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

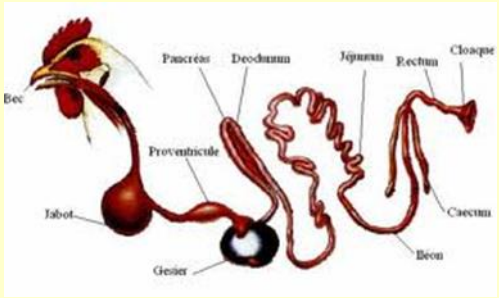
Irène Gabriel (URA)
Isabelle Bouvarel (ITAVI)
Christine Leterrier (UMR-PRC)

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

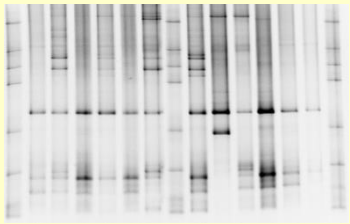
Ensemble des produits bactériens

Composition du microbiote digestif bactérien

MÉTHODE PAR CULTURE : Comptages

Aérobies / anaérobies

Non cultivable (70-90%)



MÉTHODES MOLÉCULAIRES

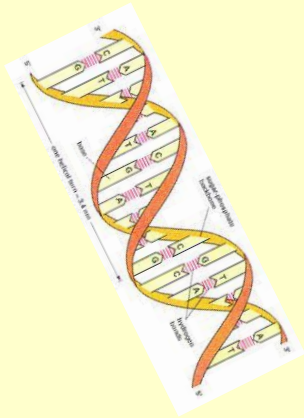
Empreintes moléculaires : TTGE, DGGE, RFLP, CE-SSCP … (1 à 0,1%)

Quantification de groupes ciblés (qPCR, FISH, …)

Clonage / séquençage Méthode Sanger

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

Composition détaillée



Pyroséquençage de régions de d'ADNr 16S

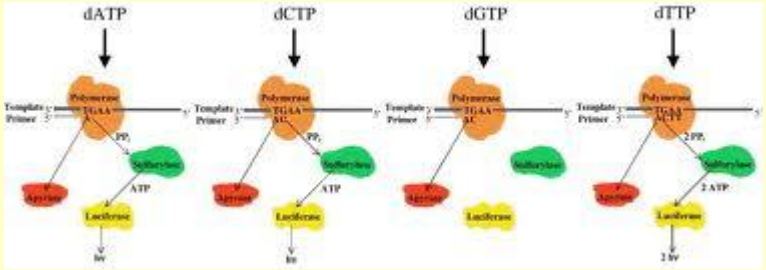
➡ Identification de familles … genres … espèces

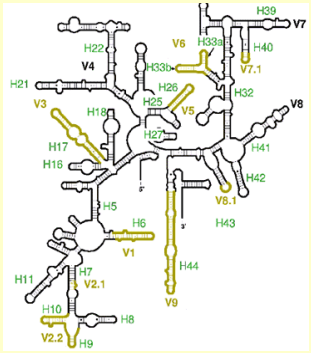
5S

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

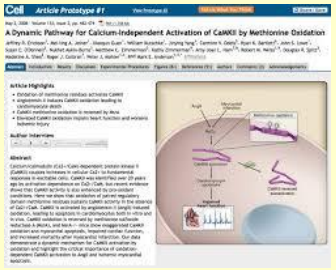
Analyses bio-informatiques

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
Proteobacteria (3)	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
			Betaproteopacteria			Burkholderiales	Comamonadaceae	x 37	
			Epsilonproteobacteria	+		Campylobacterales	Campylobacteraceae (5)	x 189.4	
Firmicutes	26.17 %	36.23 %	Bacilli	+					
			Clostridia		+	Clostridiales	Incertae Sedis XIII	x 14	
							Ruminococcaceae		x 17.7
Bacteroidetes	18.62 %	11.66 %	Flavobacteria	+		Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	x 94.3	
			Bacteroidia			Bacteroidales	Prevotellaceae		x 16
							Rikenellaceae		x 13
Fusobacteria	6.78%	0.46%	Fusobacteria	+		Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	x 11.4	
Synergistetes	0.05%	1.38%	Synergistia			Synergistales	Synergistaceae		x 37.3
Lentisphaerae	0.01%	0.08%	Lentisphaeria			Victivallales	Victivallaceae		x 17
unclassified bacteria (1)	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)

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

Traitements biostatistiques

URA : Christelle Hennequet

* AGENAE, AGENAVI

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

∑ 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%
Archées	0,4%	2,1%
Eucaryotes	4,2%	0,5%
Virus	3,8%	0,3%

Parmis les séquences assignées (50%)

Effet sur l'hôte ?

GÉNÉTIQUE

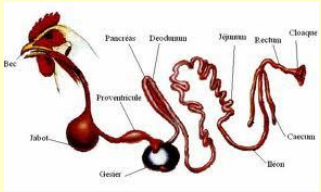
ENVIRONNEMENT

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

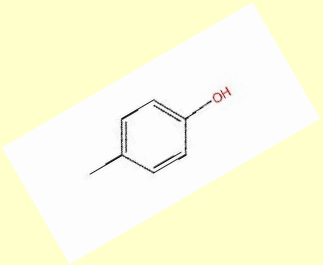
Métabolites totaux ou volatils

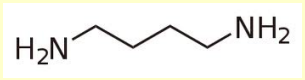
Métabolites 'marqueurs' d'états physiologiques

