

LIENS ENTRE EFFICACITE DIGESTIVE ET COMPOSITION DU MICROBIOTE CHEZ LE POULET DE CHAIR

Mignon-Grasteau Sandrine¹, Narcy Agnès¹, Le Bihan-Duval Elisabeth¹, Gabriel Irène¹

¹URA, INRA, 37380, Nouzilly, France
sandrine.grasteau@inra.fr

RÉSUMÉ

Un croisement de deuxième génération entre deux lignées divergentes de poulets de chair sélectionnés sur leur efficacité digestive a permis l'étude des relations entre composition du microbiote caecal et efficacité digestive. La composition du microbiote caecal (quantité de *Lactobacillus*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *C. coccoides*, *C. leptum* et *E. coli* par gramme de contenu caecal) a été déterminée sur 144 animaux présentant une efficacité alimentaire et digestive faible (IC = 2.02, EMAn = 2936 kcal/kg MS) ou forte (IC = 1.41, EMAn = 3444 kcal/kg MS) à 3 semaines. Au niveau phénotypique, une régression linéaire multiple a été réalisée afin de déterminer quelle part de la variabilité de l'efficacité digestive était due à la composition du microbiote. Au niveau génétique, nous avons estimé l'héritabilité de la composition du microbiote et détecté les zones du génome du poulet contrôlant la composition du microbiote (QTL) à partir de 3379 marqueurs SNP. Les animaux peu efficaces présentent 1.66 fois plus de *Lactobacillus*, 2.88 fois plus de *L. salivarius* et 2.56 fois plus d'*E. coli* que les animaux efficaces. Des régressions linéaires multiples montrent que la composition du microbiote explique 19 à 22% de la variabilité de l'efficacité digestive. Nous avons également déterminé qu'il existait chez le poulet un contrôle génétique partiel de la composition du microbiote. En effet, les ratios entre *L. crispatus*, *C. leptum* ou *C. coccoides* et *E. coli* présentent une héritabilité significative (0.16-0.24). Par ailleurs, nous avons également détecté 14 QTL contrôlant la composition du microbiote, impliquant essentiellement *C. leptum* et *Lactobacillus*. Ces zones QTL co-localisent avec des QTL de consommation et de comportement alimentaire (durée des repas), d'anatomie du tube digestif (poids et longueur de l'iléon) et de l'immunité.

ABSTRACT

Relationships between digestive efficiency and microbiota composition in meat-type chicken

A second generation cross between broiler lines divergently selected on their digestive efficiency has been used to study the relationships between the composition of cecal microbiota and digestive efficiency. The composition of cecal microbiota (amount of *Lactobacillus*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *C. coccoides*, *C. leptum* and *E. coli* per gram of cecal content) has been determined on 144 animals with contrasted feed and digestive efficiency (poor efficiency group : FCR=2.02, AMEn=2936 kcal/kg DM ; high efficiency group : FCR=1.41 ; AMEn=3444 kcal/kg DM) at 3 weeks. At the phenotypic level, a multiple linear regression has been done to estimate which part of the variability of digestive efficiency was due to microbiota composition. At the genetic level, we estimated the heritability of the composition of microbiota and detected genomic regions controlling the composition of microbiota (QTL), using 3379 SNP markers. Poorly efficient animals had 1.66 more *Lactobacillus*, 2.88 times more *L. salivarius* and 2.56 times more *E. coli* than efficient animals. Multiple linear regressions indicated that the composition of microbiota explains 19 to 22% of variability of digestive efficiency. We also showed that there is a partial genetic control of the composition of microbiota in chickens. The ratios of *L. crispatus*, *C. leptum* or *C. coccoides* to *E. coli* exhibited a significant heritability (0.16-0.24). Moreover, we also detected 14 QTL controlling microbiota composition, mostly for *C. leptum* and *Lactobacillus*. These QTL regions co-localise with QTL for feed intake, feeding behaviour (length of meals), anatomy of digestive tract (weight and length of ileum) and immunity.

INTRODUCTION

Lors d'études précédentes, nous avons montré que l'efficacité digestive, composante essentielle de l'efficacité alimentaire, était en partie sous contrôle génétique (Mignon-Grasteau et al. 2004). Après 8 générations de sélection divergente sur l'énergie métabolisable corrigée pour un bilan azoté nul (EMAn) à 3 semaines, nous avons créé deux lignées divergentes (D+ et D-) dont les performances d'efficacité digestive diffèrent de 30 à 40%.

