

Microbiote intestinal chez le porc : paramètres génétiques de sa composition et liens avec des caractères immunitaires

Jordi ESTELLE (1), Catherine LARZUL (2), Núria MACH (1), Florence LEVENEZ (3), Yulixaxis RAMAYO-CALDAS (1), François MEURENS (4), Marie-José MERCAT (5), Gaëtan LEMONNIER (1), Catherine DENIS (1), Yvon BILLON (6), Isabelle OSWALD (7), Joël DORE (3), Mustapha BERRI (4), Patricia LEPAGE (3), Claire ROGEL-GAILLARD (1)

(1) INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Jouy-en-Josas, France

(2) INRA, UMR1388 GenPhySE, Toulouse, France

(3) INRA, UMR1319 MICALIS, Jouy-en-Josas, France

(4) INRA, UMR1282 ISP, Nouzilly, France

(5) IFIP - Institut du Porc / BIOPORC, 35651 Le Rheu, France

(6) INRA, UE967 GENESI, Le Magneraud, France

(7) INRA, UMR1331 Toxicologie Alimentaire, Toulouse, France

Jordi.estelle@jouy.inra.fr

Avec l'appui financier de l'Agence Nationale de La Recherche (projet SUS FLORA, ANR-10-GENM-016, Génomique 2010), et l'appui technique des unités partenaires et de l'équipe GENESI en charge de l'expérimentation porcine.

Microbiote intestinal chez le porc : paramètres génétiques de sa composition et liens avec des caractères immunitaires

L'objectif de cette étude est d'estimer les paramètres génétiques de la composition du microbiote intestinal chez le porc Large White et d'étudier les covariations entre cette composition et des paramètres immunitaires et de croissance. Dans le cadre du projet Sus-Flora, nous avons caractérisé la diversité du microbiote fécal pour 518 porcelets âgés de 60 jours, par séquençage d'une région variable du gène bactérien codant l'ARNr 16S. Nos premiers résultats ont mis en évidence une prédominance des genres bactériens *Prevotella* puis *Oscillibacter*, *Dialister*, *Roseburia* et *Treponema*. Des valeurs d'héritabilité comprises entre $0,13 \pm 0,08$ et $0,55 \pm 0,16$ ont été estimées pour l'abondance relative de 19 genres bactériens parmi les plus fréquents, démontrant ainsi une part génétique significative de la composition du microbiote intestinal chez le porc. Des corrélations génétiques positives et négatives sont identifiées entre abondances des taxons bactériens. Des covariations positives et négatives ont été trouvées entre des paramètres de formule sanguine (taux de monocytes, éosinophiles, plaquettes) et l'abondance des genres *Prevotella*, *Roseburia*, *Dialister*. Nous montrons également, pour un sous-groupe de 31 animaux, que la composition du microbiote intestinal se stabilise après 36 jours d'âge et que les animaux se séparent en deux groupes sur la base de la composition de leur microbiote intestinal, évoquant les entérotypes identifiés chez l'homme. Ces deux groupes, dominés par le genre *Prevotella* ou les Ruminococcaceae, sont retrouvés à 60 jours d'âge, avec la cohorte des 518 porcelets.

Pig gut microbiota: genetic parameters and links with immunity traits of the host

Our objectives were to estimate genetic parameters of the gut microbiota composition in French Large White pigs, and to uncover co-variations between the abundances of microbial communities and immunity or growth parameters of the host. In the framework of the Sus-Flora project, we characterized the diversity of the faecal microbiota of 518 60 day-old piglets by sequencing a variable region of the ribosomal 16S gene. Our first results have shown that the genera *Prevotella*, followed by *Oscillibacter*, *Dialister*, *Roseburia* or *Treponema* are dominant in the porcine faecal microbiota. Heritability values ranging from 0.13 ± 0.08 to 0.55 ± 0.16 were estimated for the relative abundance of 19 of the most common bacterial genera, highlighting the contribution of the host genome to the shaping of the gut microbial ecosystem. Regularized canonical correlations and sparse Partial Least Squares analyses highlighted both positive and negative correlations between immunity traits (e.g. monocytes, eosinophils, platelets) and genera such as *Prevotella*, *Roseburia* and *Dialister*. The establishment of microbial diversity in the gut was assessed by following a subset of 31 piglets at 14, 36, 48, 60 and 70 days of age. We showed that the gut microbiota composition was stabilized after 36 days of age. In addition, a stratification of the 31 piglets in two groups was observed after weaning, suggesting the existence of enterotypes as observed in humans. These two enterotype-like clusters were primarily distinguished by the levels of unclassified Ruminococcaceae and *Prevotella*, respectively. These two enterotype-like clusters were also found in the cohort of 518 60 day-old piglets.