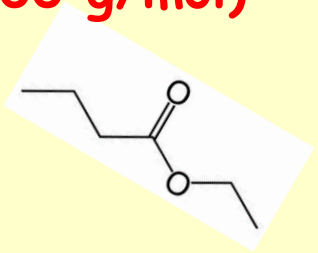
Fonctionnement digestif

Analyse des métabolites digestifs

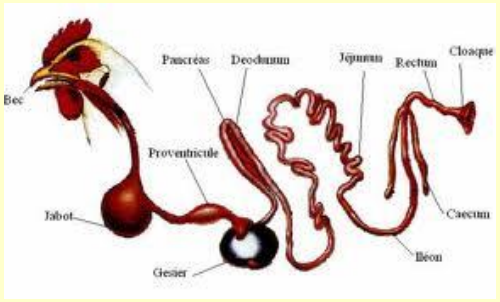
Métabolites digestifs (PM < 1 000 g/mol)







Métabolites digestifs (PM < 1 000 g/mol)



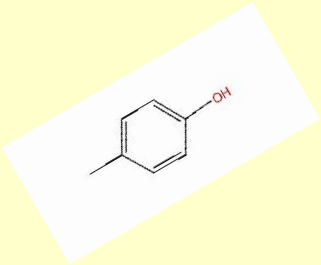
MP et les produits de leur digestion
Produits bactériens ± modifiés par la digestion
Produits endogènes ± modifiés par la digestion

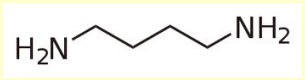
FONCTIONNEMENT DIGESTIF

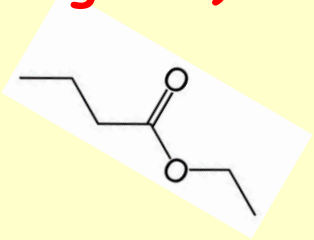
Fonctionnement global

Analyse des métabolites sanguins

Métabolites sanguins (PM < 1 000 g/mol)



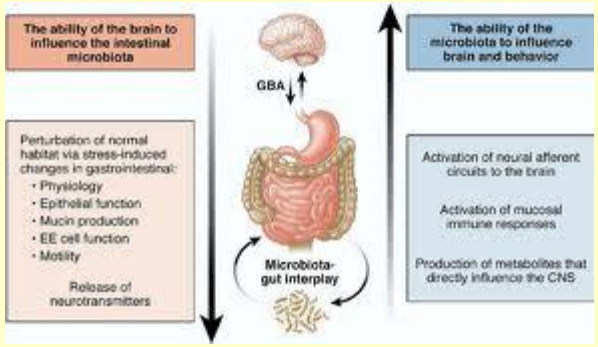




Métabolites sanguins (PM < 1 000 g/mol)

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

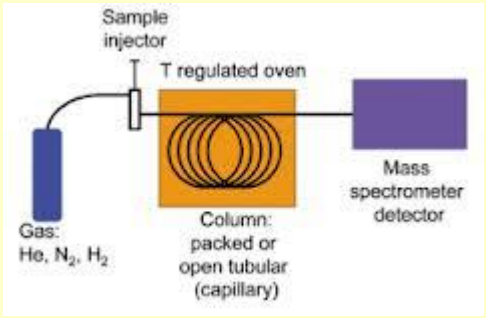
(1) Chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

(2) Spectroscopie de Résonnance 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 Résonnance Magnétique Nucléaire ^{1}H

Principe

RMN : Propriété de certains noyaux atomiques possédant un spin nucléaire (par exemple 1H, 13C, 19F, 31P, 129Xe…), 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.

(Beckornet, 2007)

Résonnance Magnétique Nucléaire

AVANTAGES

Préparation minimale de l'échantillon (biais analytiques minimisés)

Pas d'apriori (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 µM
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}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'N_2 liquide
- Conservation à -80°C

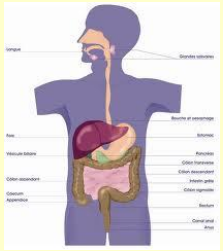
ETAPES POUR L'ANALYSE PAR RMN

Extraction des échantillons (Wu et al, 2010)

Acquisition des données RMN

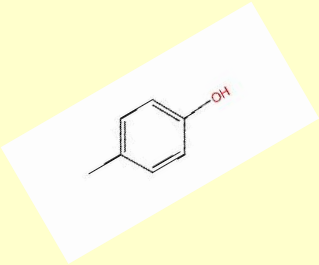
Analyses des données de RMN

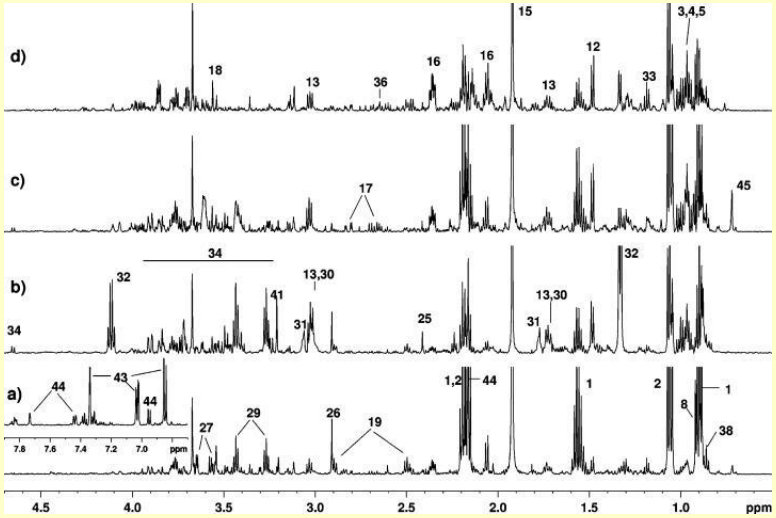
Analyses statistiques



Chez l'Homme

Le Gall et al (2011)



