



HAL
open science

Development of Molecular Tools for the Identification of Complex Bacterial Flora - Application to the Study of Galliform Gut Flora

Bastien Massias

► **To cite this version:**

Bastien Massias. Development of Molecular Tools for the Identification of Complex Bacterial Flora - Application to the Study of Galliform Gut Flora. Life Sciences [q-bio]. INAPG (AgroParisTech), 2008. English. NNT: 2008AGPT0101 . pastel-00005056

HAL Id: pastel-00005056

<https://pastel.hal.science/pastel-00005056>

Submitted on 27 May 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° 2008-AGPT-0101

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Microbiologie

*présentée et soutenue publiquement
par*

Bastien MASSIAS

le 19 décembre 2008

DEVELOPPEMENT ET MISE AU POINT D'OUTILS MOLECULAIRES POUR L'IDENTIFICATION DES FLORES COMPLEXES BACTERIENNES

APPLICATION A L'ETUDE DES FLORES DIGESTIVES DE GALLIFORMES

Directeur de thèse : Maria URDACI

Travail réalisé à l'UMR 5248

Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée

ENITA de Bordeaux, 1 cours du Général de GAULLE, CS40201, GRADIGNAN CEDEX

Devant le jury :

M. Patrick GRIMONT
M. Didier MONTET
Mme Catherine BEAL
M. Patrick FACH
Mme Maria URDACI
Mme Marisela ARTURO-SCHAAN

Professeur
Directeur de Recherche
Professeur
Directeur de Recherche
Professeur
Docteur Vétérinaire

Institut Pasteur (Paris)
CIRAD (Montpellier)
AgroParisTech-INRA
AFSSA (Paris)
ENITA (Bordeaux)
CCPA (Janzé)

Rapporteur
Rapporteur
Président
Examinateur
Directeur de thèse
Examinateur

Abréviations :

Techniques :

CDGE : Constant Denaturing Gel Electrophoresis
CSbyDG : Clone Screening by Denaturing Gradient
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
FISH: Fluorescent In-Situ Hybridization
PCR : Polymerase Chain Reaction
ProReg XL Tool: Profile Regrouping Excel Tool
qPCR : quantitative PCR
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP : Single-Strand Conformation Polymorphism
TG-CZE : Temporal Gradient Capillary Zone Electrophoresis
tRFLP : terminal RFLP
TTGE : Temporal Temperature Gel Electrophoresis

Sigles biologiques :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNr 16S : ADN ribosomique 16S
ARN 16S : Acide RiboNucléique 16S
ARNm : Acide RiboNucléique messenger

Sigles médicaux :

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
CMV : CytoMegaloVirus
HSV : Herpes Simplex Virus

Unités :

°C : degré Celsius
g, mg : gramme, milligramme
h, min, sec : heure, minute, seconde
L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre
M, mM : molaire, millimolaire
Nt : nucléotide
pb : paire de bases
v/v : volume sur volume
p/v : poids sur volume

Chimie :

dNTP : desoxynucléotides
IPTG : isopropylthio-β-D-galactoside
scFOS : short chain FructoOligoSaccharides
Tris : tri-hydroxy-méthyl-éthylène diamide
X-Gal : 5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D galactoside

Milieux :

LB : Luria-Bertani

SOMMAIRE :

INTRODUCTION

GENERALE.....	8
----------------------	----------

CHAPITRE INTRODUCTIF

I. Vie symbiotique : vocabulaire et définition	13
I. A. Les grands types de symbiose	14
I. A. 1. La symbiose vraie	14
I. A. 2. Le mutualisme : la symbiose facultative	15
I. A. 3. La syntrophie: le mutualisme bactérien	15
I. A. 4. Le commensalisme ou les compagnons de table.....	16
I. A. 5. L'amensalisme : l'antagoniste du commensalisme	17
I. A. 6. Le saprophytisme ou l'art de recycler la matière organique	18
I. A. 7. Le parasitisme: entre symbiose et prédation	19
I. A. 7. La phorésie : le transport en commun symbiotique	21
I. A. 8. L'inquilinisme : une association spatiale sans exigence physiologique.....	21
I. A. 9. L'opportunisme	22
I. A. 10. La métabiose : un opportunisme très spécialisé	22
I. B. Flores digestives et symbiose	23
II. Les microflores du tractus digestif et leur modulation	28
II. A. Les microflores complexes	28
II. A. 1. Exemples de microflores complexes	28
II. A. 2. Les microflores digestives	29
II. A. 2.a. Flore digestive de l'Homme.....	30
II. A. 2.b. Flores digestives des Galliformes (poulet et dinde).....	32
II.B. Les antibiotiques : modulateurs des flores digestives	33

II.B.1. Les antibiotiques en production animale.....	33
II.B.1.a. Les antibiotiques comme facteurs de croissance.....	33
II.B.1.b. Mode d'usages des antibiotiques chez les animaux d'élevage.....	34
II.B.1.c. Réglementation sur l'usage des antibiotiques en élevage	34
II.B.2. Problématique de l'interdiction des antibiotiques en élevage animal	35
II.B.2.a. Quelques chiffres sur la consommation d'antibiotiques	35
II.B.2.b. Apparition des bactéries multi-résistantes.....	36
II.B.2.c. Interdictions des usages zootechniques des antibiotiques	36
II.B.2.d. Alternatives aux antibiotiques comme facteurs de croissance	37
II.B.2.d.α. Les huiles essentielles	38
II.B.2.d.β. Les probiotiques	39
II.B.2.d.γ. Les prébiotiques	40
III De l'art de l'identification bactérienne.....	41
III. A. Identification bactérienne par approche morphologique	41
III.B. Identification bactérienne par approche moléculaire.....	42
III.B.1. Identification bactérienne par génies biochimique et immunologique	42
III.B.2. Identification bactérienne par phylogénétique.....	43
III.B.2.a. Histoire, définition et usage des études phylogénétiques.....	43
III.B.2.a.α. la biomolécule comme horloge moléculaire de l'évolution.....	43
III.B.2.a.β. Du choix de la bonne sémantide	44
III.B.2.a.γ. l'ADNr 16S comme sémantide bactérienne.....	44
III.B.2.a.δ. Autres sémantides bactériennes	45
III.B.2.a.ε. Et en dehors du règne bactérien ?.....	46
III.B.2.b. Identification bactérienne avec amorces oligonucléotidiques	47
III.B.2.b.α. Les électrophorèses avec gradient dénaturant : TTGE/DGGE.....	47
III.B.2.b.β. La tRFLP	50
III.B.2.b.γ. L'amplification semi-quantitative et quantitative	51

III.B.2.b.δ. Le clonage.....	52
III.B.2.c. Identification bactérienne avec sondes oligonucléotidiques	52
III.B.2.c.α. Hybridation in situ - Dot-Blot / Slot-Blot / FISH	53
III.B.2.c.β. Puces à ADN – Microarray.....	53

CHAPITRE DEUX : Etudes des flores digestives de Galliformes

II. A Mise au point du protocole de DGGE.....	59
II.B. Matériel et Méthodes	61
II.B.1. Matériel biologique	61
II.B.2. Extraction des ADN bactériens	61
II.B.3. Amplification d'ADN in vitro	61
II.B.4. DGGE	63
II.B.5. Séquençage des bandes	63
II.B.6. Réalisation des dendrogrammes.....	64
II.B.7. Identification phylogénétique.....	64
II.B.8. Clonage	64
II.B.9. Arbre phylogénétique.....	65
II.B.10. Analyses statistiques	65
II.C. Mode d'action des antibiotiques en alimentation animale.....	65
II.C. 1. Propos introductifs	65
II.C.2. Précision sur le matériel biologique.....	66
II.C.3. Résultats et discussion	67
II.D. Action de substances non-antibiotiques sur les flores digestives du poulet.....	68
II.D.1. Propos introductifs.....	68
II.D.2. Précisions sur les substances non antibiotiques testées	69

II.D.3. Résultats et discussion	69
II.D.3.a. Amorçage lactobacille.....	69
II.D.3.b. Amorçage eubactérien	70
II.E. Recherche d'un pathogène digestif putatif de la dinde	71
II.E.1. Propos introductifs	71
II.E.2. Précision sur le matériel et méthodes	72
II.E.3. Résultat et discussion	73

CHAPITRE TROIS : Apports à l'identification bactérienne et aux études environnementales

III. A. Introduction	77
III.A.1. Limites des études bactériennes par gels à gradient dénaturant	77
III.A.2. Mise au point de la CSbyDG et du programme ProReg XL Tool.....	78
III.B. ProReg XL Tool : un outil de regroupement de profils électrophorétiques.....	79
III.B. 1. Introduction du programme ProReg XL Tool	79
III. B. 2. Conclusion sur le programme ProReg XL Tool	92
III. B. 3. Détails sur les perspectives possibles de ProReg XL Tool.....	92
III. B. 3. a. Les diverses options supplémentaires envisageables.....	93
III. B. 3. b. Le réencodage de ProReg XL Tool	95
III. B. CSbyDG : une nouvelle stratégie de criblage de clones	96
III. B. 1. Introduction sur la technique CSbyDG.....	96
III. B. 2. Conclusion sur la technique CSbyDG	118
III. B. 3. Perspectives d'utilisation de la technique de CSbyDG.....	118
III. C. CSbyDG database : une suite logique à la CSbyDG	119

CONCLUSION	
GENERALE.....	123

REFERENCES	
BIBLIOGRAPHIQUES.....	127

ANNEXES.....	148
---------------------	------------

INTRODUCTION GENERALE

Les neurobiologistes ont coutume de dire avec ironie que « si, malgré sa complexité, les circuits neuronaux du système nerveux central seront peut-être un jour connus et cartographiés dans leur ensemble ; leur compréhension, quant à elle, ne sera peut-être jamais appréhendée ». S'il existe un système biologique dans le règne des animaux supérieurs que l'on peut, par analogie, rapprocher de cette pensée, c'est certainement celui des flores du tractus digestif. Leur composition, leur variabilité, leurs interactions réciproques ou avec leur hôte, font des microbiocénoses digestives l'un des systèmes du Vivant le plus complexe et le plus difficile à appréhender et à caractériser dans sa globalité comme dans ses sous-ensembles.

La recherche dans le domaine des microflore complexes a fait un bond en avant spectaculaire ces dernières décennies grâce notamment à l'arrivée de nouveaux outils moléculaires d'investigation. Ces techniques, généralement basées sur des comparaisons phylogénétiques des séquences de séquences, permettent d'identifier ou du moins de classer les micro-organismes détectés, et ce sans avoir à recourir à des techniques culturales très limitantes dans ce type d'études. Certaines approches permettent même, à moindre coût et de manière relativement rapide, de connaître et comparer les populations bactériennes présentes dans plusieurs échantillons à la fois.

De plus, le récent engouement suscité par le rôle que peut jouer le microbiote intestinal sur la santé de son hôte a engendré pléthore de travaux dans le domaine. Ainsi, la recherche de putatifs agents étiologiques des maladies du tractus digestif comme dans les MICI est très active. De même, Le potentiel médical ou vétérinaire (et *in fine* financier...) de certaines souches bactériennes dont l'interaction avec leur hôte serait bénéfique à celui-ci fait aussi l'objet de nombreuses études. Ces souches, qualifiées de « probiotiques », présentent des activités et propriétés diverses : immunomodulation, compétition avec l'adhésion intestinale de pathogènes, aide au transit, prévention de certaines allergies, etc. En contrepartie, leur hôte leur fournit protection et nourriture, d'où la qualification généralement admise d'interaction symbiotique entre les deux protagonistes.

C'est dans ce dernier cadre que le LMBA - laboratoire d'accueil de l'auteur du présent manuscrit - s'est engagé avec un industriel breton de l'agroalimentaire animal dans la réalisation de travaux où il avait pour tâche de fournir un protocole d'identification des

eubactéries présentes dans la lumière du tube digestif de galliformes, en vue de pouvoir connaître au final les éventuelles variations de la flore digestive observées lors de la prise de divers suppléments alimentaires (antibiotiques, huiles essentielles, prébiotiques, ...). Cet industriel, le CCPA (Janzé, France), a, dans sa grande générosité, permis le financement du quart des travaux de recherche détaillés dans cet écrit. Ceux-ci s'insèrent donc initialement dans cette démarche et ont été orientés vers une technique d'identification bactérienne des flores complexes peu coûteuse : l'électrophorèse sur gels à gradients dénaturants.

Insatisfait des premiers résultats obtenus par les gels à gradients dénaturants, en particulier dans le manque de précision taxinomique, une nouvelle approche utilisant le clonage a été entreprise. Le clonage/séquençage a depuis longtemps fait ses preuves quand à la qualité informative de ses résultats et il devait fournir le complément d'information nécessaire à l'identification taxinomique précise des bandes révélées, au départ, par les gels. Néanmoins, pour palier le coût relativement élevé d'une telle méthode, un système de criblage de clones a été développé (nommé CSbyDG pour Clone Screening by Denaturing Gradient). Ce crible est basé sur le regroupement des clones présentant un profil DGGE à trois bandes identique. Aucun programme informatique n'étant à même de réaliser un tel regroupement, l'auteur a alors entrepris d'en élaborer un de toutes pièces (nommé ProReg XL Tool pour Profile Regrouping Excel Tool).

Trois grandes parties formeront l'ossature du présent manuscrit.

Tout d'abord, un premier chapitre, découpé en trois parties, permettra d'introduire notre propos. Ainsi, dans une première partie, seront présentés les notions de Vie symbiotique ainsi que le vocabulaire associé. Le cas particulier des flores digestives au sein de cette Vie symbiotique sera également abordé. Ensuite, une deuxième partie exposera les connaissances actuelles dans le domaine des flores digestives des animaux supérieurs ainsi que la problématique mêlant l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes, la législation sur l'usage des antibiotiques dans les élevages et l'emploi de modulateurs des flores digestives non-antibiotiques comme les probiotiques et prébiotiques. Enfin, une troisième partie verra une discussion sur les techniques d'identification bactérienne, particulièrement par approches moléculaire et phylogénétique.

Un deuxième chapitre illustrera l'emploi des outils moléculaires dans des applications spécifiques à l'identification des bactéries présentes dans les flores digestives de deux galliformes, le poulet et la dinde. En fait, une première partie traitera de l'action de l'avilamycine, un antibiotique vétérinaire, sur l'équilibre des flores digestives du poulet d'élevage. Puis, dans une deuxième partie, seront démontrés l'impact sur les flores intestinale et caecale du poulet de substitutifs aux antibiotiques en tant que facteurs de croissance tel que des huiles essentielles et du scFOS. Enfin, dans une troisième et dernière partie, il sera établi l'intérêt des techniques utilisées dans l'identification d'un pathogène putatif des entérites non-spécifiques observées fréquemment dans les élevages de dindes français et étrangers.

Enfin, un troisième chapitre sera consacré aux apports des présents travaux dans le domaine de l'identification bactérienne, essentiellement dans l'identification bactérienne des microflores complexes. Seront ainsi détaillés, dans une première partie tout d'abord, le programme ProReg XL Tool écrit en Visual Basic Application puis, dans une seconde partie, la technique de CSbyDG permettant le criblage de clones de banques d'ADNr 16S. ProReg XL Tool permet le regroupement de profils électrophorétiques identiques; il s'agit, en ce sens, du complément indispensable à la CSbyDG. Une troisième partie illustrera une perspective possible de la technique de criblage de clones CSbyDG dans le domaine de l'identification bactérienne. Cette perspective s'appuie sur la réalisation d'une base de données de profils qui permettrait à terme d'identifier une bactérie sans séquençage sur la seule vue de son profil CSbyDG.

CHAPITRE UN
CHAPITRE INTRODUCTIF

Tableau I.1 : Tableau récapitulatif des différents types de relations symbiotiques existant dans le Vivant avec leur étymologie, leur bénéfice pour le symbiote et l'hôte et leur définition.

(+ : bénéfique ; - : délétère ; n : neutre)

Les différentes références sont disponibles dans le texte du manuscrit au chapitre relatif à chaque symbiose.

Type de symbiose	Etymologie	Bénéfice symbiote/hôte	Définition
amensalisme	du privatif <i>a</i> et latin <i>mensa</i> (table)	+/-	Relation biologique où un être vivant limite le développement d'un autre.
commensalisme	du latin <i>co</i> (avec) et <i>mensa</i> (table)	+/n	Relation biologique entre deux ou plusieurs êtres vivants où l'hôte fournit de manières diverses une partie de sa nourriture au symbiote sans bénéfice réciproque.
inquilinisme	Du latin <i>inquilinus</i> (locataire)	+/n	Relation biologique où un être vivant sert d'abri et de protection à un autre.
metabiose	Du grec <i>meta</i> (au delà de) et <i>bio</i> (vie)	n/+	Relation biologique où un être vivant profite du métabolisme d'un autre pour survivre ou se multiplier. Le métabolisme en question peut être de type trophique ou structural.
mutualisme	dérivé du latin <i>mutuus</i> (réciproque)	+/+	Relation biologique facultative et temporaire entre deux voire plusieurs êtres vivants où s'opère entre eux un échange d'intérêt métabolique, biochimique ou morphologique.
opportunisme	Du latin « tirer avantage de »	+/n ou -	Relation biologique où un être vivant profite d'une situation donnée par un autre pour se développer et se reproduire.
parasitisme	du latin <i>para</i> (à partir de) et <i>sit</i> (nourriture)	+/-	Relation biologique facultative entre deux êtres vivants mais indispensable à la survie du symbiote qui vit au dépend de son hôte en s'en nourrissant, s'y abritant et s'y reproduisant.
phorésie	du grec <i>phorêsis</i> (déplacement, mouvement)	+/n	Relation biologique libre entre deux êtres vivants où le premier, appelé le phoronte, est transporté par le second sans conséquence négative ou positive sur ce dernier.
saprophytisme	du grec <i>sapro-</i> et <i>-phyte</i> , qui aime la matière morte	+/n	Mode de vie d'un être vivant capable de décomposer des matières organiques pour se nourrir et par la même fournir des anabolites aux autres êtres vivants proches.
symbiose vraie	du grec « vivre en communauté »	+/+	Relation biologique étroite et obligatoire entre deux êtres vivants hétérospécifiques où leur survie est dépendant de l'apport de chacun.
synécrose	du grec « mort en commun »	-/-	Relation biologique de type compétitive (trophique ou autre) entraînant la mort de deux populations ou groupes de populations d'être vivants.
syntrophie	du grec « nourriture en commun »	+/+	Relation biologique facultative d'intérêt trophique entre deux espèces du règne bactérien (eubactérie ou archéobactérie).

I. Vie symbiotique : vocabulaire et définition

L'ubiquité de la Vie symbiotique n'est plus à prouver. L'écosystème à l'échelle planétaire regorge d'associations de type symbiotique que ce soit en milieu marin, en milieu terrestre, chez les animaux, les insectes, les végétaux ou les bactéries. Les microflores complexes, comme celles présentes dans le tractus digestif des animaux supérieurs, présentent un nombre important d'interactions et particulièrement de type symbiotique ; il n'est donc pas rare de les voir qualifier de saprophytes, commensales, symbiotiques, mutualistes ou encore opportunistes. Mais qu'en est-il réellement ? Ces termes sont-ils pompeux, imprécis, inadaptés ou sont-ils justement employés ?

Il n'est pas vocation au présent manuscrit de détailler et discuter l'ensemble du lexique dédié aux associations biologiques de type symbiotique. Celui-ci pourrait en effet représenter un manuscrit à lui seul, cependant, comme tout scientifique attelé à l'étude des flores complexes bactériennes, l'auteur a rencontré de nombreuses incohérences lexicales au cours de ses recherches documentaires et littéraires et il estime louable et intéressant de se pencher sur ce domaine de la Biologie ô combien vaste et digne d'intérêt tant il permet de mettre en évidence la complexité des échanges et interactions biologiques rencontrées dans le règne du Vivant dans sa globalité comme dans certains de ses sous-ensembles comme les microflores complexes. Ces dernières ne sauraient être comprises sans ces notions.

