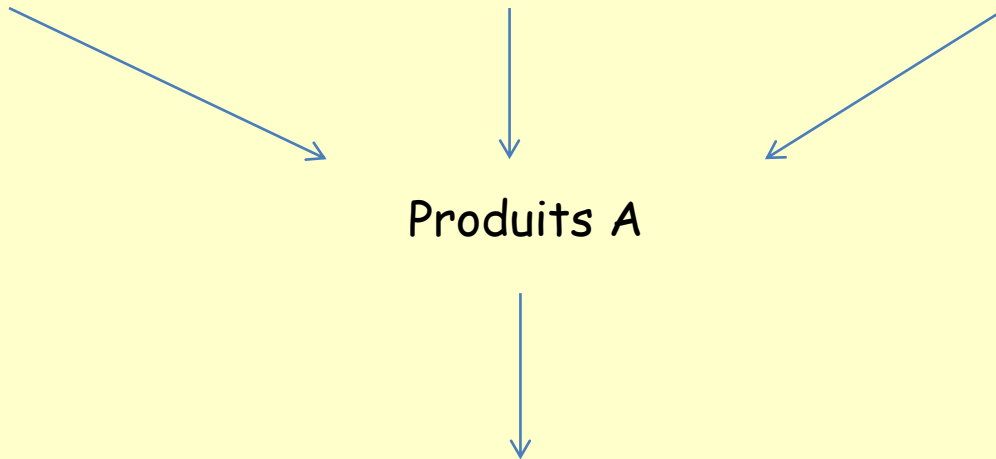
## Complexité du microbiote (1)