La sélection de l'efficacité digestive modifie la physiologie digestive et donc les conditions rencontrées par les bactéries du microbiote intestinal (pH, quantité de mucus, nutriments présents dans la lumière de l'intestin...). Par exemple, le pH du contenu de l'iléon est plus élevé chez les D+ et la quantité de cellules caliciformes productrices de mucus plus élevée chez les D-. De plus, la quantité et la nature des produits non digérés utilisés comme substrat par le microbiote varie en fonction de l'efficacité des animaux à digérer leur aliment, ce qui pourrait avoir abouti à un microbiote différent entre les deux lignées. A l'inverse, le microbiote participe à l'hydrolyse des composants présents dans l'appareil digestif, a des effets sur la physiologie digestive (Choi et al. 2015, Jandhyala et al. 2015) et contribue donc à la digestion. Il pourrait donc contribuer à la différence d'efficacité digestive observée entre les deux lignées. Une étude préliminaire a donc été entreprise sur les lignées D+/D- afin d'identifier les principaux groupes bactériens qui distinguent le microbiote des deux lignées divergentes (Gabriel et al. 2011). Cette étude avait montré qu'il existait des différences de microbiote dans la muqueuse et le contenu de l'iléon et des caeca, tant au niveau de similarité des profils de microbiote intra-lignée que de la composition, les différences les plus importantes étant observées au niveau des contenus des caeca.

La présente étude vise à approfondir ces premiers résultats, en 1/ quantifiant l'intensité du lien entre digestion et composition du microbiote caecal par le biais d'une régression et en 2/ déterminant si l'association entre digestion et microbiote est en partie liée à la génétique de l'hôte, grâce à l'estimation des paramètres génétiques et à la détection de QTL de la composition du microbiote caecal.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et Phénotypes

L'expérience repose sur 144 poulets mâles et femelles choisis parmi les 865 individus d'un croisement de 2^{ème} génération entre les lignées divergentes D+ et D- sélectionnées respectivement sur une forte ou faible efficacité digestive à 3 semaines (Mignon-Grasteau et al. 2004, Tran et al. 2014). Pour chacun des 4 lots

d'élevage, les animaux ont été élevés au sol jusqu'à 9 jours, puis placés en cages individuelles jusqu'à l'abattage à 23 jours, dans 3 cellules d'élevage comprenant chacune 3 rangées de cages. Ils ont été nourris avec un régime difficile à digérer, contenant 52.5% d'une variété de blé de fortes dureté et viscosité, comme celui utilisé pendant le processus de sélection. L'anticoccidien utilisé dans l'aliment est connu pour son effet limité sur le microbiote digestif (Clinacox®, US FDA, 1996). Un bilan digestif a été réalisé de 17 à 20 jours, permettant de mesurer l'indice de consommation, l'énergie métabolisable (EMAn) et les coefficients d'utilisation digestive de la matière sèche (CUDMS), de l'amidon (CUDA), des lipides (CUDL) et des protéines (CUDP). Parmi les 865 animaux de la population initiale, les 144 animaux présentant les valeurs les plus extrêmes pour leur indice de consommation de 17 à 20 jours ont été retenus pour l'étude du microbiote, puis classés en 2 groupes. Les animaux efficaces avaient un indice de consommation moyen de 1.41 et une valeur d'EMAn moyenne de 3444 kcal/kg MS. Les animaux peu efficaces présentaient des valeurs moyennes d'indice de consommation et d'EMAn de 2.02 et 2936 kcal/kg MS, respectivement.

A 23 jours, les animaux ont été abattus par injection de pentobarbital, et le contenu de leurs caeca a été prélevé. L'ADN bactérien a été extrait avec le kit QIAamp DNA mini-kit en incluant une étape mécanique. L'ADN ribosomal 16S a ensuite été amplifié par PCR afin de quantifier les principaux groupes bactériens (*Lactobacillus*, *L. salivarius*, *L. crispatus*, *Clostridium leptum*, *C. coccoides*, *Escherichia coli*, cf. Mignon-Grasteau et al. 2015a pour la procédure complète). Les résultats sont obtenus en nombre de copies d'ADNr 16S par gramme d'échantillon frais.

Les animaux ont été génotypés avec un jeu de 3379 marqueurs SNP répartis sur les chromosomes 1 à 28, 33 et Z, couvrant une distance de 3099.1 cM.

1.2. Analyses statistiques

Les quantifications bactériennes sont converties en logarithme avant analyse. Toutes les combinaisons possibles des ratios « log(groupe A)/log(groupe B) » ont été calculées pour prendre en compte l'équilibre entre les différents groupes bactériens. Une analyse de variance a été réalisée sur l'ensemble de ces caractères avec la procédure GLM de SAS pour déterminer quels groupes bactériens différaient entre animaux efficaces ou peu efficaces.

Afin d'évaluer quelle part de la variabilité de l'efficacité digestive pouvait être attribuée à la composition du microbiote, nous avons effectué des régressions linéaires multiples avec la procédure GLM option stepwise de SAS. Les logarithmes des quantifications bactériennes ainsi que les ratios ont été inclus dans la régression. Le R² de cette régression a été utilisé comme indicateur du pourcentage de

variance de l'efficacité digestive attribuable au microbiote.