Introduit à la fin du XIXe siècle par le botaniste allemand Anton de Bary pour désigner la vie associative de deux organismes (ses travaux portaient tout particulièrement sur le lichen), le terme « symbiose » a connu, depuis, de nombreuses déclinaisons afin de s'accorder au fil du temps avec les nouveaux modes de vie associatifs découverts par les biologistes.

Aujourd'hui, la symbiose s'emploie en Biologie pour désigner l'association durable ou éphémère existant entre deux êtres vivants d'espèces différentes, le plus petit étant appelé généralement « symbiote » et le plus grand « hôte ». Le premier jouit toujours de cette union tandis que le dernier peut en profiter comme il peut en être délétère. Différents sous-types de symbiose dérivent de cette définition et le vocabulaire disponible est riche et complexe, les

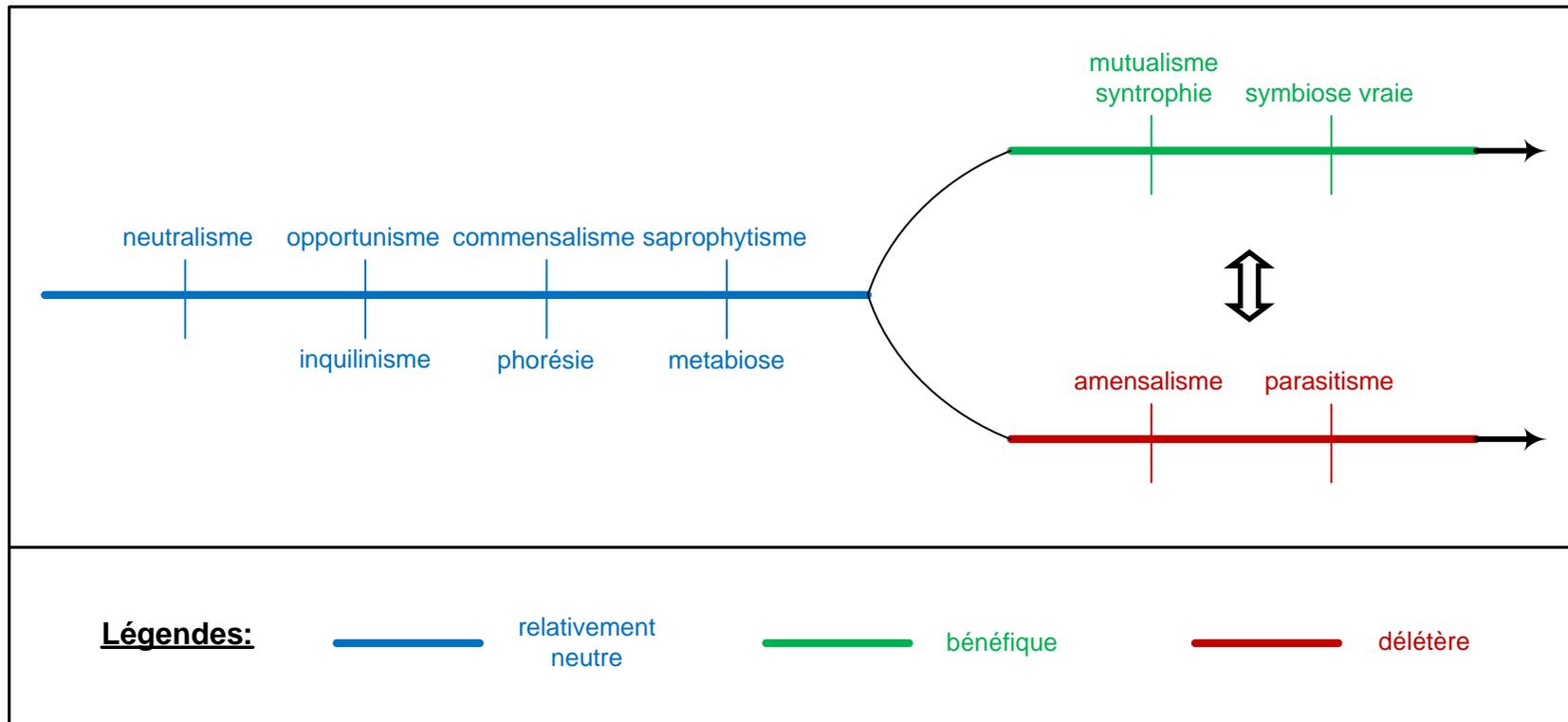


Figure I. 1 : Représentation schématique des relations évolutives existant entre les différents types de symbiose.

D'après sans auteur (1927), Ewald (1987) et Zelmer (1997).

nouvelles découvertes en la matière entraînant les scientifiques à d'incessants remaniements du champ lexical de la Vie symbiotique (cf tableau I. 1).

I. A. Les grands types de symbiose

I. A. 1. La symbiose vraie

Dans son sens le plus strict, la symbiose désigne l'association biologique étroite, durable et indispensable à la survie de deux organismes vivants. Mais pour bon nombre d'auteurs, le terme « symbiose » désigne également l'ensemble des interactions plus ou moins étroites existant entre deux organismes de manière continue ou sporadique.

L'un des exemples les plus connus de symbiose vraie est sans nul doute celui de la symbiose lichénique entre un champignon hétérotrophe et une algue ou une cyanobactérie autotrophe (Scott, 1964 ; Ahmadjian, 1965 ; Smith, 1975). Dans cette symbiose, la vie des deux protagonistes est si étroitement liée qu'ils ont été définis historiquement comme un seul et même individu puisque totalement indissociables. En fait, seul le champignon a adapté sa génétique à cette symbiose, l'algue ou la cyanobactérie ne fait que subvenir aux besoins du champignon particulièrement par son activité photosynthétique. Le champignon cultive ni plus ni moins en son sein son symbiote et le transmet à sa descendance par bourgeonnement et sporulation.

La symbiose ectomycorhizienne est également une symbiose vraie. Elle fait participer un champignon et les racines d'un végétal. Cette symbiose est fortement étudiée compte tenu de son rôle majeur dans la nutrition de la plante et donc de son rendement (Harley et Smith, 1983 ; Smith et Read, 1997). De même, on peut également ajouter aux symbioses vraies, celle du corail et de la zooxanthelle (Rowan et Knowlton, 1995).

La symbiose vraie est également connue dans les flores digestives. L'une des premières publications en 1923 à faire état de symbiose vraie est en effet dédiée aux protozoaires colonisant le tube digestif des termites, protozoaires qui leur permettent de dégrader la cellulose du bois qu'ils ingèrent (Cleveland, 1923). Plus récemment, il a été démontré que des bactéries présentes dans la lumière du tube digestif des animaux supérieurs apportaient à leur hôte nombre d'avantages comme la dégradation de nutriments indigestibles

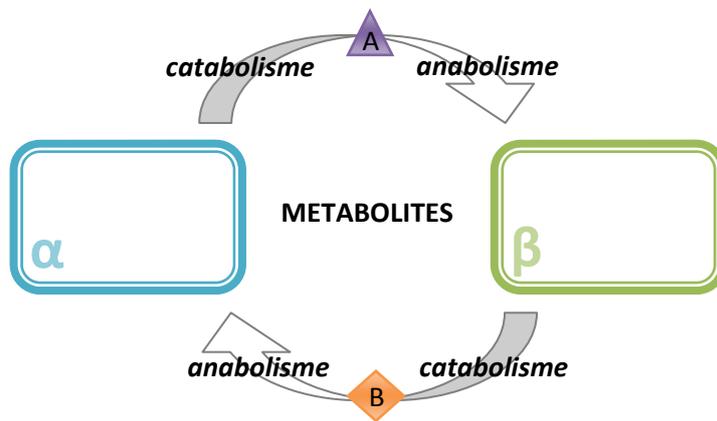


Figure I.2 : Représentation schématique d'une relation syntrophique entre deux entités α et β et leurs métabolites A et B.

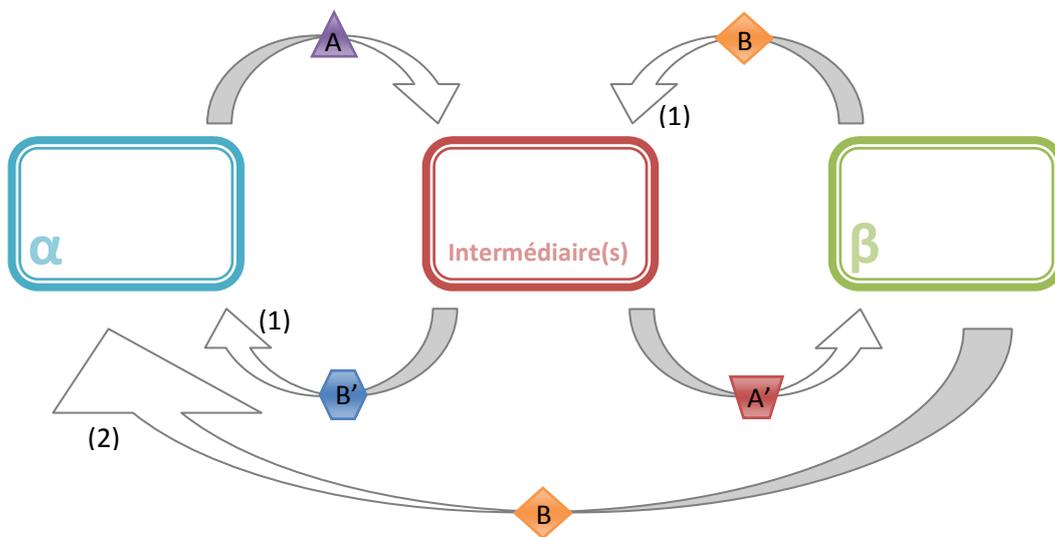


Figure I.3 : Représentation schématique d'une relation syntrophique en chaîne avec entité(s) intermédiaire(s).

Deux possibilités indépendantes peuvent être envisagées : (1) le (les) intermédiaire(s) dispose(nt) d'une double activité enzymatique ou (2) d'une seule activité enzymatique.

par la biochimie de l'hôte, la synthèse de vitamines (K, B12), ou encore la lutte contre les pathogènes par compétition (Bourlioux, 1994 ; Stevens et Hume, 1998). Ces bactéries avantageuses pour leur hôte et profitant de la nourriture et de la protection de celui-ci peuvent donc être qualifiées de symbiotes en symbiose vraie.

I. A. 2. Le mutualisme : la symbiose facultative

Le mutualisme est une association biologique facultative entre deux organismes vivants où un bénéfice réciproque pour les deux parties découle de cette union. De cette association, le symbiote profite de la nourriture et de la protection de son hôte pendant que celui-ci récupère "en retour" une activité biochimique spécifique du symbiote qui est profitable mais non indispensable à son développement. La différence avec une symbiose vraie réside dans la dimension temporelle de l'association : de discontinue pour le mutualisme, elle passe à continue et indispensable en symbiose vraie.

D'un point de vue évolutif, le mutualisme dérive probablement de relations parasites et d'une adaptation des deux espèces car la modification de l'une peut influencer la survie de l'autre voire même dans certains cas sa reproduction (cf figure I. 1).

I. A. 3. La syntrophie: le mutualisme bactérien

Lorsque l'association biologique est mutualiste et qu'elle concerne deux bactéries, ce mutualisme de type bactérien est appelé syntrophie. La syntrophie concerne généralement un échange trophique et métabolique, les catabolites de l'une des entités devenant les anabolites essentielles et indispensables de la seconde et inversement (cf figure I. 2). Les voies métabolites concernées sont très variées comme en atteste l'article de McNerney *et al.* en 2008. Dans une telle association, la notion de symbiote et d'hôte est perdue, aucune des parties ne "colonisant" une autre mais vivant plutôt en étroite synergie. Une telle association est retrouvée et étudiée dans les expérimentations de co-cultures bactériennes.

La plupart des exemples de syntrophie concerne des co-cultures d'une eubactérie et d'une archéobactérie (très souvent lié au cycle du méthane : Schnurer *et al.*, 1996 ; Sousa *et al.*,

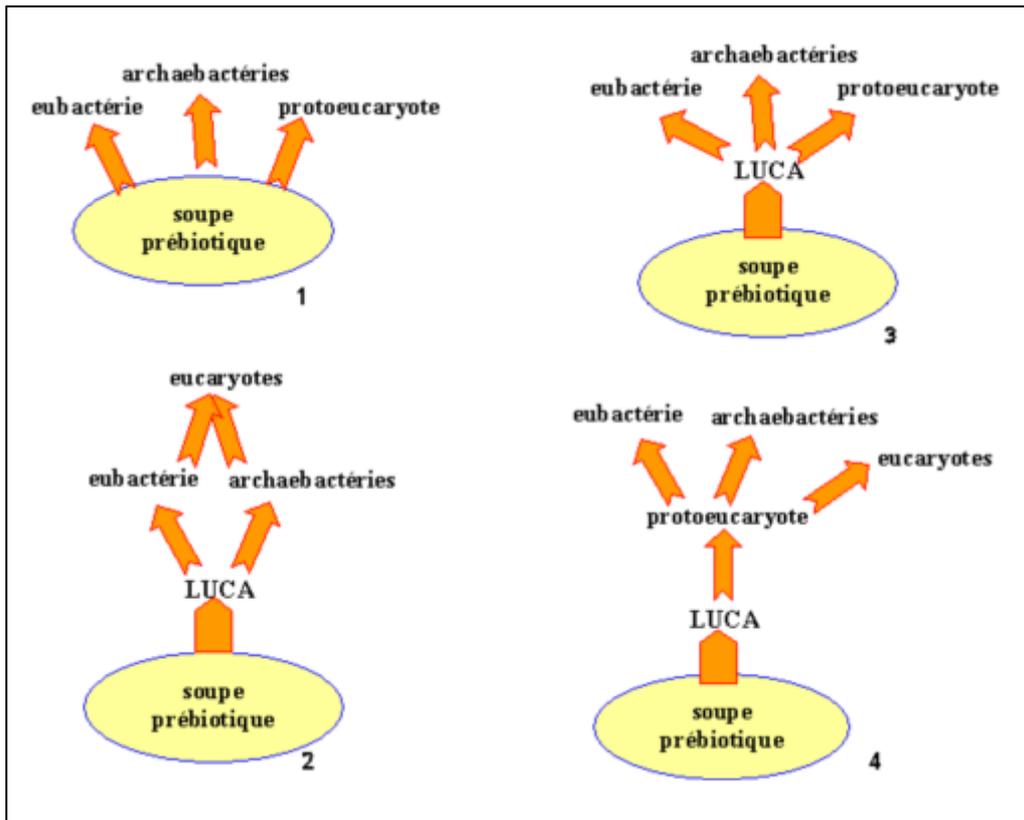


Figure I. 4 : Représentation schématique des quatre grandes théories sur l'origine des eucaryotes.

D'après Moreira et Lopez-Garcia, (1998).

2007 ; Barik *et al.*, 1985) bien que des exemples avec deux eubactéries existent également (exemple entre *Lactobacillus plantarum* et *Streptococcus faecalis* : Krieg et Pelczar, 1961). C'est d'ailleurs l'une des principales explications évoquée pour expliquer la théorie éponyme sur l'apparition des eucaryotes. Une archéobactérie aurait alors été invaginée par une eubactérie formant ainsi une cellule plus complexe "eucaryote" avec des organites nouveaux du type mitochondrie ou chloroplaste (Moreira et Lopez-Garcia, 1998). La figure I.4 illustre les quatre théories envisagées sur l'apparition des eucaryotes; la syntrophie est en deuxième position. Dans ce dernier cas, on parle de genèse eucaryote par endosymbiose.

Dans le cas des flores complexes, la syntrophie est difficilement observable, d'autant qu'elle peut refléter différents visages : syntrophie simple ou syntrophie de chaîne avec intermédiaire(s) (cf figure I.3). Dans de tels microbiotopes, la métagénomique est d'une aide précieuse car elle permet de mettre en évidence les relations trophiques entre organismes sans avoir à recourir à leur culture (Pernthaler *et al.*, 2008).

I. A. 4. Le commensalisme ou les compagnons de table

Étymologiquement, le commensalisme désigne des associations biologiques où les individus "mangent à la même table". De manière plus scientifique, le commensalisme est l'association biologique facultative liant deux êtres vivants et où l'un d'eux profite de la protection et d'une partie de la nourriture acquise par le second, ceci à ses dépens mais sans toutefois lui nuire directement. Le bénéfice est de fait non-réciproque mais le commensal est cependant le plus souvent ignoré de l'hôte. Seul le commensal a besoin de son hôte pour survivre.

Dans un grand nombre de cas, le commensal vit dans les cavités de l'hôte comme c'est le cas par exemple de la flore commensale du tube digestif des animaux supérieurs (Brisbin *et al.*, 2008 ; Cartwright, 1974) ou encore chez les holothuries. On parle dans ce cas d'endocommensalisme (Long *et al.*, 2007). Si le commensal est topiquement externe à l'hôte, on parle d'ectocommensal (Hughes-Stamm *et al.*, 1999).

Bien que considéré comme non nuisible, l'endocommensal détourne néanmoins des nutriments de son hôte pour ses propres besoins trophiques, privant ainsi son hôte d'une partie non négligeable de ses ressources alimentaires. Cette idée est illustrée par la prise de poids

des animaux d'élevage observée en présence d'antibiotique comme facteur de croissance. L'antibiotique agit sélectivement sur une partie de la flore digestive de l'animal, éliminant ainsi une part de la compétition trophique qui existe entre l'hôte et ses commensaux. L'animal dispose alors d'une plus grande quantité de nutriments et ses capacités zootechniques en sont ainsi améliorées (Elwinger *et al.*, 1998). Les endocommensaux du tube digestif des animaux supérieurs pourraient alors tout à fait être classés parmi les parasites.

I. A. 5. L'amensalisme : l'antagoniste du commensalisme

L'amensalisme n'est pas une association biologique en soi car, par définition, non durable mais plutôt une simple interaction biologique entre deux espèces vivantes dans laquelle une d'elles inhibe par diverses stratégies le développement de la seconde.

Principalement observé entre végétaux, l'amensalisme est aussi présent dans les règnes bactérien et animal.

Chez les végétaux, le noyer *Juglans regia* sécrète depuis ses feuilles la juglone, une phytotoxine limitant le développement d'autres espèces autour de son pied et ainsi réservant les ressources du sol à ses seuls besoins (Soderquist, 1973).

Chez les micro-organismes, le *Penicillium* se réserve les ressources du milieu en écartant les bactéries sensibles à la pénicilline (Bornstein, 1940). L'amensalisme s'observe également dans les communautés bactériennes comme les flores complexes. Certaines bactéries disposent en effet d'une biochimie, principalement dédiée à la synthèse de bactériocines, leur conférant des propriétés bactériostatiques voire bactéricides. Ainsi, le lactobacille *Lactobacillus reuteri* dispose-t-il d'une substance excrétée et appelée reuterine lui permettant de limiter, avec un large spectre, le développement des bactéries voisines mais aussi des champignons, levures et protozoaires voisins (Talarico et Dobrogosz, 1989).

Chez l'Homme, les gencives sécrètent du lysozyme pour réduire la formation de la flore responsable de la plaque dentaire et pour lutter contre les maladies parodontales inflammatoires (Younes *et al.*, 2008). Cette sécrétion gingivale peut être considérée comme amensale.

L'effet Jameson (Jameson, 1962; Stephens *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2000) peut trouver interprétation dans l'amensalisme. Il est caractérisé, dans une microflore donnée, par une hausse générale de la croissance de la microbiocénose au détriment d'un organisme ou groupe d'organismes donnés qui vont décroître numériquement. Cet effet Jameson peut donc s'expliquer par une simple compétition biochimique et trophique ou encore par un métabolisme de la flore majoritaire défavorable à une bactérie donnée ou un groupe de bactéries, que ce soit par la production de bactériocines, de catabolites néfastes ou par la modification des conditions physico-chimiques du microbiotope. Dans ce dernier cas, il s'agit clairement d'un antagonisme à la métabiose, comme on peut le retrouver dans le processus de production d'acide lactique entrepris par les bacilles de Döderlein (principalement *Lactobacillus acidophilus*) à partir du glycogène sécrété par les muqueuses vaginales (Lepargneur et Rousseau, 2002). L'effet Jameson serait responsable des difficultés rencontrées dans l'isolement des souches pathogènes d'*Escherichia coli* O157:H7 dans les laits non pasteurisés (Williams et Neaves, 1999).

