

Construction et validation d'un premier catalogue de gènes du microbiome intestinal chez le porc

Jordi ESTELLE (1), Yuliaxis RAMAYO-CALDAS (1), Nicolas PONS (2), Emmanuelle LE CHATELIER (2), Edi PRIFTI (2), Florence LEVENEZ (2), Catherine DENIS (1), Philippe MONGET (3), Marie-José MERCAT (4), David GUILLOU (5), Lilian LELOUTRE (6), Arturo PINON-QUINTANA (7), Jean-François LABARRE (8), Mathieu CASTEX (9), Emmanuelle MAGUIN (10), Joël DORE (2, 10), Stanislav D. EHRLICH (2), Claire ROGEL-GAILLARD (1)

(1) GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

(2) MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

(3) INRA, AGENAE, Centre Val de Loire, F-37380 Nouzilly, France

(4) IFIP/BIOPORC, Institut du Porc, La Motte au Vicomte, F-35651, Le Rheu, France

(5) SANDERS-MixSciences, Centre d'affaire Odyssée, F-35172, Bruz, France

(6) TECHNA, Route de Saint Etienne de Montluc, F-44220, Coueron, France

(7) InVivo NSA, Talhouët, F-56250, Saint-Nolff, France ; (8) CCPA-DELTAVIT, Z.A. du bois de Teillay, F-35150, Janzé, France

(9) LALLEMAND SAS, 19 Rue des Briquetiers, F-31702, Blagnac Cedex, France

(10) MICALIS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

claire.rogel-gaillard@inra.fr et jordi.estelle@inra.fr

Avec la collaboration scientifique de l'Université de Copenhague au Danemark (Karsten KRISTIANSEN, Pia KIILERICH et coll.), le BGI-Shenzhen en Chine (Lian XIAO, Wang JUN et coll.), l'aide technique des unités expérimentales et élevages commerciaux où les animaux ont été élevés et prélevés en France, au Danemark et en Chine, l'appui apporté par Réjane LE TINEVEZ (Institut Carnot Santé Animale) et le soutien financier du méta-programme INRA Méta-omique des Ecosystèmes Microbiens.

Construction et validation d'un premier catalogue de gènes du microbiome intestinal chez le porc

Le porc est une espèce importante en élevage comme en recherche biomédicale. Nous avons constitué un premier catalogue de gènes du microbiome intestinal par séquençage d'ADN fécal de 287 porcs originaires de France, Chine et Danemark. Ont été identifiés 7,7 millions de gènes microbiens non-redondants et 719 espèces métagénomiques. La moitié des gènes a pu être assignée au plan taxonomique ; 98% sont des gènes de bactéries pour lesquelles les phylums les plus représentés sont les Firmicutes (28,73%) puis les Bacteroidetes (9,28%). Le catalogue du porc partage cinq fois plus de gènes avec le catalogue humain qu'avec celui de la souris, confirmant que le porc pourrait être, dans certains cas, un meilleur modèle pour l'homme que la souris. Une analyse visant à identifier et quantifier l'abondance des gènes de résistance aux antibiotiques a reflété les pratiques courantes dans chaque pays ou élevage et montré que limiter l'usage des antibiotiques dans l'alimentation réduit massivement la charge en gènes d'antibiorésistance. Le séquençage d'ADN fécal d'animaux non représentés dans le catalogue (truies gestantes, jeunes porcelets) a permis de valider que le catalogue est perfectible mais largement utilisable de par sa couverture de la diversité microbienne. Ce premier catalogue de gènes du microbiome intestinal constitue une ressource majeure pour développer la métagénomique quantitative chez le porc et contribuer à la compréhension fine de la construction des phénotypes.

The first reference gene catalogue of the gut microbiome in pigs

The pig is an important species for food production and biomedical research. We have established a first gene catalogue of the pig gut microbiome by deep sequencing fecal DNA from a cohort of 287 pigs bred in France, China and Denmark. The catalogue contains more than 7.7 million non-redundant genes. A total of 719 metagenomic species was identified. Half of the genes could be taxonomically assigned, and 98% of them corresponded to bacteria. The most abundant phyla were the Firmicutes (28.73%) and the Bacteroidetes (9.28%). The pig and human catalogues share five times as many genes as the mouse and human catalogues, supporting the use of pigs for biomedical research. Analysis of the prevalence of antibiotic resistance genes demonstrated the effect of eliminating antibiotics from animal diets and thereby reducing the risk of spreading antibiotic resistance associated with farming systems. Additional fecal samples from animals of various ages and physiological conditions (e.g. gestating sows, young piglets before and after weaning) were sequenced, and the results validated that the catalogue is perfectible but already provides a good coverage of microbial diversity. This first gene catalogue of the gut microbiome constitutes a highly valuable resource to implement quantitative metagenomics in pigs and to contribute to understand better the construction and plasticity of phenotypes.