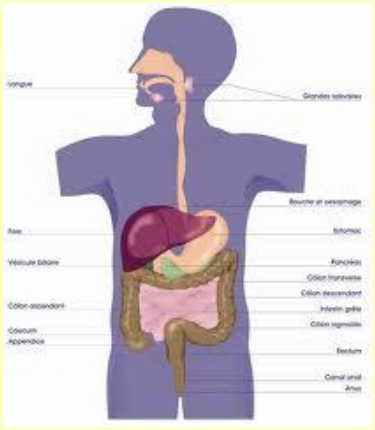


Typical 600 MHz 1H NMR spectra of aqueous fecal extracts from
(a) UC patient (inset shows aromatic region with drug and drug metabolite signals present in UC spectra)
(b) UC high lactate sample
(c) IBS patient
(d) control

Acides gras à courte chaine, AGCC
Dérivés phénoliques d' AGCC
Di-acide (glutarate)
Cétone d'acide
Acides aminés
Dérivé d'acides aminés
Monoamine
Diamine (putréscine, 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

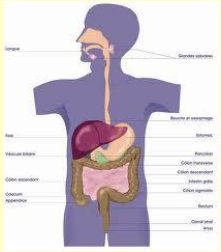
Dysbiosis
chez le poulet



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)

Féces : Calprotectin, Lactoferrin (Van Assche 2011)

Non spécifique de l'IBD

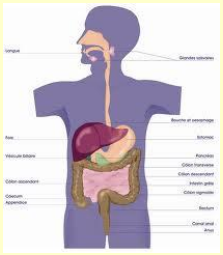
Marqueurs métabolomiques

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

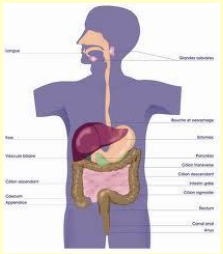
Métabol Augm : Ala, Ile, Leu, Lys, Val
Glycérol

Métabol Baisse Acétate,
Butyrate
Méthylamine
Trimethylamine

Williams et al, 2009 : Urine

Métabol Augm Gly
Formate
Glycolate
Guanidoacetate
Methylhistidine

Métabol Baisse 4-cresol
sulfate
Citrate
Hippurate

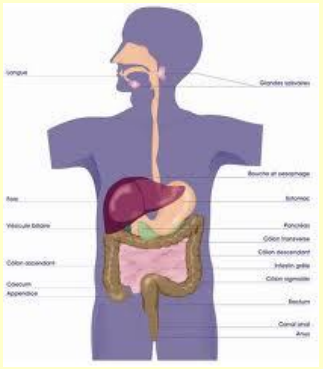


IBD en humaine
(Inflammatory Bowel Diseases)

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)

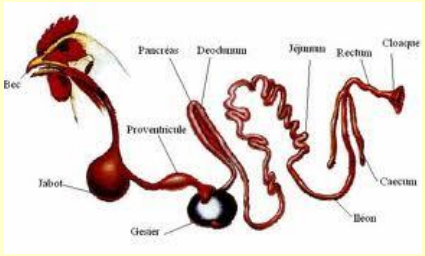
→ Origine biologique de ces marqueurs biologiques

→ 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 (≠ féces)
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

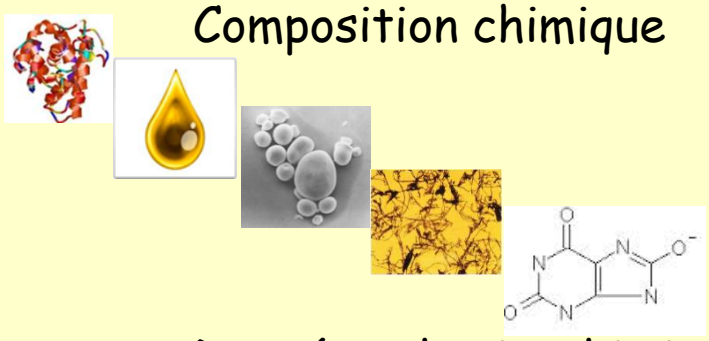
Jabot, Intestin grêle, Caeca

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

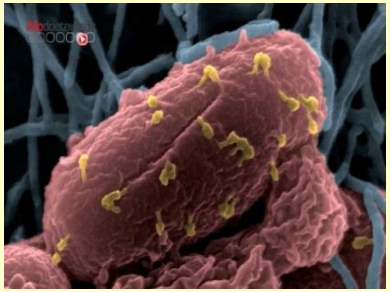
Source de nutriments
Milieu de vie

Séparation des cellules bactériennes et de leur biotope

Composition chimique

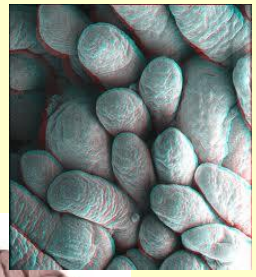


Protéines
Lipides
Amidon
Autres glucides (Fibres)
Acide urique



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)

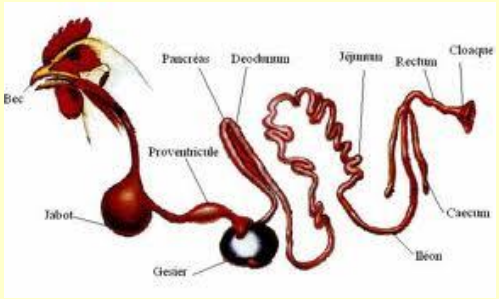
- Régulation de l'absorption des lipides au niveau des entérocytes
- Participation à la régulation de la sécrétion de bicarbonate et du pH de surface au niveau du duodénum
- Limite le passage transépithélial bactérien
- Contrôle l'inflammation induite par des endotoxines bactériennes par déphosphorylation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