I. A. 6. Le saprophytisme ou l'art de recycler la matière organique

Le saprophytisme n'est pas une association biologique au sens strict mais plutôt une manière de vivre d'organismes capables de se nourrir de matière organique morte en les décomposant. Certaines formes de saprophytisme font intervenir trois protagonistes: l'organisme mort fournissant la matière en décomposition, l'agent ou les agents micro-organiques initiant la décomposition (le seul des trois à être réellement appelé saprophyte au sens strict) et enfin un organisme opportuniste profitant des produits de dégradation produits par le saprophyte.

La Nature regorge de saprophytes impliqués dans le recyclage des matières organiques du Vivant et de fait liés de manière très étroite à l'équilibre biologique naturel. L'humus, source minérale première des végétaux, est ainsi formé par dégradation de débris végétaux par les flores complexes du sol constituées de bactéries et de champignons (Kapoor *et al.*, 1978 ; Mishra *et al.*, 1979). Ces communautés microbiennes du sol jouent un rôle capital dans le cycle de la matière (cycles du carbone et de l'azote). De même, une partie des flores digestives peut être considérée comme saprophyte, l'animal « hôte » devenant de fait, tout comme une grande partie de la microflore, un opportuniste en puisant dans les éléments

dégradés. Le terme « saprophyte » se voit également employé pour caractériser d'autres flores épithéliales des animaux supérieurs comme celles de la peau, du vagin ou de la bouche (Macura, 1995).

Les micro-organismes saprophytes sont de puissants recycleurs de la matière organique et ils disposent d'une panoplie biochimique qui intéresse fortement la communauté scientifique (Yamagushi et Yokoe, 2000 ; Sanchez *et al.*, 2004 ; Yun *et al.*, 2004). La mise en évidence de micro-organismes dépolluants ou recycleurs représente en effet une grande partie de l'activité de recherche des équipes spécialisées dans les microflore du sol. Le potentiel économique de tels organismes est grandissant dans une société où les déchets sont devenus un problème majeur.

I. A. 7. Le parasitisme: entre symbiose et prédation

Le parasitisme est l'un des premiers termes à avoir été défini et employé pour qualifier une association biologique entre deux organismes. Dans le cas du parasitisme, l'association est de telle sorte que le symbiote vie alors au dépend de son hôte et souvent s'en nourrit. La mort de l'hôte, par définition, n'est jamais souhaitable ni bénéfique au symbiote, sa vie étant étroitement dépendante de celle de son hôte et de son état de santé. Dans le cas où la mort de l'hôte survient, on parle plutôt de parasitoïde. Dans ce contexte, l'hôte sert de nourriture à un stade précoce du développement du parasitoïde souvent au stade larvaire. On peut citer pour exemple de parasitoïdes, certains diptères qui pondent leur œufs dans les naseaux des bovidés; leurs larves se nourrissent alors de leur hôte jusqu'à entraîner sa mort. Certains parasitoïdes peuvent se révéler utiles en agriculture en tant que bioinsecticides comme le trichogramme par exemple, un parasitoïde oophage, qui est utilisé pour lutter contre la pyrale du maïs en pondant ses œufs dans les propres œufs de la pyrale (Smith, 1996). Les larves de l'hyménoptère vont alors se nourrir de l'albumen des œufs de pyrale : le trichogramme devient alors ce qu'on appelle un hyperparasite car parasite d'un autre parasite. Il est à noter que l'hyperparasitisme peut également désigner simplement une importante charge parasitaire chez l'hôte.

Trois grandes formes de parasite peuvent être définies selon leur localisation chez leur hôte : l'ectoparasite, le mésoparasite et l'endoparasite. L'ectoparasite est localisé sur les

parties externes de l'hôte, l'épiderme ou les cavités dérivant du feuillet épidermique embryonnaire comme les cavités buccales et branchiales. Parmi les animaux, les genres *Acari* (tique) (Kaliszewski *et al.*, 1995), *Siphonaptera* (puce) (Krasnov *et al.*, 2006), *Phthiraptera* (pou) (Barker, 1996) ou encore *Hirudinea* (sangsue) (Meyer, 1949) sont de bons exemples d'ectoparasites, tout comme le gui chez les plantes. Le mésoparasite se retrouve dans les cavités de l'hôte dérivant du feuillet mésodermique embryonnaire comme les intestins, le foie, les poumons ou les sinus par exemple. La frontière entre ectoparasite et mésoparasite est parfois difficile à cerner comme dans le cas des cavités branchiales. Le meilleur exemple de mésoparasite est certainement ceux présents dans la lumière intestinale comme les vers plathelminthes du genre *Taenia* (Baer, 1956) ou le champignon unicellulaire *Candida albicans* (Deslauriers *et al.*, 1995), principal responsable des candidoses humaines particulièrement chez l'immunodéprimé. Enfin, l'endoparasite est capable de pénétrer directement dans les tissus, le système sanguin ou les cellules de l'hôte. Les endoparasites sont légion et se rencontrent dans tous les règnes du Vivant. La bactérie *Legionella pneumophila* est l'exemple le plus fameux d'endoparasite bactérien; elle est qualifiée de parasite intracellulaire (Belyi, 1999).

De nombreux parasites ont besoin de deux hôtes taxinomiquement éloignés pour compléter leur cycle de vie ; ils sont mésoparasites chez l'un et endoparasites chez l'autre. On peut citer comme exemples la leishmaniose (Alexander *et al.*, 1999) ou les trypanomiasés.

Le parasitisme est considéré comme défavorable pour l'hôte, bien que souvent ce dernier ignore la présence de son symbiote et qu'il peut même dans certain cas en éprouver un bien être (cas rare de neurosyphilis rapportée par Olivier Sacks dans son excellent livre « L'homme qui prenait sa femme pour un chapeau », 1992, éditeur « Seuil »).

A la frontière entre prédation et symbiose, le parasitisme est apparu relativement tôt dans l'évolution. Pour certains auteurs (sans auteur, 1927 ; Ewald, 1987 ; Zelmer, 1997), le parasitisme serait une simple évolution de la symbiose, une sorte de transition entre phorésie et commensalisme (cf figure I.1).

I. A. 7. La phorésie : le transport en commun symbiotique

La phorésie est un type d'association biologique facultative entre deux organismes vivants où le premier, appelé phoronte, est transporté par le second, l'hôte. Le phoronte est souvent également commensale de son hôte. Nombre de parasites et de pathogènes peuvent être également considérés comme phorontes de leur hôte. Ils profitent alors de ce dernier pour être « présentés » à de nouveaux individus et ainsi les contaminer de proche en proche. De même, les eaux de boissons et baignades sont-elles contaminés par des entérocoques fécaux provenant des excréments des animaux. Ils vont alors contaminer d'autres individus de proche en proche.

Il existe deux modes de phorésie : l'épiphorésie et l'endophorésie. L'épiphorésie est caractérisée par une localisation externe du phoronte, généralement sur l'épiderme de l'hôte. C'est le cas par exemple des arthropodes comme certains acariens qui peuvent s'abriter sous l'abdomen antérieur de lucanes et ainsi profiter de l'envol du coléoptère pour coloniser d'autres plantes (Macchioni, 2007) ; de même les poux sont des phorontes des animaux à fourrure comme des insectes (Barreto *et al.*, 2001). Au contraire, l'endophorésie est caractérisée par une localisation du phoronte interne à l'organisme de l'hôte comme par exemple avec le fierasfer, un poisson anguilliforme, capable de pénétrer par l'anus son hôte, certaines espèces échinodermes d'holothuries appelées plus communément concombre de mer (Parker, 1926 ; Britaev *et al.*, 1994)).

I. A. 8. L'inquilinisme : une association spatiale sans exigence physiologique

L'inquilinisme est une association biologique facultative entre deux organismes vivants où la nécessité de l'un n'est que spatiale sans aucune exigence physiologique. L'organisme symbiote recherche alors protection, généralement contre ses prédateurs, dans les cavités ou la masse de son hôte. L'inquilinisme est principalement retrouvé dans les écosystèmes marins bien qu'il soit présent dans l'ensemble des systèmes du Vivant.

De telles associations sont courantes entre poissons et gastéropodes (Parmentier *et al.*, 1998 ; Hamel et Mercier, 1999 ; Flammang *et al.*, 2002) et entre crustacés et bivalves (Takeda *et al.*, 1997).

I. A. 9. L'opportunisme

Le terme d'opportunisme est principalement employé en microbiologie et entomologie pour désigner des micro-organismes ou insectes profitant d'une situation ponctuelle pour se multiplier. Des vers polychètes ainsi que des bactéries sulfureuses des plaines abyssales océanographiques profitent ainsi des carcasses des baleines échouées sur les fonds marins pour se développer (Craig et Baco, 2003).

Cette notion est à rapprocher des maladies et pathogènes opportunistes observés en clinique généralement chez des patients immuno-déprimés dans les cas de chimiothérapies anticancéreuse et immunosuppressive ou d'atteinte du sida par exemple. Les maladies les plus fréquentes sont des pneumopathies de type bactérienne (tuberculose ou mycobactériose par exemple), virale (CMV ou HSV par exemple), parasitaire (pneumocystose ou toxoplasmose par exemple) et mycosique (candidose ou aspergillose par exemple) (Poindexter et Washington, 1974). L'emploi du terme pathogène reste abusif pour nombre d'agents bactériens impliqués dans de telles pathogénies car ils ne font pas nécessairement appel à des gènes de virulence.

I. A. 10. La métabiose : un opportunisme très spécialisé

La métabiose est une association biologique particulière dans le sens où elle a lieu en deux temps. Un premier partenaire, le donneur, va produire un élément ou modifier l'environnement dans un premier temps, ce qui, en un second temps, va favoriser la vie et le développement d'un second partenaire, le receveur. Le receveur est donc dépendant du donneur à produire un environnement favorable à sa survie.

La métabiose représente un enjeu d'étude pour contrôler la transmission de nombreux pathogènes par l'alimentation. D'après Wade et Beuchat (2003), une métabiose entre

moisissures protéolytiques et des salmonelles serait à l'origine de la récente recrudescence d'infections humaines par consommation de légumes crus. Le développement de champignons (*Cladosporium herbarum* ou *Alternaria alternata*) ou de bactéries (*Clostridium cladosporioides*) sur le péricarpe de la tomate augmenterait son pH de 2,3 unités rendant le milieu neutre et acceptable pour une culture de salmonelles (*S. montevideo* ou *S. enterica*). Les *Pseudomonas* pourraient aussi favoriser dans le lait la croissance de pathogène humain comme *Staphylococcus aureus* (Seminiano et Frazier, 1966). Dans le poisson fumé avarié, une baisse de la concentration en oxygène par certaines bactéries Gram-négatives permettrait la croissance de bactéries anaérobies strictes tel que *Clostridium botulinum* (Huss *et al.*, 1979).

La métabiose serait fortement impliquée dans la dégradation de la nourriture en favorisant la production d'amines biogéniques - produits finaux de la dégradation des acides aminés - comme la putrescine et la cadavérine. Gram *et al.* (2002) précisent la possibilité que des *Pseudomonas spp.* puissent par production de sidérophores chélateurs du fer favoriser certaines bactéries responsables de la genèse d'amines biogéniques. De même, Dainty *et al.* (1986), Jorgensen *et al.* (2000) et Edwards *et al.* (1985) soulignent la possibilité d'association entre des bactéries de la famille *Enterobacteriaceae* et des bactéries lactiques et entre *Serratia proteamaculans* ou *Hafnia alvei* et des bactéries lactiques capables de dégrader l'arginine pour former des amines biogéniques.

I. B. Flores digestives et symbiose

Le cas des flores digestives est intéressant dans le cadre de la lexicographie de la symbiose tant le vocabulaire employé par les biologistes est riche et varié en le domaine. Mais est-il bien contrôlé et employé pertinemment et correctement ? On retrouve en effet régulièrement l'usage des expressions "flore symbiotique", "flore saprophyte", "bactéries commensales" ou encore "bactéries mutualistes" pour qualifier les flores du tractus digestif.

Les populations microbiennes du tractus digestif peuvent-elles être qualifiées de parasites ?

Certaines populations de la microbiocénose digestive de l'humain sont reconnues comme parasite du tube digestif; c'est le cas de *Candida albicans*. Ce champignon unicellulaire n'offre en effet à son hôte aucun effet bénéfique reconnu et pire, tout en consommant une partie de ses ressources alimentaires, *C. albicans* tapisse les voies digestives de son hôte limitant ainsi, en partie, l'absorption des nutriments destinés à ce dernier. De plus, *C. albicans* peut se révéler pathogène et entraîner des candidoses pouvant se révéler mortelles. Bien que nous soyons tous porteurs sains de cette levure, sa mise en évidence à des taux trop élevé entraîne médicalement son traitement par un antifongique comme l'amphotéricine B.

L'emploi à des doses sous-thérapeutiques des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les élevages intensifs d'animaux a démontré de longue date ses effets bénéfiques sur leur croissance. Cet effet zootechnique bien qu'incompris est admis et expliqué aujourd'hui par l'action bactéricide de l'antibiotique sur une partie des populations bactériennes présentes naturellement dans le tractus digestif des animaux, entraînant une baisse de la compétition trophique entre bactéries et hôte. De cette action bénéfique à l'hôte découle une disponibilité des nutriments plus importante et donc une prise de poids plus importante. Cet effet de l'antibiotique présente les bactéries vivant dans le tube digestif des animaux supérieurs, ou du moins une partie d'entre elles, comme inhibitrice du développement de leur hôte et entre ainsi parfaitement dans la définition du parasitisme. Néanmoins, cette vision peut paraître minimaliste car, si les bactéries du tube digestif entre *a fortiori* en compétition trophique avec leur hôte, il n'en demeure pas moins qu'elles peuvent avoir, en retour de leur anabolisme consommateur, un catabolisme bénéfique pour leur hôte. Ainsi, on peut imaginer qu'à terme, les animaux d'élevage pourraient souffrir d'un taux de cancers du colon plus important, voire de toute autre complication digestive nuisible à leur santé. Certes, les animaux d'élevage n'étant pas destinés à vivre au delà de leur phase de croissance, ce problème ne se pose pas, mais il pourrait se poser chez l'humain. N'y a-t-il donc pas un risque pour la physiologie du tube digestif à terme de détruire une partie de la flore digestive en prenant de trop grande quantité d'antibiotique? Pour répondre à cette question et ainsi pouvoir affirmer que certaines bactéries du tube digestif des animaux supérieurs sont bien des parasites, il faudra s'assurer que les bactéries inhibées par les antibiotiques n'ont aucun des effets bénéfiques qui ont été répertoriés chez les flores digestives.

Les populations microbiennes du tractus digestif peuvent-elles être qualifiées de commensales ?

A n'en point douter, les micro-organismes présents dans le tube digestif des animaux supérieurs peuvent être, de part leur localisation trophiquement privilégiée, qualifiés de commensaux et même, plus précisément, d'endocommensaux. Néanmoins, la question reste posée sur le fait qu'il s'agisse de commensaux parasites ou de commensaux mutualistes...

Peut-on également envisager qu'une bactérie puisse ne pas être un commensal de son hôte mais simplement vivre des catabolites de ses congénères, de manière syntrophique ou non et sporadique ou continue ? S'il s'agit d'un état sporadique, on peut imaginer que son métabolisme pourrait alors être, dans sa phase commensale, dépendant de nutriments occasionnellement présents dans l'alimentation de l'hôte et, dans sa phase non commensale, dépendant de nutriments catabolites de ses congénères lorsque ceux-ci ne sont plus présents dans l'alimentation de l'hôte.

Les populations microbiennes du tractus digestif peuvent-elles être qualifiées de saprophytes ?

Comme nous l'avons vu précédemment, les saprophytes sont des êtres vivants qui puisent leurs ressources dans des éléments organiques morts qu'ils vont alors décomposer pour en extraire les éléments trophiques élémentaires. Les aliments ingérés par les animaux supérieurs étant en grande partie de nature organique, leurs flores digestives peuvent être qualifiées en totalité ou en partie de saprophytes.

Saprophyte ou commensale ? La seule distinction notable entre une bactérie qualifiée de commensale et une bactérie qualifiée de saprophyte réside dans la compétition trophique avec l'hôte. Ainsi, pour un élément nutritif donné, si l'hôte dispose de la biochimie adéquate pour l'assimiler, il y a compétition trophique avec la bactérie et donc celle-ci est qualifiée de commensale. Par contre, si l'hôte ne dispose pas de la biochimie nécessaire à l'assimilation d'un élément nutritif donné (comme les fibres par exemple), il s'agira alors de saprophytisme. On peut néanmoins tout à fait envisager qu'un micro-organisme donné dispose des deux propriétés de manière concomitante.

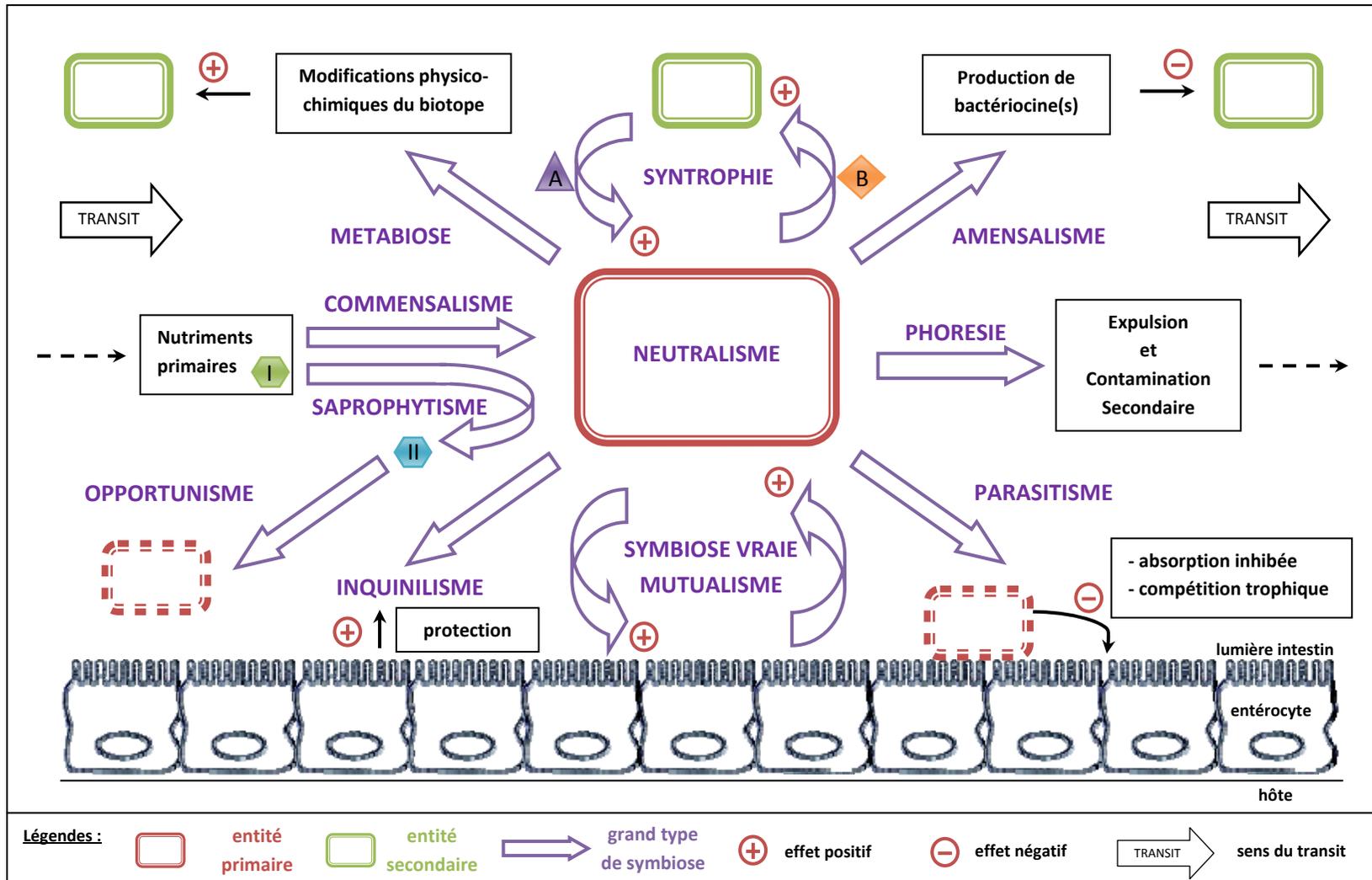


Figure I. 5 : Représentation schématique des différents type d'interactions de type symbiotique pouvant être rencontrées dans la microflore du tractus digestif des animaux supérieurs.