INTRODUCTION

La robustesse est un caractère global ambitieux dans son concept. En élevage, un animal robuste sera celui qui résiste aux variations d'environnement (alimentation, pression sanitaire, conditions d'élevage), sans perdre sa capacité de production liée aux objectifs visés. La robustesse peut être considérée comme la résultante d'une combinatoire complexe entre des caractères d'efficacité alimentaire, de santé (résistance aux agents pathogènes, bonne réponse à la vaccination), de résilience face aux changements de comportement, et de bien-être. De fait, l'ensemble des rôles joués par le microbiote digestif (Sommer et Bäckhed, 2013) suggère un lien avec les principales fonctions à étudier pour améliorer la robustesse des animaux en élevage (Figure 1 ; Calenge *et al.*, 2014), d'où le démarrage d'études d'envergure sur le sujet, en complément de mesures zootechniques

individuelles de plus en plus fines. Le microbiote est ainsi considéré comme un acteur important de la variabilité individuelle, à explorer.

Les recherches en cours chez le porc ont pour objectifs d'analyser les relations entre les variations de composition du microbiote digestif et la capacité immunitaire de l'hôte ou l'efficacité alimentaire, d'étudier les interrelations entre la composition du microbiote et la capacité adaptative des animaux lors des périodes de transition comme le sevrage, les changements d'environnement ou d'alimentation.

Nous présentons ici les résultats du projet SUS-FLORA (ANR Génomique 2011-2014), qui a pour but d'analyser la contribution du microbiote intestinal à l'homéostasie du système immunitaire chez le porc, par des approches génétiques et génomiques.

