

MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL ET DU METABOLISME LIPIDIQUE CHEZ LE CANARD MULARD

Maxime Even¹, Stéphane DAVAIL¹, Karine GONTIER¹, Annabelle TAVERNIER¹, Marie-Dominique BERNADET², Karine BRUGIRARD-RICAUD¹

¹UMR INRA 1419 NuMÉA (Nutrition, Métabolisme, Aquaculture), IUT Pays de l'Adour, 371 rue du ruisseau, F-40002 Mont de Marsan, France ; ²Unité Expérimentale Palmipèdes à Foie Gras Inra Bordeaux-Aquitaine
Domaine d'Artiguères 1076, route de Haut Mauco 40280 Benquet France

karine.brugirardricaud@univ-pau.fr

RÉSUMÉ

Le microbiote intestinal est un environnement complexe et joue un rôle fondamental dans la régulation de la physiologie et du métabolisme de son hôte. Si de nombreuses études menées récemment chez le poulet ont permis de confirmer ces effets, les travaux menés spécifiquement chez les canards sont plus rares. Les études précédemment réalisées au laboratoire ont permis de caractériser l'implantation du microbiote chez le caneton et sa composition chez le canard avant et pendant le gavage. Il a été ainsi mis en évidence une plasticité initiale du microbiote ainsi qu'un rôle potentiel des *Lactobacillus* durant la phase de gavage. Pour comprendre le rôle fonctionnel du microbiote intestinal, et en particulier celui des *Lactobacillus*, dans la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard, nous avons donc supplémenté des canards avec des probiotiques incluant des souches de *Lactobacillus* de l'éclosion à la fin de la période de gavage. L'analyse des résultats zootechniques n'a pas montré d'effet significatif de la supplémentation sur les performances des animaux. L'étude de l'expression des gènes du métabolisme lipidique et de la réponse immunitaire n'a pas montré non plus d'effet significatif des probiotiques. Néanmoins, l'expression de gènes marqueurs de la stéatose hépatique a bien été modifiée suite au gavage, ainsi que deux marqueurs de la réponse immunitaire. Les phyla bactériens majoritaires sont les *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Proteobacteria*. La supplémentation en probiotique modifie très peu la composition du microbiote intestinal en comparaison des effets du gavage.

ABSTRACT

Modulation of intestinal microbiota and lipid metabolism in mule ducks

The intestinal microbiota is a complex environment and plays a fundamental role in its host. While many studies in chickens have recently been conducted in this direction, studies in ducks are less common. Previous studies from the laboratory allow us to characterize the implantation of the microbiota in ducklings and its composition in the duck before and during overfeeding. It was demonstrated an initial plasticity of the microbiota and a potential role of the *Lactobacillus* genus during the overfeeding. In order to understand the functional role of the intestinal microbiota and in particular the *Lactobacillus* genus, in the hepatic steatosis in the duck, we supplemented ducks with probiotics including *Lactobacillus* strains from hatching to the end of overfeeding. The analysis of animal performance did not show any significant effect of supplementation. The study of the metabolism and immune response expression genes did not allow us to conclude on an effect of probiotics. The effect of overfeeding allowed us to see a modification on immune gene expression. Major bacterial phyla are *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. The supplementation affects very slightly intestinal microbiota composition in comparison to the effect of overfeeding.

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal est un environnement complexe et joue un rôle fondamental chez son hôte, notamment dans la régulation du métabolisme lipidique de son hôte, expliquant en partie les phénomènes d'obésité (Bäckhed et al., 2004). Si de nombreuses études menées récemment chez le poulet vont dans ce sens (Jin et al, 1998 ; Yin et al, 2010; Zhao et al, 2013) les travaux menés spécifiquement chez les canards sont plus rares.

Les études déjà menées au laboratoire ont permis de connaître la composition du microbiote intestinal des canards Pékin, Barbarie et mulard avant et au cours du gavage (Vasai et al, 2014ab). Ainsi, les phyla majoritaires sont les *Firmicutes* et les *Bacteroides* (Vasai et al, 2014ab). Une corrélation entre la capacité à réaliser une stéatose hépatique (Barbarie et mulard) ou un engraissement périphérique (Pékin) et la composition du microbiote avant gavage a été mise en évidence (Davail et al, 2003 ; Vasai et al, 2014ab). Ainsi, avant gavage, le canard mulard a un microbiote proche de celui du canard Barbarie au niveau des classes et des genres (genre dominant : *Clostridium*) alors que le canard Pékin a comme genres dominants *Streptococcus* et *Enterococcus*.

