

# Caractérisation comparée des communautés bactériennes du contenu cæcal, des cæcotrophes et des fæces dures chez le lapin adulte par CE-SSCP des gènes codant pour l'ARN16S

MICHELLAND R, COMBES S, CAUQUIL L, GIDENNE T, MONTEILS V, FORTUN-LAMOTHE L

INRA, Université de Toulouse, INPT-ENSAT, UMR 1289, TANDEM,  
BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

**Résumé** – L'objectif de cette étude est de caractériser les communautés bactériennes du contenu cæcal du lapin par CE-SSCP et de les comparer avec celles des cæcotrophes et des fæces dures (stabilité dans le temps, variabilité entre individus). Des échantillons de fæces dures et de cæcotrophes ont été prélevés pendant 5 semaines sur 14 lapins adultes tandis que des échantillons de contenu cæcal ont été prélevés la 3<sup>ème</sup> semaine par voie chirurgicale et la 5<sup>ème</sup> semaine après sacrifice. Les communautés bactériennes ont été comparées sur leur composition (analyse des profils CE-SSCP) et leur biodiversité (indice de biodiversité de Simpson modifié). En l'absence de perturbation, la communauté bactérienne du cæcum est stable au cours du temps mais présente une variabilité individuelle. En revanche, le prélèvement de contenu cæcal par voie chirurgicale perturbe la biodiversité et la structure bactériennes. Pour réaliser des études de dynamique des communautés bactériennes du cæcum, il est donc nécessaire de trouver une matrice d'échantillonnage alternative. Les indices de biodiversité des contenus cæcaux, des cæcotrophes et des fæces dures sont similaires ( $D'$ :  $3,71 \pm 0,50$ ,  $3,85 \pm 0,58$  et  $3,99 \pm 0,51$ , respectivement ; NS) ; en revanche, la composition bactérienne des cæcotrophes semble plus proche de celle du contenu cæcal que ne l'est celle des fæces dures. Les cæcotrophes peuvent donc être utilisés pour réaliser des études de dynamique des populations bactériennes du contenu cæcal.

**Abstract – Compared characterization of bacterial communities in cæcal content, soft and hard fæces of adult rabbit using CE-SSCP.** - The aim of this study was to characterize cæcal bacterial communities using CE-SSCP and to compare them with those of hard and soft fæces in terms of dynamic and individual variability. Soft and hard fæces of 14 adult rabbits were weekly sampled during 5 weeks while cæcal content were sampled on weeks 3 (surgical way) and 5 (after sacrifice). Bacterial communities were compared according to their structure (CE-SSCP profiles analysis) and diversity (modified Simpson biodiversity index). Without perturbations, cæcal bacterial ecosystem remained constant but showed individual variability. On the other hand, sampling cæcal content by surgical way modify bacterial diversity and structure. These results suggest the necessity to find an alternative and reliable type of sample to investigate dynamic studies of cæcal bacterial communities. According to bacterial community structure, soft fæces seemed closer of cæcal content than hard fæces. In contrary, diversity index of cæcal content, soft and hard fæces did not differ (diversity index :  $3,71 \pm 0,50$ ,  $3,85 \pm 0,58$  et  $3,99 \pm 0,51$ , respectively ; NS). Therefore, soft fæces could be used to investigate dynamic studies of cæcal bacterial communities.

## Introduction

Les troubles digestifs (colibacillose, entérococolite...) entraînent 12 à 18% de mortalité dans les élevages cynicoles français (Guerder, 2003). Afin de réduire ces troubles, de nouvelles recommandations d'apport en fibres ont été récemment définies (Gidenne, 2003). La dégradation de ces fibres se réalisant essentiellement par les bactéries dans le cæcum, la caractérisation de cette flore semble être une voie d'étude pertinente pour comprendre l'origine de ces troubles. Les techniques d'empreinte moléculaire comme la CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism) permettent d'avoir une image représentative et rapide des communautés bactériennes. Cette étude a pour objectif de caractériser les communautés bactériennes du cæcum du lapin par CE-SSCP : stabilité dans le temps, variabilité individuelle et représentativité de 2 matrices alternatives (fæces dures et cæcotrophes).