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal définit l'écosystème microbien qui réside dans l'intestin et interagit en continu avec son hôte. Ses multiples fonctions complètent celles de l'hôte, avec notamment la contribution à la digestion d'aliments fibreux pas ou peu digestibles, la synthèse de vitamines et d'acides gras à chaînes courtes, la maturation du système immunitaire (Sommer et Bäckhed, 2013). Le microbiote intestinal est devenu depuis quelques années un compartiment biologique important à étudier chez les animaux d'élevage, car identifié comme un acteur de la variabilité individuelle des phénotypes (Calenge *et al.*, 2014, Rogel-Gaillard, 2014). Les résultats récents chez le porc mettent en évidence des liens entre variations de composition du microbiote intestinal et efficacité alimentaire, performances de croissance et paramètres immuns (Yang *et al.*, 2017 ; Mc Cormack *et al.*, 2017 ; Ramayo-Caldas *et al.*, 2016 ; Estellé *et al.*, 2016 ; Mach *et al.*, 2015).

Le séquençage de l'ADN du microbiote permet d'obtenir des informations sur les communautés microbiennes cultivables et non cultivables, ces dernières étant majoritaires. Il est important de rappeler ici que des échantillons de fèces sont utilisés couramment pour caractériser le microbiote intestinal. Sans être totalement représentatif du microbiote contenu dans la longueur de la lumière intestinale, le microbiote fécal est considéré comme informatif. Son étude est privilégiée car elle repose sur des prélèvements non invasifs et répétables. Initialement basée sur la caractérisation de la diversité du gène codant l'ARNr 16S, l'analyse du microbiote s'élargit à son métagénome au complet, par séquençage de l'ensemble des gènes présents. L'étude du microbiome donne ainsi accès à des informations fonctionnelles non disponibles par séquençage du gène de l'ARNr 16S. Elle permet d'engager des analyses fines des interactions entre l'hôte et son microbiote et d'identifier des biomarqueurs.

Construire un catalogue de gènes du microbiome est un pré-requis essentiel pour mettre en place des approches de métagénomique quantitative, qui consistent à aligner des séquences de petites tailles sur des séquences de référence correspondant à des gènes identifiés par assemblage *de novo* (plusieurs kilobases). Il n'existe à priori que très peu de recouvrement entre les microbiomes d'espèces distinctes, d'où la nécessité de produire des catalogues pour chaque espèce d'intérêt. De plus, pour être exploitable, un catalogue doit être représentatif de la diversité des microbiomes de l'espèce hôte considérée, ce qui implique de prendre en compte des individus à la fois nombreux et diversifiés. Des catalogues de référence du microbiome intestinal ont été constitués pour l'homme (Qin *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2014) et la souris (Xiao *et al.*, 2015).

Nous présentons ici, d'une part, les résultats issus de la construction du premier catalogue de gènes du microbiome intestinal du porc (Xiao *et al.*, 2016) et, d'autre part, sa validation, grâce à un consortium public-privé entre l'INRA, BIOPORC et des entreprises de nutrition animale (CCPA, InVivo NSA, Lallemand, MixSciences, TECHNIA).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux et prélèvements

Pour la construction du catalogue, 287 animaux (mâles entiers et castrés, femelles) d'âges variés (55 à 225 jours) ont été choisis pour optimiser la diversité génétique (17 races ou lignées), et d'environnement, avec des animaux élevés dans 11

fermes basées en France métropolitaine (7), en Guadeloupe (1), en Chine (1) et au Danemark (2). Au total, 100 porcs français, 100 porcs danois et 87 porcs chinois ont été prélevés. Les animaux ont été élevés dans des conditions standard de production pour chaque pays ; les porcs chinois ont été alimentés avec une supplémentation en antibiotiques à faible dose en continu (fluorobenzène et pénicilline).

Pour l'étape de validation, nous avons inclus une cinquantaine d'animaux. En concertation avec les partenaires du consortium public-privé français, nous avons choisi des truies gestantes ou en lactation et des porcelets dont les âges étaient peu représentés parmi les 287 animaux du catalogue : animaux avant sevrage (14-21 jours) et en post-sevrage, groupés par tranches d'âges pour les analyses ultérieures (14-21 jours, 28-35 jours, 42-56 jours et 69-71 jours). Nous avons aussi inclus une dizaine d'échantillons utilisés pour le catalogue, comme témoins.

Les fèces ont été prélevées de manière individuelle, congelées dans de l'azote liquide en cryotubes, puis stockées à -80°C. L'ADN a été extrait selon la méthode utilisée chez l'homme (Qin *et al.*, 2010), afin de permettre des analyses comparatives, sans biais lié à la méthode d'extraction d'ADN.