Les populations microbiennes du tractus digestif peuvent-elles être qualifiées de mutualistes ou symbiotiques ?

Pour qu'une bactérie du tube digestif puisse être qualifiée de symbiotique, il faut : 1) que cette bactérie ne se retrouve que dans les cavités digestives des animaux supérieurs, 2) que son hôte lui apporte nourriture et protection et enfin 3) que cette bactérie fournisse en retour un bénéfice à son hôte. Dans le cas du mutualisme, seuls les points 2) et 3) doivent être pris en considération car le mutualiste par définition peut vivre sans son hôte et vice-versa. *Faecalibacterium prausnitzii* est un bon exemple de relation symbiotique, vu que celle-ci n'est pas présente en dehors du tube digestif des animaux supérieurs et est réputée bénéfique pour son hôte. D'autres bactéries, comme *Escherichia coli*, présente dans et en dehors du tractus digestif des animaux supérieurs peut être considéré au vu de sa synthèse de vitamine K comme une bactérie mutualiste.

En conclusion, nous avons vu que les bactéries présentes dans la lumière du tube digestif des animaux supérieurs peuvent être qualifiées de : symbiotiques, saprophytes, parasites, mutualistes et commensales. Mais, à vrai dire, si l'ensemble de ces termes peuvent convenir à décrire les microbiotes digestifs, un seul serait imprécis. En effet, ce n'est pas une simple interaction qui régit la vie de ce microbiote mais bien toute une panoplie. Et si ces termes sont des termes de choix pour parler des flores digestives, la plupart des autres développés ci-avant le sont tout autant. La figure I.5 illustre l'ensemble des interactions possibles pour un micro-organisme présent dans le tractus digestif des animaux, que ce soit avec son hôte directement ou avec les autres membres de la microbiocénose digestive. Le nombre de ses relations biologiques explique à lui seul la complexité des microflore digestives et il est surprenant de retrouver toutes ces interactions, normalement présentes de manière éparsée dans le Vivant, là dans cet espace confiné qu'est le système digestif des animaux supérieurs. Il est bien évident que la sélection naturelle et l'adaptation ont eu une activité remarquablement intense dans de tels microbiotes (cf figure I.1).

Des associations symbiotiques siégeant au sein des flores digestives, comme dans toutes flores complexes, naît un savant équilibre souvent nommé « eubiosis ». Cette

« homéostasie » des microbiocénoses est grandement dépendante de la qualité des populations micro-organiques présentes. Etudier qualitativement les habitants de ces microbiotes ne serait donc se faire sans appréhender les interactions symbiotiques qui y règnent. Si telle ou telle population bactérienne est présente ou absente, ce n'est pas dû au hasard mais bel et bien aux interactions et échanges biologiques qui existent dans de tels microbiotopes. L'adaptation joue un rôle prépondérant dans l'établissement de ces interactions symbiotiques et *in fine* de l'équilibre biologique des microflores complexes.

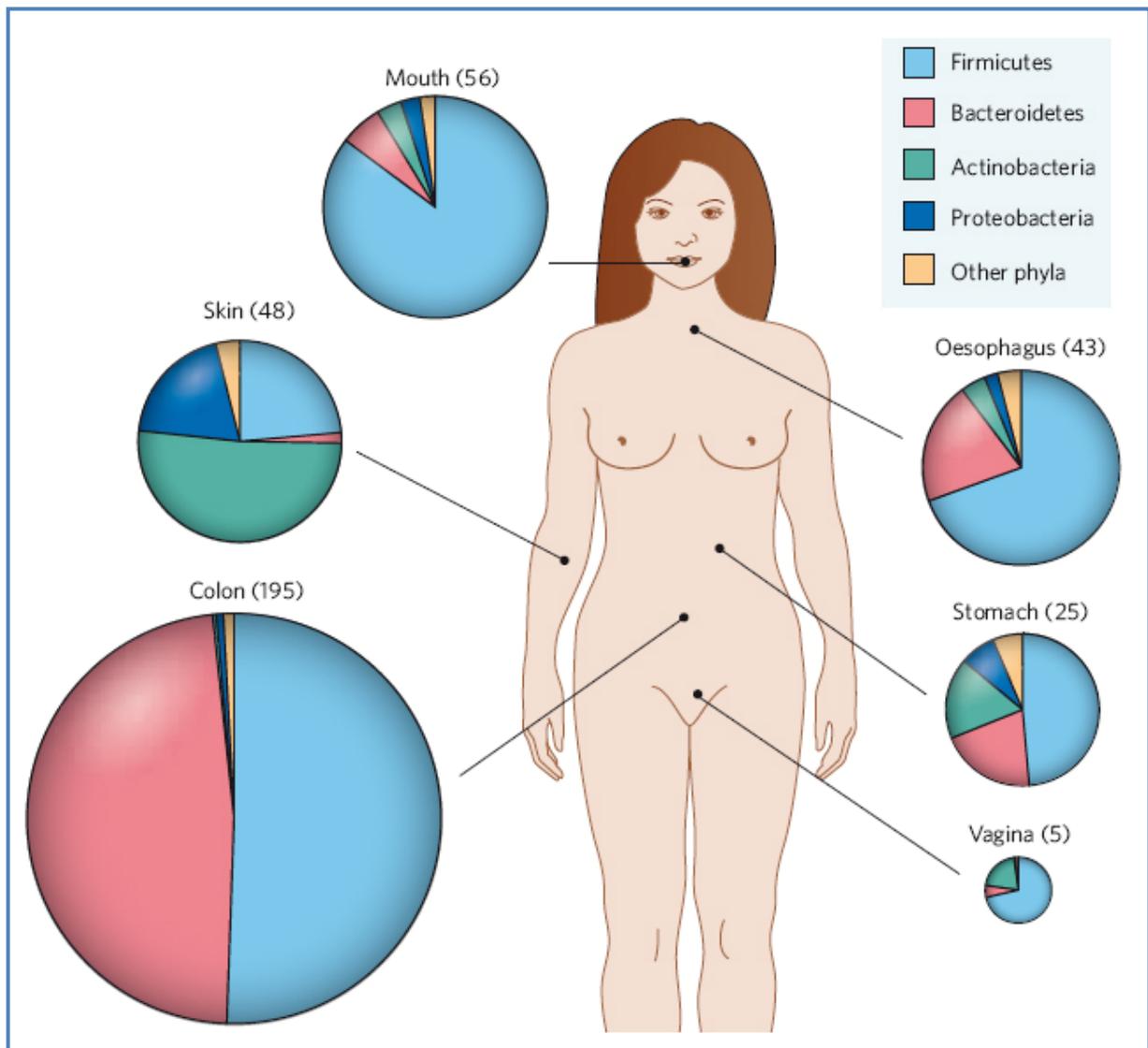


Figure I.6 : Répartition et distribution des principaux taxons des flores complexes bactériennes de l'Homme.

D'après Les Dethlefsen *et al.*, 2007.

II. Les microflores du tractus digestif et leur modulation

L'émergence de nouvelles techniques d'identification bactérienne par phylogénie comparative a suscité un tel engouement auprès des bactériologistes que ces quinze dernières années ont connu une pléthore d'études d'identification et caractérisation de communautés bactériennes sur des plans très variés.

Les flores du tractus digestif des animaux supérieurs font partie de ces communautés bactériennes qui ont connu un grand essor ces dernières décennies.

II. A. Les microflores complexes

Par définition, s'entend par l'expression « microflore complexe », l'ensemble des micro-organismes vivants présents dans un microbiotope donné, défini spatialement et temporellement.

II. A. 1. Exemples de microflores complexes

Les exemples de microflores complexes ne manquent pas et par mesure de simplification elles peuvent être classées en trois grands groupes : flores des épithéliums des animaux, flores écologiques et flores des produits fermentés.

Les données sur les flores des épithéliums des animaux supérieurs se retrouvent principalement chez l'humain : sur la peau (Herz *et al.*, 1976), le vagin (Hyman *et al.*, 2005) et les cavités digestives (Turnbaugh *et al.*, 2007) (cf figure I. 6). Mais, nombre d'autres animaux sont renseignés particulièrement sur leur flores digestives, comme les animaux d'élevage (porcs (Leser *et al.*, 2002), poulets (Lan *et al.*, 2002), dindes (Scupham *et al.*, 2007), bovins (Ozutsumi *et al.*, 2005), ...) ou les animaux modèles expérimentaux normaux (rats, souris (Bibiloni *et al.*, 2005), ...) ou axéniques (rats, souris (Kibe *et al.*, 2005), ...).

Les flores écologiques sont représentés par les études en milieu marin (Simmons *et al.*, 2007), par les études sur le sol (Stafford *et al.*, 2005) ou encore de manière plus insolite par des études sur différents supports d'intérêt où se propagent des microorganismes comme en

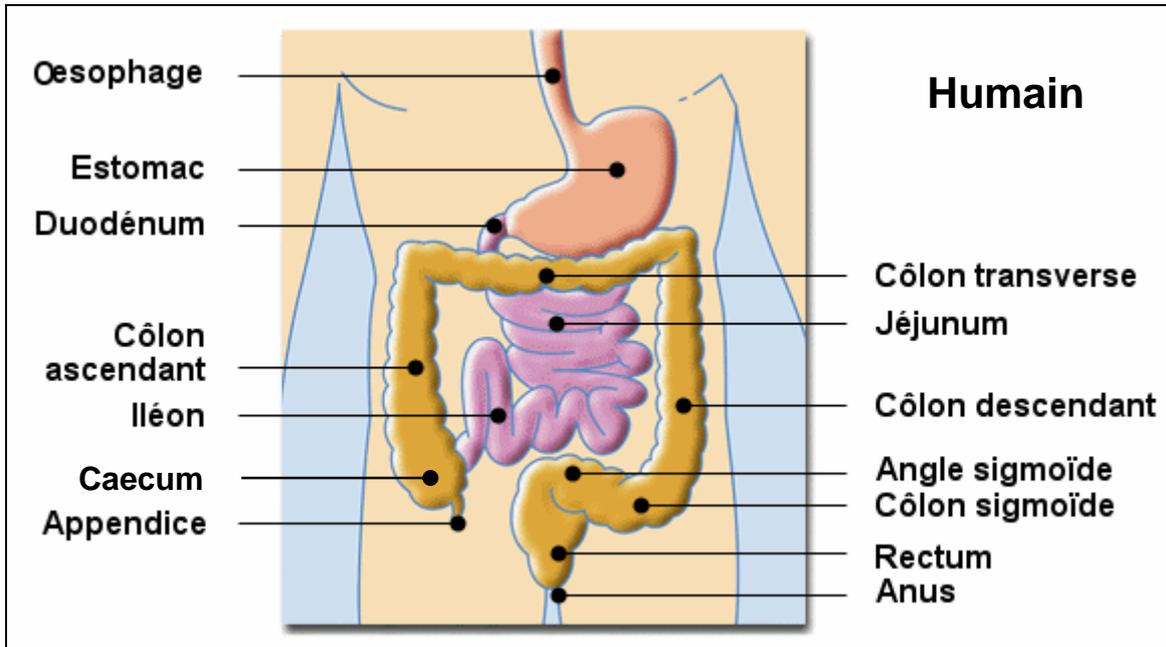


Figure I.7 : Appareil digestif de l'Homme.

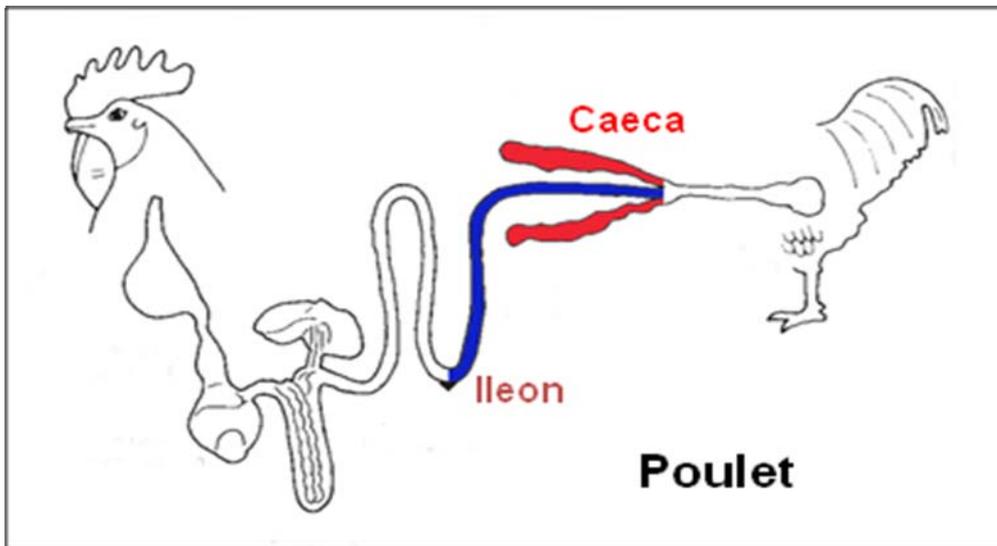


Figure I.8 : Appareil digestif du poulet.

atteste la recherche des microorganismes responsables de la dégradation de peintures dans un château autrichien orchestrée par Heyrman *et al.* en 2002.

Les flores des produits fermentés englobent les flores fromagères (LeBourhis *et al.*, 2005), les flores des yaourts et laits fermentés (Ginovart *et al.*, 2002) ou encore les flores des produits carnés et végétaux (Fontana *et al.*, 2005).

II. A. 2. Les microflores digestives

L'anatomie du tube digestif est si complexe qu'il est aisément facile de confondre tel ou tel segment et de mélanger les données des flores constituant l'ensemble des flores du tube digestif (cf. figures I.7 et I.8). Le microbiologiste attelé à des études sur les flores digestives doit donc prendre soin de bien les annotées tant celles-ci sont variables sur les différents étages du système digestif.

On ne confondra donc pas l'expression flore digestive avec les expressions flore intestinale ou flore colique par exemple. Par définition, la flore digestive s'entend par flore de l'appareil digestif et donc du tractus digestif dans son ensemble, de la bouche à l'anus. Cette flore digestive est donc la somme, chez l'Homme, des flores buccale, œsophagienne, stomacale, intestinale (elle-même composée des flores duodénale, jéjunale et iléale), colique (elle-même composée des flores caecale, coliques ascendante, transverse et descendante et sigmoïdienne) et, enfin, rectale. Ainsi, l'emploi de l'expression flore digestive pour ne désigner que la flore présente dans l'intestin grêle et le colon est un abus de langage mais couramment usitée par facilité d'écriture. Cette remarque est importante pour la compréhension de la physiologie du système digestif et des nombreuses données disparates le documentant. En conséquence, un prélèvement effectué sur le sigmoïde ne pourra en aucun cas révéler une image correcte de l'ensemble de la flore du système digestif encore moins d'une de ses portions comme le caecum par exemple beaucoup plus acide que le sigmoïde et dont la flore est donc nettement divergente aussi bien qualitativement que quantitativement. De même, un prélèvement d'un contenu luminal est bien entendu fortement différent d'une biopsie ou d'un contenu muqueux. Il se doit de ce fait de bien documenter les prélèvements afin de faciliter suivies et comparaisons des données et ainsi concourir à une meilleure compréhension des flores et du fonctionnement du tube digestif.

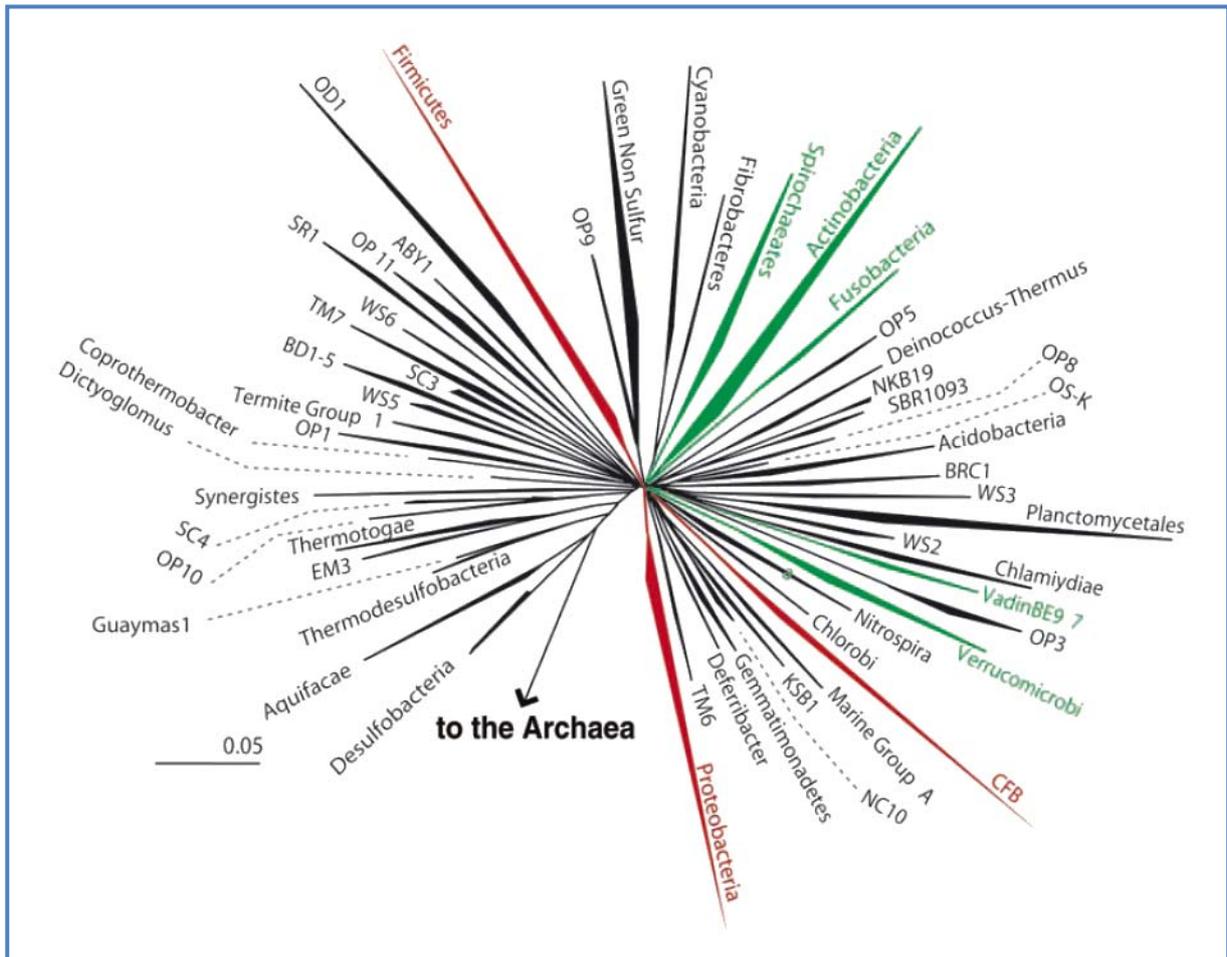


Figure I.9 : Arbre phylogénétique des principaux taxons bactériens présents dans le tube digestif de l’Homme.

D’après Backhed *et al.*, 2005.