De plus, au cours du gavage, le changement d'alimentation favorise fortement le genre *Lactobacillus* au niveau de l'iléon (Vasai et al, 2014ab). Une autre étude menée au laboratoire sur la mise en place du microbiote chez le caneton a mis en évidence une implantation séquentielle du microbiote ainsi qu'un effet génétique sur sa composition (Rey et al, 2015). Ainsi, les bactéries de la classe des *Bacilli* sont plus abondantes chez le canard Pékin que les canards de Barbarie et mulard confirmant l'effet génétique décrit précédemment (Vasai et al, 2014ab). Il en a été conclu que le microbiote présentait une plasticité initiale mais qu'il tendait vers un équilibre (Rey et al, 2015).

Ces données suggèrent que c'est dès la phase de démarrage qu'il est possible d'intervenir pour réorienter le microbiote des canetons quand le microbiote est encore suffisamment plastique. De plus, le genre *Lactobacillus* pourrait être une cible privilégiée afin d'orienter le microbiote pour améliorer le gavage, notamment une souche à plus forte activité amylolytique afin de favoriser la digestibilité de l'amidon. L'objectif de cette étude est donc de comprendre le rôle fonctionnel du microbiote intestinal, et en particulier celui des *Lactobacillus*, lors de la mise en place de la stéatose hépatique chez le canard. Pour cela, nous avons étudié la réponse métabolique et physiologique du canard mulard lors de la supplémentation en probiotiques incluant des

souches de *Lactobacillus*, pendant les phases d'élevage et de gavage.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Sélection et supplémentation des souches dans l'aliment

Deux probiotiques ont été sélectionnés pour la conduite de cette expérimentation. Le premier est une souche endogène isolée par méthode culturale sur milieu MRS/Rogosa (VWR chemicals) à partir du contenu digestif iléal d'un canard en fin de gavage sélectionnée pour sa forte activité amylolytique. Cette souche a ensuite été identifiée comme un *Lactobacillus salivarius* par séquençage du gène codant l'ARN 16S. Le second probiotique est un produit commercial composé d'un mix de souches isolées du poulet contenant une souche de *Lactobacillus salivarius*, de *Bifidobacterium* spp., d'un *Enterococcus faecium* et d'un *Pediococcus acidilactici*. La supplémentation des animaux a été réalisée par ajout des probiotiques dans l'aliment à une charge bactérienne de 2.10^8 UFC/g d'aliment. La présence des bactéries a été contrôlée dans l'aliment granulé jusqu'à 3 jours après son ajout. La concentration est diluée par un facteur 10.

1.2 Conduite d'élevage

150 canards mâles mulards ont été répartis en 3 groupes expérimentaux égaux. Le premier groupe n'a pas reçu de probiotique durant l'ensemble de l'expérimentation (Groupe témoin). Le second groupe a reçu la souche endogène (Groupe A). Enfin le troisième groupe a reçu le mix de souches (Groupe B). Durant la phase d'élevage (0 à 84 jours), l'ensemble des animaux concernés a reçu la (les) souche(s) adéquate(s) dans l'aliment tous les jours de l'élevage. A la mise en gavage (85 jours), les groupes A et B ont été divisés en deux sous-groupes égaux. Un des sous groupe continuait à recevoir le probiotique durant le gavage à chaque repas (modalité +) et l'autre ne le recevait plus (modalité -). Cela représente donc 3 modalités pendant la phase d'élevage et 5 durant la phase de gavage, gavage comprenant 21 repas et 11 jours.

De la naissance (jour 1) à 3 jours d'âge, les animaux ont été alimentés *ad libitum* avec des granulés fournissant 2822 kcal/kg et un taux de MAT de 22.6 %. De 4 jours jusqu'à 28 jours, 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. De 30 à 65 jours, les canards ont été nourris *ad libitum* avec des granulés de 4mm fournissant 2803 kcal / kg pour une MAT de 15 %. De 66 à 84

jours, les canards ont été nourris avec les mêmes granulés avec un accès horaire restreint.