1.2. Construction du catalogue de gènes

Des bibliothèques "paired-ends" ont été construites pour les 287 échantillons d'ADN fécal et séquencées avec un HiSeq2000 (Illumina) par le BGI-Shenzhen. Le catalogue de gènes a été établi en appliquant la méthodologie utilisée pour le catalogue humain (Qin *et al.*, 2010). Les étapes de construction du catalogue et l'analyse statistique de ses principales caractéristiques sont détaillées dans Xiao *et al.* (2016). En résumé, après assemblage *de novo* des séquences, l'ensemble des gènes non redondants (NR) a été établi avec des critères d'identité (>95%) et de chevauchement (>90%). L'assignation taxonomique a été établie en interrogeant la base NR du NCBI, et l'annotation fonctionnelle réalisée par assignation des gènes à des fonctions KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes v48.2). Des espèces métagénomiques (MGS) ont été caractérisées par clusterisation des gènes sur la base de leur co-abondance (Nielsen *et al.*, 2014). Les analyses de diversité et les analyses multidimensionnelles non paramétriques (NMDS) basées sur la distance de Bray-Curtis ont été réalisées à l'aide du package Vegan (<https://vegan.r-forge.r-project.org>) du logiciel R.

1.3. Validation du catalogue par métagénomique quantitative

Les échantillons d'ADN fécal, issus des animaux prélevés pour l'étape de validation du catalogue, ont été séquencés avec la technologie SOLID à MetaGenoPolis (www.mgpps.eu), afin de générer de courtes séquences (30 à 50 bases). Ces séquences ont été alignées sur le catalogue de gènes de référence pour identification et quantification, permettant ainsi de connaître l'abondance relative des gènes du microbiome de chaque individu testé.

2. RESULTATS

2.1. Un catalogue de 7,7 millions de gènes non redondants

Le séquençage des 287 échantillons d'ADN fécal a généré 1 758 Gigabases de séquences de haute qualité. Leur assemblage *de novo* a permis d'identifier 7 685 872 gènes NR, avec une

longueur N50 des contigs de 1,89 kilobases (Xiao *et al.*, 2016). La reconstruction de MGS sur la base de 500 gènes co-abondants a mis en évidence 719 MGS, qui correspondent donc à des entités fonctionnelles putatives.

L'analyse de raréfaction des gènes NR avec les 287 échantillons de porcs révèle une courbe en forme de plateau, qui signifie que le catalogue généré approche la saturation, comme pour les catalogues construits chez l'homme et la souris avec des nombres d'échantillons respectivement de 1 267 et 184 (Figure 1). Il peut être noté que la saturation n'est atteinte avec aucun des sous-groupes de porcs français, danois ou chinois, et que le nombre de gènes issus du groupe de porcs chinois est plus faible que celui obtenu avec les groupes français et danois.

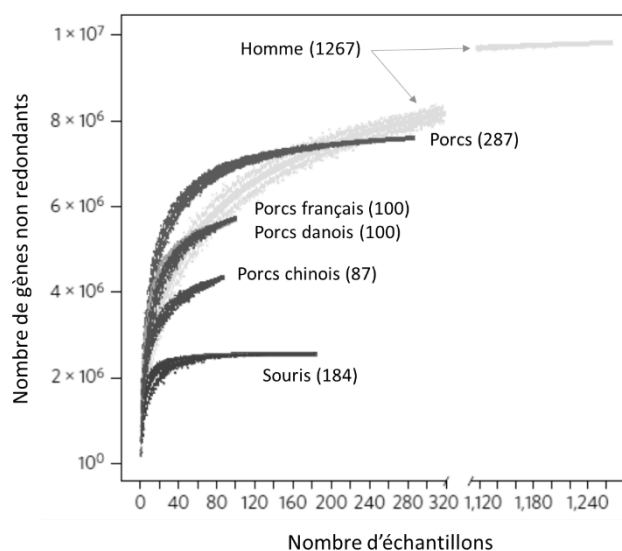


Figure 1 – Courbes de raréfaction établies à partir des gènes NR pour les catalogues établis chez l'homme, la souris et le porc. Les courbes construites pour les groupes de porcs français et danois se superposent. Le nombre d'échantillons utilisé pour chaque courbe est indiqué entre parenthèses.

La moitié des gènes NR a pu être assignée au plan taxonomique. Parmi cette moitié de gènes assignés, plus de 98% sont des gènes de bactéries, les autres correspondant à des gènes d'archées ou d'eucaryotes (Xiao *et al.*, 2016). Les phylums les plus représentés sont les Firmicutes (28,73%) puis les Bacteroidetes (9,28%). Seulement 7,6% des gènes NR annotés ont été assignés à des genres bactériens et 0,33% à des espèces. Par comparaison, 16,3% des gènes NR du catalogue humain ont été assignés à des genres bactériens. Les genres majoritaires représentés dans le catalogue sont *Prevotella* (1,90%), *Bacteroides* (0,80%), *Clostridium* (0,79%), *Ruminococcus* (0,72%) et *Eubacterium* (0,51%).