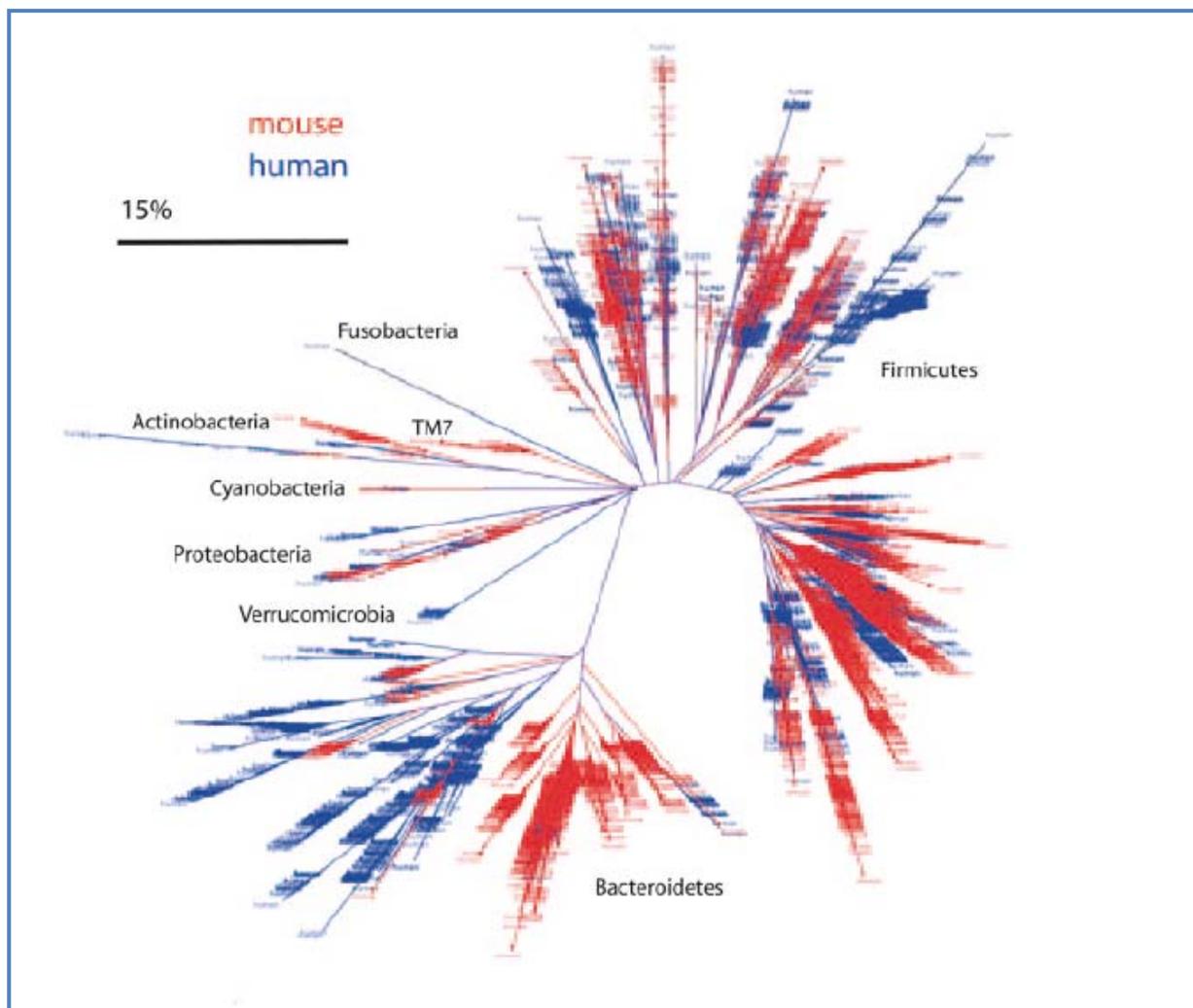


Figure I.10 : Arbre phylogénétique différentiel des bactéries présentes dans le tube digestif de l'Homme (en bleu) et de la souris (en rouge).

D'après Ley *et al.*, 2005.

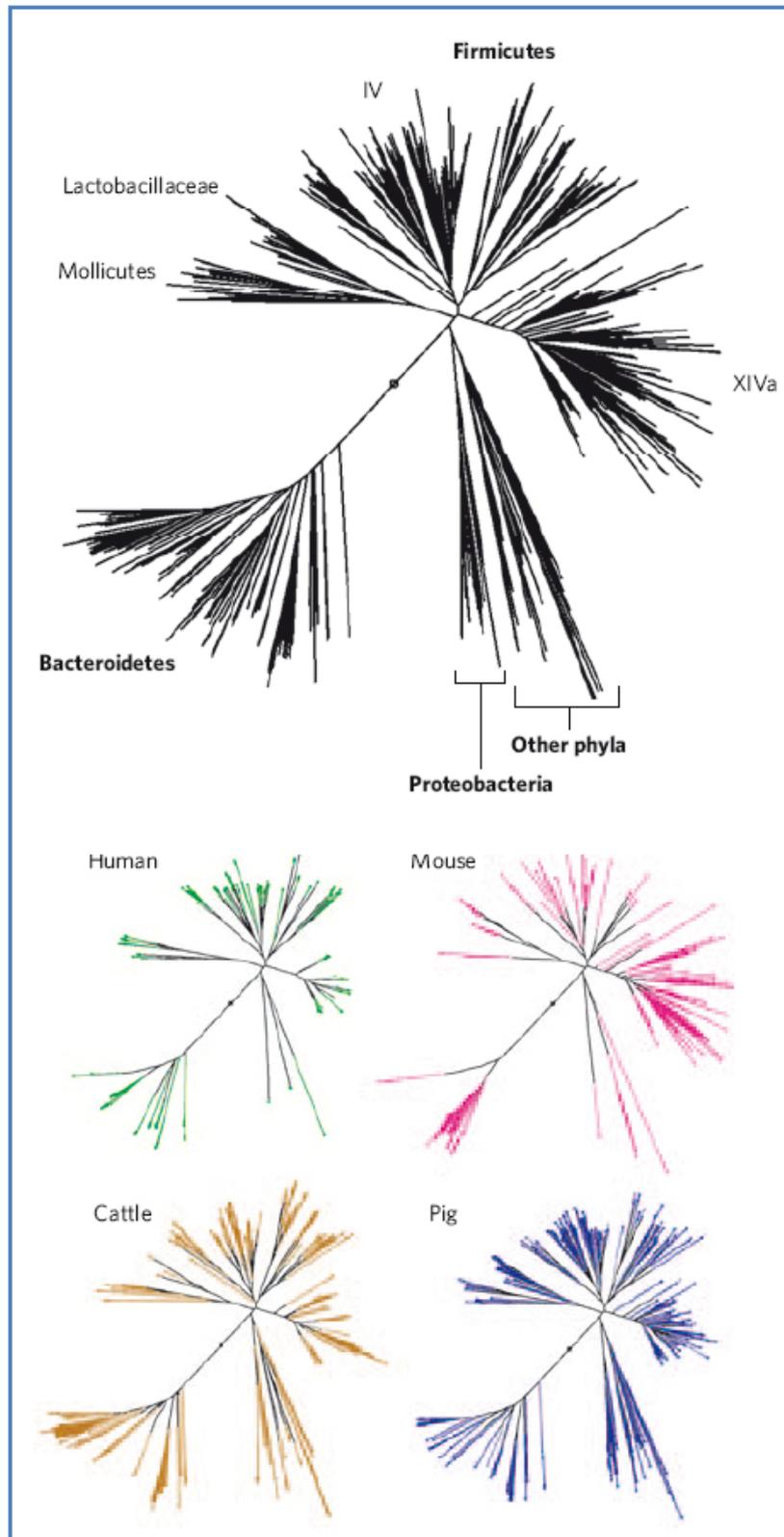


Figure I.11 : Arbres phylogénétiques des bactéries présentes dans le tube digestif de l'Homme, la souris, le bœuf et le porc.

D'après Les Dethlefsen *et al.*, 2007.

En résumé, sans exhaustivité, le système digestif des animaux supérieurs est principalement colonisé par des espèces des taxons suivants : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Lactobacillaceae*, *Mollicutes*, et *Proteobacteria* (cf figures I.6 et I.9). Le taux des Firmicutes baisse au fur et à mesure du transit quand ceux des Bacteroidetes et des espèces du cluster XIVa augmentent. Si la qualité des taxons est conservée entre animaux, la quantité et la nature des espèces présentes sont modifiées. Ainsi, comme en atteste la figure I.10, la nature des espèces présentes dans le tube digestif de la souris et de l'humain diffère grandement dans les taxons Firmicutes et Bacteroidetes. De même, par rapport à l'humain, la figure I.11 et I.12 illustre l'existence d'un déploiement plus important des Bacteroidetes et des Proteobacteria chez le bœuf et le porc et du cluster XIVa (principalement constitué du groupe *Clostridium coccoïdes*) chez la souris, le porc et le poulet.

II. A. 2.a. Flore digestive de l'Homme

« Charité bien ordonnée commence par soi-même », cet adage à lui seul explique la pléthore de publications existant dans le domaine des flores digestives humaines. L'intérêt croissant porté par la communauté scientifique sur les habitants de notre lumière intestinale s'explique par la prise de conscience du potentiel de ce symbiote sur la santé humaine. Deux axes principaux sont alors retrouvés dans les publications scientifiques traitant du microbiotum du tractus gastrointestinal humain : 1) des recherches fondamentales sur sa composition, ses évolutions et ses interactions et 2) des recherches étiologiques sur différentes pathologies digestives ou associées.

D'un point de vue fondamental, le microbiote intestinal humain est étudié sous toutes les coutures à l'aide de l'ensemble de la palette d'outils disponibles aux bactériologistes : clonage (Blaut *et al.*, 2002 ; Hayashi *et al.*, 2002), tRFLP (Li *et al.*, 2007), DGGE (Walter *et al.*, 2001 ; Walter *et al.*, 2001), etc... Il est à noter que certains auteurs se focalisent sur des groupes bactériens donnés, en particulier les lactobacilles (Walter *et al.*, 2001 ; Walter, 2008), et non sur l'ensemble des populations bactériennes présentes. D'autres auteurs étudient la composition des biofilms (Mac Farlane et Mac Farlane, 2006) ou utilisent une approche de métagénomique (Gill *et al.*, 2006). D'autres encore utilisent des modèles expérimentaux comme les bioréacteurs ou les animaux axéniques, lesquels ils inoculent avec des contenus intestinaux humains (Alpert *et al.*, 2008 ; Pang *et al.*, 2007). Quelque soient l'approche ou les

techniques utilisées pour connaître la microbiocénose du tractus digestif de l'Homme, celle-ci est aujourd'hui fortement documentée et on peut ainsi voir de nombreux articles et « reviews » exposer sa diversité et proposer des hypothèses quand à la nature de ses nombreuses interactions avec son hôte ou existant en son sein (Hooper et Gordon, 2001 ; Mac Farlane et Mac Farlane, 2004 ; Mac Farlane, 2008).

D'un point de vue pathologique, diverse études ont été entreprises afin de définir l'implication du microbiote dans son ensemble ou d'une espèce le constituant dans telle ou telle maladie. On peut ainsi rencontrer des recherches dans les pathologies suivantes :

1) Les maladies spécifiques de la sphère digestive comme les MICI par exemple. La recherche sur les MICI est très active compte tenu de leur étiologie encore inconnue. Le taux de ces maladies est en constante augmentation ces dernières décennies, principalement dans les pays développés. Bien que cette augmentation puisse être corrélée avec un meilleur diagnostic médical, elle reste un problème de santé important. Nombre de facteurs sont considérés responsables ou aggravants de ces pathologies digestives tels que la génétique, le stress, l'alimentation, et bien sûr le microbiote intestinal. Dans le cas de la maladie de Crohn par exemple, diverses pistes étiologiques sont recherchées : 1) certains auteurs recherchent une origine alimentaire avec des régimes spécifiques (Tanaka *et al.*, 2007), 2) d'autres un agent étiologique microbien comme *Escherichia coli* (Boedeker, 2000 ; Malchow, 1997 ; Rhodes, 2007 ; Tabaqchali *et al.*, 1978, Boudeau *et al.*, 1999, Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998) ou *Mycobacterium paratuberculosis* (Naser *et al.*, 2002 ; Autschbach *et al.*, 2005).

2) Les maladies métaboliques comme l'acidémie méthylmalonique (Bain *et al.*, 1988) ou des maladies métaboliques où le métabolisme des graisses joue un rôle important dans l'obésité (Bajzer et Seeley, 2006 ; Ley *et al.*, 2006 ; Turnbaugh *et al.*, 2006), les maladies cardio-vasculaires (Fava *et al.*, 2006) ou encore l'atteinte du foie lié au surpoids (Parlemuter *et al.*, 2007 ; Solga et Diehl, 2003).

3) Les maladies cancéreuses. En particulier depuis que les acides gras à courtes chaînes, comme l'acide butyrique, ont été impliqués dans une meilleure différenciation des entérocytes et ainsi une réduction des risques du cancer du colon (Nangia-Makker *et al.*, 2002 ; Hardman et Cameron, 2005). Ceux-ci sont produits par la flore digestive à partir de chaînes oligosaccharidiques, comme la pectine, normalement indigestibles par la biochimie luminale de l'hôte. D'après Saemann *et al.* (2002), ces acides gras joueraient également un

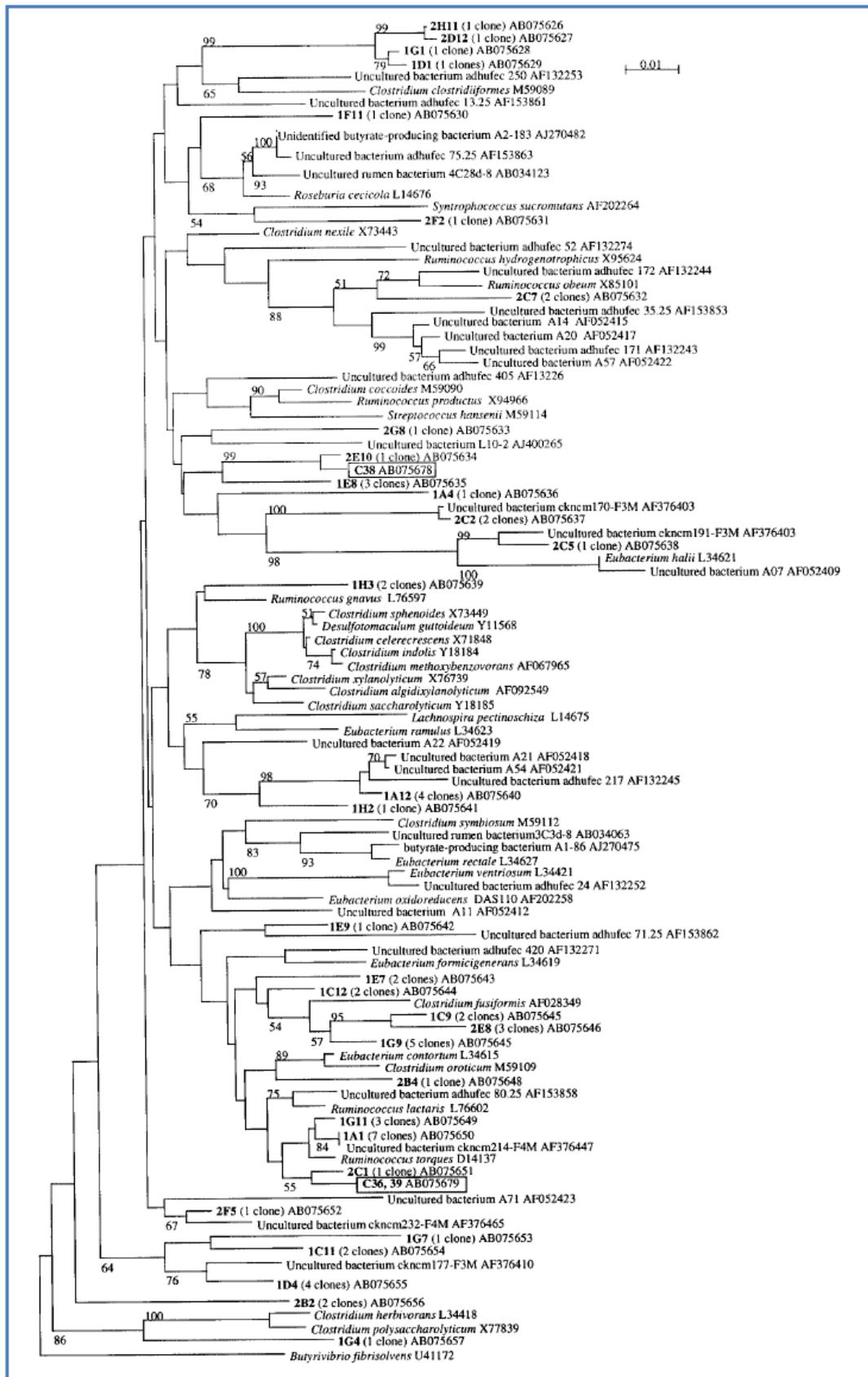


Figure I.12 : Arbre phylogénétique obtenu par comparaison phylogénétique des séquences de clones d'ADNr 16S dont l'origine est la flore du poulet et des séquences des banques de données. D'après Lan *et al.*, 2002.

rôle de médiateurs bactériens et interviendraient dans l'équilibre microbien des flores du tractus digestif.

4) Les pathologies infectieuses digestives comme par exemple celles déclenchées par les agents pathogènes *Candida albicans* (Payne *et al.*, 2003) et *Clostridium difficile* (Iizuka *et al.*, 2004).

II. A. 2.b. Flores digestives des Galliformes (poulet et dinde)

Moins développées que celles de l'Homme, les études des microflore du tractus du poulet d'élevage restent néanmoins très importantes. Faute en est : 1) au rôle aujourd'hui admis des flores digestives sur la santé de l'individu et *in fine* de sa croissance, 2) à la récente interdiction des antibiotiques comme facteurs de croissance opérée par l'Union Européenne en janvier 2006 et 3) à la lutte contre les pathogènes digestifs responsable d'importantes pertes dans le milieu avicole.

Ainsi, fort de l'idée que le microbiote intestinal puisse jouer un rôle important sur la santé de son hôte et particulièrement favoriser son métabolisme et sa croissance, nombre d'équipes spécialisées dans la nutrition des volailles et leurs performances zootechniques se sont lancées dans l'étude des flores digestives des Galliformes et ce dès les années 1980. De la sorte, de nombreuses publications fondamentales présentent les populations bactériennes présentes chez le poulet sain : dans les fèces (Lan *et al.*, 2002 ; Olsen *et al.*, 2008), les contenus intestinaux après sacrifice de l'animal (Lu *et al.*, 2003) ou associées à la muqueuse intestinale (Gong *et al.*, 2007). De même, l'implication de la flore digestive sur le métabolisme énergétique, clef principale d'une croissance réussie, est fortement étudiée (Torok *et al.*, 2008 ; Muramatsu *et al.*, 1994).

Pris dans la tourmente des interdictions européennes sur l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les élevages d'animaux, ces mêmes équipes ont dû s'adapter et trouver de nouveaux facteurs de croissance comme les huiles essentielles, les probiotiques et les prébiotiques. Ainsi, soucieuses de connaître le mode d'action des antibiotiques, ces équipes recherchèrent les modulations de la flore face à de nombreux antibiotiques (Zhou *et al.*, 2007 ; Dumonceaux *et al.*, 2006). Puis, dans la continuité, des tests furent entrepris sur de nombreux probiotiques (Gerard *et al.*, 2008 ; Vahjen *et al.*, 2002 ; Lan

et al., 2004) et prébiotiques (Hubener *et al.*, 2002) qui seraient potentiellement de bons substitutifs des antibiotiques.

Enfin, certains élevages intensifs souffrent d'importantes pertes causées par des infections de nature digestive. Il n'est donc pas rare de retrouver dans la littérature des études sur le mode d'action et de propagation de tel ou tel pathogène digestif avicole. Ainsi on peut faire mention d'études sur *Campylobacter jejuni* (Van Deun *et al.*, 2008), *Clostridium perfringens* (Skanseng *et al.*, 2006) ou *Escherichia coli* (Mellata *et al.*, 2003).

II.B. Les antibiotiques : modulateurs des flores digestives

II.B.1. Les antibiotiques en production animale

La majorité des données qui suivent ont été extraites du rapport Bories/Louisot de février 1998, rapport commandé par le Secrétariat d'Etat à la Santé.