## 1. Matériel et Méthodes

### 1.1. Animaux et échantillonnage

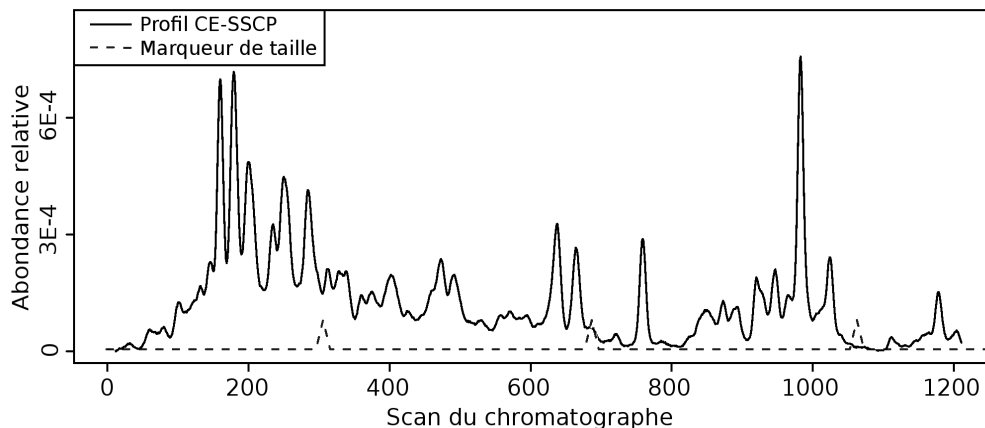
Les prélèvements ont été réalisés sur 14 lapins (Néo-

zélandais blanc x Californien, poids =  $4,2 \text{ kg} \pm 0,5$ ) âgés de 12 semaines en début d'expérimentation (semaine 0). Afin de ne pas modifier la flore cæcale, les animaux n'ont reçu aucun antibiotique ni anticoccidien et ont été nourris à volonté avec l'aliment expérimental 15 jours avant le début des prélèvements. L'aliment a été formulé pour répondre aux besoins nutritionnels du lapereau en fin de croissance (2378 Kcal/kg d'ED ; 18 % de PB ; 2,0 % de MG ; 14,2 % de CB ; 19,4 % d'amidon ; 16,5% d'ADF). Trois matrices ont été prélevées : i) du contenu cæcal en semaines 3 et 5, ii) des cæcotrophes en semaines 1, 2, 3, 4 et 5, iii) des fæces dures en semaines 1, 2, 3, 4 et 5. Les prélèvements de fæces dures et de cæcotrophes ont eu lieu une fois par semaine. L'accès à la matrice cæcale a été réalisée par voie chirurgicale en semaine 3 et après sacrifice des animaux en semaine 5.

### 1.2. Extraction d'ADN et amplification PCR

L'ADN total contenu dans chaque échantillon a été extrait avec le kit QIAamp® DNA Stool Mini kit (QIAGEN). L'amplification par PCR de la région V3 des gènes bactériens codant pour l'ARNr 16S a été

**Figure 1 :** Exemple d'un profil SSCP réalisé à partir d'un cæcotrophe. La communauté bactérienne de l'échantillon correspond à la courbe noire tandis que la courbe grise correspond au marqueur de taille utilisé pour l'alignement des différents profils



réalisée avec les amorces W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG) et W104\* (TTACCGCGGCTGCTGGCAC). L'amorce W104 est marquée par un fluorochrome 6-Fam. L'amplification PCR a été réalisée dans un volume total de 50  $\mu$ l (38,25  $\mu$ l d'eau PPI, 5  $\mu$ l de tampon PfuUltra™ II Fusion, 2,5  $\mu$ l de B.S.A., 1  $\mu$ l de mix dNTP, 1  $\mu$ l de chaque amorce, 0,25  $\mu$ l de Taq PfuUltra™ II Fusion, 1  $\mu$ l d'extrait d'ADN dilué au 1/200<sup>ème</sup>) durant 30 cycles (94°C pendant 30', 61°C pendant 30', 72°C pendant 30').