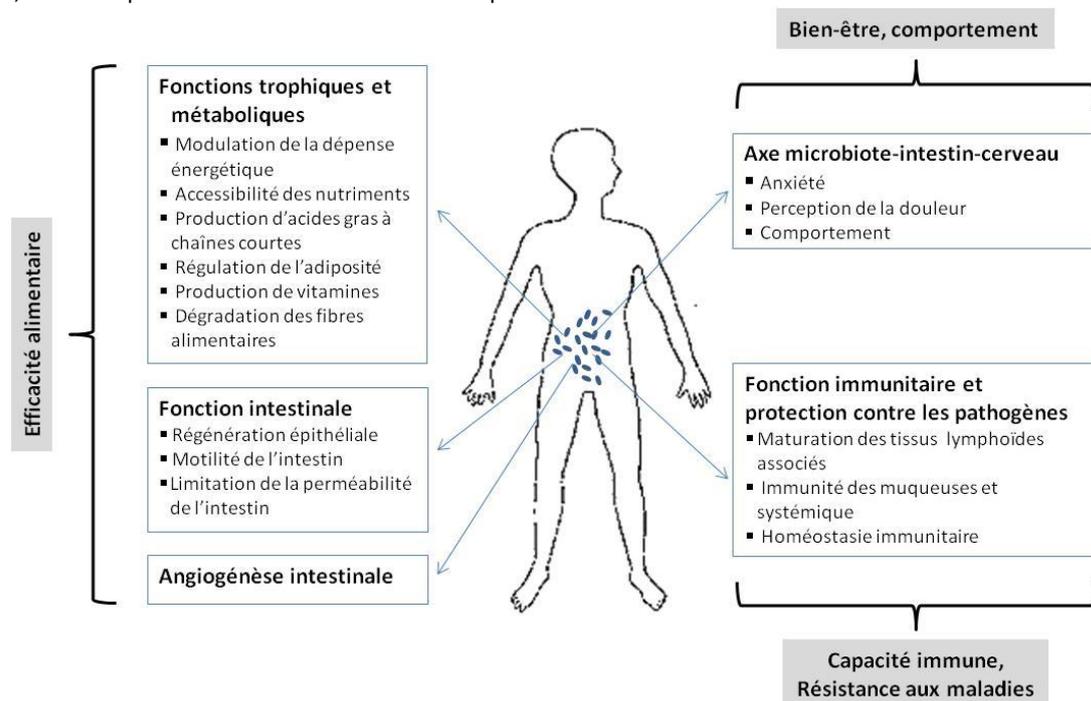


Figure 1 - Multiples fonctions du microbiote intestinal trouvées chez l'homme et leurs correspondances avec des objectifs de sélection en élevage, actuels ou futurs, encadrés en gris (adapté de Rogel-Gaillard, 2014).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et prélèvements

Quatre-vingt-dix familles de porcs Large White ont été produites dans l'unité expérimentale INRA GENESI au Magneraud (17700 Surgères), et six descendants par famille ont été étudiés. Les porcelets ont été allaités par leur mère (les animaux adoptés ont été exclus du protocole) et ont eu accès à de l'aliment solide avant sevrage. Les porcelets ont été sevrés à 28 jours d'âge et vaccinés contre *Mycoplasma hyopneumoniae* à 35 jours (vaccin Stellamune, Pfizer), avec rappel de vaccination à 42 jours.

Des échantillons sanguins, pour le phénotypage de paramètres immuns (Flori *et al.*, 2010), et des fèces, pour la caractérisation du microbiote intestinal, ont été prélevés chez tous les animaux à 60 jours d'âge. Un sous-groupe de 36 animaux a été suivi de la naissance à 70 jours d'âge, avec des prélèvements de fèces à 14, 36, 48, 60 et 70 jours, afin de suivre la mise en

place progressive du microbiote chez le jeune (Figure 2). Pour ce sous-groupe d'animaux, les fèces des mères ont été prélevées en même temps que celles de leurs porcelets à 14 jours d'âge. Le contenu luminal du côlon a été prélevé à 70 jours d'âge chez les animaux abattus (Mach *et al.*, 2015). Dans les analyses présentées ici sont inclus 518 porcelets de 60 jours d'âge, dont un sous-groupe de 31 individus sur les 36 suivis de la naissance à 70 jours.

Sont présentées ici les analyses réalisées avec le taux d'immunoglobulines A (IgA) lumenales dosées par ELISA à partir de prélèvements de liquide dans le colon (Mach *et al.*, 2015), et douze paramètres issus d'une numération-formule sanguine réalisée par un laboratoire d'analyses médicales (VT-BIO, Secondigny, Deux-Sèvres) : le nombre total de leucocytes, de lymphocytes, de monocytes, de neutrophiles, d'éosinophiles, d'érythrocytes, les taux de plaquettes, de globules rouges, d'hémoglobine, l'hématocrite, le volume globulaire moyen, la concentration et la teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine.

Les fèces, prélevées à la source pour chaque animal, ont été collectées dans des cryotubes, congelées dans de l'azote liquide, et conservées ensuite à -80°C avant extraction d'ADN.

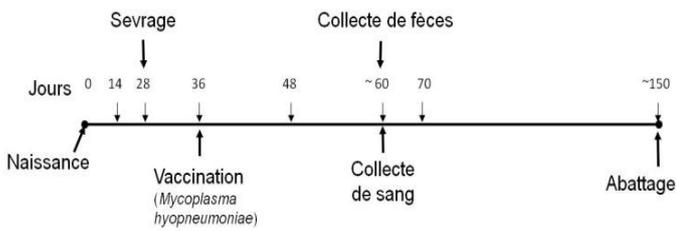


Figure 2 – Protocole de prélèvement des animaux. Du sang et des fèces ont été prélevés sur tous les animaux à 60 jours d'âge. Un sous-groupe a été prélevé pour des fèces à 14, 28, 38, 48, 60 et 70 jours d'âge (abattage).