II.B.1.a. Les antibiotiques comme facteurs de croissance

En dehors de leur rôle thérapeutique contre les maladies à agents bactériens, les antibiotiques ont été employés dès les années 1940-50 comme additifs alimentaires pour les animaux d'élevage, d'abord aux Etats-Unis d'Amérique puis en Europe. Un contrôle de leur usage ainsi que des procédures d'homologation ont été mis en place des deux cotés de l'Atlantique avec la FDA aux Etats-Unis et en France avec un arrêté ministériel pris après avis de la CIIAA (Commission Interministérielle et Interprofessionnelle de l'Alimentation Animale), commission créée en 1960.

L'usage des antibiotiques en élevage intensif à doses sous-thérapeutiques a été justifié par des démonstrations scientifiques de leur action en tant que promoteurs ou facteurs de croissance (Anthony *et al.*, 2006 ; Milles *et al.*, 2003).

II.B.1.b. Mode d'usages des antibiotiques chez les animaux d'élevage

En élevage, les antibiotiques sont utilisés selon deux grands usages : thérapeutique ou zootechnique.

En usage thérapeutique, l'administration d'antibiotiques a deux buts : un but curatif visant à l'éradication d'une infection avérée et un but prophylactique pour la prévention de possibles infections particulièrement à l'occasion de vaccinations ou de périodes de stress comme les transports. Cet usage, considéré comme médicamenteux, est contrôlé par les vétérinaires et les principales familles d'antibiotiques y sont représentées. Souvent utilisés en urgence sur un grand nombre d'individus, les voies d'administration des antibiotiques en usage thérapeutique se font majoritairement par incorporation aux aliments et eaux de boisson.

En usage zootechnique, les antibiotiques sont administrés à doses sous-thérapeutiques dans les élevages de rente pour améliorer les performances zootechniques des animaux. Ils sont alors définis comme additifs alimentaires dans la classe des promoteurs ou facteurs de croissance. Le bénéfice pour l'éleveur réside en une consommation moindre pour une meilleure croissance, augmentant significativement la productivité (en moyenne de 2 à 5 % en prise de poids). L'effet semble inversement proportionnel au niveau d'hygiène de l'installation, offrant donc un bénéfice supérieur aux élevages à l'hygiène précaire.

II.B.1.c. Réglementation sur l'usage des antibiotiques en élevage

La réglementation en termes d'usage des antibiotiques pour les animaux d'élevage diffère selon les deux modes d'usage cités précédemment. Dans le cas d'un usage comme additif alimentaire et facteur de croissance, les conditions d'emploi sont strictes et limitées par la réglementation. Leur innocuité pour le consommateur doit être prouvée en particulier dans le cadre des doses de résidus assimilables dans les produits et qui doivent être largement inférieures aux doses journalières légalement admissibles. Dans le cas d'un usage thérapeutique, qu'il soit à but curatif ou à but prophylactique, les conditions d'emploi sont moins standardisées mais définies au cas par cas de la prescription vétérinaire. Le contrôle se fait alors *a posteriori* par analyses des résidus présents sur les produits des animaux. Ces réglementations d'usage sont propres à la Communauté Européenne, en effet, les Etats-Unis,

par exemple, ne font pas de différence entre les deux usages et les mêmes dispositions réglementaires s'appliquent donc à chacune des formes d'utilisation.

Sous la direction de l'AESA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments), les entreprises productrices d'additifs alimentaires se doivent de suivre une procédure d'autorisation de mise sur le marché pour tout nouveau produit commercialisé. Ces entreprises doivent prouver l'efficacité, l'action positive avérée sur l'animal, la sécurité de leur produit et l'absence de risque sur la santé humaine et animale ainsi que sur l'environnement. Les autorisations sont délivrées pour une espèce animale donnée et pour des quantités maximales. Toute autorisation de mise sur le marché est limitée à dix ans et doit donc faire l'objet d'une réévaluation suite à cette durée. Les Limites Maximales de Résidus (LMR) retrouvés dans les produits de consommation sont fixées pour chaque additif et sont contrôlées régulièrement pour s'assurer de leur respect.

II.B.2. Problématique de l'interdiction des antibiotiques en élevage animal

II.B.2.a. Quelques chiffres sur la consommation d'antibiotiques

La consommation mondiale tout usage confondu est estimée à 30000 tonnes par an dont 90 % uniquement alloué à l'usage animale d'où l'importance d'une législation réglementant leur emploi en production animale.

Les proportions sont inversées en Europe et les chiffres annoncées par la FEDESA (Fédération Européenne de la Santé Animale) sont de l'ordre de 13200 tonnes consommées par an en 1999 avec 65 % réservé à l'usage humain et 35 % à l'usage animal avec une part de 29 % pour l'usage thérapeutique (maladie) et 6 % pour l'usage zootechnique (croissance). Il est à noter que cette même fédération estime qu'une baisse de 50 % de la consommation d'antibiotiques utilisés comme facteurs de croissance a été observée entre les années 1997 et 1999 suite aux diverses directives européennes de suspension de l'utilisation de certains d'entre eux comme l'Avoparcine et l'Ardacin.

II.B.2.b. Apparition des bactéries multi-résistantes

C'est dès la fin des années 1940, soit quelques années après leur première découverte par Flemming avec la pénicilline, qu'apparaissent les premières interrogations sur les résistances bactériennes aux antibiotiques. A cette date, les répercussions de ces résistances sur la santé humaine ou animale ne sont pas encore discutées, seules sont débattues les théories sur l'origine de ces résistances comme en atteste d'ailleurs l'article de Demerec de 1948 où il n'est nullement fait état d'un quelconque risque de santé publique. Ce sera bien plus tard, trente ans après pour être plus exact, à la fin des années 1970, que les premières réelles inquiétudes vont alors voire le jour suite à l'apparition de souches multi-résistantes et *de facto* suite aux risques en santé publique découlant de l'absence de moyens chimiothérapeutiques efficaces contre de telles souches. Aujourd'hui, on sait que les emplois abusifs dans de nombreux domaines comme la médecine (prévention, cathéter), l'alimentation animale, la prophylaxie ou la désinfection à outrance ont été favorable à l'apparition de souches multirésistantes et ce, par le simple jeu de la sélection naturelle.

II.B.2.c. Interdictions des usages zootechniques des antibiotiques

Il suffit de faire une simple recherche sur le site en ligne "Eur-Lex" (« <http://eur-lex.europa.eu/fr/index.html> ») du Journal Officiel du Parlement Européen en indiquant en invite les termes "additifs" et "animaux" pour se rendre compte de l'importance législative au sein de l'Union Européenne et de ses pays-membres du sujet des antibiotiques et des résistances bactériennes. Près de quatre cents entrées - que ce soient des questions ou propositions au Parlement mais aussi surtout des textes de loi de type Directive ou Règlement ou Rectificatif - sont disponibles dans la base avec ces termes et ce, des années 1967 à 2007. Ainsi, en quarante ans, le sujet des additifs dans l'alimentation animale a été au moins traités six fois par an en moyenne au Parlement Européen !

Les pays européens nordiques sont connus pour leur protectionnisme environnemental et leur respect des consommateurs, ce n'est donc pas étonnant que la Suède fût le premier pays européen à interdire l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les exploitations d'élevage d'animaux et ce dès l'année 1986. L'Union Européenne suivra le pas avec diverses interdictions au cours des années 1990 et ce ne sera qu'en janvier 2006, qu'elle bannira tous les antibiotiques comme facteurs de croissance (directive n° 70/524/CEE). Cet

important délai de réflexion peut s'expliquer par le revers observé lors de l'interdiction entamée par la Suède. En effet, fait insolite, la consommation d'antibiotiques dans les élevages suédois a été presque triplée entre l'année 1986, année du début de l'interdiction, et l'année 1987. Cette différence de tonnage dans l'administration des antibiotiques à usage animal est explicable par le brusque changement de l'état de santé des animaux, celui-ci s'étant rapidement dégradé à l'arrêt des antibiotiques, entraînant de lourdes pertes animales et économiques. Les vétérinaires ont alors dû administrer non pas des doses sous-thérapeutiques aux animaux mais, cette fois-ci, des doses massives pour enrayer la morbidité ravageante. La sélection des animaux entreprise au long court sous antibiotiques a eu raison de cette directive. Il faudra en fait plusieurs années à la Suède pour réellement équilibrer la santé de ses animaux d'élevage et au final abaisser sa consommation en antibiotiques à usage animal.

II.B.2.d. Alternatives aux antibiotiques comme facteurs de croissance

Suite à la leçon tirée de l'importante baisse de production observée lors de l'interdiction des antibiotiques en Suède en 1987, les différentes branches de la production, en particulier les industriels de l'alimentation animale, se sont largement préparés à l'inévitable interdiction des antibiotiques comme facteurs de croissance sur l'ensemble du territoire européen. Ils ont donc dû trouver des substitutifs non-antibiotiques qui puissent garantir les taux de production connus sous antibiotiques ou du moins s'en rapprocher en évitant l'escalade des pertes observées en Suède. Ainsi, nombre de substances, possibles substitutifs des antibiotiques, ont été testées au cours des années 1990 et début 2000.

Ces substitutifs sont de nature diverse.

Tout d'abord, les huiles essentielles sont des composés aujourd'hui largement utilisés dans les préparations alimentaires pour animaux. Leurs propriétés bactériostatiques les rapprochent en effet des antibiotiques et en font donc des substitutifs de choix. Il faut noter néanmoins que, compte-tenu de leur relative toxicité, nombre de ces huiles sont réglementées et ne peuvent être vendus que dans le cadre pharmaceutique (par exemple les absinthes, les armoises ou la sauge officinale).

Viennent ensuite des éléments dont la popularité est grandissante : les probiotiques et prébiotiques. Les probiotiques sont des micro-organismes dont l'ingestion est susceptible

d'apporter un effet bénéfique ; dans le cas des animaux d'élevage c'est bien entendu un effet bénéfique sur la croissance qui est recherché. Les prébiotiques sont des polysaccharides à longue ou courte chaîne qui, comme leur nom l'indique, agissent en amont et permettent, de manière spécifique, le développement intra-luminale de bactéries supposées bénéfiques pour l'hôte.

Enfin, il faut noter l'emploi toujours présent d'enzymes et d'acides aminés.

II.B.2.d.a. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles ou essences végétales sont connues depuis des siècles, sous des formes plus ou moins pures, pour leurs propriétés médicinales et organoleptiques. Aujourd'hui, elles sont employées dans des domaines aussi divers que la parfumerie, les cosmétiques, les produits ménagers, l'industrie alimentaire ou l'aromathérapie (plus scientifiquement pharmacognosie).

Leur mode de production est très variable mais seuls quelques uns assurent une qualité finale suffisante pour l'aromathérapie. On peut les extraire par simple pression à froid, par distillation, par solvants volatiles ou supercritique comme le dioxyde de carbone (31,1°C ; 74 atm). Les huiles essentielles sont faiblement concentrées dans les végétaux et il faut souvent plusieurs tonnes de plantes pour obtenir seulement un litre d'huile essentielle pure. Bien qu'elles agissent à des concentrations très faibles, les huiles essentielles restent donc relativement onéreuses.

Bien que cet effet ne soit pas recherché en alimentation animale, il est à noter que les huiles essentielles sont également réputées être de très bons antioxydants. Les antioxydants offrent aux tissus cellulaires une meilleure régénération et une protection efficace contre les radicaux libres responsable du vieillissement d'où l'emploi des huiles essentielles dans les produits cosmétiques. En alimentation animale, c'est leur effet bactériostatique et bactéricide qui est recherché (Pruthi, 1980 ; Moleyar et Narasimham, 1992). Elles sont ainsi largement utilisées en alimentation animale (Botsoglou *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2003). Des actions anti-inflammatoires sont également rapportées (Mizrahi *et al.*, 2006).

Tableau I. 2 : Principaux effets bénéfiques des probiotiques retrouvés dans la littérature.

EFFET	BACTERIE	REFERENCE
IMMUNOLOGIE		
Effet antiallergique	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> <i>Bifidobacterium lactis Bb-12</i>	Ouwehand, 2007
Activation des macrophages	<i>Lactobacillus casei</i> and <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Perdigon <i>et al.</i> , 1986
Activation phagocytose	<i>L. casei</i> and <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Perdigon <i>et al.</i> , 1988
Baisse de TNF α	<i>L. acidophilus Lal</i> <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	Schiffrin <i>et al.</i> , 1995 Majamaa et Isolauri, 1997
Augmentation de la réponse à l'ovalbumine	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Moreau <i>et al.</i> , 1990
Stimulation d'IgA en réponse à la toxine cholérique	<i>Bifidobacterium breve</i>	Yasui <i>et al.</i> , 1992
Augmentation des anticorps anti-rotavirus	<i>L. rhamnosus GG</i>	Kaila <i>et al.</i> , 1992
THERAPIES		
Diminution des symptômes des MICI	<i>lactobacilli</i> et <i>bifidobacteries</i>	Madden et Hunter, 2002 ; Fujimori <i>et al.</i> , 2007
Lutte contre <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Lactobacillus acidophilus HY2177</i> , <i>Lactobacillus casei HY2743</i> , <i>Bifidobacterium longum HY8001</i> , et <i>Streptococcus thermophilus B-1</i>	Kim <i>et al.</i> , 2008
Prévention des maladies cardio-vasculaires	diverses	Larkin <i>et al.</i> , 2007
Prévention du cancer du colon	diverses	Hirayama et Rafter, 2000
PHYSIOLOGIE		
Facteur de croissance (poulet)	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Khan <i>et al.</i> , 2007 ; O'Dea <i>et al.</i> , 2006
Apaisement de l'intolérance au lactose	diverses	Parra et Martinez, 2007

II.B.2.d.β. Les probiotiques

Selon Corthier (2004), le terme « probiotique » fût initialement introduit par Vergin en 1954 qui cherchait à créer une opposition entre les antibiotiques et les agents microbiens susceptibles d'avoir une activité bactéricide. Le terme fût réemployé en 1974 par Parker, puis par Fuller en 1989 et enfin par Schrezenmeir et de Vrese en 2001. Ces derniers définissent un probiotique comme étant « une préparation de micro-organismes bien définis et vivants, en nombre suffisant pour coloniser un compartiment de l'hôte et ainsi exercer un effet bénéfique sur la santé de celui-ci».

Aujourd'hui, la définition d'un micro-organisme probiotique a quelque peu évolué et la communauté scientifique s'est accordée sur plusieurs critères permettant de classer un micro-organisme comme probiotique potentiel. Pour qu'un micro-organisme soit considéré comme probiotique, il faut donc, d'après Ouwehand *et al.* (2002), qu'il remplisse les critères suivants :

- Etre inoffensif pour son hôte
- Etre résistant aux attaques des sucs gastriques, des acides biliaires et des enzymes pancréatiques
- Avoir été isolé sur l'espèce où l'exploitation va être entreprise pour des raisons de compatibilité, particulièrement dans l'adhésion aux muqueuses intestinales (mais ce n'est pas toujours vrai)
- Avoir des effets avérés bénéfiques pour la santé de l'hôte (compétition avec les pathogènes, aide au transit, immunomodulation, activité antiallergique, etc...)
- Accessoirement présenter des avantages technologiques comme une facilité de production (stabilité de la souche, production à grande échelle et résistance au dioxygène).

La littérature révèle un grand nombre de propriétés bénéfiques des probiotiques pour la santé de l'hôte. Le tableau I. 2 présente, de manière non exhaustive, les grandes propriétés physiologiques et immunologiques des probiotiques sur leur hôte.

II.B.2.d.γ. Les prébiotiques

Les prébiotiques agissent en amont des probiotiques. Où le probiotique va fournir directement un micro-organisme aux actions bénéfiques pour l'hôte, le prébiotique se contente d'apporter une source nutritive sélective d'une flore bénéfique pour l'hôte. Le mode d'action des prébiotiques est donc à rapprocher de celui des probiotiques.

Les prébiotiques sont généralement des oligosaccharides ou des polysaccharides à courte chaîne constitués approximativement de deux à vingt unités de sucre. Ils échappent à la digestion dans l'intestin grêle et sont des substrats potentiels pour l'hydrolyse et la fermentation par les bactéries intestinales.

Les prébiotiques doivent agir comme substrat sélectif d'une ou d'un nombre restreint de souches bactériennes bénéfiques qui résident dans le côlon et en stimuler la croissance. Les bifidobactéries et les lactobacilles sont les micro-organismes du microbiote intestinal les plus fréquemment ciblés (Marteau *et al.*, 2004).

De plus en plus utilisé en thérapie (Fujimori *et al.*, 2007 ; Larkin *et al.*, 2007), les prébiotiques sont également grandement utilisés dans les alicaments et dans l'alimentation animale.

III De l'art de l'identification bactérienne

L'art est une catégorie culturelle dont la portée varie largement selon les temps et les lieux. Comment alors ne pas qualifier l'identification bactérienne comme une activité artistique ? De la découverte du premier microorganisme en 1677 par le microscopiste hollandais Antoine van Leeuwenhoek aux dernières puces à ADN, les méthodes d'identification bactérienne ont fortement évoluées au cours du temps. De plus, les moyens d'identification mis en jeu selon les disciplines, en médecine clinique ou en recherche fondamentale par exemple, sont très variables.

Les quelques pages qui suivent présentent un court résumé de cet art et l'ensemble de la palette d'outils disponible aux bactériologistes qu'ils soient cliniciens ou chercheurs pour identifier ou tout au moins classer une bactérie.

III. A. Identification bactérienne par approche morphologique

Historiquement, de la découverte des micro-organismes par microscopie photonique a découlé le premier critère de leur classification et de leur identification. Ainsi, avant l'apparition des premiers outils moléculaires, la systématique bactérienne s'est longtemps cantonner à classer les bactéries sur de simples éléments morphologiques visibles au microscope photonique comme la taille, la forme ou encore le regroupement des cellules bactériennes. Bien qu'éloigné de l'approche morphologique, en 1884, Hans Christian Gram apporte une nouvelle dimension à l'identification par microscopie avec la coloration qui porte son nom, coloration positive ou négative selon la nature membranaire de la bactérie.