Durant la phase d'élevage, les animaux ont été élevés dans le même bâtiment, chauffé à 28°C lors de l'arrivée des canetons, dans trois loges collectives, isolées les unes des autres pour éviter les contaminations croisées. A partir de 7 jours d'âge, la température a été graduellement baissée. Aucun chauffage n'a été fourni à partir de 28 jours d'âge. De 28 jours à la mise en gavage, les animaux ont eu accès au parcours extérieur couvert durant la journée.

1.3. Mesures et prélèvements

Le suivi de croissance individuelle des animaux a été réalisé une fois par semaine et trois fois par semaine pour le suivi de consommation par loge. Deux points de prélèvements ont été réalisés : un premier à 15 jours (P1) et un second en fin de gavage à 97 jours (P2). Les canards ont été tués par exsanguination après éthernarcose (15 animaux/modalités). Les plasmas ont été récupérés (après centrifugation du sang) à l'abattage en vue de mesurer les glycémies et triglycéridémies. Des mesures de poids de muscle (*pectoralis major*), de foie et de gras abdominal ont été réalisées à chacun des points de prélèvements. Des prélèvements de foie, muscle (*pectoralis major*), de gras abdominal et de gras sous cutané ainsi que de scrapping sur les muqueuses intestinales (jéjunum) ont été réalisés en vue d'analyser l'expression génique de gènes cibles chez le canard. Les contenus digestifs de l'iléon et des caeca ont été recueilli en vidant les organes par une pression, immédiatement pesés et stockés à - 80°C avant l'extraction.

1.4. Mesure de l'expression génique

Afin de mesurer l'expression des gènes d'intérêt du métabolisme lipidique et de la réponse immunitaire, les ARNs totaux ont été extraits au Trizol (Invitrogen/Life technologies) à partir des tissus congelés, avec 100 mg (foie), 200 mg (muscle) et 500 mg (gras abdominal et gras sous cutané) de tissus comme matrice de départ. Les échantillons (n=6/modalité) ont été broyés dans 1mL de Trizol avec un Ultra-Turrax (IKA), puis les recommandations du fournisseur ont été suivies. La rétro-transcription des ARNs a été réalisée grâce à l'enzyme Superscript III (Invitroge Ltd). Elle rétro-transcrit indistinctement tous les ARNs à partir d'amorces aléatoires (Random primer, Promega) et d'oligonucléotides à queue poly-T (OligodT, Promega) et de polynucléotides (dNTP, Promega). Les ADNc synthétisés ont été ensuite quantifiés par PCR en temps réel (StepOne AppliedBiosystem) dans un volume final de 15µL : 2µL d'ADNc et 13µL de premix : (5.5µL de SybGreen FASTmix ROX(Hoefer) +7.5µL d'amorces forward+reverse 15µM).

Les ADNc correspondant aux ARNm ont été amplifiés grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques aux gènes cibles, dessinées au laboratoire à l'aide de Primer3 (Tavernier et al, 2016). La quantification des ADNc des gènes d'intérêt a été normalisée contre la quantification d'un gène de référence, le gène *actB* codant pour une protéine impliquée dans le cytosquelette d'actine.

L'expression génique est exprimée en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ +/- SEM, avec $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de réf.}$ et $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tech}} - \Delta Ct_{\text{référence}}$. Le groupe de référence qui détermine la valeur du ΔCt référence est le groupe témoin (sans probiotique) avant gavage (point de prélèvement 1).

1.5 Caractérisation du microbiote intestinal

1.5.1 Séquençage

Afin de caractériser les populations microbiennes au niveau des contenus digestifs, l'ADN bactérien génomique total des échantillons d'iléon et de caeca (n=5/modalité) a été extrait en utilisant le kit QIAampFast DNA stool minikit (QiagenGmbH, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Des amplicons des régions V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S ont ensuite été générés par PCR. La préparation des amplicons a été effectuée dans un volume total de 50 µL contenant 1 U de TAQ polymérase et son tampon (MTP Taq ADN polymérase, Sigma), 200 µM de dNTP (Sigma), 0,2 µM de chaque amorce (amorce sens 343F : TACGGRAGGCAGCAG, amorce anti-sens 784R : TACCAGGGTATCTAATCCT) et 2 µL de matrice d'ADN. La pureté des produits PCR a été contrôlée par électrophorèse (1% agarose/ TBE).

