

IMPLANTATION DU MICROBIOTE INTESTINAL DANS L'ILEON ET LES CECA DES CANETONS BARBARIE, PEKIN ET MULARD PAR SEQUENÇAGE MISEQ

Rey Mikael ¹, Brugirard-Ricaud Karine ¹, Bernadet Marie-Dominique ²,
Pascal Géraldine ^{3,4,5}, Combes Sylvie ^{3,4,5}, Cauquil Laurent ^{3,4,5}, Bouchez Olivier ⁶
et Davail Stéphane ¹

¹ IPREM-EEM, Université de Pau, IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, F-40004 Mont de Marsan

² INRA, UE89, UEPFG d'Artiguères, F-40280 Benquet

³ INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁴ Université de Toulouse INPT-ENSAT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁵ Université de Toulouse INPT-ENVT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage, F-31076 Toulouse, France

⁶ GeT-PlaGe, Genotoul, INRA Auzeville, F-31326 Castanet-Tolosan, France

mikael.rey@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

Chez les êtres vivants, le microbiote intestinal joue un rôle essentiel et s'implante au cours de la croissance. Chez le canard, cette implantation est peu connue. Il a donc été étudié l'implantation du microbiote dans l'iléon et les caeca chez deux types génétiques parentaux *Anas platyrhynchos* (Pékin) et *Cairina moschata* (Barbarie) et leur hybride stérile, le canard mulard. Cette étude a été réalisée pendant les phases de démarrage, de croissance et finition. Les contenu digestifs de 5 canetons par type génétique ont été prélevés post-mortem les jours 2, 3, 5, 12, 15, 30, 36, 50 et 60. Les analyses ont été réalisées par séquençage Miseq sur le gène codant l'ARN 16S. Il a été démontré que les phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria* et *Bacteroidetes* sont majoritaires dans l'iléon et les caeca chez le caneton en croissance. L'implantation du microbiote est séquentielle au niveau des deux segments intestinaux étudiés et évolue avec l'âge au niveau des phyla bactérien mais aussi en fonction de l'alimentation. De plus, un effet génétique a été observé dans l'implantation des *Firmicutes*, uniquement dans l'iléon.

ABSTRACT

Implantation of ileal and cecal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin), *Cairina moschata* (Muscovy) and mule ducklings using Miseq sequencing.

Microbiota plays an essential role in host health. To access the implantation of microbiota in Pekin, Muscovy and mule ducklings, the ileum and ceca digestive contents of five animal by genetic type and days of growth (Day 2, 3, 5, 12, 15, 30, 36, 50 and 65) were studied. These analyses were performed by using Miseq sequencing of the gene coding for the 16S rRNA. *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroides* are the most dominant phyla in the different samples independently of genetic type. A sequential implantation is detected in both ileal and cecal digestive contents according to age and the type of food at the phyla level. Finally, a genetic effect was detected regarding *Firmicutes* phylum only in ileum.

INTRODUCTION

Chez les être vivants, la flore intestinale (microbiote) joue un rôle essentiel dans la physiologie et l'immunité de l'hôte. Le microbiote protège l'intégrité de la muqueuse intestinale (Ducluzeau, 1999) ou encore permet la dégradation et l'assimilation de certains composés non assimilables par l'hôte (Bernalier et al., 2002) ou empêche l'implantation de bactéries pathogènes (Ducluzeau et Raibaud, 1979). Chez le poulet, l'activité bactérienne est plus intense dans le jabot, les caeca et l'intestin grêle (Fuller, 1984). Par des techniques de microbiologie classique et de biologie moléculaire, des études ont montré que les trois fragments de l'intestin grêle ont une flore anaérobie facultative et les caeca une flore anaérobie stricte. Chez le canard mulard en élevage, du jabot à l'intestin grêle, la flore est pauvre en lactobacilles, plus riche en *Clostridium* spp. et *Bacteroides*. La flore caecale est plus importante (Gabriel et al., 2005 ; Brugirard-Ricaud et al., 2010).