1.2. Analyse de la diversité microbienne

La diversité microbienne de l'ADN fécal a été établie par séquençage de la région variable v3-v4 du gène bactérien qui code l'ARNr 16S (pyroséquençage 454). L'ensemble des méthodes, basées sur celles utilisées chez l'homme, est décrit dans Mach *et al.* (2015).

1.3. Stratification des animaux selon la composition de leur microbiote

L'analyse de regroupement ou « *clustering* » des animaux pour l'identification d'entérotypes a été réalisée selon la procédure décrite chez l'homme par Arumugam *et al.* (2011). Les analyses statistiques ont été conduites avec le logiciel R (www.r-project.org) et le package « *vegan* » (Oksanen *et al.* 2015).

1.4. Calcul d'héritabilité

Les calculs d'héritabilité de la composition du microbiote ont été réalisés en utilisant comme information de composition du microbiote les abondances relatives des genres bactériens, exprimées en pourcentage, avec une transformation racine carrée. Le modèle d'analyse est un modèle linéaire incluant le poids à 21 jours, le sexe, la bande, la loge de post sevrage pour les effets fixes, et la portée en effet aléatoire. Les effets génétiques ont été estimés avec le logiciel VCE6 (Groeneveld *et al.*, 2010).

1.5. Analyse des covariations entre abondance des genres bactériens et caractères immunitaires ou de croissance

Afin de mettre en évidence des relations entre composition du microbiote et phénotypes de l'hôte, des analyses multivariées ont été réalisées par une approche rCCA (Analyse canonique régularisée), avec le package *mixOmics* (Lê Cao *et al.*, 2009) sous R.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Dynamique de diversification et de stabilisation du microbiote intestinal entre la naissance et 70 jours

Les résultats, basés sur l'exploitation de l'information des genres bactériens, mettent en évidence une nette séparation entre les porcelets avant sevrage à 14 jours d'âge, et les porcelets après sevrage (36 à 70 jours d'âge). Cette distribution reflète la forte diversification du microbiote suite au démarrage de l'alimentation solide. Le groupe des mères se détache de celui des porcelets après 36 jours d'âge, ce qui suggère une maturation supplémentaire du microbiote chez les truies par rapport à celui des porcelets de 70 jours d'âge.

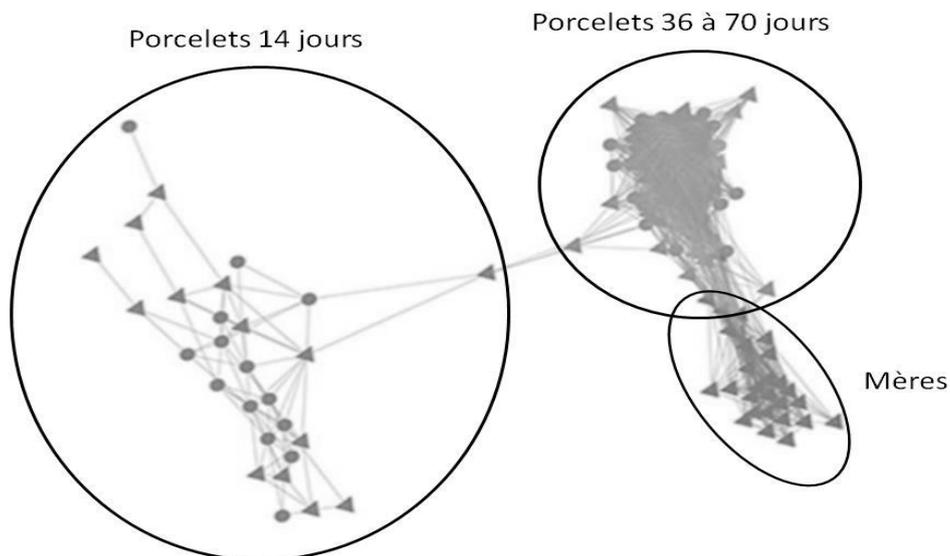


Figure 3 - Distribution des porcelets et des mères sur la base de la composition en genres bactériens de leur microbiote fécal (deux individus sont connectés si la distance de Jaccard entre eux est inférieure à 0,70). La distance de Jaccard mesure la dissimilarité entre des ensembles. Elle est calculée par soustraction de 1 à l'indice de Jaccard, qui est le rapport entre l'intersection des ensembles et l'union des ensembles. La distance de Jaccard est utilisée ici pour comparer les microbiomes des animaux. Les mâles sont représentés par des ronds et les femelles par des triangles (adapté de Mach *et al.*, 2015).