La classification fonctionnelle des gènes NR annotés met en évidence une prédominance de fonctions associées aux mécanismes de réplication et réparation de l'ADN, au métabolisme des carbohydrates, acides aminés, nucléotides, et au transport membranaire (Xiao *et al.*, 2016).

Les métagénomes du microbiome fécal des 287 porcs partagent 4 430 gènes NR, 36 MGS et 3 463 fonctions KEGG (Figure 2). Ces analyses mettent en évidence un nombre très restreint de gènes présents chez 100% des individus mais un partage de plus de 50% des fonctions KEGG, suggérant une forte redondance de gènes différents pour des fonctions similaires.

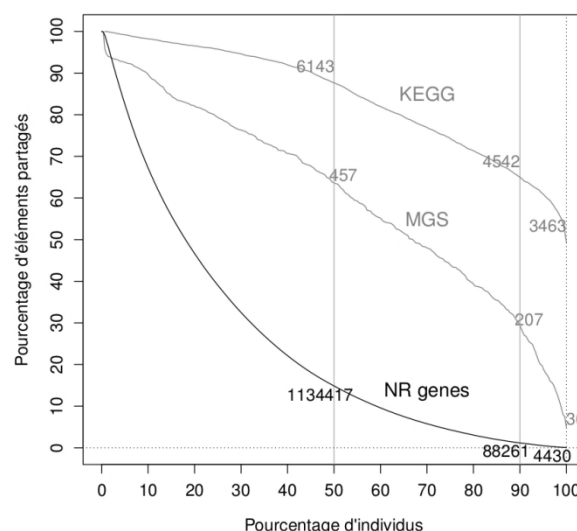


Figure 2 – Contenu microbien partagé aux échelles des gènes NR, des MGS et des fonctions KEGG.

2.2. Comparaison des catalogues de gènes du microbiome intestinal de l'homme, la souris et le porc

Le microbiome du porc présente une diversité alpha (index de Shannon) des gènes NR supérieure à celle de l'homme et de la souris, mettant en évidence une diversité microbienne plus importante à l'échelle individuelle chez le porc que chez ces deux autres espèces (Figure 3). En revanche, la diversité bêta (index de Whittaker) est réduite chez le porc et la souris par comparaison à l'homme, indiquant une moindre variabilité interindividuelle des microbiomes. Cette dernière observation est compatible avec la maîtrise des pratiques et de l'alimentation en élevage, qui vise à limiter les variations liées à l'environnement. Ces résultats de diversité sont reproduits en se basant sur les genres bactériens annotés et dans une moindre mesure avec les fonctions KEGG (Xiao *et al.*, 2016).

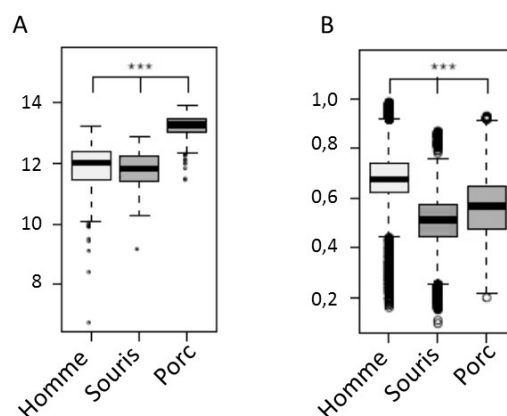


Figure 3 - Diversités alpha (A) et bêta (B) des métagénomes des microbiomes chez l'homme, la souris et le porc, sur la base de l'analyse des gènes NR (Xiao *et al.*, 2016).

Sur la base d'un partage par 90% des individus au minimum au sein d'une espèce, il existe un très faible recouvrement des gènes NR entre espèces : 0,2% des gènes du catalogue porc, 0,19% des gènes du catalogue humain et 0,54% des gènes du catalogue souris.

En comparant les catalogues deux à deux, un recouvrement plus important existe entre les catalogues de l'homme et du porc (9,49% des gènes du catalogue humain présents dans le catalogue du porc) qu'entre celui de l'homme et de la souris (1,5% des gènes du catalogue de l'homme présents dans le catalogue de la souris). Ces résultats confirment bien la nécessité d'établir des catalogues de gènes pour chaque espèce hôte. En se basant sur les fonctions KEGG, le recouvrement est nettement plus important, avec 3 157 fonctions partagées par les catalogues des trois espèces, soit 66,2% de l'ensemble des fonctions identifiées (Figure 4). Ces fonctions partagées correspondent en majorité aux fonctions prédominantes identifiées chez le porc (détails dans Xiao *et al.*, 2016). De manière intéressante et plutôt inattendue, 96% des fonctions identifiées dans le métagénome intestinal de l'homme sur la base des gènes NR annotés sont retrouvées chez le porc, alors que seulement 78% des fonctions KEGG identifiées dans le métagénome intestinal du porc sont retrouvées dans celui de l'homme. Ces résultats mettent en évidence de nombreuses fonctions spécifiques du microbiome intestinal du porc, qui restent à explorer.