Une étude récente (Vasai et al., 2014a ; Vasai et al., 2014b) par séquençage haut débit (454), a montré que dans l'iléon, les phyla majoritaires sont les *Firmicutes* (composés par les classes *Clostridia* et *Bacilli*), les *Bacteroidetes* (classe *Bacteroidia*) et les *Proteobacteria* (classe *Gammaproteobacteria*) chez les canards Pékin, Barbarie et mulard. Au niveau des caeca, les *Firmicutes* (*Clostridia*) et les *Bacteroidetes* (*Bacteroidia* et *Bacilli*) sont majoritaires. Les abondances des phyla ou des classes diffèrent en fonction du type génétique mais les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* restent les composants majoritaires du microbiote suggérant un rôle conservé au niveau métabolique (Ley et al., 2008 ; Kohl, 2012). De nombreux stress subis par les animaux comme un changement alimentaire (comme c'est le cas lors du gavage) peuvent entraîner une variation au sein du microbiote (Serino et al. 2011 ; Vasai et al., 2014a). De plus, il a été montré que chez le canard adulte, le canard mulard a un microbiote intestinal proche du canard Pékin au niveau des phyla mais se rapproche du canard Barbarie au niveau des classes (notamment avec la prédominance de *Clostridia*). Le canard mulard est intermédiaire entre les canards Pékin et Barbarie à la fois d'un point de vue physiologique (Baéza et al., 2005) et au niveau du microbiote intestinal (Vasai et al., 2014b).

Dans les caeca du poulet, à 4 jours d'âge, *Lactobacilli* représente 25% de la population bactérienne, *Salmonella* est majoritaire (40%), il n'y a pas de *Bifidobacterium*, peu de *Campylobacter* sont représentés (2%) et un tiers des bactéries sont représentées par *Escherichia coli* et *Clostridium*. A 14 jours d'âge, *Lactobacilli* et *Bifidobacterium* atteignent 40% des bactéries totales, *Salmonella* diminue pour atteindre 10% et *Campylobacter*, *E. coli* et *Clostridium* varient peu. A partir de 25 jours d'âge, la moitié de la population bactérienne est représentée par *Lactobacilli* et *Bifidobacterium*, *Salmonella* diminue

de 50% par rapport à son abondance à 4 jours d'âge, *Campylobacter* est faiblement représenté tandis que *E. coli* et *Clostridium* représentent 30% de la population bactérienne (Amit-Romach et al., 2004).

Les résultats observés jusqu'à présent concernent souvent le poulet (jeune ou adulte) ou le canard adulte. L'étude suivante vise donc à déterminer l'implantation du microbiote intestinal des canetons Pékin, mulard et Barbarie et de déterminer s'il existe un effet de la génétique sur cette implantation.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expérimentation animale

Les procédures expérimentales portant sur les canards étaient en conformité avec les lignes directrices nationales françaises pour le soin des animaux à des fins de recherche. Deux types génétiques, les canards mâles Barbarie (*Cairina moschata*) et Pékin (*Anas platyrhynchos*) et les canards mulards mâles, ont été élevés à la station expérimentale INRA d'Artiguères. De la naissance (jour 1) à 3 jours d'âge, les animaux sont alimentés *ad libitum* avec des granulés fournissant 2822 kcal/kg et un taux de MAT de 22.6 %; de 4 jours jusqu'à 4 semaines, les animaux ont été nourris *ad libitum* avec des granulés de 2 mm pour une alimentation fournissant 2753 kcal / kg et un taux de MAT de 17,5 %; suivi par une journée de transition (29 jours d'âge) avec un sixième de l'aliment précédent et cinq sixième de l'aliment suivant ; et de 5 à 12 semaines d'âge (de 36 à 65 jours), les canards ont été nourris avec des granulés de 4mm sur un régime restreint fournissant 2803 kcal / kg pour une MAT de 15 %. Les jours de prélèvements les animaux ont été pesés. Les contenus digestifs de 5 canards par type génétique ont été prélevés de la naissance (jour 1) et durant les deux premiers mois de vie et effectués à 2, 3, 5, 12, 15, 29, 36, 50 et 65 jours d'âge.