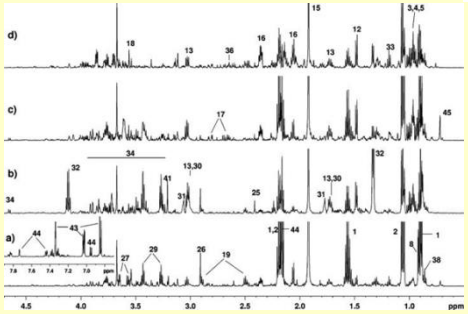
Enzymes impliquées dans l'étape finale de la digestion

Protéines (aminopeptidase)
Glucides (dissaccharidase)

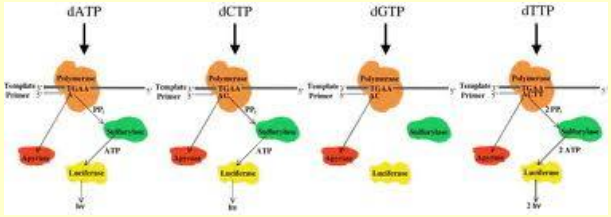
MERCI DE VOTRE ATTENTION

Fonctionnement digestif





Biotopes digestifs



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

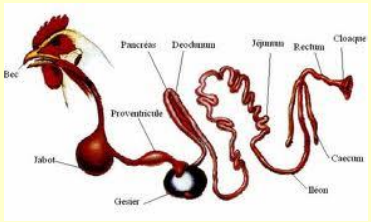
Recherche

Noyau commun ('core ')

Marqueurs

Idéal / Optimal pour l'animal

Oiseaux



Intestin Grêle (1h) →

- Fines particules et liquide → Caeca (Sacs 'aveugles') (8-24h) (Vidange = f(éclairage))
- Moyenne et grosses particules → Rectum (30 min)

→ Féces

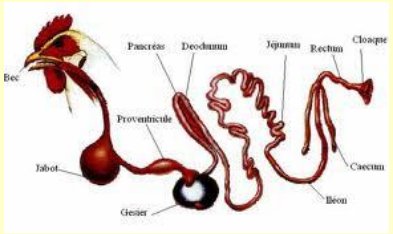
Féces : Contenus d'iléon + contenus de caeca 10 à 100 fois plus concentrés en bactéries, avant passage dans le rectum (30 min)

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 féces / 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)

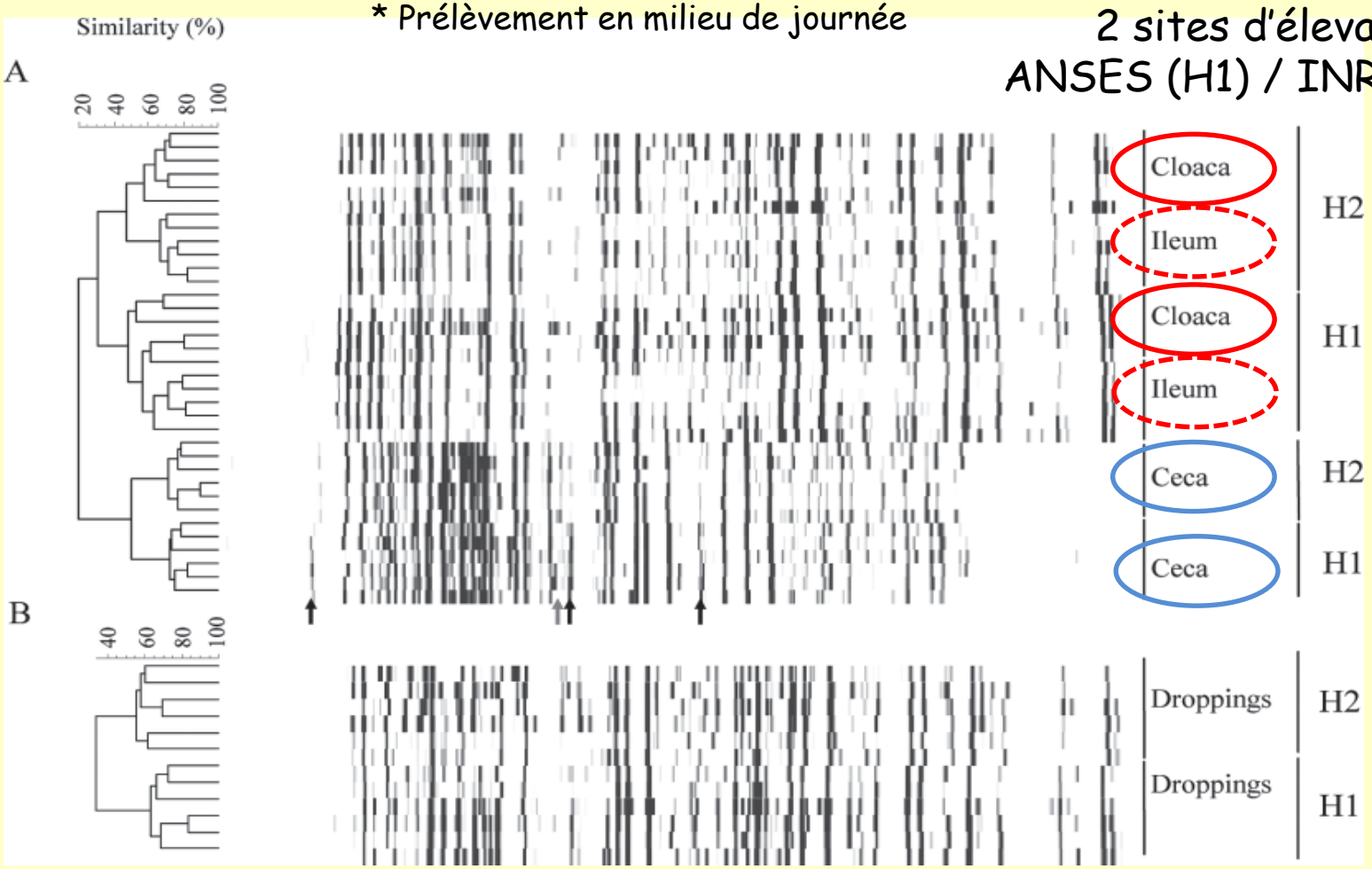
Similitudes des microbiotes de l'iléon et du cloaque* (≠ caeca)