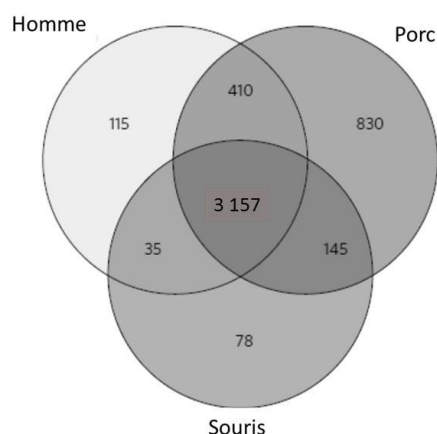


Figure 4 - Comparaison des catalogues du microbiome intestinal de l'homme, de la souris et du porc (Xiao *et al.*, 2016) : diagramme de Venn des fonctions KEGG partagées par au minimum 90% des individus pour chaque espèce.

2.3. Prévalence des gènes d'antibiorésistance

Le séquençage du métagénome permet, à l'échelle individuelle, d'identifier les gènes d'antibiorésistance et de quantifier leur abondance dans le microbiome de chaque animal. Cette analyse met en évidence que tous les porcs, quelle que soit leur origine, sont porteurs de gènes d'antibiorésistance, avec toutefois une charge globale beaucoup moins forte pour les porcs élevés en Europe, qui ne sont pas supplémentés en continu par de faibles doses d'antibiotiques. L'analyse NMDS sépare les animaux en deux groupes, selon la charge en gènes d'antibiorésistance et leur spécificité (Figure 5).

Les porcs chinois sont rassemblés sur la base de la surabondance, par rapport aux porcs élevés en Europe, de gènes de résistance à de nombreux antibiotiques parmi lesquels l'amikacine, la butirosine, la gentamycine B, la kanamycine, la pénicilline, la néomycine, le chloramphénicol, la bléomycine, les fluoroquinolones (détails dans Xiao *et al.*, 2016). Seuls les porcs chinois ont été trouvés porteurs de gènes de résistance aux fluoroquinolones. Les porcs français et danois sont groupés de par la surabondance en gènes de résistance aux

tétracyclines, macrolides, vancomycine et téicoplanine. A noter que les gènes de résistance à la téicoplanine n'ont pas été trouvés chez les porcs chinois.

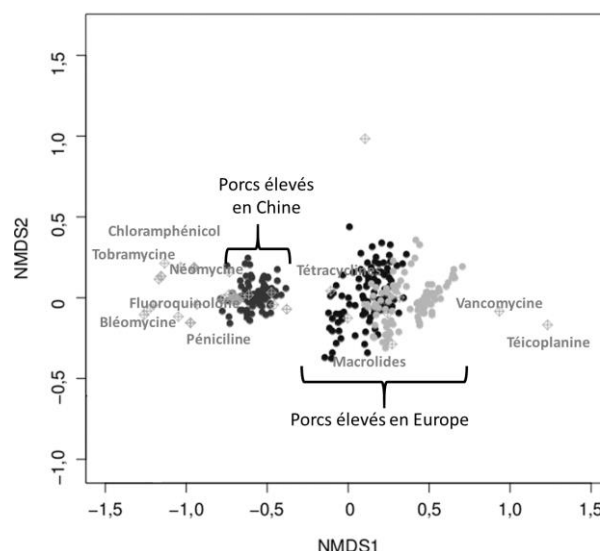


Figure 5 – Analyse NMDS de la distribution des porcs en tenant compte de la charge en gènes d'antibiorésistance. Ces gènes sont symbolisés par des losanges gris et les plus significatifs pour le regroupement des animaux sont mentionnés sur la figure. Les porcs chinois symbolisés par des ronds noirs sont regroupés à gauche du plan. Les porcs danois et français, regroupés à droite du plan sont symbolisés par des ronds respectivement noirs et gris.

2.4. Un catalogue de référence exploitable pour de la métagénomique quantitative chez le porc

Afin de tester la représentativité de ce premier catalogue de gènes et donc de son potentiel d'exploitation chez le porc, nous avons analysé le microbiote fécal d'individus de types pas ou peu représentés parmi les 287 animaux du catalogue : des truies gestantes ou en lactation et des porcelets entre 14 et 71 jours d'âge (Figure 6).