Les groupes bactériens les plus abondants avant sevrage (14j d'âge) sont les genres *Bacteroides*, suivis par *Ruminococcus*, *Oscillibacter*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Butyricimonas*, *Escherichia*, *Shigella*. Après le sevrage, le genre *Prevotella* devient largement dominant, et apparaissent également les genres *Acetivibrio*, *Dialister*, *Oribacterium* et *Succinivibrio*.

Les genres *Butyricimonas*, *Shigella* et *Escherichia* deviennent à peine détectables dans nos conditions d'analyse. Les dominances après sevrage, identifiées avec ce groupe de 31 porcelets, ont été confirmées avec les 518 individus analysés à 60 jours d'âge (Ramayo-Caldas *et al.*, soumis).

2.2. Stratification des animaux en deux sous-groupes sur la base de la composition de leur microbiote intestinal : existence d'entérotypes chez le porc ?

Les analyses de regroupement ont montré que les 31 animaux se subdivisent en deux groupes (A et B) après 36 jours d'âge et la proportion de bactéries du genre *Prevotella* est prédictive de l'appartenance à l'un ou l'autre groupe (Mach *et al.*, 2015). Les animaux du groupe A ont un microbiote enrichi en bactéries du genre *Ruminococcus* et le groupe B en bactéries du genre *Prevotella* (>30%). Ces deux groupes ont été aussi observés dans la cohorte de 518 individus à 60 jours d'âge (Figure 4), avec comme genres bactériens supplémentaires spécifiques, *Treponema* pour le groupe A et *Mitsuokella* pour le groupe B.

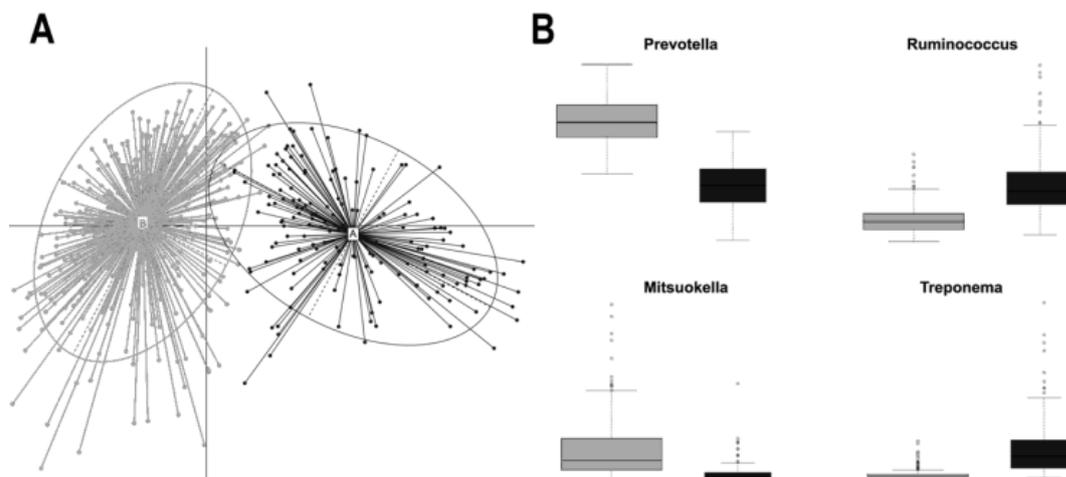


Figure 4 – A : distribution des 518 animaux en deux groupes ou entérotypes (A en noir ou B en gris) en fonction de leur microbiote fécal. B : abondances relatives des principaux genres bactériens qui caractérisent le microbiote fécal de chacun des groupes d'animaux (Ramayo-Caldas *et al.*, soumis)

Ces groupes A et B évoquent les entérotypes identifiés chez l'homme (Arumugam *et al.*, 2011). Dans notre expérience, les conditions d'élevage sont identiques pour tous les individus. Nos résultats devraient renforcer le concept d'entérotipe, encore controversé chez l'homme, chez qui les conditions de vie ne peuvent être contrôlées pareillement.