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

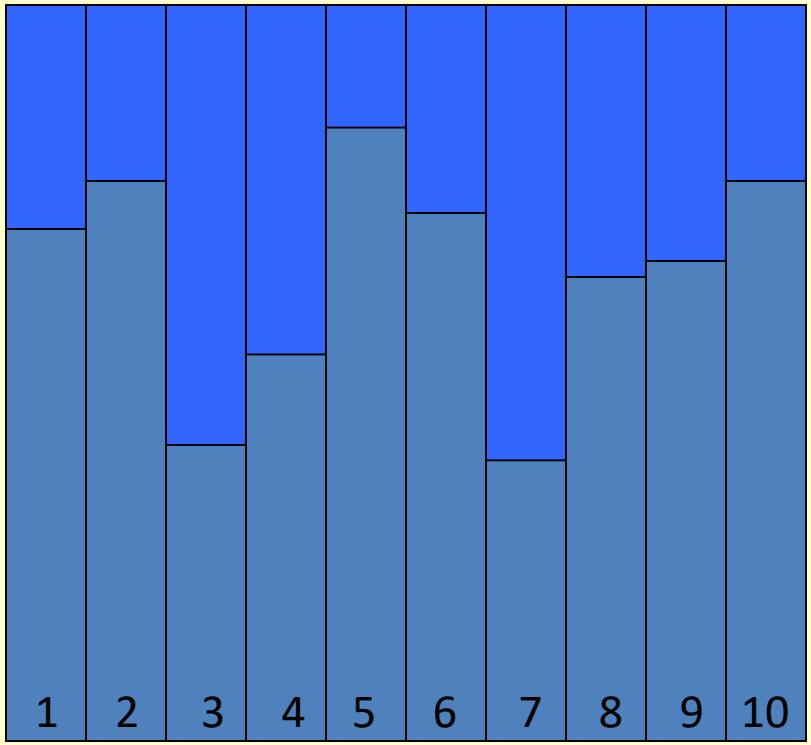
Région variable de l'ADN 16S : non optimale, V3-V4
PCR
Séquençage du 16S : 454 (MiSeq)
Analyses bioinformatiques
Analyses biostatistiques

Methods of DNA extraction

Bacterial DNA extracted

Bacterial DNA not extracted

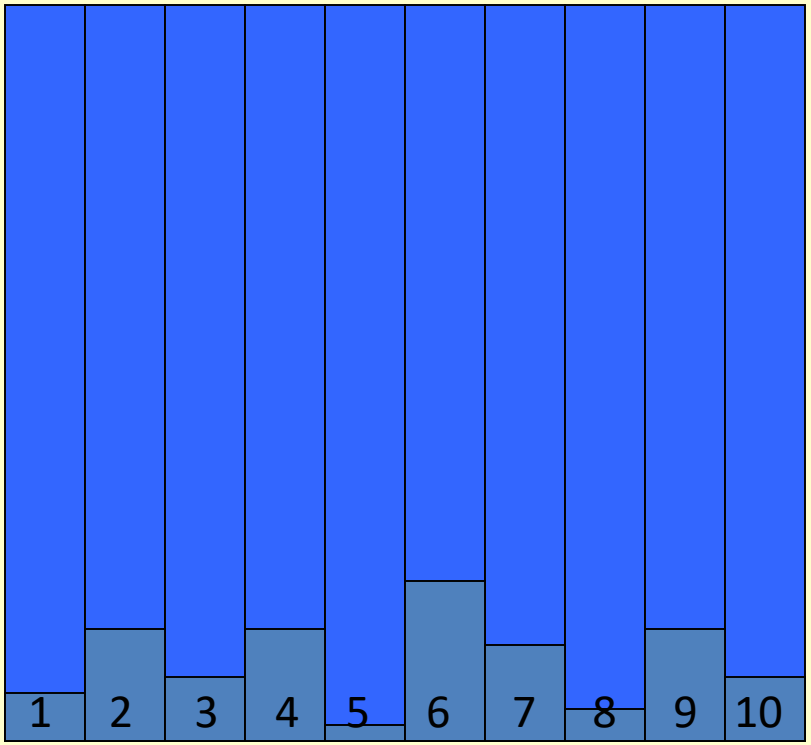
Method 1



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%

Identification de 8 OTU (non précisés)

Apajalahti et al (2012) : Performance-linked Microbial Index (PMI)

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

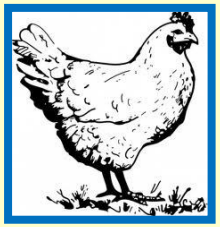
Zhao et al (2013)
Singh et al (2013)
Nakphaichit et al (2011)

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
Σ 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 (pilli) (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