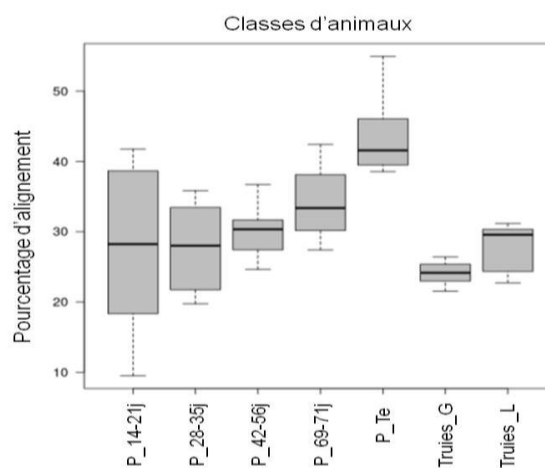


Figure 6 – Box-plot représentant la distribution des individus, selon l'alignement des séquences de leur ADN fécal sur le catalogue de gènes. Truies_G/L : truies gestantes/en lactation ; P_Te : témoins ; P : porcelets, avec l'âge indiqué en jours (j).

Nous avons aussi inclus dix échantillons utilisés pour le catalogue, comme témoins, afin de prendre en compte, dans cette étape de validation, d'éventuels biais d'interprétation liés au protocole de séquençage.

Entre 40 et 50% des séquences des témoins s'alignent sur le catalogue contre 25 à 35% pour les animaux choisis pour cette étape de validation, démontrant que ce premier catalogue constitue une ressource utilisable mais perfectible. En effet, le moindre alignement des séquences d'ADN fécal des animaux du lot de validation, par comparaison aux témoins, indique qu'il existe une marge de progrès pour compléter le catalogue, comme cela a été le cas chez l'homme (Li *et al.*, 2014).

3. DISCUSSION

Le porc est la troisième espèce animale (après l'homme et la souris) et la première espèce d'élevage pour laquelle un catalogue de gènes du microbiome intestinal est constitué. La caractérisation de ce catalogue montre une richesse en gènes supérieure chez le porc par rapport à l'homme, ce qui suggère que l'écosystème microbien digestif du porc contient davantage d'espèces microbiennes que celui de l'homme. Le microbiome intestinal du porc couvre 96% des fonctions KEGG identifiées chez l'homme alors que seulement 78% des fonctions KEGG portées par le microbiome intestinal du porc sont retrouvées dans celui de l'homme. Le recouvrement entre les microbiomes du porc et de l'homme est supérieur à celui observé entre les microbiomes de l'homme et de la souris, ce qui souligne que le porc pourrait se révéler un meilleur modèle biologique que la souris pour l'étude des interactions hôte-microbiome intestinal.

L'étape de validation du catalogue, avec des échantillons divers choisis par le consortium public-privé, montre que la totalité des séquences générées ne s'aligne pas sur les gènes NR du catalogue. Cette observation, également faite mais dans une moindre mesure avec les échantillons témoins inclus dans le catalogue, était attendue compte tenu de la présence de gènes rares et très peu fréquents dans chaque échantillon. Ces résultats montrent ainsi que le nombre de gènes identifiés est largement exploitable pour chaque échantillon analysé et que le catalogue est utilisable pour caractériser le microbiome d'animaux d'origine et d'âge différents de ceux du catalogue. Comme chez l'homme, il sera toutefois opportun d'enrichir le catalogue de gènes présenté ici avec de nouvelles séquences produites au fil des projets en cours, et de considérer également l'ajout ciblé de séquences issues d'animaux de races et lignées venant de pays et d'environnements très différents de ceux du catalogue. Pour mémoire, le catalogue initial du microbiome intestinal humain contenait 3,3 millions de gènes à partir de 124 individus européens (Qin *et al.*, 2010). Il s'est progressivement élargi à un catalogue de 9,9 millions de gènes à partir de 1 267 individus (Li *et al.*, 2014), avec un enrichissement essentiellement en gènes rares. En se basant sur les données des catalogues humains successifs, nous pouvons faire l'hypothèse que ce premier catalogue de gènes du microbiome intestinal chez le porc représente la majorité des gènes les plus abondants. Ajouter d'autres échantillons reste un objectif, afin de constituer un catalogue de seconde génération qui nous permettrait d'identifier des gènes plus rarement représentés mais d'intérêt potentiel pour différencier et caractériser finement les individus dans des environnements variés.