Les animaux de moins de 250 grammes ont été tué le matin à 9h par dislocation des cervicales et au-delà de 250 g, les canards sont tués par exsanguination après éthernarcose. Les contenus digestifs de l'iléon et des caeca ont été recueillis en vidant les organes par une pression sur ceux-ci, immédiatement pesés et stockés à - 80°C avant l'extraction.

1.2 Séquençage haut débit Miseq

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons en utilisant le kit QiAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été élué dans 50 µL de tampon ATE et conservés à -20 °C.

La préparation des échantillons a été faite dans un volume total de 100µL contenant le tampon PCR 1X, 200µM de dNTP, 1U d'ADN polymérase (MP Biomedicals), 0,5 µM de chaque amorce (amorce

sens 343F: TACGGRAGGCAGCAG, amorce anti-sens 784R : TACCAGGGTATCTAATCCT) et 1-5 ng d'ADN. Les produits PCR ont été purifiés avec le kit QIAquick PCR (Qiagen) suivi d'une estimation de la qualité et de la quantité des ADN grâce à un Nano-Drop. Le séquençage des gènes codant l'ARN 16S a été réalisé avec la technologie Miseq (Miseq Illumina - Roche) et le kit Miseq Reagent selon les instructions du fabricant. Les amplicons de 460 pb ont été rassemblés en utilisant une quantité égale de chaque produit PCR. Les séquences ont été analysées avec le logiciel Mothur v 1.34 et ont été alignées avec la base de données SILVA. Les données sont analysées par R (R Development Core Team « R ») pour le traitement en classe via le package TREE et par anova pour les effets âge, type génétique et l'interaction des deux.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur les 270 échantillons testés, il a été détecté un total de 5 294 827 séquences avec 99% d'identification. La diversité microbienne dans les échantillons a été estimée par le calcul du nombre d'OTU's (Operational taxonomic unit). Pour tous les échantillons d'iléon, le nombre d'OTU's avec un cutoff de 0.05 est de $47\,082 \pm 17\,536$. Le nombre moyen de séquences était de 22 181 par échantillon d'iléon, 5 phyla différents ont été répertoriés pour 112 taxons différents. La majorité de la diversité de l'iléon entre 2 et 65 jours d'âge est représentée par les *Firmicutes* avec 85% de la population. Le reste est composé à 7% de *Proteobacteria*, 5% de *Bacteroidetes*, 3% d'*Actinobacteria* et 0.2% de *Tenericutes* (Fig. 1a). Pour les caeca le nombre moyen d'OTU's avec un cutoff de 0.05 est le même que pour l'iléon. Le nombre moyen de séquences est de 16 879 comprenant 5 phyla représentés par 112 taxons différents. Les caeca sont composés majoritairement de *Firmicutes* avec 71% d'apparition de ce phylum. Les *Bacteroidetes* représentent eux 20% de la population tandis que les *Proteobacteria* sont à 8%. Le reste de la diversité représente moins de 2% du total des séquences (Fig. 1b).

Dans l'iléon, les *Firmicutes* sont représentés majoritairement par la classe *Clostridia* (74,97%) et *Bacilli* (7,94%) (Figure 2a). Les *Bacteroidetes* sont représentés à 4,90% par la classe des *Bacteroidia*. Les *Proteobacteria* sont majoritairement représentés par *Gammaproteobacteria* (3,55%) et *Alphaproteobacteria* (2,54%). Dans les caeca, les *Firmicutes* sont majoritairement représentés également par *Clostridia* (69,20%) et *Bacilli* (1,44%). Les *Bacteroidetes* eux sont représentés par *Bacteroidia* (Figure 2b). Les *Proteobacteria* sont majoritairement représentés par les *Gammaproteobacteria* (6,58%).