2.3. Une héritabilité significative de la composition du microbiote intestinal

L'héritabilité de l'abondance relative des genres bactériens a été estimée avec la cohorte des 518 porcelets à 60 jours d'âge. Nos résultats (Tableau 1) mettent en évidence des valeurs d'héritabilité significatives des abondances relatives pour les genres bactériens *Ruminococcus* ($h^2=0,55\pm 0,16$), *Prevotella* ($h^2=0,37\pm 0,27$), *Campylobacter* ($h^2=0,34\pm 0,10$), *Treponema* ($h^2=0,29\pm 0,03$) et *Blautia* ($h^2=0,24\pm 0,09$).

Les animaux étant répartis en deux groupes A et B de prédominance *Ruminococcus* (groupe A, 30% des porcelets) ou *Prevotella* (groupe B, 70% des porcelets), l'héritabilité de l'appartenance à l'un de ces deux sous-groupes a également été estimée. La valeur estimée de l'héritabilité est de $h^2=0,31\pm 0,10$, ce qui indique une héritabilité modérée pour l'appartenance à un groupe/entérotipe A ou B.

Tableau 1. Estimation de l'héritabilité (h^2) et de l'erreur standard pour les abondances relatives des communautés bactériennes à l'échelle des genres.

Genre bactérien ¹	h^2	std h^2
<i>Ruminococcus</i>	0,55	0,16
<i>Prevotella</i>	0,37	0,27
<i>Campylobacter</i>	0,34	0,10
<i>Dorea</i>	0,31	0,23
<i>Treponema</i>	0,29	0,03
<i>Anaerovibrio</i>	0,26	0,17
<i>Faecalibacterium</i>	0,25	0,28
<i>Blautia</i>	0,24	0,09
<i>Parabacteroides</i>	0,22	0,30
<i>Lactobacillus</i>	0,18	0,23
<i>Catenibacterium</i>	0,16	0,08
<i>Peptococcus</i>	0,14	0,08
<i>Fibrobacter</i>	0,14	0,43
<i>Helicobacter</i>	0,13	0,08
<i>Streptococcus</i>	0,13	0,10
<i>Anaerostipes</i>	0,13	0,08

¹ Les genres bactériens identifiés comme caractéristiques des entérotypes sont en caractères gras.

2.4. Covariations entre paramètres de composition du microbiote intestinal et paramètres immunitaires ou de production

Nous avons mis en évidence des relations entre l'appartenance à un groupe ou entérotype après 36 jours d'âge et, d'une part, le taux d'IgA luminal du côlon et, d'autre part, le poids avant et après sevrage (Mach *et al.*, 2015, Ramayo-Caldas *et al.* soumis). Les animaux du groupe A (*Prevotella*) sont plus lourds avant sevrage mais ont une croissance post sevrage plus faible que les animaux du groupe B (*Ruminococcus*) qui sont in fine plus lourds après 48 jours d'âge (Figure 5).