### 1.3. CE-SSCP et traitement des profils

L'analyse CE-SSCP est basée sur la migration différentielle des séquences d'ADN monocaténares dans un gel non dénaturant lors d'une électrophorèse capillaire (Orita *et al.*, 1989). La migration est en relation avec la conformation tridimensionnelle de l'ADN monocaténaire, elle-même liée à sa séquence en nucléotide et à sa taille. Pour chaque échantillon, on obtient un chromatogramme des communautés bactériennes d'une résolution de 1200 points (figure 1). La grande richesse d'espèces bactériennes présente dans les matrices de prélèvement provoque des co-migrations de ribotypes appartenant à des espèces différentes. De ce fait, chaque pic correspond à un assemblage de ribotypes ayant des mobilités électrophorétiques proches (Loisel *et al.*, 2006). Un marqueur de taille utilisant un fluorochrome différent (5-Rox) est ajouté à chaque échantillon et permet ainsi la comparaison des profils entre eux. Les produits PCR (1  $\mu$ l) ont été ajoutés à 7,8  $\mu$ l de formamide désionisée (Genescan, Applied Biosystem) et 0,2  $\mu$ l de marqueur de taille (Genescan-HD400). Les amplicons présents dans le mix ont été dénaturés pendant 5 min à 94°C et placés directement dans la glace pendant 5 min. L'électrophorèse capillaire et la détection laser des produits de migration ont été réalisés dans un capillaire de 36 cm avec un séquenceur ABI 3100. La correction de l'alignement et la normalisation des profils ont été réalisées avec le script Safum dans Matlab® (Zemb *et al.*, 2007). La normalisation a été réalisée telle que

l'aire totale sous la courbe du profil CE-SSCP soit égale à 1.

### 1.4. Analyses statistiques

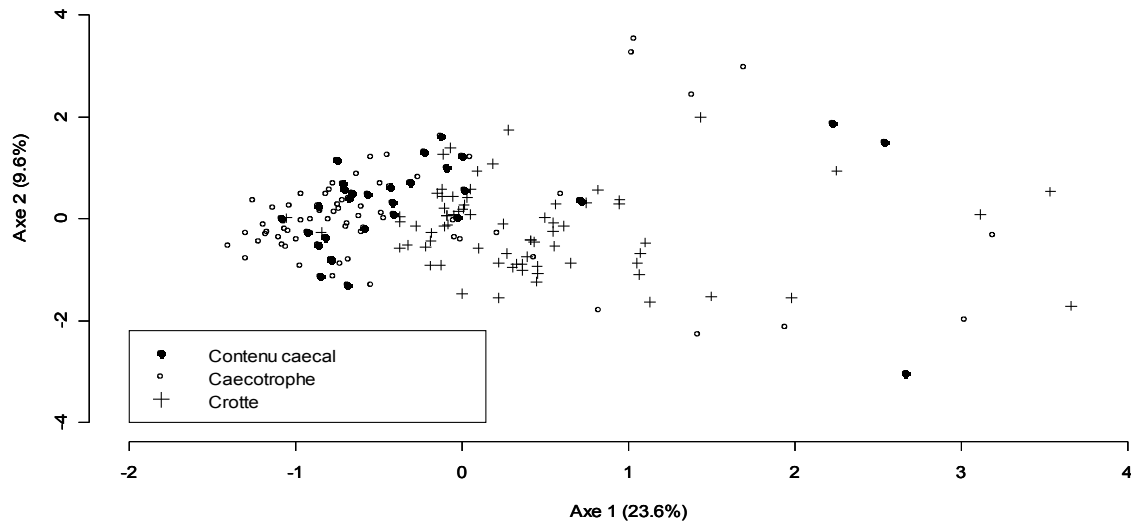
Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (<http://www.r-project.org/>). Les profils CE-SSCP bruts ont été comparés 2 à 2 en distance euclidienne pour être analysés par non-Metric Multidimensional Scaling (nMDS) et analyse de similarité (ANOSIM). L'ANOSIM teste le degré (R statistic) de différence entre deux groupes de CE-SSCP profiles et la significativité de R (P). Quand P est significatif, plus R est proche de 1 plus les groupes sont séparés. Pour chaque profil CE-SSCP, nous avons calculé avec le script Safum dans Matlab®, un indice de biodiversité de Simpson adapté aux données issus des fingerprints (D', Haegeman *et al.*, 2007). Une analyse de variance a été réalisée sur cet indice avec un modèle comprenant l'individu, le type de matrice d'échantillonnage et la semaine de prélèvement de l'échantillon comme effets fixes, ainsi que leurs interactions deux à deux. Lorsque le test était significatif, les distributions ont été comparées entre elles à l'aide du test HSD de Tukey.

## 2. Résultats

### 2.1. Etude de la composition des communautés bactériennes

Le nMDS (figure 2) et l'ANOSIM montrent un regroupement significatif mais peu séparé des profils CE-SSCP selon la matrice d'échantillonnage et l'effet chirurgie (R=0,16 et 0,29 respectivement; P<0,05). Les profils CE-SSCP du contenu cæcal sont statistiquement plus proches de ceux des cæcotrophes que de ceux des fèces dures (R=0,13, 0,24 pour contenu cæcal respectivement contre cæcotrophes et fèces dures; P<0,05). Les profils CE-SSCP ne diffèrent pas significativement entre semaines avant (S1, S2, S3; P=NS) ou après (S4, S5; P=NS) l'opération chirurgicale. La variabilité individuelle est faible mais significative (R=0,19; P<0,001), seul le lapin 1 se différenciant des autres animaux (P<0,001).