L'identification des populations microbiennes a été réalisée par séquençage Illumina MiSeq des amplicons générés selon la méthode décrite par (Lluch et al., 2015).

1.5.2 Analyse de séquençage

Tous les outils informatiques utilisés pour l'analyse du séquençage sont disponibles dans le pipeline FROGS de la plateforme Galaxie, développé par la plateforme bioinformatique de Toulouse (Escudie F. et al, 2015). Seuls les groupes bactériens présents dans au minimum 3 échantillons et représentant au moins 0,005% des séquences totales (Bokulich et al, 2013) ont été retenus. L'affiliation a été réalisée par BLAST sur la base de données Silva16S.

1.6. Analyses statistiques

L'ensemble des résultats zootechniques (n=15/modalité) et d'expression génique ((n=6/modalité) et d'expression de gène a été analysé par ANOVA 1 voie (groupes et âges indépendant) et 2 voies (interaction âge/groupes) sous le logiciel R. Un test de Tukey a été réalisé en cas de différence significative. Pour le microbiote, les tables d'OTU (operational taxonomic unit) obtenues après l'analyse

FROGS ont été analysées sous le logiciel R avec le package Phyloseq.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Résultats zootechniques et développement des organes

En cours de l'élevage, le suivi de consommation d'aliment et le suivi de croissance, ainsi que la pesée des tissus aux 2 points de prélèvements n'ont montré aucune différence significative en fonction du groupe expérimental. L'ajout de probiotique n'a donc pas eu d'effet sur l'appétence des aliments et la croissance des animaux, ainsi que sur le poids des organes. L'ajout de probiotiques n'a donc pas montré d'effet sur le développement des canards.

2.2 Glycémie et triglycéridémie

Les dosages biochimiques de la glycémie et de la triglycéridémie n'ont pas montré d'effet des probiotiques avant et en fin de gavage.

2.3 Métabolisme lipidique et réponse immunitaire

La mesure de l'expression des principaux gènes du métabolisme lipidique impliqués dans la stéatose hépatique n'a montré ni interaction entre l'effet gavage et l'effet probiotique, ni effet significatif de la supplémentation en probiotiques (Tableau 1). Néanmoins les gènes marqueurs de la stéatose hépatique ont été augmentés par le gavage en accord avec des travaux récemment publiés au laboratoire (Tavernier et al, 2016).

Tableau 1. Analyses ANOVA sur l'expression relative des gènes du métabolisme lipidique et de la réponse immunitaire dans différents tissus en fonction du gavage et du groupe expérimental

Gène	Tissu	Effet gavage	Effet probiotique
IL 8	Jéjunum	ND	ns
LITAF	Jéjunum	**	A+=A- > B+ (*)
PPAR	Jéjunum	**	ns
FABP4	Foie	*	ns
FAT/CD36	Foie	*	ns
FASN	Foie	***	ns
FASN	Muscle	ND	ns

ND : données non disponibles, pas de mesures à 15j, ns : non significatif, (*) $P < 0.10$; * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.01$; Absence d'interaction Gavage x Probiotique

Ces gènes marqueurs sont impliqués notamment dans la lipogénèse *de novo* (FASN) ainsi que dans le