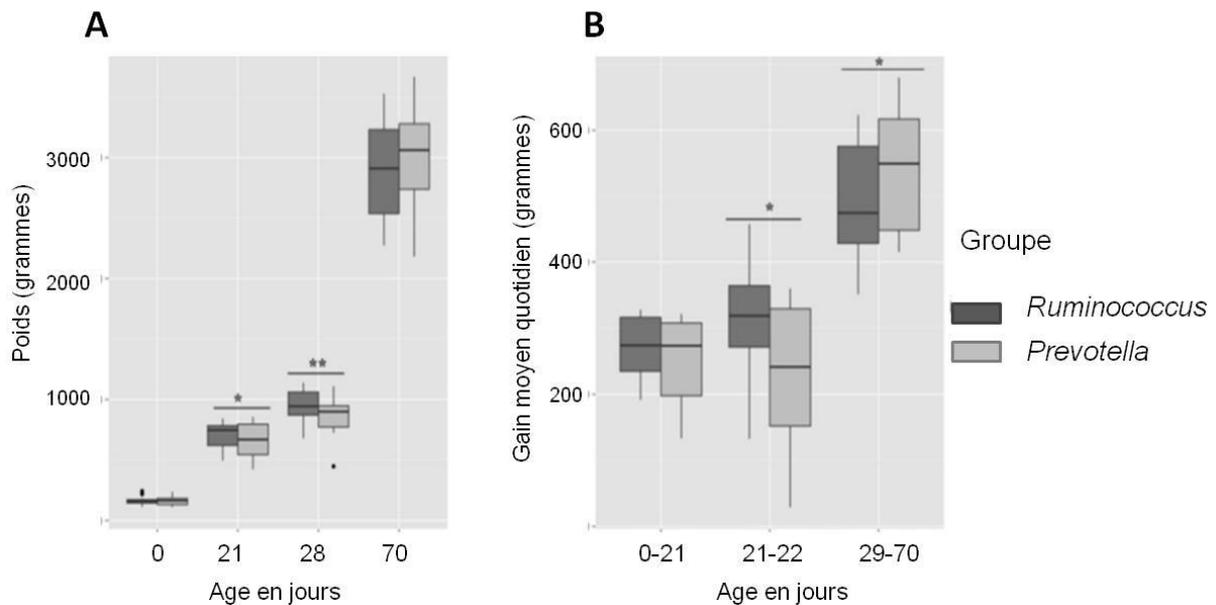


Figure 5 - Effet de l'appartenance aux groupes dominés par *Ruminococcus* ou *Prevotella*, respectivement, sur les paramètres de croissance estimés chez 31 individus (Mach *et al.* 2015). **A** : poids ; **B** : gain moyen quotidien.

CONCLUSION

Nos résultats mettent en évidence des liens entre la composition du microbiote fécal et des paramètres immunitaires ou de production. Nous montrons, ainsi, des corrélations positives entre l'appartenance à l'entérotype caractérisé par le genre *Prevotella* et, d'une part, la croissance avant 70 jours et, d'autre part, le taux d'IgA dans la lumière du côlon. Les IgA secrétées dans la lumière intestinale sont intimement liées au développement du microbiote. Elles pourraient se lier aux bactéries et contribuer à maintenir un état non inflammatoire des interactions entre l'hôte et ses communautés bactériennes, favorisant ainsi la symbiose et la mise en place de l'homéostasie (Palm *et al.*, 2014). Nos résultats suggèrent donc un rôle plutôt favorable de l'entérotype caractérisé par le genre *Prevotella*.

Identifier des microbiotes qui favorisent robustesse et production en élevage porcin, et trouver les leviers qui permettent de les orienter, représentent des voies prometteuses d'innovation en élevage. Alors qu'il est bien admis et démontré que la nutrition et l'environnement influencent la composition du microbiote intestinal, nous apportons des éléments qui indiquent que la génétique de l'hôte joue également un rôle significatif dans la composition de l'écosystème digestif, par l'estimation de l'héritabilité de l'abondance relative des genres bactériens.

Les analyses statistiques multivariées, basées sur l'analyse canonique régularisée (rCCA), ont mis en évidence des corrélations canoniques positives entre les genres bactériens appartenant au phylum des Firmicutes (*e.g. Ruminococcus, Roseburia, Clostridium*) et les taux de monocytes et plaquettes, ainsi que des corrélations négatives entre ces mêmes genres bactériens et les taux d'éosinophiles et d'hémoglobine dans le sang (Estellé *et al.*, 2014).

En revanche, les genres bactériens appartenant au phylum des Bacteroidetes (*e.g. Prevotella, Mitsuokella*) présentent des corrélations canoniques inverses de celles observées pour les Firmicutes par rapport aux mêmes paramètres immunitaires.