>

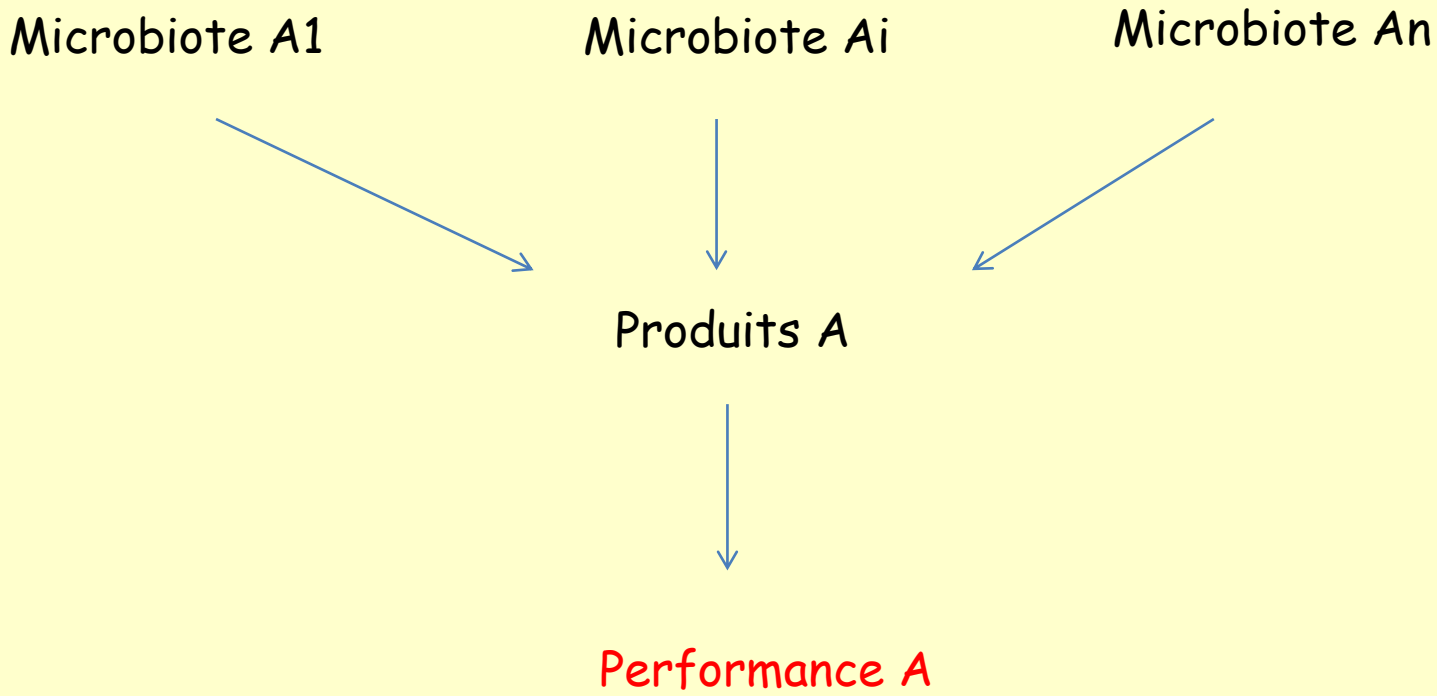
Microbiote B

Performance B

MICROBIOTE IDÉAL ?

Complexité du microbiote (1)

