

# Inventaire des bactéries caecales du lapin par clonage aléatoire : résultats et perspectives

L. CAUQUIL<sup>1</sup>, V. MONTELS<sup>1</sup>, J.J. GODON<sup>2</sup>, G. MASTIN<sup>1</sup>, S. COMBES<sup>1</sup>, T. GIDENNE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INRA, Université de Toulouse, UMR 1289, *Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme*,  
Chemin de Borde Rouge - Auzeville BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

<sup>2</sup>INRA, Laboratoire de Biotechnologie de l'environnement, 11100 Narbonne, France

**Résumé .** Les récents progrès en biologie moléculaire nous permettent maintenant de caractériser (identification des espèces bactériennes) des écosystèmes digestif complexes de manière plus exhaustive. Nous avons réalisé un inventaire moléculaire, basé sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, sur un prélèvement de caecum d'un lapin adulte. Une banque aléatoire de 228 clones a été constituée. De l'analyse de ces séquences, 70 OTU (operational taxonomic unit) ont été identifiés dont 60 (80%) correspondent à de nouvelles espèces bactériennes. L'analyse phylogénétique de ces OTU les range dans leur très grande majorité (92,9%) dans les *Firmicutes* ainsi que quelques *Bacteroidetes* (4,3%) et *Verrucomicrobiae* (1,4%). On constate peu de redondance avec un précédent inventaire, plus restreint et réalisé sur de jeunes lapins. Cette étude met en évidence le caractère particulier de la flore caecale du lapin et une grande biodiversité.

**Abstract - Molecular inventory of microbial ecosystem in the rabbit caecum: results and perspectives.** Recent advances in molecular biology tools now allow us to characterize (identified bacterial species) complex digestive ecosystems. We constructed a library based on 16S rDNA analysis from an adult rabbit caecum sample. We obtained 228 clones. The sequence analysis identified 70 OTU (operational taxonomic unit), 80% of which are considered as new bacterial species. The phylogenetic analysis of the OTU classified the vast majority of them in the *Firmicutes* phyla, and very few in *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobiae*. There was little correspondence between this study and a previous library constructed from young rabbits samples. Our results show how the rabbit digestive microflora was quite specific.

## Introduction

Jusqu'à présent l'étude des relations entre nutrition et écosystème digestif caecal du lapin consistait essentiellement à mesurer les paramètres physico-chimiques du milieu caecal et l'activité fermentaire. La nature et le rôle des populations microbiennes n'étaient évalués que par les techniques classiques de cultures, sachant que ces dernières sont lourdes à mettre en oeuvre et peu discriminantes (seulement 10 à 50% des bactéries de la flore digestive sont cultivables, Zoetendal *et al.*, 2004). Les récents progrès de la biologie moléculaire fournissent des outils (T-RFLP, TTGE, SSCP) qui permettent une étude plus rapide et beaucoup plus complète des écosystèmes complexes, tels ceux des milieux digestifs. Ainsi, l'inventaire moléculaire de flore digestive a déjà été réalisé chez certaines espèces d'élevage, tel le porc (Leser *et al.*, 2002), le cheval (Daly *et al.*, 2001) ou le poulet (Bjerrum *et al.*, 2006). Chez le lapin, une seule étude avec un nombre limité de clones a été réalisée récemment (46 clones sur 2 lapereaux âgés de 56 jours, Abecia *et al.*, 2005).

Cette étude est la première étape d'un projet plus large visant à analyser la biodiversité de l'écosystème caecal du lapin, en relation avec des facteurs nutritionnels ou d'élevage. L'objectif est ici de caractériser la composition de la flore caecale chez le lapin adulte, en équilibre physiologique. Un inventaire moléculaire a donc été réalisé pour obtenir (par clonage aléatoire et séquençage de l'ADN bactérien codant pour le gène de l'ARNr 16S) une image des

espèces bactériennes présentes dans le caecum, et décrire leur distribution au sein des grands groupes bactériens.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1 Origine de l'échantillon

Cet inventaire a été effectué sur un animal adulte dont la flore est bien implantée et stable. Le lapin est issu d'une femelle de souche hybride (type INRA 1067) et d'un mâle de type PS HYPLUS79 (colorés, Grimaud). Les échantillons de contenu ceecal ont été prélevés sur un lapin âgé de 7 mois et nourri depuis son sevrage à 35 jours avec un aliment ne contenant ni antibiotique ni anti-coccidien. L'échantillon a été conservé à -80°C.