L'étude morphologique des colonies bactériennes obtenues sur boîte de Petri présente des similitudes avec celle des bactéries observées sur lame. Sur boîte, on observe ainsi le diamètre, le contour, la hauteur et la couleur des colonies. L'ensemble des critères morphologiques sur lame et sur boîte offre alors un outil d'identification certes archaïque mais relativement pertinent et suffisant dans nombre d'applications. Encore aujourd'hui, connaître les critères morphologiques sur lame et sur boîte d'une bactérie donnée ainsi que la nature du milieu de culture sur lequel elle croît permet souvent de restreindre l'identification à

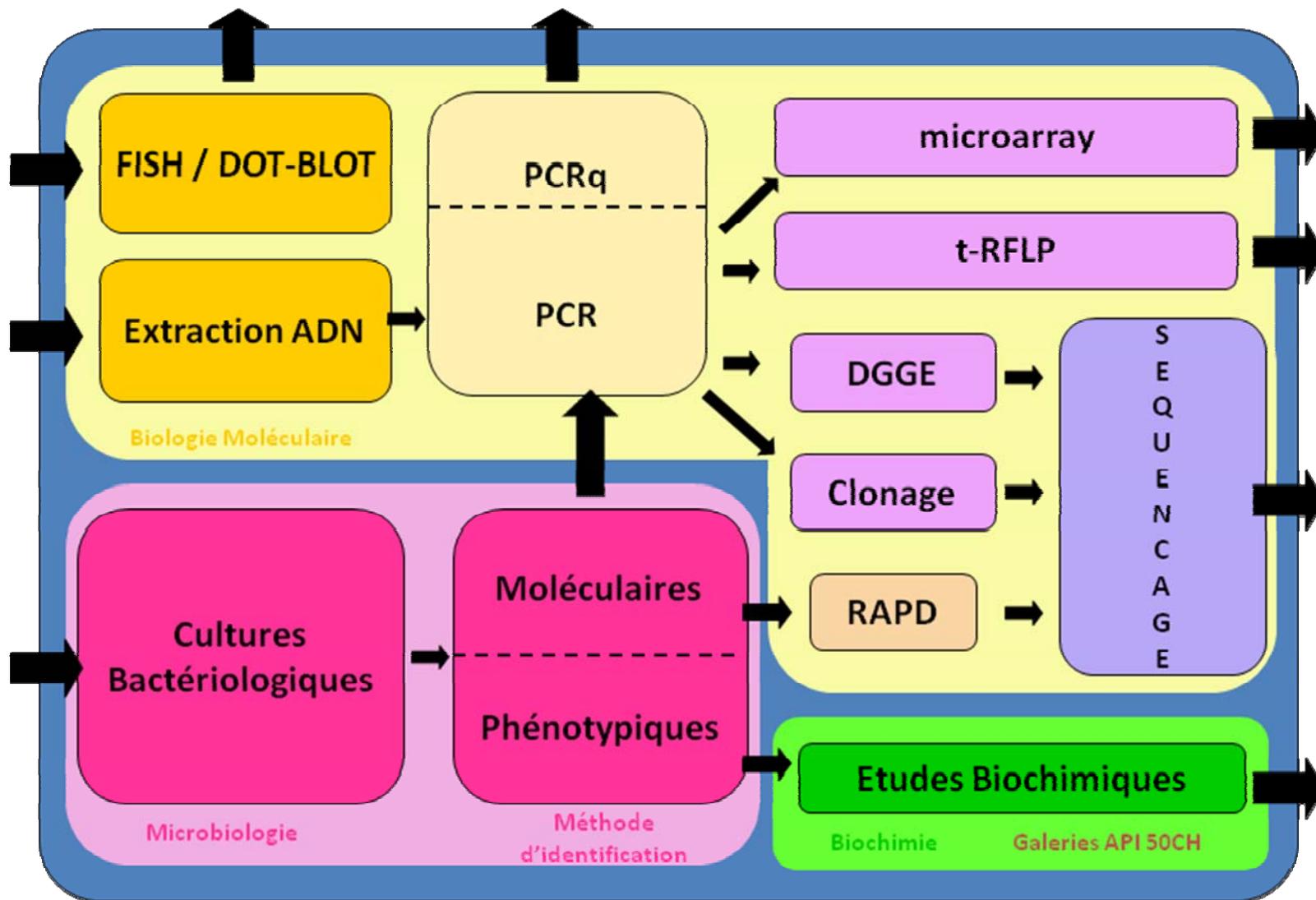


Figure I.13 : Schéma général des principales méthodes d'identification bactérienne.

quelques dizaines d'espèces voire quelques espèces si ce n'est à l'unité, particulièrement en diagnostic clinique des pathogènes où le nombre d'individus reste relativement restreint.

Cependant, la diversité taxinomique des bactéries dépasse largement leur diversité morphologique ; utiliser la morphologie bactérienne à des fins d'identification ou de classification reste donc peu usitée en recherche bactériologique où les résultats trop vagues restent souvent insuffisants en l'état actuel des connaissances. Si elle est grandement substituée aujourd'hui par l'outil moléculaire, l'approche morphologique n'en reste pas moins une base fondamentale en identification et classification différentielles bactériennes. Elle demeure donc de part son coût modeste et dans certaines applications, notamment cliniques, un outil d'identification de choix.

III.B. Identification bactérienne par approche moléculaire

L'identification bactérienne par approche moléculaire a connue de très nombreuses approches et variantes. Le schéma I.13 résume ces différentes approches qu'elles soient de nature biochimique, immunologique ou génétique.

III.B.1. Identification bactérienne par génies biochimique et immunologique

D'un point de vu historique, les bactéries ont longtemps étaient classées, outre par leur morphologie observable au microscope, par leur biochimie. Par biochimie s'entend l'ensemble des enzymes capables de fournir une information pertinente à l'identification. Ces activités enzymatiques peuvent être recherchées par des tests uniques ou à l'aide de galeries de tests dédiées de type Galerie API. Selon la nature des résultats, la souche sera classée dans un taxon donné plus ou moins étroit. Cette méthode se révèle peu couteuse mais d'une grande imprécision.

En clinique, le diagnostic indirect par recherche sérologique peut être entrepris si l'infection date d'au moins cinq jours, temps nécessaire à la production d'anticorps. Les anticorps peuvent être recherchés par agglutination, par ELISA, par immunofluorescence ou par hémolyse.

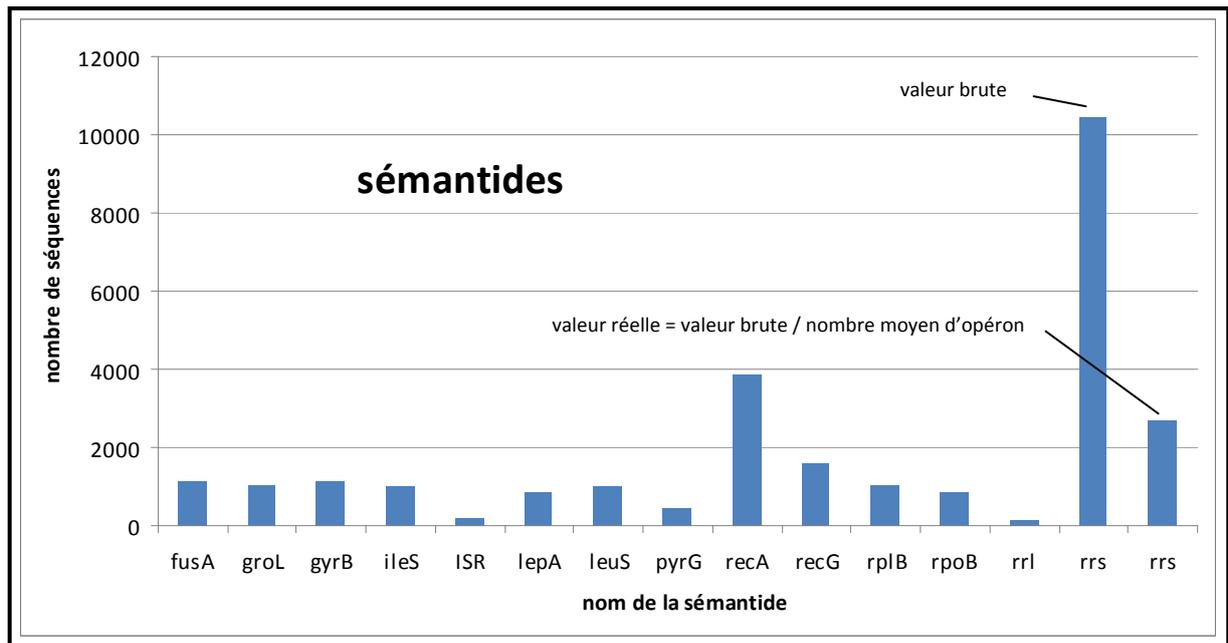


Figure I.14 : Représentation graphique du nombre de séquences disponibles dans la base de données nucléotidiques (nucleotide/gene) de NCBI pour un certain nombre de sémantides bactériennes.

Le nombre moyen d'opéron (=3,91) permettant d'obtenir la « valeur réelle » du nombre de séquences disponible pour la sémantide rrs est tiré de la base de données rrndb (« <http://ribosome.mmg.msu.edu/rrndb/index.php> »).

Tableau I. 3 : Tableau des principales sémantides bactériennes retrouvées dans la littérature.

^a (NC) = non codant, (A) = ARN, (P) = protéine ;

^b données extraites de la base ncbi/nucleotide/gene à l'exception de l'ISR.

Nom	Produit ^a	Longueur chez <i>E. coli</i> (Nt)	Nombre de séquences ^b	Référence
groL	chaperonine 60 (cpn60) (P)	1646	1066	Hill <i>et al.</i> , 2006
fusA	elongation factor G (P)	2114	1127	Santos et Ochman, 2004
gyrB	DNA gyrase, subunit B (P)	2414	1129	Watanabe <i>et al.</i> , 2001
ileS	isoleucyl-tRNA synthetase (P)	2816	1022	Santos et Ochman, 2004
ISR (16S-23S espace intergénique)	Non codant (NC)	447	204	Gurtler et Stanisich, 1996
lepA	elongation factor 4 (P)	1799	860	Santos et Ochman, 2004
leuS	leucyl-tRNA synthetase product (P)	2582	992	Santos et Ochman, 2004
pyrG	orotidine-5'-phosphate decarboxylase (P)	1637	472	Santos et Ochman, 2004
recA	Recombinase A (P)	1721	3853	Jawad <i>et al.</i> , 1998
recG	Recombinase B (P)	2081	1574	Santos et Ochman, 2004
rplB	50S ribosomal subunit protein L2 product (P)	821	1039	Santos et Ochman, 2004
rpoB	RNA polymerase, beta subunit product (P)	4026	881	Mollet <i>et al.</i> , 1997
rrl (ADNr 23S)	ARN 23S (A)	2904	132	Manz <i>et al.</i> , 1993
rrs (ADNr 16S)	ARN 16S (A)	1541	10453	Weisburg <i>et al.</i> , 1991

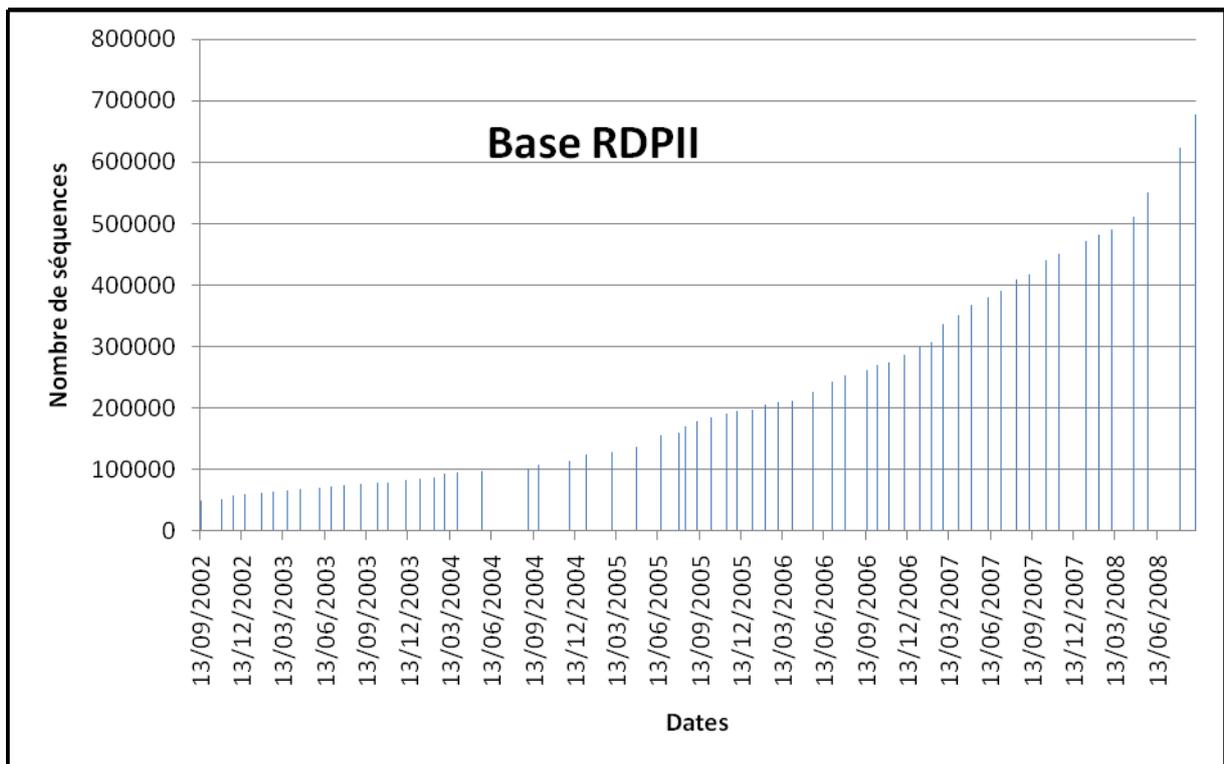


Figure I.15 : Graphique illustrant l'évolution en nombre de séquences d'ADNr 16S de la base RDPII en fonction du temps.

Les données sont extraites de l'historique (« release notes ») fourni par le site web de la base RDPII (« <http://nightingale.cme.msu.edu/misc/rel9info.jsp#history> »).

III.B.2. Identification bactérienne par phylogénétique

Les pages qui suivent traitent de l'identification bactérienne par phylogénétique et plus particulièrement de ses atouts dans les études dites environnementales.

III.B.2.a. Histoire, définition et usage des études phylogénétiques

III.B.2.a.a. la biomolécule comme horloge moléculaire de l'évolution

Voir dans les modifications mutationnelles des molécules du Vivant une horloge moléculaire de l'évolution n'est pas une notion récente puisque Zuckerkandl et Pauling furent les pionniers de cette idée en 1965 avec leur article intitulé « Molecules as documents of evolutionary history » et publié dans la revue « Journal of Theoretical Biology » (Zuckerkandl and Pauling, 1965). Dans cet article, ils présentent la matière vivante comme un système « constamment aboli et simultanément préservé » où ses biomolécules disposent selon leur intégration d'une part plus ou moins importantes de son histoire.

Ils classifient les biomolécules selon trois grandes classes en fonction du degré d'information génétique qu'elles reflètent de l'organisme vivant qui les contient :

- les biomolécules sémantophorétiques ou sémantides. Il s'agit des biomolécules portant l'information des gènes ou de leur transcrits. Les auteurs divisent ce rang en trois sous-classes : les gènes représentent les sémantides primaires, les ARNm représentent les sémantides secondaires et enfin les protéines représentent les sémantides tertiaires.

- les biomolécules épisémantiques. Ce sont les biomolécules dont la synthèse est sous le contrôle de sémantides tertiaires (les protéines enzymatiques). Glycogène, amidon et polysaccharides sont des exemples de molécules épisémantiques.

- les biomolécules asémantiques. Cette dernière classe contient toutes les molécules non produites et n'exprimant aucune information de l'organisme vivant qui les contient, que ce soit de manière directe ou indirecte. Dioxygène, ion phosphate sont des exemples données par les auteurs de molécules asémantiques.

Dés lors, nombre d'applications utilisant ces horloges moléculaires verront le jour. Tout d'abord orientées vers des domaines comme la systématique et la taxinomie, elles se tourneront ensuite, une fois les arbres phylogénétiques bien renseignés, vers l'identification.

Thermus thermophilus
SSU rRNA
variability map

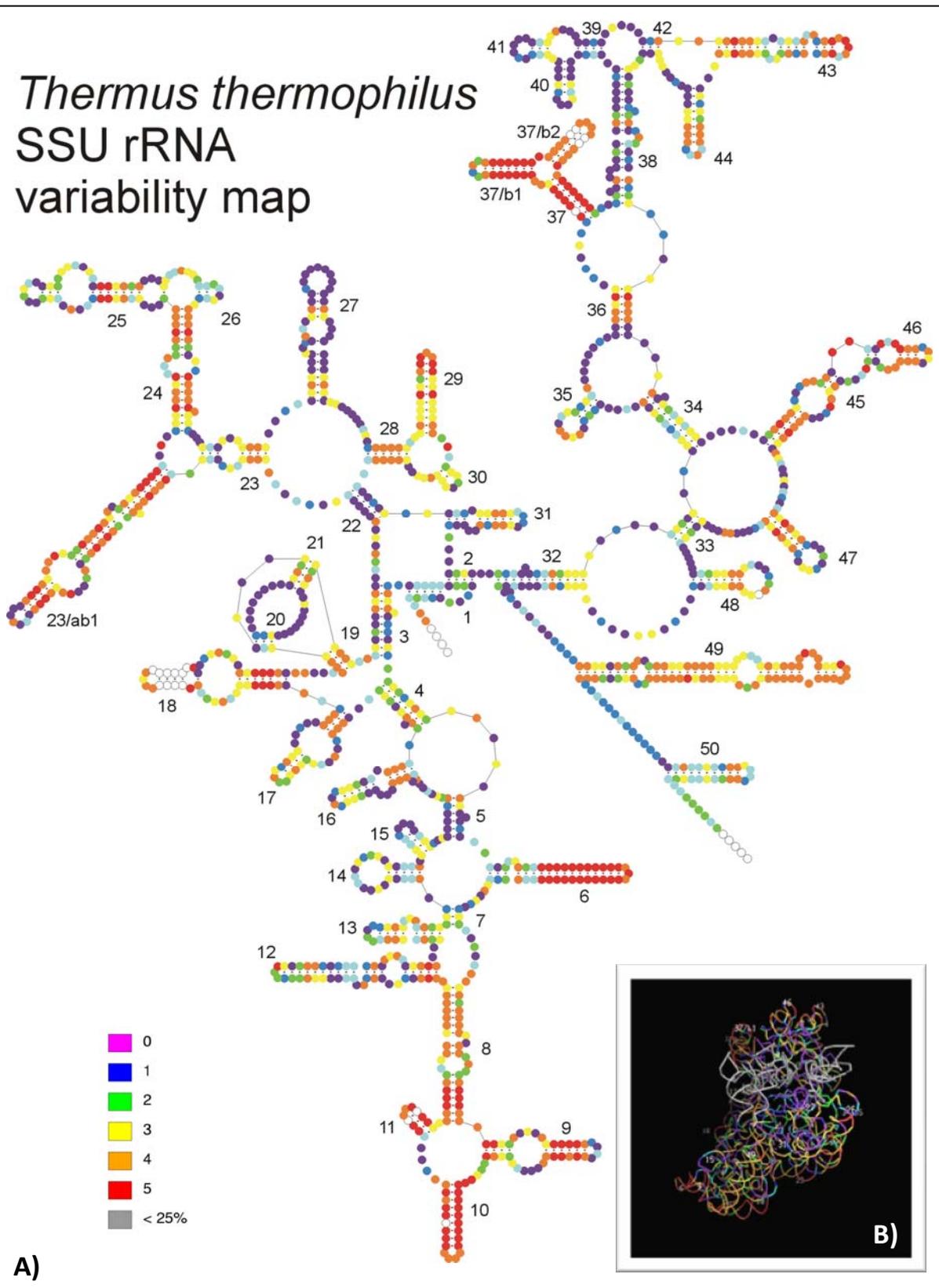


Figure I.16 : Représentation schématique des structures secondaire (A) et tertiaire (B) de la petite sous-unité ribosomique de *Thermus thermophilus*. La structure secondaire présente, par un code de couleurs, le taux de substitution de chaque nucléotide.

D'après Van de Peer *et al.*, 1996 et Wuyts *et al.*, 2001.

Dans les pages qui suivent, le terme « sémantide » sera de nombreuses fois utilisée pour traduire des séquences à intérêt phylogénétique, autrement dit des marqueurs de l'évolution.

III.B.2.a.β. Du choix de la bonne sémantide

Dans toutes études phylogénétiques ou d'identification bactérienne, le choix de la sémantide repose sur trois critères principaux :

- Le nombre de séquences de la sémantide dans les bases de données de séquences doit être suffisamment élevé pour s'assurer de la précision et du sens des résultats. En particulier, si l'identification porte sur une bactérie inconnue, la sémantide devra toucher l'ensemble du règne bactérien (amorce ou sonde universelle). Ainsi, comme en atteste la figure I.14, le gène de l'ADNr 16S (rrs) reste la sémantide la plus largement représentée dans les banques de données, suivie de près par la recombinaise A (RecA).

- Si les taxons à discriminer sont connus, il conviendra de s'assurer que la sémantide choisie permet réellement leur identification et discrimination. Le cas échéant, il conviendra, si cela est possible, de compléter la base de données ou, dans le cas contraire, garantir que la sémantide choisie dispose d'une variabilité dont l'universalité ou la spécificité ne fait pas de doute compte-tenu des éléments déjà présents dans la base.

- De la technique d'identification moléculaire choisie dépend également le choix de la sémantide : ainsi, selon la technique choisie, il faudra disposer d'une sémantide avec des régions variables ou non, des régions conservées ou non et des tailles pour ces régions très variables.