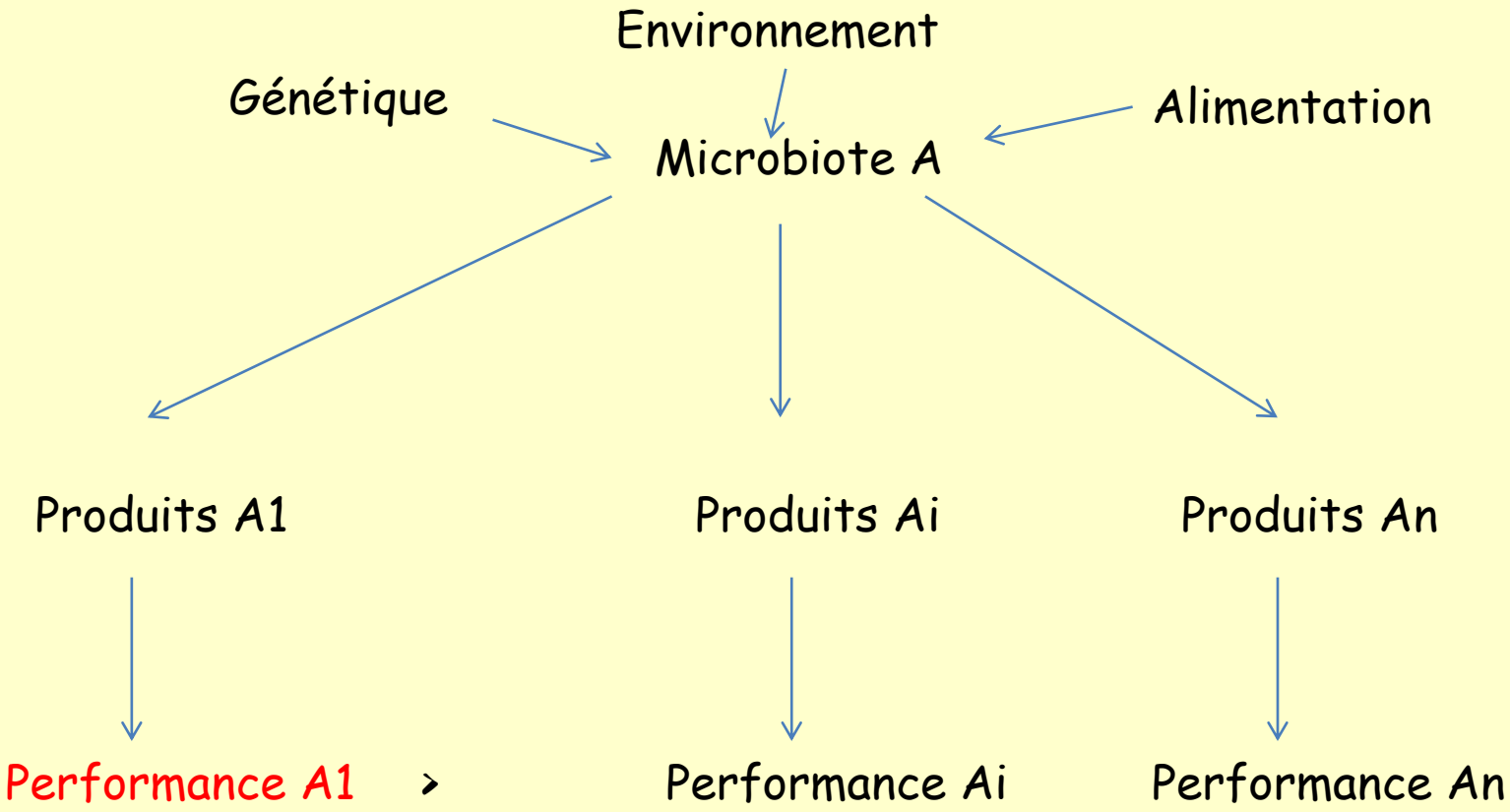
Redondance fonctionnelle



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)

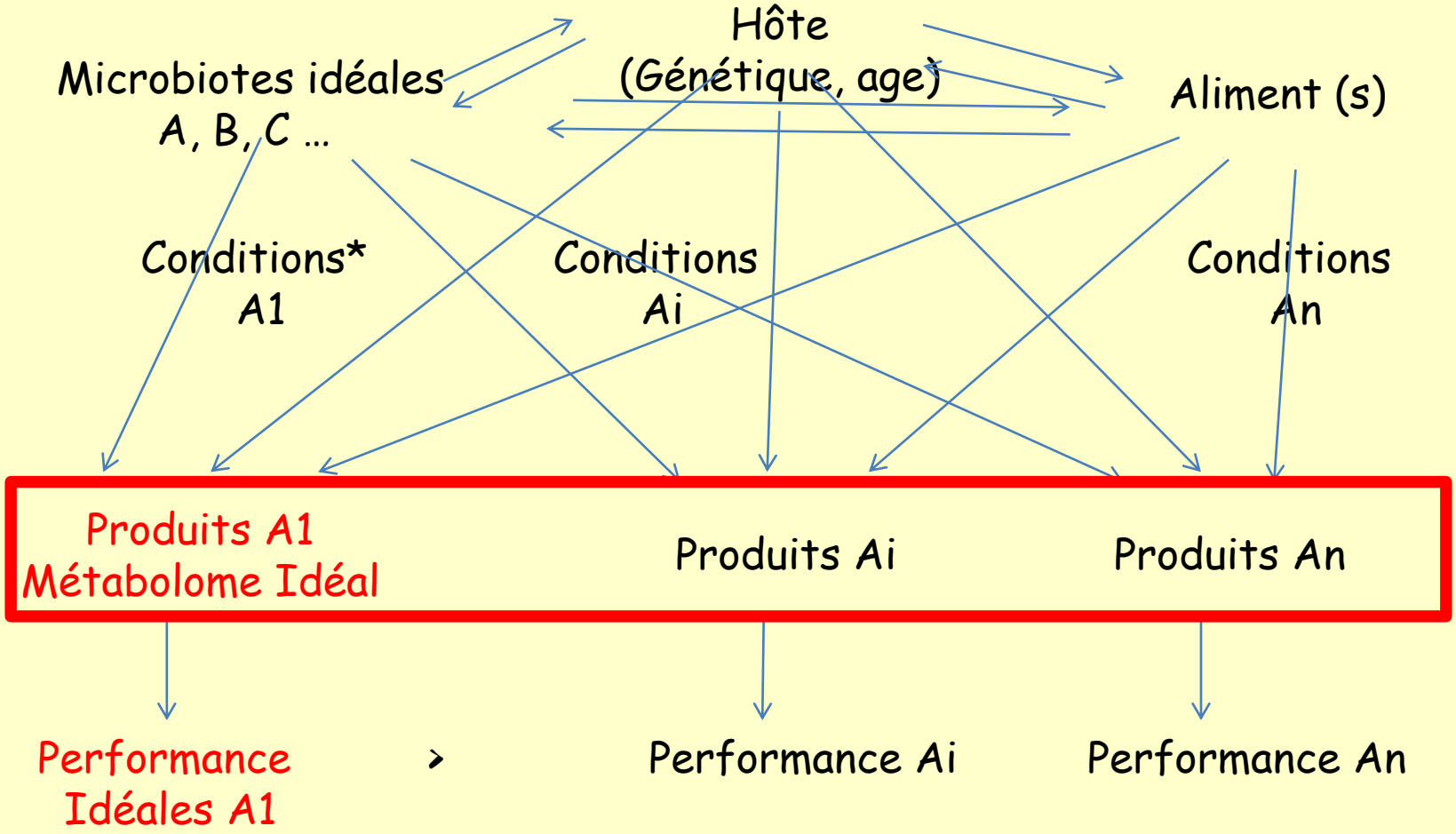
Complexité du microbiote (2)



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 + Hote + aliment (métabolites)
et non pas la description du microbiote