Le logiciel VCE 6.0.2. (Kovac et al. 2008) a été utilisé pour estimer l'héritabilité de la composition du microbiote à l'aide d'un modèle animal incluant également les effets du lot, du sexe, de la cellule d'élevage et de la rangée de cages.

Enfin, la détection de QTL a été réalisée à l'aide du logiciel QTLMap (Gilbert et al. 2008) en utilisant un modèle demi-frère par cartographie d'intervalle fondé sur des estimations du maximum de vraisemblance. Le niveau de significativité au niveau du chromosome a été calculé grâce à 5000 simulations réalisées sous l'hypothèse d'absence de QTL.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les animaux peu efficaces présentent 1.66 fois plus de *Lactobacillus*, 2.88 fois plus de *L. salivarius* et 2.57 fois plus d'*E. coli* que les animaux les plus efficaces. Les quantités de *L. crispatus* et de clostridies (*C. coccoides* et *C. leptum*) ne diffèrent pas entre les deux groupes d'animaux. Les ratios entre *L. salivarius* et les autres groupes bactériens (sauf *E. coli*) sont 5 à 10% plus élevés chez les animaux peu efficaces. Enfin, les ratios entre les 2 groupes de clostridies et *Lactobacillus* et entre les 2 groupes de clostridies et *E. coli* sont respectivement 4 à 5% plus faibles et 12% plus faibles chez les animaux peu efficaces.

Le tableau 1 montre que la composition du microbiote explique de 19.5 à 22.4% des paramètres d'efficacité digestive, principalement à cause du ratio *E. coli/Lactobacillus* pour EMAN et CUDMS, le ratio *L. salivarius/C. leptum* pour CUDL et CUDA et *C. leptum/E. coli* pour CUDP. Les études de Torok et al. (2011) et Stanley et al. (2012) avaient déjà identifié ces groupes bactériens comme étant ceux principalement associés aux performances des animaux, bien que le sens de l'association diffère en fonction du génotype, du sexe ou du régime des animaux.

L'héritabilité des différents indicateurs de la composition du microbiote est faible à modérée (0.02 à 0.24). Elle est significativement non nulle pour les ratios *C. coccoides/Lactobacillus* (0.10), *L. crispatus/C. coccoides* (0.14), *C. coccoides/E. coli*

(0.16), *C. leptum/E. coli* (0.21) et *L. crispatus/E. coli* (0.24).

Nous avons détecté un total de 14 QTL de composition du microbiote, significatifs au niveau du chromosome (cf. tableau 2). La plupart de ces QTL impliquent *C. leptum* et *Lactobacillus*. Le QTL pour *C. leptum* sur le chromosome 6 approche la significativité au niveau du génome ($P=0.09$). Cette zone contient principalement des gènes liés aux voies TGF β et NF κ B du système immunitaire (Mignon-Grasteau et al. 2015a). De plus, plusieurs QTL de microbiote co-localisent avec des QTL d'anatomie du tractus digestif, en particulier le poids et la longueur de l'iléon (QTLs 2, 7, 13 et 14, Tran et al., 2014, Mignon-Grasteau et al. 2015b) et le poids du proventricule (QTLs 4 et 6, Tran et al. 2014). Enfin les QTL de *L. crispatus* et *L. crispatus/C. coccoides* sur le chromosome 14 co-localisent avec des QTL de longueur des repas (Mignon-Grasteau et al. 2016). Ces co-localisations suggèrent que les mécanismes qui affectent la composition du microbiote, l'anatomie du tractus digestif, le comportement alimentaire et l'immunité pourraient être en partie identiques.

CONCLUSION

Notre étude démontre que l'impact du microbiote sur la digestion est important (de l'ordre de 20%) et que sa composition est en partie déterminée par la génétique de l'hôte. Cette étude est actuellement étendue aux autres segments intestinaux afin d'établir un profil complet des liens entre efficacité digestive et composition du microbiote. Compte-tenu de l'abondance des gènes impliqués dans l'immunité détectés dans les zones QTL, l'étude génétique intègre également la mesure de paramètres du système immunitaire afin de raffiner les zones QTL et proposer une liste pertinente de gènes candidats.