Implantation du microbiote iléal

Dans un premier temps, nous avons voulu comprendre comment s'implante la population bactérienne (microbiote) dans l'iléon chez les canards Pékin, mulard et Barbarie. Quelque soit le type génétique et l'aliment, le phylum *Firmicutes* est majoritaire (Tableau 1a). Cependant, un effet statistique est détecté sur le type génétique. Ainsi le phylum *Firmicutes* est différenciellement représenté par 79,91%, 83,46% et 90,59% de la population totale pour Barbarie, mulard et Pékin respectivement. Au niveau des *Proteobacteria*, l'évolution fluctue en fonction de l'âge et du type génétique. Pour les phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Tenericutes*, seul un effet âge est détecté (Tableau 1a). Ainsi, *Actinobacteria* représente moins de 2% de la population bactérienne avant 50 jours d'âge jusqu'à atteindre 10, 6% en fin de phase de finition (J65). Malgré l'effet âge détecté, le phylum *Tenericutes* ne dépasse pas 1% de la population totale bactérienne. Pour le phylum *Bacteroidetes*, 2 phases d'implantation sont détectées, la première de la naissance à 15 jours d'âge avec 2,23% et la deuxième de la phase de transition à la fin de la phase de finition avec 8,1%. L'importance des *Firmicutes* observée est en accord avec les résultats obtenus chez le canard adulte avant gavage, bien que leur pourcentage soit supérieur chez le caneton (Vasai et al., 2014a ; Vasai et al., 2014b).

Implantation du microbiote caecal

Dans un deuxième temps, nous avons voulu comprendre comment s'implante la population microbienne dans les caeca des canards Pékin, mulard et Barbarie. Nous avons observé une implantation du microbiote séquentiel en fonction de l'âge et fortement lié aux changements d'alimentation (Tableau 1b). Ainsi, en phase de démarrage (J2, J3), indépendamment du type génétique, les phyla majoritaires sont les *Firmicutes* (74,67%) et les *Proteobacteria* (24,77%). En phase de croissance, les *Firmicutes* augmentent fortement pour atteindre 94,71% des bactéries totales au détriment des *Proteobacteria* (2,80%). En phase de finition, les *Firmicutes* diminuent pour atteindre 57,67% pour laisser place aux *Bacteroidetes*. Concernant le phylum *Bacteroidetes*, une interaction âge/type génétique est détectée. Ainsi, en phase de croissance, les *Bacteroidetes* représentent 3% chez le Pékin et est inférieur à 0.5% chez le Barbarie et le mulard. En phase de finition, les *Bacteroidetes* augmentent jusqu'à devenir le deuxième phylum majoritaire respectivement 48,95%, 43% et 36,2% pour Barbarie, mulard et Pékin. Le phylum *Tenericutes* est non détecté de la naissance à 15 jours d'âge et apparaît lors de la phase de transition (1,33%) pour augmenter pendant la phase de finition (5,27%) et diminuer à 65 jours d'âge (0.6%). Ces résultats sont en accord avec ce que est connu chez le poussin et le veau où l'incidence en *Proteobacteria* diminue au cours de la

croissance (Amit-Romach et al., 2004, Rey et al, 2013).

CONCLUSION

Cette étude a permis d'observer une implantation différentielle entre l'iléon et les caeca des différents phyla. Néanmoins, les phyla majoritaires restent les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*, en accord avec les résultats observés chez le canard adulte et le poulet (Vasai et al., 2013 ; Vasai et al., 2014). Peu d'effets génétiques ont été détectés au niveau taxonomique étudié, à savoir les phyla. Il sera important de poursuivre l'investigation au niveau des classes et des genres afin d'établir les groupes métaboliques bactériens majoritaires. Néanmoins, il est intéressant de noter que le microbiote intestinal du caneton