Métabolomique par RMN ^{1}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 ^1H 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'N_2 liquide
- Transport au laboratoire
- Conservation à -80°C

Double extraction des échantillons

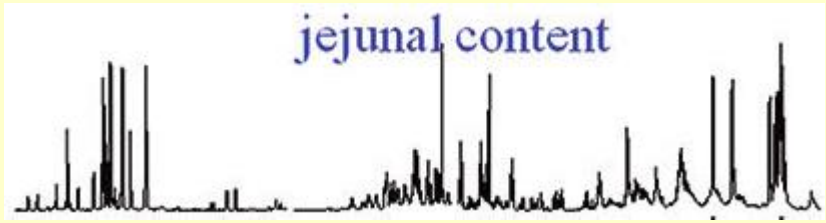
- Peser
- Ajout Tp phospate + TSP (étalon interne qui permet la calibration du spectre à 0 ppm)
- Cycle congélation/décongélation *3
- Cycle sonication-vortex-pause *10
- Centrifugation (13 000 rpm , 10 min)
- Filtration des surnageants à 0,2 µm
- Mesure du pH
- Stockage à -20°C

Acquisition des données RMN

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

Principe de la méthode (2)

Analyse des données de RMN



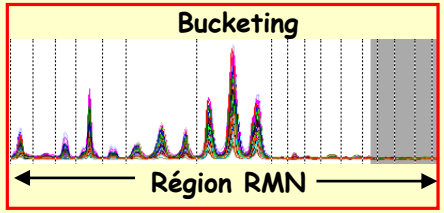
(Tian et al, 2012)

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

Pré-processing



Analyses statistiques

- Approche multivariée non supervisée (sans a priori)

  Analyse par composante principale (ACP)

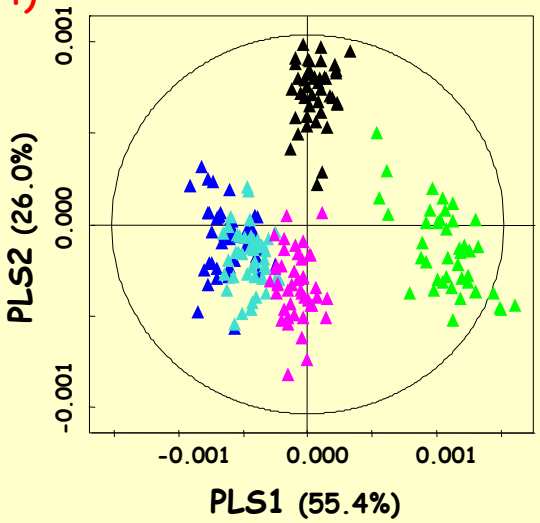
- Approche multivariée supervisée (identification de biomarqueurs)

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

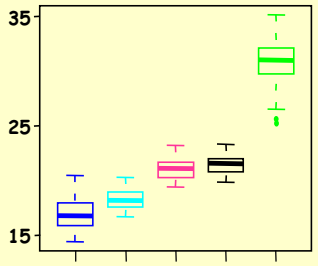
- Approche univariée supervisée

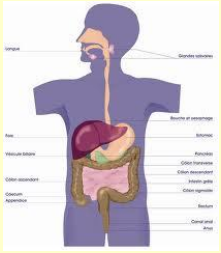
  Test de Welch, boxplots, ANOVA

PLS-DA

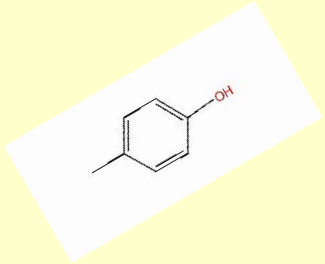


Boxplot Créatine





Chez l'Homme



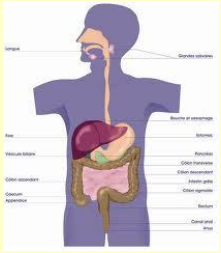
Métabolites discriminantes des individus sains et des individus affectés par des troubles digestifs

Inflammatory Bowel Diseases (IBD)

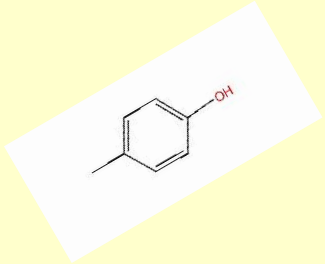
Group of inflammatory conditions of the colon and small intestine. The disease is characterized by infiltration of inflammatory cells into the mucosa of the digestive tract. Human IBD is a chronic relapsing/remitting inflammatory condition of unknown origin.

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

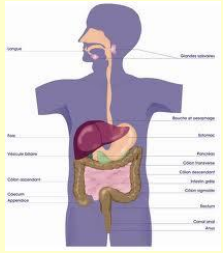
Inflammatory Bowel Diseases (IBD)

Crohn's disease (Iléon ou colon):

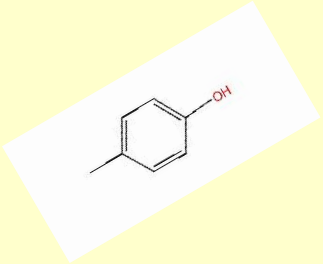
Discontinuous inflammation in any part of the digestive system (primarily the ileum of the Small Intestine and/or the colon) that extends deeply into the layers of the intestine wall. Most commonly CD affects the last part of the Small Intestine (terminal ileum) and parts of the large intestine.

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 fix

Animal : Génétique

Conditions d'élevage

Bâtiment …
Alimentation
…

Caractérisation phénotypique :

Etat de santé global (Diagnostique 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 recherch

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

Parmis 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 : CH4)
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)