REMERCIEMENTS

Ce programme a été financé par l'ANR, contrat n° ANR-09-GENM-007.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Choi K.Y., Lee T.K., Sul W.J., 2015. As. Australas. J. Anim. Sci., (28), 1217-1225
- Gabriel I., Guardia S., Konsak B., Leconte M., Rideaud P., Moreau-Vauzelle C., Dupont C., Mignon-Grasteau S., 2011. 9èmes Journées de la Recherche Avicole, 760-764
- Gilbert H., Le Roy P., Moreno C., Robelin D., Elsen J.M., 2008. Ann. Hum. Genet., (72), 694
- Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., Reddy D.N., 2015. World J. Gastroenterol., (21), 8787-8803
- Kovac M., Groeneveld E., Garcia-Cortez A., 2008. VCE 6 User's Manual. Version 6.0.2.
- Mignon-Grasteau S., Muley N., Bastianelli D., Gomez J., Péron A., Sellier N., Millet N., Besnard J., Hallouis J.M., Carré B., 2004. Poult. Sci., (83) 860-867

- Mignon-Grasteau S., Narcy A., Rideau N., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Sellier N., Konsak-Ilievski B., Le Bihan-Duval E., Gabriel I., 2015a. Plos One, (10), e0135488
- Mignon-Grasteau S., Rideau N., Gabriel I., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Sellier N., Chabault M., Le Bihan-Duval E., Narcy A., 2015b. Genet. Sel. Evol., (47), 74
- Mignon-Grasteau S., Chantry-Darmon C. Boscher M.Y., Sellier N., Le Bihan-Duval E., Bertin A., 2016. Behav. Genet., 1-11
- Stanley D., Denman S.E., Hughes R.J., Geier M.S., Crowley T.M., Chen H., Haring V.R., Moore R.J., 2012. Appl. Microbiol. Biotechnol., (96), 1361-1369
- Torok V.A., Hughes R.J., Mikkelsen L.L., Perez-Maldonado R., Balding K., MacAlpine K., Oercy N.J., Ophel-Keller K., 2011. Appl. Env. Microbiol., (77), 5868-5878
- Tran T.S., Narcy A., Carré B., Gabriel I., Rideau N., Gilbert H., Demeure O., Bed'Hom B., Chantry-Darmon C., Boscher M.Y., Bastianelli D., Sellier N., Chabault M., Calenge F., Le Bihan-Duval E., Beaumont C., Mignon-Grasteau S., 2014. Genet. Sel. Evol., (46), 25
- US FDA, 1996. NADA number 140-951

Tableau 1. Coefficients de détermination des régressions des caractères d'efficacité digestive sur la composition du microbiote caecal.

	EMAn	CUDMS	CUDL	CUDA	CUDP
<i>R² partiels</i>					
log(<i>E. coli</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	0.128	0.129		0.038	0.061
log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>C. leptum</i>)	0.051		0.093	0.117	
log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	0.028	0.049			
log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>E. coli</i>)	0.014		0.024	0.052	
log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>E. coli</i>)		0.022		0.017	0.102
log(<i>C. coccoides</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)			0.025		
log(<i>C. coccoides</i>)			0.021		
log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)			0.015		
log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)			0.018		
log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>E. coli</i>)					0.029
R ² total	0.220	0.200	0.195	0.224	0.197

Tableau 2. QTL contrôlant le microbiote caecal (d'après Mignon-Grasteau et al. 2015a).

N°	Caractère	Chr	Marqueurs flanquants de l'intervalle de confiance du QTL		Effet du QTL ¹
			Nom	Position	
1	log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	1	Gga_rs13911828- Gga_rs13913250	101115495- 102541560	0.814
2	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	2	Gga_rs15142674- Gga_rs431871688	111504149- 114972652	0.552
3	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	3	Gga_rs16324984- Gga_rs14399484	94693836- 96453172	0.86
4	log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. leptum</i>)	6	Gga_rs14579919- Gga_rs15807987	18604578- 27210078	0.677
5	log(<i>C. leptum</i>)	6	Gga_rs15813564- Gga_rs16565135	29424015- 30730285	0.895
6	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	6	Gga_rs19644770- Gga_rs16006607	19644770- 32526626	0.903
7	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	8	Gga_rs15892308- Gga_rs318012175	12949- 4647348	0.605
8	log(<i>E. coli</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	12	Gga_rs15632811- Gga_rs14032854	2332254- 3357537	0.52
9	log(<i>L. crispatus</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	14	Gga_rs315655894- Gga_rs431846116	5486990- 5853831	0.897
10	log(<i>L. crispatus</i>)	14	Gga_rs315655894- Gga_rs14074053	5486990- 5748683	1.241
11	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	14	Gga_rs15738570- Gga_rs314499044	10100475- 12533165	0.591
12	log(<i>C. leptum</i>)/log(<i>C. coccoides</i>)	18	Gga_rs31812060- Gga_rs316856036	2984403- 6829371	0.476
13	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>C. leptum</i>)	21	Gga_rs14285137- Gga_rs14286198	5286156- 6448006	0.605
14	log(<i>L. salivarius</i>)/log(<i>Lactobacillus</i>)	26	Gga_rs314058682- Gga_rs15235289	3059337- 3992639	0.532

¹ en proportion de l'écart-type phénotypique du caractère