s'implante au cours de la croissance, les premiers jours étant plus variable. Il sera donc important d'implanter une souche probiotique (par exemple *Lactobacillus* connue pour ses activités amylolytiques) dès les premiers jours de croissance lorsque le microbiote des canetons n'est pas définitif.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les agents de la station expérimentale INRA d'Artiguères pour leur investissement dans cette étude, ainsi que le CIFOG et le Conseil Général des Landes pour leur soutien financier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Amit-Romach E., Sklan D. and Uni Z., 2004. Poult. Sci., (83),1093-1098.
2. Baéza E., Rideau N., Chartrin P. et al. 2005. INRA Prod. Anim., (18), 131-141.
3. Bernalier A., Doré J., Rabot S. 2002. In Robertfroid M. Editions Tec&Doc Lavoisier, 40-72.
4. Brugirard-Ricaud K., Peillod C., Daniel P., Houmaire C., Mesplède A., Davail S., 2010. JRA.
5. Ducluzeau R. 1999. In Bergogne-Berezin E. Editions Médicales. 10-23.
6. Ducluzeau R., Raibaud P. 1979. In Actualités Scientifiques de l'INRA. Editions Masso.
7. Fuller R. 1984. Proc. Nut. Soc., (43), 55-61.
8. Gabriel I., Mallet S., Sibille P., 2005. INRA Prod. Anim. (15), 309-322. Kohl K.D. 2012. J. Comp. Physio.,(182), 591-602.
9. Ley R.E., Hamady M., Lozupone C. et al. 2008. Sci., (320), 1647-1651.
10. R.:R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
11. Rey M., Enjalbert F., Combes S. et al. 2013. J. Appli. Microb., doi:10.1111/jam.12405.
12. Serino M., Luche E., Gres S. et al. 2011. Gut, (61), 543-553.
13. Vasai F. Brugirard Ricaud K., Bernadet M.D. et al. 2014a. FEMS Microbiol., (87), 204-216.
14. Vasai F. Brugirard Ricaud K., Cauquil L. et al. 2014b. Poult. Sci., (93), 916-925.

Figure 1. Composition du microbiote de 2 à 65 jours après la naissance selon les différents grands phyla dans l'iléon (a) et les caeca (b)

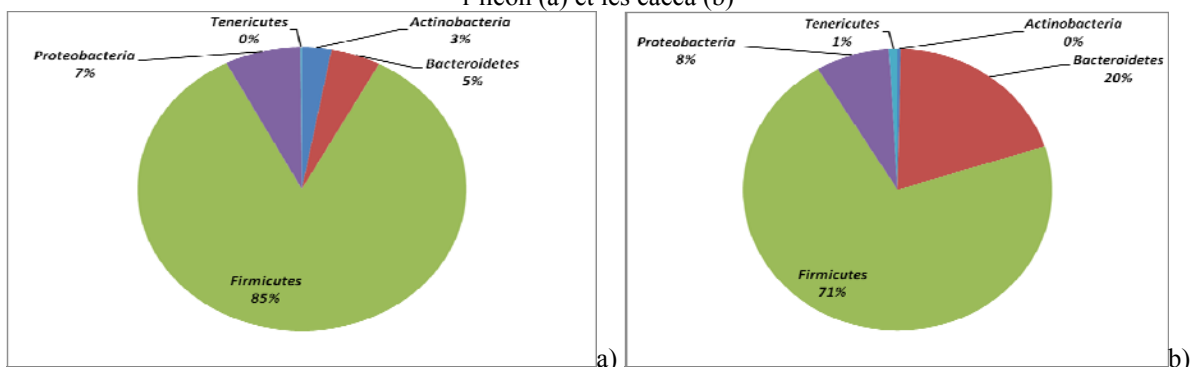


Figure 2. Composition du microbiote de 2 à 65 jours après la naissance selon les différentes grandes classes dans l'iléon (a) et les caeca (b)