Redondance fonctionnelle

Microbiote A1

Microbiote Ai

Microbiote An



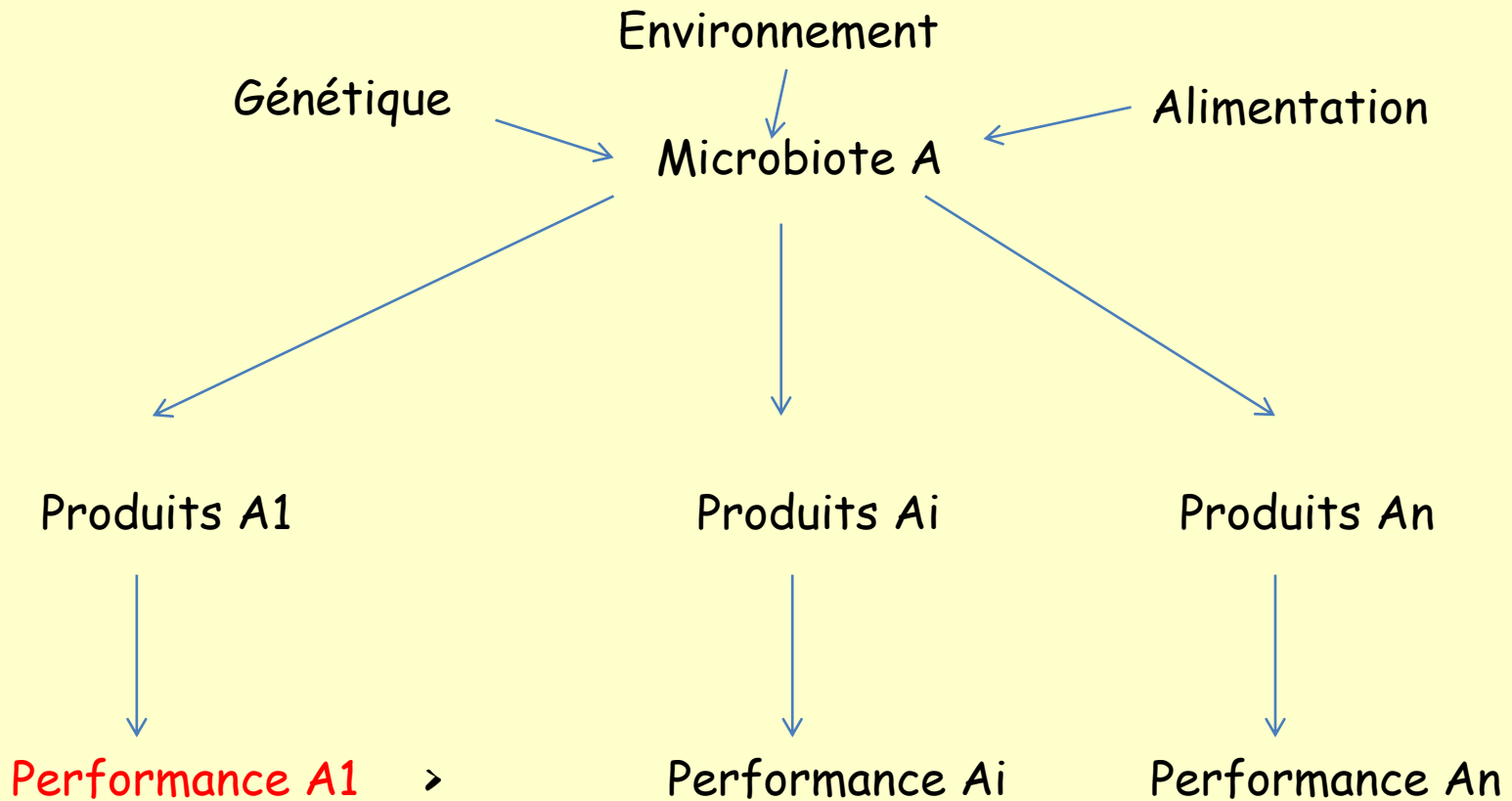
Performance A



**Pas un seul 'microbiote idéal'**

Homme : l'unicité du microbiote de chaque individu en particulier au niveau des espèces et des souches (Holmes et al, 2012)

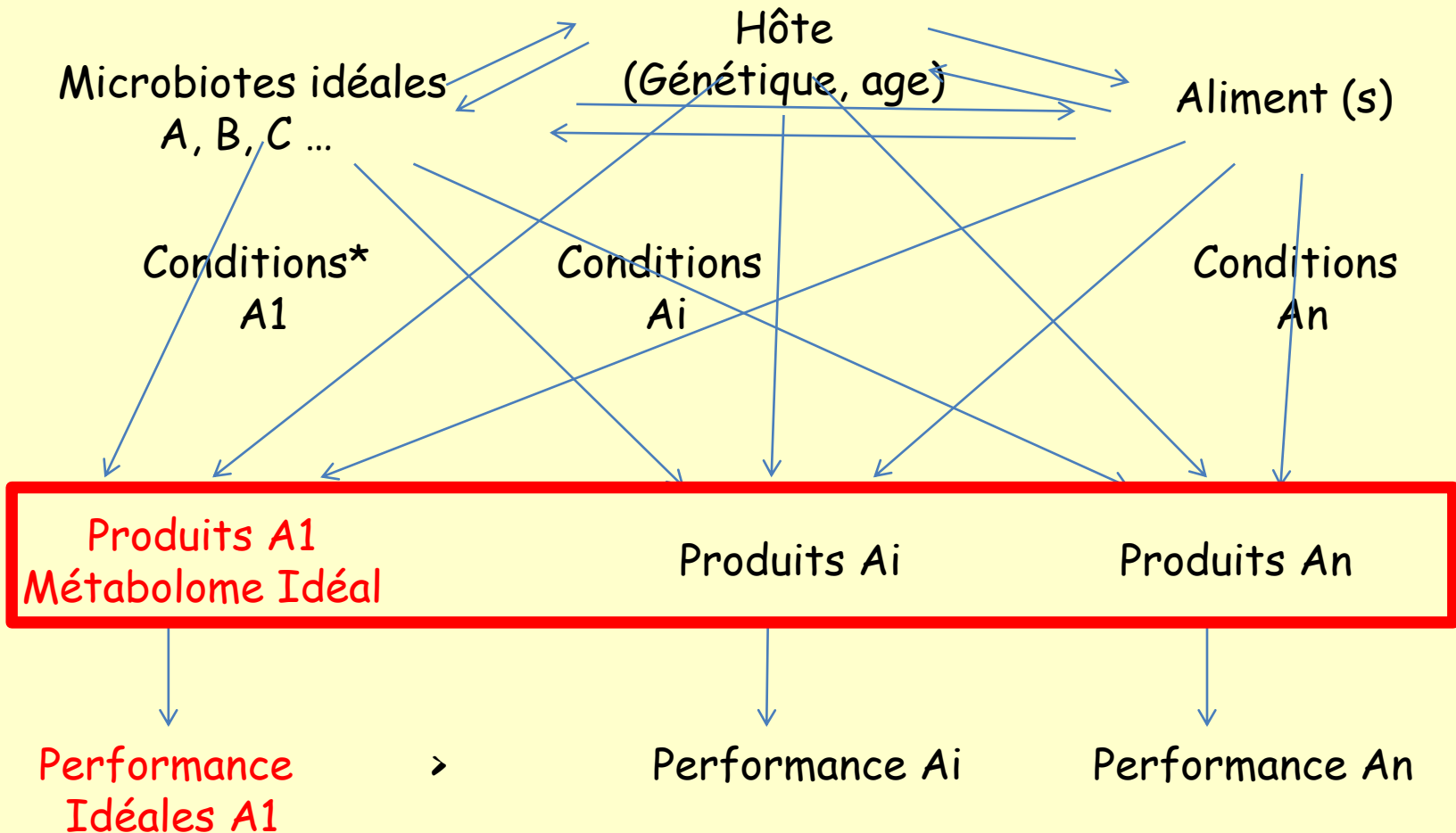
## Complexité du microbiote (2)