Le phénotype d'un individu est schématiquement considéré comme la résultante d'effets liés à la génétique de l'hôte, à son environnement et aux interactions entre les deux. On peut y ajouter les effets liés aux mécanismes épigénétiques, de plus en plus étudiés pour comprendre le façonnage des phénotypes. Les travaux récents sur le microbiote digestif, dont les nôtres, mettent en évidence la pertinence de considérer également les effets de ses variations de composition pour caractériser les phénotypes animaux. Les progrès technologiques permettent désormais d'envisager la prise en compte des informations de métagénomique dans les équations de prédiction des phénotypes. L'hôte et son microbiote sont en interaction continue et leurs génomes également. Émerge le concept d'hologobionte, qui englobe l'hôte et ses communautés microbiennes symbiotiques qui ont co-évolué au fil du temps (Guerrero *et al.*, 2013 ; Salvucci 2014), avec la notion d'hologénome qui intègre le génome de l'hôte et son métagénome (Rosenberg *et al.*, 2009).

Si la caractérisation du microbiote intestinal est amenée à se développer en routine sur de grandes populations, il faudra concevoir des outils diagnostics performants et peu coûteux, à l'image des outils de génotypage qui renseignent sur la variabilité du génome de l'hôte. De plus, identifier les moyens d'orienter de manière durable le microbiote intestinal tout au long de la vie des animaux pour répondre aux objectifs en

élevage est un enjeu qui nécessitera un travail collaboratif conséquent entre généticiens, zootechniciens, vétérinaires, immunologistes, physiologistes, microbiologistes et spécialistes de la formulation des aliments.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arumugam *et al.* 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174–180.
- Calenge F., Martin C., Le Floch N., Phocas F., Morgavi D., Rogel-Gaillard C., Quéré P. 2014. Intégrer la caractérisation du microbiote digestif dans le phénotypage de l'animal de rente : vers un nouvel outil de maîtrise de la santé en élevage ? *INRA Prod. Anim.*, 27, 209-222.
- Estellé J., Mach N., Ramayo-Caldas Y., Levenez F., Lemonnier G., Denis C., Doré J., Larzul C., Lepage P., Rogel-Gaillard C., SUS FLORA consortium. 2014. The influence of host's genetics on the gut microbiota composition in pigs and its links with immunity traits. *In: Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production.*
- Flori L., Gao Y., Laloë D., Lemonnier G., Leplat J.J., Teillaud A., Cossalter A.M., Laffitte J., Pinton P., de Vaureix C., Bouffaud M., Mercat M.J., Lefèvre F., Oswald I.P., Bidanel J.P., Rogel-Gaillard C., 2011. Immunity Traits in Pigs: Substantial Genetic Variation and Limited Covariation. *Plos One*, 6, 7.
- Guerrero R., Margulis L., Berlanga M. 2013. Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int. Microbiol.*, 16, 133-43.
- Groeneveld E., Kovac M., Mielenz N. 2010. VCE User's Guide and Reference Manual Version 6.0. <ftp://ftp.tzv.fal.de/pub/vce6/doc/vce6-manual-3.1-A4.pdf>.
- Lê Cao K.A., González I., Déjean S. 2009. interOmics: an R package to unravel relationships between two omics data sets. *Bioinformatics*, 25, 2855-2856.
- Mach N., Berri M., Estellé J., Levenez F., Lemonnier G., Denis C., Leplat J.J., Chevaleyre C., Billon Y., Doré J., Rogel-Gaillard C., Lepage P. 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ. Microb. Rep.*, 7, 554-569.
- Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., M.H.H Stevens, Wagner H. 2015. *vegan: Community Ecology.* Package. R package version 2.3-0. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Palm N.W., de Zoete M.R., Cullen T.W., Barry N.A., Stefanowski J., Hao L., Degnan P.H., Hu J., Peter I., Zhang W., Ruggiero E., Cho J.H., Goodman A.L., Flavell R.A. 2014. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell*, 158, 1000-1010.
- Ramayo-Caldas *et al.* Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. *soumis*
- Rogel-Gaillard C. 2014. Le microbiote intestinal : un compartiment à explorer chez les animaux d'élevage. *Bull. Acad. Vet. France*, 167, 131-136.
- Rosenberg E., Sharon G., Zilber-Rosenberg I. 2009. The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environ. Microbiol.*, 11, 2959-2962.
- Salvucci E. 2014. Microbiome, holobiont and the net of life. *Crit. Rev. Microbiol.*, 28, 1-10.
- Sommer F., Bäckhed F. 2013. The gut microbiota -- masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11, 227-38