**Figure 2** : Analyse factorielle des correspondances des profils SSCP par matrice d'échantillonnage



**2.2. Etude de la biodiversité des communautés bactériennes**

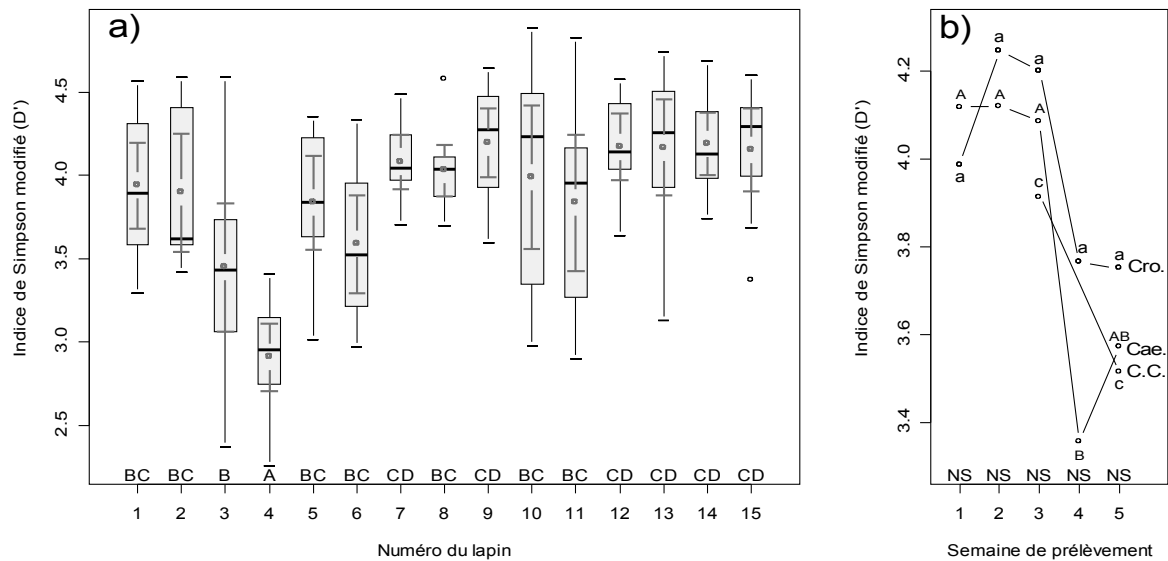
Toutes matrices confondues, l'indice de biodiversité D' des communautés bactériennes du lapin est de  $3,96 \pm 0,48$ . Néanmoins, la biodiversité des populations bactériennes est variable en fonction des individus (figure 3a ;  $P < 0,001$ ). Ainsi, par exemple, le D' du lapin 3 est plus faible que celui des autres animaux ( $P < 0,05$ ).

La figure 3b montre que l'indice de biodiversité D' est stable au cours des 3 premières semaines de

prélèvement ( $4,18 \pm 0,38$ ). Ensuite, D' chute de façon importante entre les semaines 3 et 4 suite à l'intervention chirurgicale ( $-13\%$  ;  $P < 0,05$ ) puis augmente légèrement de la semaine 4 à la semaine 5 ( $+0,21\%$  ; NS).

La biodiversité D' des populations bactériennes des contenus cœcaux, des caecotrophes et des fèces dures est similaire ( $3.75 \pm 0.49$ ,  $3.94 \pm 0.53$  et  $4.08 \pm 0.4$  respectivement; NS). Nous n'observons pas d'interaction significative entre les effets matrice et semaine.

**Figure 3** : Boîte à moustache et moyenne de l'indice modifié de Simpson D' par lapin a), Moyenne de l'indice modifié de Simpson D' par semaine et par matrice d'échantillonnage b). CC. : contenu cœcal ; Cae : caecotrophes ; Cro : fèces dures ; NS : différence non significative entre matrices d'échantillonnage au seuil  $P < 0,05$ . Pour une même matrice, les moyennes affectées d'une lettre identique ne diffèrent pas au seuil de  $P < 0.05$  (A, B pour les caecotrophes ; a pour les fèces dures ; c pour le contenu cœcal).