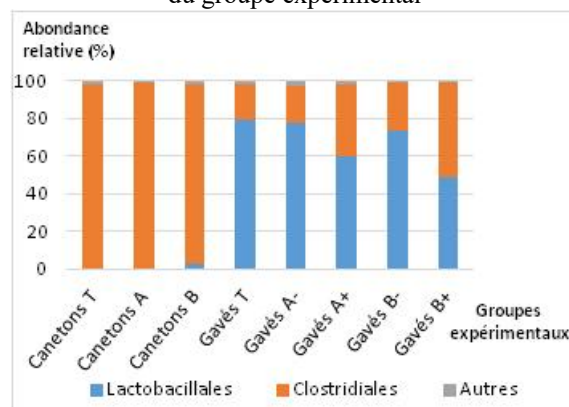
transport des acides gras (FABP4 et FAT/CD36). En effet, lors du gavage, l'apport massif en glucose, issu de la digestion de l'amidon de maïs, au niveau du foie, entraîne une lipogénèse importante conduisant à une stéatose hépatique. Une exportation faible (Chartrin et al, 2006) et un recaptage important des acides gras circulant au niveau du foie (Tavernier et al, 2016) en fin de gavage augmente le phénomène de stéatose hépatique. L'expression de FASN, gène impliqué dans lipogénèse *de novo* au niveau du foie, augmente significativement ($P < 0.001$) au cours du gavage. L'expression des gènes impliqués dans le transport des lipides augmente également, comme le montre l'expression de FABP4 ($P < 0.05$) tandis que FAT/CD36 diminue.

La mesure de l'expression des gènes de la réponse immunitaire (IL8, PPAR, LITAF) n'a montré ni interaction entre l'effet gavage et l'effet probiotique, ni effet significatif de la supplémentation (Tableau 1). En revanche, l'expression du gène LITAF est plus faible en fin de gavage. Ce gène code pour un facteur de transcription impliqué dans la réponse pro-inflammatoire en réponse à la présence de Lipopolysaccharide (LPS). La diminution de l'expression de LITAF pourrait être liée à la diminution de la réponse pro-inflammatoire durant le gavage comme observé chez l'oie (Liu et al, 2016).

2.4 Composition du microbiote intestinal

Comme décrit précédemment (Vasai et al, 2014ab), le phylum dominant au niveau de l'iléon chez les canetons est celui des *Firmicutes* (jusqu'à 98% d'abondance relative). Au sein des *Firmicutes*, les ordres dominants sont les *Clostridiales* avant le gavage, et les *Lactobacillales* en fin de gavage (figure 1). Ces résultats sont cohérents avec les précédentes observations réalisées au laboratoire (Rey et al, 2015; Vasai et al, 2014 ab).

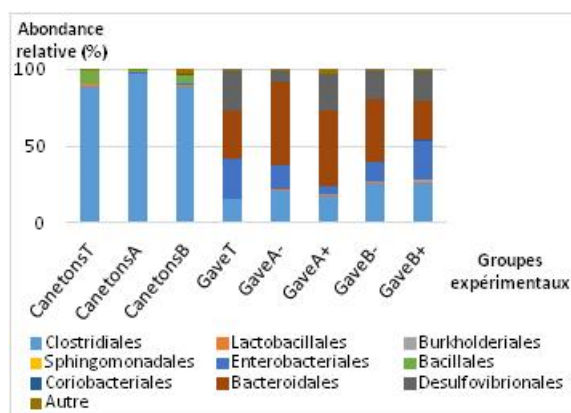
Figure 1. Abondance relative des ordres bactériens dans les iléons de canetons et de canards en fonction du groupe expérimental



Les groupes canetons correspondent aux 3 modalités du point de prélèvement 1, avant gavage. Les groupes gavés correspondent aux 5 modalités du point de prélèvement 2, après gavage

Au niveau des caeca, le phylum dominant avant gavage est celui des *Firmicutes* (jusqu'à 97% d'abondance relative), tandis qu'à la fin du gavage les phyla dominants sont ceux des *Proteobacteria*, des *Bacteroidetes* et celui des *Firmicutes* (respectivement 50, 30 et 15% d'abondance relative). L'ordre majoritaire chez les *Firmicutes* est celui des *Clostridiales* indépendamment du point de prélèvement. Après gavage, l'ordre majoritaire chez les *Proteobacteria* est celui des *Enterobacteriales*. Chez les *Bacteroidetes* l'ordre majoritaire est celui des *Bacteroidales*. Ces données sont en accord avec des études récentes (Rey et al, 2015, ; Vasai et al, 2014 ab).