Un même microbiote digestif peut conduire à un phénotype de l'hôte différent en fonction de facteurs extérieurs

Exemple :

## Complexité du microbiote (3)



\* Dont l'interaction entre les microorganismes

➡ Le lien entre l'Hôte / Microbiote / Aliment et les performances se fait avec les produits du microbiote + Hôte + aliment (métabolites) et non pas la description du microbiote

# Métabolomique par RMN $^1\text{H}$

La métabolomique complète les trois grands niveaux d'analyse moléculaire du vivant que sont la génomique, la protéomique et la transcriptomique.

Elle consiste en l'analyse globale du métabolisme à l'échelle d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme.

Fiehn, 2001

L'analyse du métabolome et de ses variations est un outil puissant pour révéler et caractériser la réponse globale des organismes vivants qui réagissent souvent de manière imprévisible à des stimuli internes ou externes provoquant ainsi des maladies ou des dommages.

La métabolomique consiste à identifier et à quantifier de petites molécules appelées métabolites.

Nicholson, 1999

# Procédure expérimentale (1)

Analyses RMN  $^1\text{H}$  réalisées sur un spectromètre 500 MHz avec cryosonde (Bruker)

Minimisation du nombre d'étapes : limitation des biais analytiques

Expérimentation animale (Elevage)

Prélèvement des échantillons (Surnageant de contenus digestifs)

- Congélation immédiate dans l' $\text{N}_2$  liquide
- Transport au laboratoire
- Conservation à  $-80^\circ\text{C}$

Double extraction des échantillons

- Peser
- Ajout Tp phosphate + TSP (étalon interne qui permet la calibration du spectre à 0 ppm)
- Cycle congélation/décongélation \*3
- Cycle sonication-vortex-pause \*10
- Centrifugation (13 000 rpm , 10 min)
- Filtration des surnageants à  $0,2 \mu\text{m}$
- Mesure du pH
- Stockage à  $-20^\circ\text{C}$

Acquisition des données RMN

- Décongélation
- Analyse RMN (<1h30) (séquence NOESYPR1D)



# Principe de la méthode (2)

## Analyse des données de RMN

### Attribution des signaux RMN

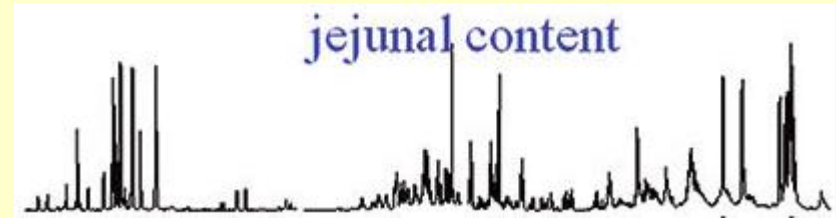
### Pré-processing des spectres

Traitement des spectres

Bucketing : Segmentation en régions consécutives (pas fixe ou aléatoire) et non-chevauchantes)

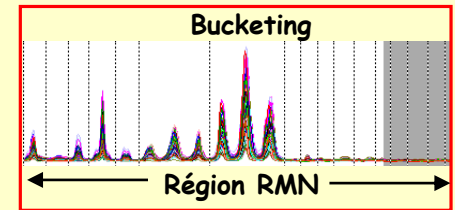
### Pré-traitement

Intégration et normalisation des données



(Tian et al, 2012)

### Pré-processing



## Analyses statistiques

### - Approche multivariée non supervisée (sans a priori)

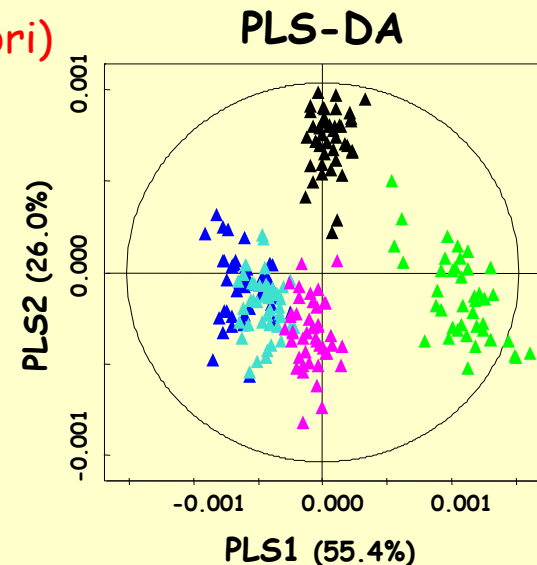
Analyse par composante principale (ACP)