### 3. Discussion

La variabilité individuelle observée sur la composition et la biodiversité des communautés bactériennes a déjà été montrée chez l'homme (Eckburg *et al.*, 2005). Ces résultats montrent qu'il sera nécessaire d'utiliser un effectif de lapins suffisant (10 à 20 par groupe) lors des études portant sur les facteurs de variation des communautés bactériennes cœcales.

La stabilité de la diversité et de la composition dans les 3 semaines qui précèdent la chirurgie (semaines 1 à 3) montre que dans nos conditions (lapins adultes, alimentation stable) et en l'absence de perturbation induite, les communautés bactériennes du cæcum sont stables. Ces résultats permettent d'envisager des études de dynamique des communautés bactériennes suite à des perturbations (perturbation nutritionnelle, sanitaire).

Nos résultats montrent qu'un prélèvement de contenu cæcal par voie chirurgicale induit une forte perturbation de la diversité et de la composition des communautés bactériennes. Le contenu cæcal n'étant accessible que par voie chirurgicale (prélèvement isolé ou canulation) ou suite à l'abattage, cette matrice ne peut donc pas être retenue pour des études de dynamique à court terme. Il serait intéressant de mesurer la durée nécessaire pour que l'écosystème cæcal retrouve une composition et une biodiversité bactérienne similaire à celle observée avant l'acte chirurgical. De plus, nos résultats suggèrent que la composition et la biodiversité des communautés bactériennes présentes dans le contenu cæcal et les cæcotrophes sont relativement proches et qu'elles évoluent de la même façon suite à une perturbation (ici la chirurgie). Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation des cæcotrophes comme matrice alternative pour l'étude des communautés bactériennes du cæcum. Cette proximité entre l'écosystème cæcal et les cæcotrophes est en accord avec la physiologie digestive du lapin et la composition chimique de ces deux matrices (Carabano et Piquer, 1998). En effet, les cæcotrophes correspondent au contenu cæcal peu modifié et excréte après un transit simple dans le côlon. De ce fait, leur composition chimique est très proche de celle du contenu cæcal. En revanche, les fèces dures contiennent une proportion plus élevée de particules grossières que le contenu cæcal, du fait d'un processus de tri lors du transit dans le côlon proximal

(Björnhag, 1972). Cela peut expliquer l'écart plus important sur la diversité et la composition des communautés bactériennes entre le contenu cæcal et les fèces dures.

### Conclusion

En l'absence de perturbation, les communautés bactériennes du cæcum du lapin sont relativement stables au cours du temps. Ces résultats permettent d'envisager des études de dynamique des populations bactériennes cœcales. Toutefois, l'accès au cæcum est difficile et un prélèvement réalisé par voie chirurgicale perturbe fortement les communautés bactériennes. En revanche, les cæcotrophes, dont l'accès est aisé présentent une bonne similarité de composition et de diversité avec le contenu cæcal et peuvent donc être utilisés pour les études de dynamique des populations bactériennes du contenu cæcal.

### Références

- BJÖRNHAG G., 1972. Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swed. J. Agric. Res.*, 2, 125-136.
- CARABANO R., PIQUER J., 1998. The digestive system of the rabbit. *The nutrition of the rabbit*, CABI Publishing 1:16
- DIGBY G.N., KEMPTON R.A., 1987. Multivariate Analysis of Ecological Communities. *Population and Community Biology Series* (London).
- ECKBURG P.B., BIK E.M., BERNSTEIN C.N., PURDOM E., DETHLEFSEN L., SARGENT M., GILL S.R., NELSON K.E., RELMAN D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308:1635-1638.
- GIDENNE T., 2003. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livest. Prod. Sci.*, 81: 105-117.
- GUERDER F., 2003. Bilan du réseau national de gestion technique de performances. *Cuniculture*, 29: 150-155.
- HAEGEMAN B., GODON J. J., SEN B., HAMELIN J., 2007. Measuring of microbial diversity using fingerprints. *Soumis*.
- LOISEL P., HARMAND J., ZEMB O., LATRILLE E., LOBRY C., DELGENÈS J.P., GODON J.J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8: 720-731.
- ORITA M., SUZUKI Y., SEKIYA T., HAYASHI K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5:874-879.
- Zemb O., Haegeman B., Vanpeteghem D., Harmand J., Lebaron P., Godon J.J., 2007. SAFUM : Statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular ecology notes*.