### 1.2 Extraction d'ADN et clonage

L'extraction de l'ADN total a été réalisée à l'aide du kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). L'amplification par PCR de la séquence complète d'ADNr 16S (1500 nucléotides) a été effectuée avec une amorce universelle W02 (GNTACCTTGTTACGACTT) et une amorce bactérienne W18 (GAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Godon *et al.* 1997). Le programme d'amplification PCR utilisé comprend, une phase initiale de dénaturation 2 min à 94°C suivi de 25 cycles des étapes suivantes: dénaturation (1 min à 94°C), hybridation (1 min à 50°C), et élongation (1 min à 72°C); enfin une dernière d'étape 10 min à 72°C. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés à l'aide du kit QIAquick PCR purification kit columns (QIAGEN).

Les produits PCR purifiés ont été insérés dans le plasmide pCR4-TOPO et transformés dans un *Escherichia coli* TOP 10 One Shot (Invitrogen). Les clones transformés ont été mis en culture dans des plaques de 96 puits et conservés à -20°C. Nous avons ensuite isolé 298 colonies et extrait l'ADN plasmidique contenant le gène cloné à l'aide du kit Montage Plasmid Miniprep96 kit (Millipore).

### 1.3. Séquençage

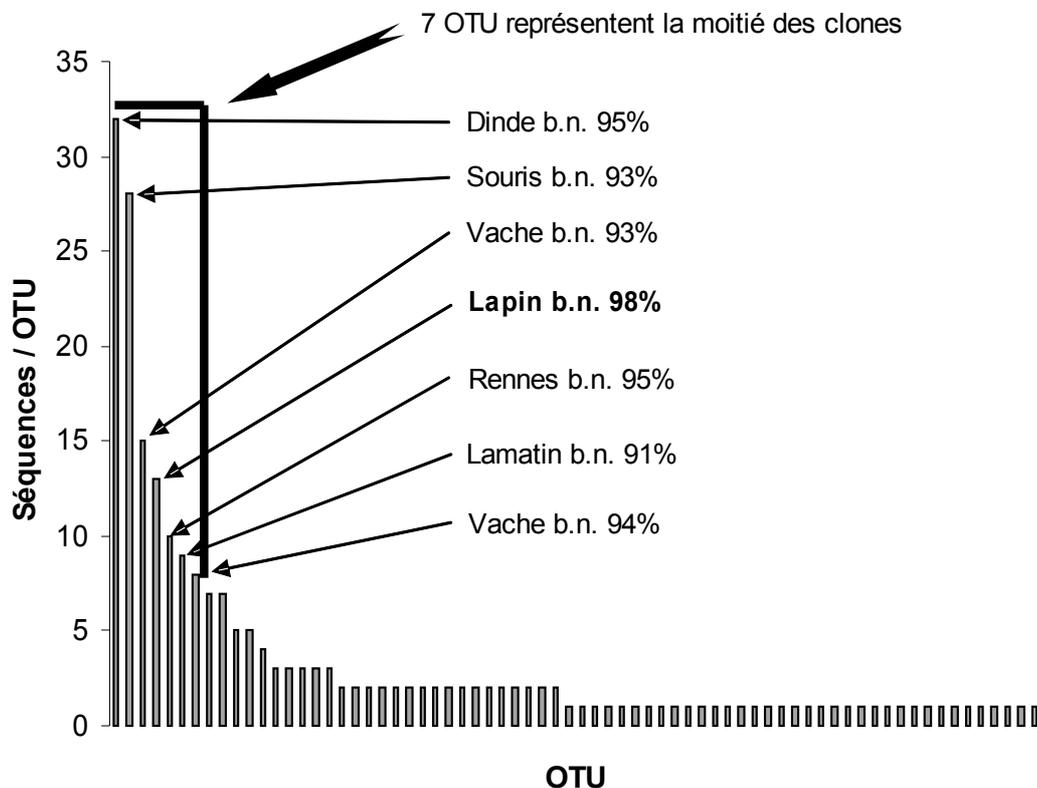
Les fragments d'ADNr 16S extraits ont été séquencés au Centre de Ressources Genotypage Séquençage (C.R.G.S.) de l'INRA de Toulouse. Les séquences obtenues ont été nettoyées (élimination des bases non identifiées, des séquences de mauvaises qualités et des séquences chimériques). Au final 228 séquences complètes du gène codant pour l'ARNr 16S ont été obtenues. Ces séquences ont ensuite été regroupées entre elles au seuil de 97% de similarité (calculé par