Le séquençage du métagénome fécal permet de qualifier et quantifier la charge individuelle en gènes de fonctions spécifiques. Nous illustrons ce potentiel avec l'étude des gènes de résistance aux antibiotiques, la lutte contre l'antibiorésistance étant un défi mondial et global de santé. En effet, il existe un continuum d'interactions entre les populations

humaines et animales, et les écosystèmes environnementaux : de la santé des uns dépend la santé des autres. Ainsi, dans une perspective « One Health, une seule santé », une des priorités est d'identifier des leviers d'action qui limitent la perte d'efficacité des antibiotiques. Nos résultats mettent en évidence la présence de gènes d'antibiorésistance chez tous les porcs, mais avec des modulations en termes de quantité et de spécificité, qui reflètent les systèmes d'élevage dans chaque pays. Ainsi, les porcs chinois supplémentés en continu avec des antibiotiques à faible dose sont porteurs de la plus grosse charge en gènes d'antibiorésistance, contrairement aux porcs élevés en France et au Danemark, ce qui souligne l'importance de la réduction de l'usage des antibiotiques pour diminuer de manière significative les risques de dissémination. Les observations faites avec les données du catalogue sont cohérentes avec l'interdiction totale de l'usage des antibiotiques promoteurs de croissance depuis 2006 en Europe, et confirment ainsi la pertinence du premier plan ECOANTIBIO mis en œuvre sur la période 2012-2016, avec un objectif chiffré de réduction de 25% en cinq ans de l'exposition des animaux aux antibiotiques. Le premier plan ECOANTIBIO est considéré comme une réussite collective car sur les quatre premières années du plan (2012-2015), l'exposition des animaux aux antibiotiques a reculé de 20%, avec une tendance globale de repli de l'antibiorésistance pour la plupart des antibiotiques et des filières animales. La loi d'avenir pour l'agriculture, l'alimentation et la forêt a ajouté un objectif chiffré de réduction de 25% en trois ans (2014-2016) de l'exposition des animaux aux antibiotiques d'importance critique, à savoir les fluoroquinolones et les céphalosporines de dernières générations. Les porcs français et danois inclus dans le catalogue n'ont pas été trouvés porteurs de gènes de résistance aux fluoroquinolones, ce qui est en ligne avec cet objectif. Le plan ECOANTIBIO² mis en place pour la période 2017-2021 a, parmi ses priorités, outre la poursuite du plan précédent, l'accès à des alternatives d'intérêt aux antibiotiques, l'amélioration des mesures de prévention des maladies infectieuses et la mise à disposition de meilleurs outils de diagnostic, de suivi de la cession des antibiotiques et de suivi de l'antibiorésistance (<http://agriculture.gouv.fr/ecoantibio>). Dans ce contexte, connaître de manière quasi-exhaustive la charge individuelle en gènes d'antibiorésistance par séquençage du métagénome fécal va donner accès à des informations nouvelles et complémentaires de celles qui existent déjà, pour caractériser et suivre les résistances.

Les variations de composition du microbiome intestinal sont trouvées associées à de la variabilité phénotypique chez le porc : lien avec l'efficacité alimentaire (Mc Cormack *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2017 ; Camarinha-Silva *et al.*, 2017), la croissance (Mach *et al.*, 2015, Ramayo-Caldas *et al.*, 2016 ; Camarinha-Silva *et al.*, 2017), des paramètres immuns (Mulder *et al.*, 2009 ; Mach *et al.*, 2015). Ces analyses reposent sur la caractérisation de la diversité microbienne par séquençage du gène de l'ARNr 16S. Sont mis en évidence, dans deux études séparées, deux entérotypes qui définissent des écosystèmes bactériens dont les fonctionnalités semblent suffisamment distinctes pour être associées à des performances de croissance ou d'efficacité alimentaire significativement différentes (Mach *et al.*, 2015 ; Ramayo-Caldas *et al.*, 2016 ; Yang *et al.*, 2017). Même si la technologie basée sur le séquençage 16S permet des analyses taxonomiques puissantes, se limiter à la seule étude de la diversité du microbiote ne nous permettra pas d'identifier les gènes impliqués dans les différences métaboliques et fonctionnelles entre écosystèmes, et donc d'avancer dans la

compréhension fine des mécanismes biologiques qui régulent les interactions entre l'hôte et son microbiote. La métagénomique quantitative va nous permettre d'avoir accès à des informations d'un tout autre ordre de grandeur que celui issu des données 16S, favorables pour identifier des biomarqueurs microbiens candidats pour qualifier les microbiomes et leurs fonctionnalités, comme cela se développe chez l'homme avec par exemple l'identification de biomarqueurs microbiens associés à des pathologies diverses (Wang et Jia, 2016).