Figure 2. Abondance relative au niveau des ordres bactériens dans les caeca de canetons et de canards en fonction du groupe expérimental



Les groupes Canetons correspondent aux 3 modalités du point de prélèvement 1, avant gavage. Les groupes gavés correspondent aux 5 modalités du point de prélèvement 2, après gavage

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L.V, Koh G.Y, Nagy A, Semenkovich C.F, Gordon J.I, 2004. Proc Natl Acad Sci U S A.; (44), 15718–15723
- Bokulich N.A, Subramanian S, Faith J.J, Gevers D, Gordon J.J, Knight R, Mills D.A, Caporaso J.G, 2013. Nature Methods., (10), 57–59
- Chartrin P, Bernadet M.D, Guy G, Mourot J, Hocquette J.F, Rideau N, Duclos M, Baéza E, 2006. Comparative Biochemistry and Physiology (145), 390–396
- Davail S, Rideau N, Guy G, Hoo-Paris R, 2003. Comparative Biochemistry and Physiology., (4), 707-715
- Escudie F, Auer L, Bernard M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Mariadassau M, Hernandez Raquet G, Pascal G, 2015. Conference: -Pathobiome 2015, At National Veterinary School (ENVA), Maisons-Alfort
- Jin L.Z, Ho Y.W, Abdullah N, Jalaludin S, 1998. Lett Appl Microbiol. (3):183-5.
- Liu L, Zhao X, Wang Q, Sun X, Xia L, Wang Q, Yang B, Zhang Y, Montgomery S, Meng H, Geng T, Gong D, 2016. Scientific Reports 6, Article number: 31763
- Lluch J, Servant F, Païssé S, Valle C, Valière S, Kuchly C, Vilchez G, Donnadiou C, Courtney M, Burcelin R, Amar J, Bouchez O, Lelouvier B, 2015. PLoS One 10(11): e0142334.
- Rey M, Brugirard Ricaud K, Bernadet M.D, Davail S, JRA-JRPF, 24 et 25 mars 2015, Tours
- Tavernier A, Davail S, Ricaud K, Bernadet M.D, Gontier K, 2016. Mol. Cell. Biochem., doi:10.1007/s11010-016-2850-7
- Vasai F, Brugirard Ricaud K, Bernadet M.D, Cauquil L, Bouchez O, Combes S, Davail S, 2014a. FEMS Microbiol Ecol. (1), 204-216.
- Vasai F, Brugirard Ricaud K, Cauquil L, Daniel P, Peillod C, Gontier K, Tizaoui A, Bouchez O, Combes S, Davail S, 2014b. Poult Sci. (4), 916-925.
- Yin Y, Lei F, Zhu L, Li S, Wu Z, Zhang R, Gao G.F, Zhu B, Wang X, 2010. The ISME Journal (4), 367–376
- Zhao X, Guo Y, Guo S, Tan J, 2013. Applied Microbiology and Biotechnology Vol.97, (14) 6477–64.

La supplémentation en probiotique quant à elle n'a eu que très peu d'effet sur la composition du microbiote intestinal en terme de phylum et d'ordre (données non montrées). Cependant, il est important d'étudier des niveaux taxonomiques inférieurs (Famille, Genre, Espèces, Souches) pour conclure sur la présence ou non d'éventuelles différences. Cette absence d'effet à ce jour, sur les paramètres étudiés de la supplémentation pourrait être due à une charge bactérienne insuffisante ou à un mode d'inoculation inapproprié mais nécessite néanmoins d'être approfondi (viabilité de la souche et capacité de la détecter spécifiquement dans les intestins).

CONCLUSION

L'ajout de probiotiques dès la phase de démarrage n'a pas modifié les performances zootechniques des animaux. L'étude de l'expression de gènes du métabolisme et de la réponse immunitaire chez le canard n'a également pas permis de mettre en évidence un effet significatif de la supplémentation sur l'hôte. Toutefois, dans les cas de challenge tests, ces probiotiques pourraient présenter un effet barrière ou antimicrobien intéressant dans le cadre de maîtrise de condition sanitaire dégradée.

Quant au microbiote, l'étude de sa composition en terme de phyla et d'ordres bactériens, n'a pas permis de mettre en évidence d'effet des probiotiques, mais l'étude à des niveaux taxonomiques inférieurs est nécessaire pour déterminer la présence ou non de différences.