BLAST), seuil à partir duquel 2 clones sont considérés comme appartenant à la même espèce. Au sein de chaque groupe appelé OTU (operational taxonomic group) la séquence la plus longue a été retenue pour l'identification des espèces. Ces séquences nucléotidiques sont enregistrées dans la base de données de GenBank avec les numéros d'enregistrement : EF445140 à EF445293.

### 1.4 Analyse des séquences et phylogénie

Dans un premier temps nous avons comparés les séquences représentant chaque OTU sur la base de données GenBank par BLASTN. Ensuite, après alignement et correction manuelle de l'alignement sur *E. coli* nous avons intégrés ces séquences dans l'arbre phylogénétique de la base de données SSUref\_02\_07\_1\_4\_tree\_silva\_opt, établie par le projet SILVA ([www.arb-silva.de](http://www.arb-silva.de)) à l'aide du logiciel ARB (Ludwig *et al.*; 2004).

**Figure 1.** Distribution des clones dans les OTU après comparaison des séquences par BLAST au seuil de 97 % de similarité.



## 2. Résultats et discussion

Un total de 228 séquences complètes a été obtenu. La comparaison de ces séquences entre elles au seuil de 97% de similarité a permis de distinguer 70 groupes de séquences bactériennes distinctes ou OTU. La figure 1 représente la répartition des clones dans les différents OTU.

Sept OTU représentent près de la moitié des clones obtenus. La comparaison de nos séquences avec les base de données (BLAST sur NCBI) indique que sur ces 7 OTU, une seule séquence a déjà été identifiée

chez le lapin (98% de similarité avec une séquence de l'inventaire de Abecia *et al.*, 2005). Les autres proviennent de contenus digestifs d'espèces animales diverses (homme, vache, poulet, ...) et avec des scores plus faibles compris entre 91 et 97% de similarité. A l'inverse 36 OTU (51%) ne contiennent qu'un seul clone. Sur l'ensemble des OTU recensés, seuls 14 (20%) ont un taux de similarité supérieure à 96 %. Les 60 autres OTU sont donc considérés comme représentant des espèces nouvelles. Le tableau 1 récapitule les scores de ces 14 OTU.

**Tableau 1.** Récapitulatif de l'analyse des séquences des gènes d'ARN16S par comparaison avec les séquences répertoriées dans la base GenBank du NCBI au seuil de 97%.

OTU	Nb de clones	% Similarité	Séquence la plus proche	Origine
NED1D3	2	99	b.n. <sup>1</sup> (DQ905060)	Homo sapiens fecal
NED2D4	2	99	b.n. (AY993615)	mouse caecum
NED2F10	2	99	b.n. (DQ777919)	rat
NED1B6	1	99	Variovorax sp.(AB196432)	Soil
NED1E5	13	98	b.n. (AJ863539)	Rabbit
NED2D1	2	98	b.n. (AB264069)	dugong feces
NED2F5	10	97	b.n. (DQ824540)	Human feces
NED2A9	7	97	b.n. (DQ815741)	Mus musculus
NED1C12	2	97	b.n. (DQ394667)	Reinder
NED3C7	1	97	b.n. (AB270018)	Bos taurus
NED3H1	1	97	b.n. (DQ824540)	Human feces
NED1E3	1	97	b.n. (DQ815580)	Mus musculus
NED2G1	1	97	b.n. (DQ394637)	Reindeer
NED3G6	1	97	b.n. (DQ456201)	Turkey

<sup>1</sup>b.n.: bactérie non-cultivée

On retrouve une grande diversité d'espèce dans l'origine des écosystèmes digestifs des séquences correspondantes dans GenBank. Sur les 70 OTU obtenus seuls 2 correspondent à des séquences de lapin avec une similarité de 98% et de 95%. Les 2 séquences sont issues du séquençage effectué par Abecia et al. (2005). Enfin, une seule séquence a été identifiée il s'agit d'un *Variovorax* sp. qui est une bactérie du sol.