### - Approche multivariée supervisée (identification de biomarqueurs)

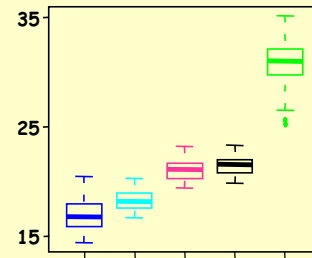
Analyse Discriminante par la méthode de régression des moindres carrés (PLS-DA)

### - Approche univariée supervisée

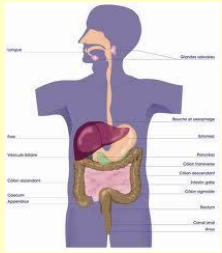
Test de Welch, boxplots, ANOVA



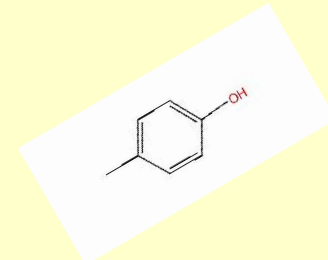
### Boxplot Créatine







# Chez l'Homme



Métabolites discriminantes  
des individus sains et  
des individus affectés par des troubles digestifs

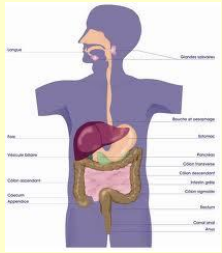
## Inflammatory Bowel Diseases (IBD)

Group of **inflammatory conditions** of the colon and small intestine. The disease is characterized by **infiltration of inflammatory cells** into the mucosa of the digestive tract. Human IBD is a chronic relapsing/remitting inflammatory condition of unknown origin.

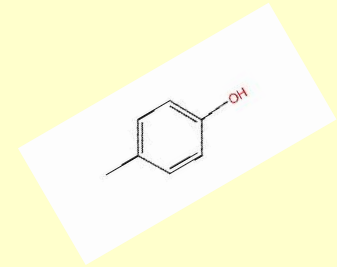
IBD is an emerging disease and the incidence amounts to **2/10 000** in Europe and North America.

There is a link with the social and economic development of the countries: the increase in IBD was first seen in northern Europe and North America, followed by the rest of Europe, Japan, South America and certain parts of Asia (Cohen, 2000; Ouyang et al., 2005).

Causes severe watery and bloody **diarrhoea**, and **abdominal pain**. IBD is often debilitating and is characterized by onset at a young age and extra-intestinal manifestations



# Chez l'Homme



Métabolites discriminantes  
des individus sains et  
des individus affectés par des troubles digestifs

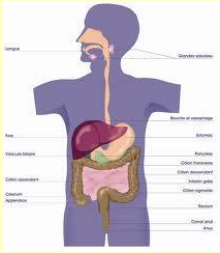
## Inflammatory Bowel Diseases (IBD)

**Crohn's disease** (Iléon ou colon):

Discontinuous inflammation in any part of the digestive system (primarily the **ileum** of the Small Intestine and/or the colon) that extends **deeply into the layers of the intestine wall**. Most commonly CD affects the last part of the Small Intestine (terminal ileum) and parts of the large intestine.

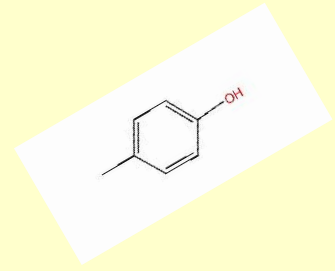
**Ulcerative colitis** (colon):

Continuous **superficial mucosal inflammation** almost exclusively restricted to the colon



# Chez l'Homme

Métabolites discriminantes  
des individus sains et  
des individus affectés par des troubles digestifs



## Inflammatory Bowel Diseases (IBD)

### ≠ Irritable bowel syndrome (IBS)

Irritable bowel syndrome (IBS, or spastic colon) is a symptom-based diagnosis characterized by **chronic abdominal pain, discomfort, bloating, and alteration of bowel habits.**

As a **functional** bowel disorder, IBS has no known organic cause. Diarrhea or constipation may predominate, or they may alternate (classified as IBS-D, IBS-C or IBS-A, respectively).