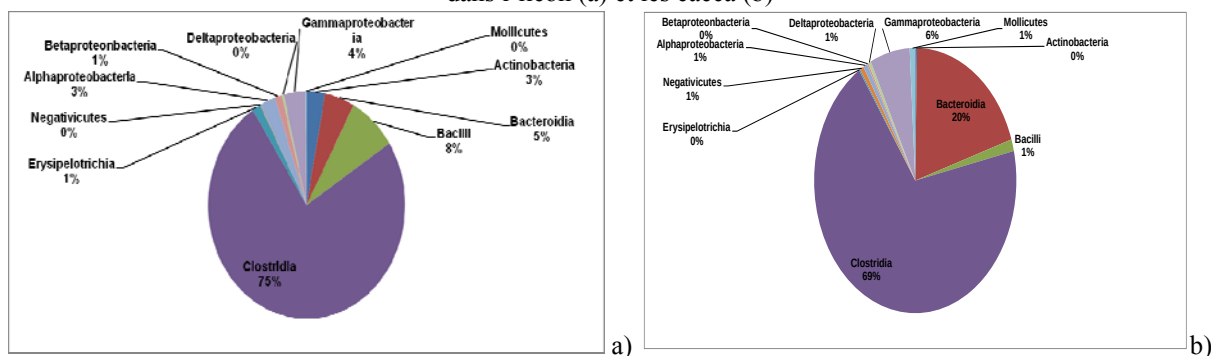


Tableau 2. Répartition en fonction des classes d'âge des différents phyla bactériens

Alimentation		Aliment de démarrage		Aliment de croissance		Aliment de transition		Aliment de finition										
Phyla /Age (jours)		2	3	5	12	15	29		36	50	65	PRE	P-value					
												age	tg	age*tg				
Actinobacteria		1.87±0.3									10.6±4	0.16	*	NS	NS			
Bacteroidetes		2.23±0.26					8.1±1.2					0.16	**	NS	NS			
Firmicutes	Barbarie	79.91±3.41									-							
	Mulard	83.46±3.37									-	NS	*		NS			
	Pékin	90.59±2.53									-							
Proteobacteria	Barbarie	2.70±1.77	0.75±0.51	2.94±2.29	0.34±0.12	3.60±2.54	12.42±5.17		12.71±4.72	10.69±4.75	4.39±2.98	-						
	Mulard	0.21±0.11	0.25±0.23	2.60±2.43	3.00±2.70	7.42±5.23	14.17±8.87		14.58±8.34	8.21±3.78	8.24±5.15	-	*	NS	*			
	Pékin	0.20±0.15	2.79±1.75	0.04±0.01	4.58±4.33	2.45±2.32	0.23±0.08		3.56±2.02	1.72±0.81	6.97±3.17	-						
Tenericutes		0.04±0.001							0.87±0.03	0.13±0.002		0.12	*	NS	NS			
Alimentation		Aliment de démarrage		Aliment de croissance		Aliment de transition		Aliment de finition										
Phyla /Age (jours)		2	3	5	12	15	29		36	50	65	PRE	P-value					
												age	tg	age*tg				
Actinobacteria		0.22±0.002			0.87±0.0003		0.12±0.001					0.10	*	NS	NS			
Bacteroidetes	Barbarie	0.08±0.0007					48.95±2.3					0.90						
	Mulard	0.4±0.006					43±2.8					0.83	***	NS	**			
	Pékin	3.16±2.2					36.2±1.4					0.64						
Firmicutes		74.67±4.8		94.71±1.4			57.67±1.8				36.73±0.6	0.69	***	NS	NS			
Proteobacteria		24.77±4.9		2.81±0.14									0.46	***	NS	NS		
Tenericutes		Non Détecté				1.33±0.02		5.27±0.33	0.6±0.02		0.30					***	NS	NS

Tableau 2 : Classification par classe d'âge des échantillons d'iléon (a) et de caeca (b) des canetons (Barbarie, Mulard et Pékin) selon l'abondance relative des phyla bactériens de 2 à 65 jours après la naissance, les valeurs sont exprimées en pourcentages moyens ± l'écart-type moyen. PRE indique la proportion de variabilité expliquant la division en classes d'âge. L'effet de l'âge, du type génétique et leur interaction a été analysé et est désigné comme *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$ et NS $P > 0,05$.