**Tableau 2.** Distribution des OTU et des clones dans les phyla.

Phyla	OTU (%)	Clones (%)
Bacteroidetes	3 (4,3)	7 (3,1)
Beta-gamma-proteobacteria	1 (1,4)	1 (0,4)
Firminutes	65 (92,9)	211 (92,5)
Verrucomicrobiae	1 (1,43)	9 (4)

Concernant la phylogénie (Tableau 2) les 70 OTU sont répartis dans 4 phyla, mais la très grande majorité se regroupe dans les Firmicutes (93%). Le phylum des Bacteroidetes est très peu représenté avec 3 OTU (7 clones sur 228). L'OTU présent dans les Betagammaproteobacteria correspond à *variovorax* sp. et ne comprend qu'un seul clone. La répartition entre les phyla reste la même que l'on prenne en compte les OTU ou les clones. Nos résultats confirment ceux de l'inventaire réalisé par Abecia et al. (2005) avec une très forte proportion de Firmicutes et peu de Bacteroidetes et de Verrucomicrobiae. Par contre, ils n'appuient pas ceux obtenus à partir de cultures classiques (Gouet et al., 1979) ou d'hybridation ARN/ADN (Bennegadi et al., 2002).

### Conclusion

Un très faible recouvrement au niveau des séquences est observé entre notre inventaire et celui d'Abecia et al (2005). Ceci est probablement le reflet d'une

modification des espèces bactériennes présentent en fonction de l'âge et/ou des facteurs d'élevage. La répartition des espèces entre les phyla reste quant à elle similaire avec une large domination du phylum des Firmicutes. L'écosystème caecal reste majoritairement composé de bactéries non décrites et constitue donc un écosystème bien spécifique. Ce dernier point est mis en exergue par le manque de données obtenues à l'aide d'outils moléculaires sur la flore digestive du lapin.

Suite à cet inventaire, chaque clone contenant une séquence du gène de l'ARNr16S bactérien sera analysé par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Cette technique de fingerprint nous permettra de suivre les différentes espèces clonées dans différents contenus caecaux et en fonction de divers facteurs de variation tels la nutrition ou les techniques d'élevage.

### Références

- ABECIA, L., FONDEVILLA, M., BALCELLS, J., EDWARDS, J.E., NEWBOLD, C.J., McEWAN, N.R., 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters*, 244, 111-115.
- BENNEGADI, N., FONTY, G., MILLET, L., GIDENNE, T., LICOIS, D., 2003. Effects of Age and Dietary Fibre Level on Caecal Microbial Communities of Conventional and Specific Pathogen-Free Rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 5 : 23-32.
- BJERRUM, L., ENGBERG, R.M., LESER, T.D., JENSEN, B.B., FINSTER, K., PEDERSEN, K., 2006. Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Culture-Based Techniques. *Poultry Science*, 85 : 1151-1184.
- DALY, K., STEWART, C.S., FLINT, H.J., SHIRAZY-BEECHY, S.P., 2001. Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 38, 141-151.
- GOUET, P., FONTY, G., 1979. Changes in the digestive microflora of holoxonic rabbits from birth until adulthood. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19 : 553-566.

- LESER, T. D., AMENUVOR, J. Z., JENSEN T.K., LINDECRONA, R.H., BOYE, M., MOLLER, K., 2002. Culture-Independent Analysis of Gut Bacteria: the Pig Gastrointestinal Tract Microbiota Revisited. *Applied And Environmental Microbiology*, 68(2) : 673-690.
- LUDWIG, W., STRUNK, O., WESTRANM, R., RICHTER, L., MEIER, H., YADHUKUMAR, BUCHNER, A., LAI, T., STEPPI, S., JOBB, G., FORSTER, W., BRETTSCHE, I., GERBER, S., GINHART, A.W., GROSS, O., GRUMANN, S., HERMANN, S., JOST, R., KONIG, A., LISS, T., LUBMANN, R., MAY, M., NONHOFF, B., STREHLOW, R., STAMATAKIS, A., STUCKMANN, N., VILBIG, A., LENKE, M., LUDWIG, T., BODE, A., SCHLEIFER, K.-H., 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research*, vol.32, 1363-1371.
- ZOETENDAL, E.G., COLLIER, C.T., KOIKE, S., MACKIE, R.I., GASKINS, H.R., 2004, Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *J. Nutr.* vol. 134, 465-472