Les approches de métagénomique quantitative ont démontré leur intérêt chez l'homme et c'est le moment de se poser la question de la faisabilité de leur mise en œuvre chez le porc et plus généralement chez les animaux d'élevage. Tout d'abord, le prix à payer est élevé car même si les coûts de séquençage baissent, séquencer un métagénome revient 35 à 50 fois plus cher que séquencer la portion variable du gène de l'ARNr 16S. Dans les programmes à venir, le couplage des deux approches pourrait être envisagé pour l'étude de grandes cohortes d'animaux : caractérisation 16S sur tous les animaux et métagénomique quantitative pour de petits groupes d'individus, sur la base des résultats 16S, pour une analyse approfondie. Nous avons également besoin d'établir des standards pour les méthodes d'échantillonnage et d'extraction de l'ADN. Le protocole d'extraction d'ADN fécal que nous avons utilisé pour le porc est celui qui a été élaboré pour les échantillons de fèces humains pour le catalogue correspondant

(Qin *et al.*, 2010). Depuis, dans le cadre d'un vaste consortium européen coordonné par MetaGenoPolis à l'INRA (www.microbiome-standards.org), une étude comparative réalisée avec des prélèvements de fèces humains a permis d'identifier que ce protocole d'extraction est parmi les plus robustes (Costea *et al.*, 2017). Au-delà des échantillons de fèces de porc qui se traitent de manière assez similaire à ceux de l'homme, il sera essentiel de suivre une démarche organisée de standardisation des protocoles, afin de se reposer sur des résultats reproductibles qui permettront d'avancer vers des recommandations fiables en élevage.

CONCLUSION

Le contexte scientifique et technologique est favorable pour mettre en place des projets qui croisent des informations individuelles liées au microbiome (diversité, écologie fonctionnelle) et à l'hôte (génétique, caractères zootechniques et cliniques, statut immunitaire), afin d'aborder de manière intégrée les nouveaux caractères de robustesse à mesurer et améliorer. Ce premier catalogue de gènes du microbiome intestinal du porc complète la séquence de référence du génome de cette espèce (Groenen *et al.*, 2012; Servin *et al.*, 2014), l'ensemble des deux fournissant ainsi des ressources remarquables pour analyser les interactions entre le microbiome et son hôte.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Calenge F., Martin C., Le Floc'h 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.
- Camarinha-Silva A., Maushammer M., Wellmann R., Vital M., Preuss S., Bennewitz J., 2017. Host genome influence on gut microbial composition and microbial prediction of complex traits in pigs. Genetics, 206, 1637-1644.
- Costea *et al.*, 2017. Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. Nature Biotechnol., published online 2 October 2017; doi:10.1038/nbt.3960
- Estellé *et al.*, 2016. Microbiote intestinal chez le porc : paramètres génétiques de sa composition et liens avec des caractères immunitaires. Journées Rech. Porcine, 48, 267-272.
- Groenen *et al.*, 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature, 491, 393-398.
- Li *et al.*, 2014. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. Nat. Biotechnol., 32, 834-841.
- Mach N., Berri M., Estellé J., Levenez F., Lemonnier G., Denis C., Leplat JJ., Chevalere 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. Microbiol. Rep., 7, 554-569.
- Mc Cormack U.M., *et al.*, 2017. Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. Appl. Environ. Microbiol., 83, e00380-17.
- Mulder I.E., Schmidt B., Stokes C.R., Lewis M., Bailey M., Aminov R.I., Prosser J.I., Gill B.P., Pluske J.R., Mayer C.D., Musk C.C., Kelly D., 2009. Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. BMC Biol., 7, 79.
- Nielsen *et al.*, 2014. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. Nat. Biotechnol., 32, 822-828.
- Qin *et al.*, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature, 464, 59-65.
- Ramayo-Caldas Y., Mach N., Lepage P., Levenez F., Denis C., Lemonnier G., Leplat J.J., Billon Y., Berri M., Doré J., Rogel-Gaillard C., Estellé J., 2016. Phylogenetic network analysis applied to pig gut microbiota identifies an ecosystem structure linked with growth traits. ISME J., 10, 2973-2977.
- Rogel-Gaillard C. 2014. Le microbiote intestinal : un compartiment à explorer chez les animaux d'élevage. Bull. Acad. Vet. France, 167, 131-136.
- Servin *et al.*, 2014., Le séquençage du génome du porc : apport des nouvelles technologies de séquençage à la génomique et à la génétique porcine. Journées Rech. Porcine, 46, 7-18.
- Sommer F., Bäckhed F. 2013. The gut microbiota -- masters of host development and physiology. Nat. Rev. Microbiol., 11, 227-38.
- Xiao *et al.*, 2015. A catalog of the mouse gut metagenome. Nat Biotechnol., 33, 1103-1108.
- Xiao *et al.*, 2016. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. Nat Microbiol., 19, 16161.
- Yang H., Huang X., Fang S., He M., Zhao Y., Wu Z., Yang M., Zhang Z., Chen C., Huang L. 2017. Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. Front. Microbiol., 8, 1555.
- Wang J., Jia H., 2016. Metagenome-wide association studies: fine-mining the microbiome. Nat. Rev. Microbiol., 14, 508-522.