Serait lié à l'alimentation, stress, gastro-entérite et sédentarité

10% de la population mondiale (Drossman et al, 2002)

20% des consultations en gastroenterologie (UK, Jones et al, 2000)



**Nécessité de marqueurs pour le diagnostique**

## PROPOSITION : INVENTAIRE / CATALOGUE DES MÉTABOLITES

Poulet de chair en conditions d'élevage variées et performances variées (age fixe)

Animal : Génétique

Conditions d'élevage

Bâtiment ...

Alimentation

...

Caractérisation phénotypique :

Etat de santé global (Diagnostic vétérinaire)

Etat de santé digestif (Ex : Score de 1 à 10)

Poids vif

Caractérisation métabolique (prelev invasif ou non invasif)

### Analyses statistiques multivariées

→ Relation entre Environnement / Phénotype / Métabolites digestifs

Noyau commun de métabolites

Métabolites liés à des états physiologiques spécifiques

Utilisation de la voie alimentaire pour orienter vers l'état physiologique recherché

# Evaluation des coûts analytiques

RMN : Pour 1 000 ech  
70 k€

Biostatistique (CDD) : 20k€

# Métabolites digestifs volatils

## Pathologies systémiques

**Shirasu M**, Touhara K., 2011. The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *J Biochem.* 2011 Sep;150(3):257-66.

Changement de compositions des COV fécaux associés à des **troubles digestifs**

Patients with intestinal diseases often report that the odour of their faeces is abnormal and unpleasant during disease relapse

**Garner CE**, Smith S dLCB, White P, Spencer R, Probert CS, Ratcliffe NM. 2007. **Volatile organic compounds** from **feces** and their potential for **diagnosis of gastrointestinal disease**. *FASEB J* 2007 Jun;21(8):1675-88 Epub 2007 Feb 21.

**Dixon E**, Clubb C, Pittman S, Ammann L, Rasheed Z, Kazmi N, Keshavarzian A, Gillevet P, Rangwala H, Couch RD. 2011. Solid-phase microextraction and the human fecal VOC metabolome. *PLoS One* 6:e18471.

**Probert CS.**, 2011. Role of faecal gas analysis for the diagnosis of **IBD**. *Biochem Soc Trans.* 2011 Aug;39(4):1079-80.

**Ahmed I**, Greenwood R, Costello Bde L, Ratcliffe NM, Probert CS., 2013. An investigation of fecal volatile organic metabolites in **irritable bowel syndrome**. *PLoS One.* 8(3):e58204.

# Métabolites digestifs volatils

Chez l'oiseau

Garner CE, Smith S, Elviss NC, Humphrey TJ, White P, Ratcliffe NM, Probert CS. 2008. Identification of Campylobacter infection in chickens from volatile faecal emissions. Biomarkers 13:413-421.

## Méthodes

Extraction avec des fibres SPME (CAR/PDMS) ('headspace')

Extraction non quantitative → Présence / Absence

GC-MS

# Métabolites digestifs volatils

Chez l'oiseau

Garner CE, Smith S, Elviss NC, Humphrey TJ, White P, Ratcliffe NM, Probert CS. 2008. Identification of Campylobacter infection in chickens from volatile faecal emissions. Biomarkers 13:413-421.

## Résultats

Identification de 125 COV (3 élevages, 71 échantillons)

Dans chaque élevage, A, B et C : 31, 33 et 43 COV en moyenne  
COV spécifiques d'élevage

Parmi les COV non spécifique d'élevage :

5 COV + important chez les animaux Campylobacter +

24 COV - important chez les animaux Campylobacter +

Pas de COV présents uniquement chez les Campylobacter + ou -

Analyse discriminante

→ 6 COV permettent de prédire la présence ou absence de Campylobacter



# Métabolites digestifs volatils

**Avantages**    Sensibilité

**Inconvénients**    Choix à priori (Chromatographie)  
                          Certains métabolites non détectable (Ex : CH<sub>4</sub>)  
                          Pas de quantification

**Coûts** : Projet GISA Whelp (Univ de Chimie de Pierre et Marie Curie à Paris)

700-800 € / ech    Technique couteuse

# Métabolites volatils exhalés

Reflet de la circulation systémique

Détection de pathologie systémique  
Désordre métabolique

Représentatif de la santé digestive (SARDI; R.J. Hughes)

'Casque' à poulet

Limite

Contribution des bactéries de la bouche et de la langue  
(Khalid et al, 2013)