III.B.2.a.γ. l'ADNr 16S comme sémantide bactérienne

De toutes les sémantides bactériennes, le gène de l'ADNr 16S reste certainement la plus usitée faite à Fox *et al.* (1980) et Weisburg *et al.* (1991) qui historiquement en firent la première sémantide bactérienne et la première facilement amplifiable « universellement ». Aujourd'hui encore, le gène de l'ADNr 16S reste la sémantide la mieux renseignée dans les bases de données de séquences nucléotidiques (cf figure I.15) et *de facto* la plus employée

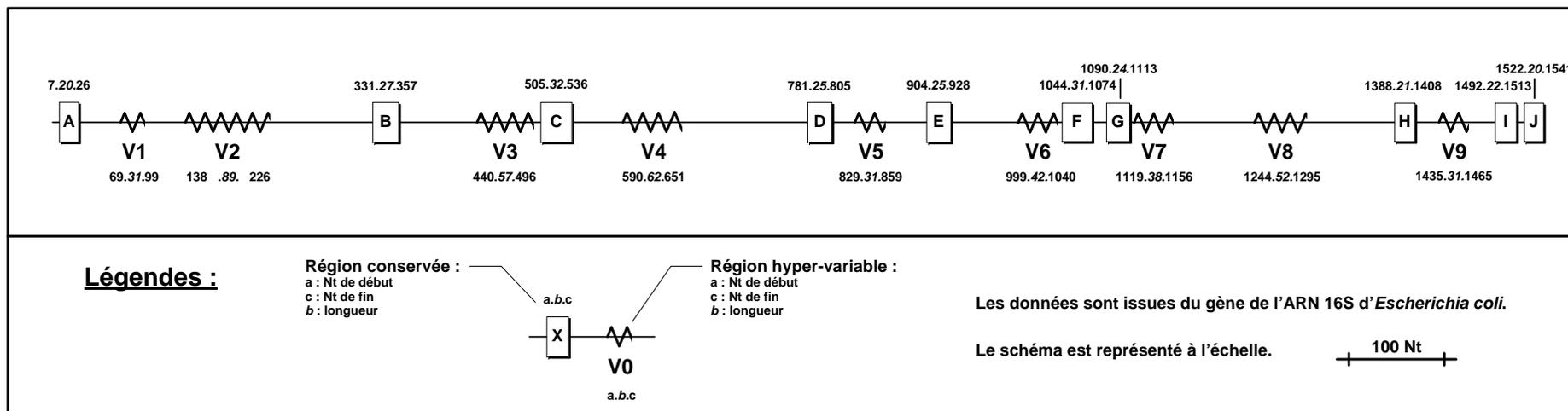


Figure I.17 : Représentation schématique de la distribution des régions hyper-variables (notées de V1 à V9) ainsi que des régions conservées (notées A à J) du gène de l'ARN 16S d'*Escherichia coli*.

(près de 600000 séquences dans la base « RDPII » (Cole *et al.*, 2007) et plus de 200000 séquences supérieures à 1250 Nt dans la base « Greengenes » en août 2008 (DeSantis *et al.*, 2006)).

L'ARN 16S est un constituant de la petite sous-unité ribosomique. De fait, la survie de la cellule dépend de sa conformation (cf figure I.16). Or sa conformation dépend de sa séquence et donc la séquence du gène de l'ADNr 16S est indispensable à la survie de la cellule. Il existe donc des zones conservées du gène qui sont indispensables à la structure tertiaire de l'ARNr. Ces régions conservées sont au nombre de dix et sont représentées et annotées de A à J sur la figure I.17. De ces régions peuvent être extraits des amorces ou sondes dites « universelles ». Entre ces régions conservées existent des régions dites « hypervariables » dont la séquence n'est pas « indispensable » à la conformation ribosomique. Ces régions hypervariables sont au nombre de neuf et sont représentées et annotées de V1 à V9 sur la figure I.17. Ces régions hypervariables offrent des possibilités d'amorçages spécifiques d'un taxon donné ou, couplé avec deux régions conservées et une amplification, permettent une identification phylogénétique de la bactérie. L'ensemble de ces régions et la taille relativement restreinte du gène de l'ADNr 16S (1541 bases chez *E. coli*) assurent de nombreuses possibilités de travail aux bactériologistes.

Malgré son usage intensif, l'emploi de l'ADNr 16S en tant que sémantide dans les études phylogénétiques souffre néanmoins de plusieurs revers. Dans de tels cas, on peut alors avantageusement remplacer le gène de l'ADNr 16S par d'autres sémantides bactériennes.

III.B.2.a.δ. Autres sémantides bactériennes

Le tableau I. 3 présente un nombre non exhaustif de possibles sémantides du monde bactérien. Si historiquement le gène de l'ADNr 16S fut la première sémantide utilisée et de fait aujourd'hui la mieux documentée, nombre d'auteurs, mécontents des résultats que cette sémantide leur offrait, ont recherché à la remplacer par d'autres séquences. Ainsi, Manz *et al.* en 1993 utilisent-ils non pas le gène de l'ARN 16S mais celui de l'ARN 23S pour leur identification bactérienne.

Dés la fin des années 1990, nombre d'auteurs préféreront utiliser des gènes codant pour des protéines et non des ARNr comme sémantides. Ils argumentent que les ARNr, qui

par définition ne sont pas traduits, souffrent d'un important taux d'insertion et délétion qui rendent l'alignement des séquences difficile. Ainsi, Mollet *et al.* proposent rpoB en 1996, Jawad *et al.* recA en 1998, Watanabe *et al.* gyrB en 2001, Hill *et al.* groL en 2006 et enfin Santos et Ochman en 2004 proposent une série de gènes possibles substitutifs à l'ADNr 16S comme fusA, ileS, lepA, leuS, pyrG, recG ou encore rplB. De toutes ces possibilités, ce sont surtout groL, recA et rpoB qui tirent leur épingle du jeu. Ainsi, rpoB est beaucoup utilisé pour discriminer certaines espèces dans des genres bien précis. Entre autres espèces, les espèces des genres *Bartonella* (Renesto *et al.*, 2001), *Corynebacterium* (Khamis *et al.*, 2004), *Leptospira* (La Scola *et al.*, 2006) ou *Staphylococcus* (Drancourt et Raoult, 2002) sont avantageusement identifiées avec l'analyse phylogénétique de la séquence de leur gène rpoB qui permet alors une identification précise là où le gène de l'ARN 16S peinait difficilement à donner simplement le genre. De même, l'étude de famille entière peut être facilitée comme le rapporte Mollet *et al.* en 1997 avec la famille *Enterobacteriaceae*.

Il est à noter qu'outre les gènes codant pour des protéines ou des ARNr, des régions non codantes peuvent également servir de sémantides. C'est ce que proposent Gurtler et Stanisich en 1996 avec l'espace intergénique existant entre les gènes des ARN 16S et 23S (en anglais ISR pour Intergenic Spacer Region). Garcia-Martinez *et al.* proposent en 2001 leur propre base de données sur cette sémantide. La plupart des sémantides mentionnées dans ce chapitre disposent aujourd'hui de leur propre base de données.

III.B.2.a.ε. Et en dehors du règne bactérien ?

Le règne bactérien n'est pas le seul à disposer de sémantides permettant la classification et l'identification des individus. En 2007, Ratnasingham et Hebert proposent une base de données pompeusement intitulée BOLD pour l'anglais Barcode Of Life Data system, les bactéries n'étant bien entendu pas incluses à la base. La sémantide employée est une portion de 648 pb du gène de la cytochrome oxydase I (en anglais cytochrome *c* oxidase I (COI) gene). Ce gène a l'avantage d'être quasi-ubiquitaire du monde Vivant et permet donc théoriquement l'identification de tout végétal ou animal.

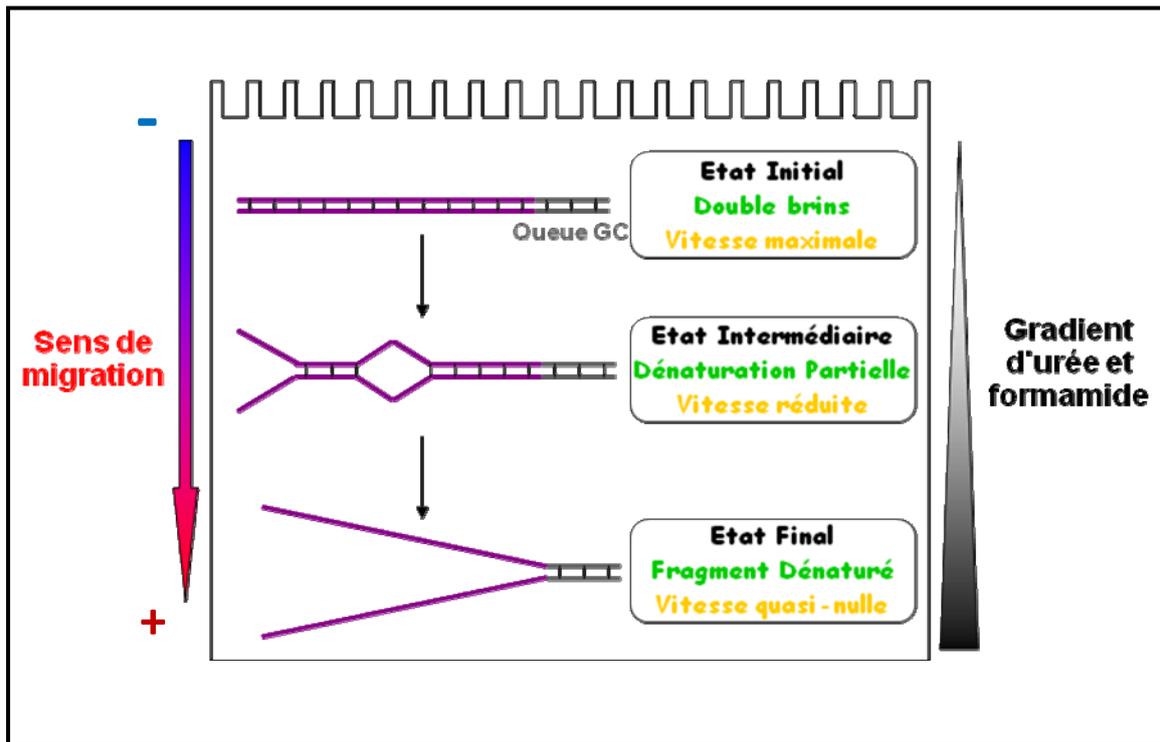


Figure I.18 : Représentation schématique de la dénaturation progressive de fragments d'amplification dans un gel de DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

III.B.2.b. Identification bactérienne avec amorces oligonucléotidiques

Les techniques d'identification bactérienne faisant appel à des amorces oligonucléotidiques ne s'utilisent, par définition, qu'avec une pré-étape d'amplification d'ADN (PCR). Au choix, les amorces peuvent être spécifiques d'une espèce ou d'un taxon donnés ou encore dites « universelles » et amplifiées alors l'ensemble du règne bactérien. Dans un cas comme dans l'autre, les termes « spécificité » et « universalité » ne doivent pas être pris au pied de la lettre. Les amorces sont en effet définies par rapport aux bases de données de séquences à un instant donné, ne reflétant donc qu'une part restreinte de la réalité du monde bactérien. Rien ne prouve alors que les amorces choisies soient, en pratique ou dans l'absolu, « spécifiques » ou « universelles ».

Il est à noter que, contrairement aux techniques d'identification utilisant des sondes oligonucléotidiques (traitées § III.B.2.c), les techniques avec amorces oligonucléotidiques requièrent deux régions conservées dans le taxon d'intérêt, distinctes et d'une taille moyenne de 18-20 Nt au lieu d'une seule de 30-40 Nt pour les techniques d'identification avec sondes oligonucléotidiques.

En outre, à l'exception des techniques utilisant l'amplification quantitative ou semi-quantitative, l'identification est dépendante de la variabilité de la région amplifiée par les amorces. La séquence de cette région, déterminée en totalité ou en partie par séquençage ou d'autres moyens, permettra si ce n'est l'identification de la bactérie au moins son classement phylogénétique parmi les séquences déjà connues des banques de données.

III.B.2.b.a. Les électrophorèses avec gradient dénaturant : TTGE/DGGE

Les premières publications à faire état de l'utilisation de gels d'électrophorèse avec gradient dénaturant sont apparues au début des années 1980. Ainsi, en 1983, dans la revue « Proceedings of the National Academy of Sciences », Fischer and Lerman décrivent l'emploi d'un gel d'électrophorèse avec gradient dénaturant pour différencier des fragments d'ADN possédant des substitutions de l'ordre de la paire de bases. Ils y indiquent également une correspondance avec la théorie des températures de fusion des acides nucléiques (T_m).

Le principe d'une séparation de fragments d'acides nucléiques sur un gel d'électrophorèse avec gradient dénaturant est basé sur une perte différentielle de leurs vitesses

de migration dépendante de leur T_m (figure I.18). En effet, la dénaturation progressive des fragments au fur et à mesure de leur progression dans le gel entraîne une nouvelle conformation ouverte des molécules qui ralentit leur migration. Cette dénaturation étant dépendante des T_m des fragments et le T_m de leur séquence, leur vitesse et *in fine* leur position dans le gel sera donc dépendante de leur séquence. Pour favoriser la résolution, l'emploi d'une séquence riche en guanine et cytosine, appelée queue GC (en anglais, GC clamp), a été proposé par Myers *et al.* en 1985 avec une taille de 300 Nt puis par Sheffield *et al.* en 1989 avec cette fois-ci une taille plus faible de 40 Nt. Aujourd'hui, c'est cette dernière taille de 40 Nt qui est toujours utilisée. Cette queue GC est ajoutée à l'une des amorces pour être ainsi présente sur tous les fragments après amplification. Compte tenu de la composition de cette séquence GC, son T_m , très élevé, prévient toutes possibilités de dénaturation complète du fragment amplifié. Il en résulte que la conformation la plus dénaturé d'un fragment amplifié est une sorte de « Y » qui freine considérablement sa progression dans le maillage du gel ; ouvrant alors les « bras » dans le maillage du gel, la vitesse de migration du fragment devient alors quasi-nulle.

L'emploi des électrophorèses avec gradient dénaturant englobe donc toutes les applications où une simple différence de T_m entre deux ou plusieurs fragments permettrait de les discriminer par électrophorèse. Cette notion est importante et doit toujours être présente à l'esprit de l'utilisateur, tant elle explique l'impuissance de cette technique à séparer des fragments d'acide nucléique de séquences pourtant divergentes mais avec des T_m identiques ou très proches (illustration est faite dans cet article : Jackson *et al.* 2000). On retrouve en premier lieu des applications sur la recherche de mutation ponctuelle (Fischer and Lerman 1983) ou la mise en évidence de polymorphisme de gènes (Collins *et al.* 1989). Viennent ensuite des applications dans le domaine du diagnostic de maladies génétiques comme par exemple la β -thalassémie (Cai and Kan 1990), l'hémophilie (Higuchi *et al.* 1991) ou encore la maladie d'Alzheimer (Peacock and Fink 1994). On peut encore citer des applications dans les domaines du prion, des virus, des oncogènes ou des récepteurs du système immunitaire. Enfin, les études environnementales présentent aujourd'hui l'une des parts les plus importantes des applications des électrophorèses avec gradient dénaturant (Muyzer *et al.* 1993).

La TTGE, quand à elle, pour l'anglais Temporal Temperature Gel Electrophoresis, est relativement proche de la DGGE et a été utilisée pour la première fois par Day *et al.* en 1995.

En fait, quand les agents dénaturants de la DGGE sont de nature chimique et thermique, celui de la TTGE est simplement thermique. Ainsi, au fur et à mesure de la migration, la température du tampon se voit augmenter temporellement. La TTGE reste sous-employée par rapport à la DGGE, car elle présente une qualité et une finition des bandes largement inférieures (données personnelles). Cependant, ses fidèles affirment que, n'utilisant aucun gradient chimique, elle offre une meilleure reproductibilité. L'auteur infirme cette idée reçue : si la qualité des gels dénaturants est contrôlée tant par leur composition que par leur production, il n'y a pas lieu de voir de différences entre deux gels DGGE présentant les mêmes échantillons.

De nombreuses autres techniques dérivées de la DGGE ont vu le jour. Premièrement, la CDGE, pour Constant Denaturing Gel Electrophoresis, est une variante de la DGGE où les conditions dénaturantes sont alors constantes et identiques sur l'ensemble du gel. Cette constance de dénaturation est favorable à la discrimination de fragments très proches et dont les conditions de séparation optimales sont déjà connues comme c'est le cas avec des mutations morbides par exemple. Deuxièmement, la SSCP, pour Single-Strand Conformation Polymorphism, décode le polymorphisme conformationnel existant entre des fragments simple brin. Des techniques bidimensionnelles ont également été mises au point sur la base de la DGGE. Enfin, de récentes avancées dans les électrophorèses capillaires permettent de contrôler la température interne du capillaire via l'effet Joules (par variations de l'intensité). Cette dernière perspective permettrait d'améliorer significativement la reproductivité et le rendement de techniques comme la TTGE.

L'arrivée d'appareillages commerciaux dédiés, en 1995, comme le D-code de Bio-Rad (Hercules, Californie, EUA), démocratise l'usage des électrophorèses avec gradient dénaturant et crée une explosion des publications dans ce domaine. En outre, le coût de l'appareil et des analyses, relativement modique, ainsi que leur relative simplicité de mise en œuvre expliquent également le grand succès rencontré par les gels avec gradient dénaturant.

A leur charge, les gels à gradient dénaturant souffrent de certains revers. Ainsi, la DGGE et la TTGE sont des techniques difficiles à maîtriser et il n'est pas rare de voir des gels de qualité médiocre. Lorsque l'amplification est nouvelle et inconnue, il est souhaitable de réaliser un gel monopuits avec un gradient horizontal pour connaître le bon gradient à utiliser ainsi qu'un test temporel de migration en appliquant sur un gel à gradient vertical le même

échantillon toutes les quinze minutes sur un puits différent. De plus, dans le cas des études environnementales, l'information extraite d'une bande est généralement restreinte à un genre ou un groupe d'espèces, faute à la limitation de 600 pb imposée aux fragments afin d'obtenir une bonne résolution. Il est également souvent impossible de réaliser un séquençage des bandes directement extraites des gels ; celles-ci nécessitent en effet une purification par multiples passages sur gels avant d'offrir une qualité convenable pour le séquençage.

III.B.2.b.β. La tRFLP

La tRFLP, pour l'anglais terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, est une technique qui a été initiée par Liu *et al.* en 1997 puis approfondie en 1999 par Moeseneder *et al.* et par la review de Marsh. Cette technique ne fait des émules que plus tardivement vers les années 2000, avec l'arrivée de bases de données dédiées et plus particulièrement celle pour la flore colique humaine, PAD-HCM, de Matsumoto *et al.* rendue disponible en 2005.

Comme toute RFLP, la discrimination de fragments nucléotidiques d'une analyse par t-RFLP se base sur la présence ou l'absence de sites de restriction enzymatique. Après digestion par un ou plus généralement par plusieurs enzymes de restriction, les sous-fragments de digestion présentent alors un polymorphisme de taille qui permet de discriminer les fragments initiaux. La seule différence de la tRFLP avec la RFLP classique réside dans l'ajout d'un marquage terminal – d'où le « t » – des extrémités des fragments pré-amplifiés (marquage réalisé le plus souvent par ajout d'un fluorochrome sur les amorces). Seule la taille des fragments terminaux sera alors déterminée, généralement par électrophorèse capillaire ou bien par simple électrophorèse classique.

Réaliser une étude phylogénétique par tRFLP reste relativement hasardeux compte tenu de la faible information séquentielle fournie par cette technique. Il faudra donc privilégier l'emploi de la tRFLP dans des applications où les organismes sont déjà clairement établis et non dans des applications où la plupart des organismes restent inconnus. En outre, la tRFLP reste une technique partiellement imprécise (résultats pouvant conduire à des conclusions divergentes comme un fragment donnant le genre *Clostridium* ou *Lactobacillus* dans la base de données...) et doit donc être réservée à des applications peu exigeantes.

A sa décharge, la tRFLP est une technique très rapide en particulier dans son emploi de l'électrophorèse en capillaire.

III.B.2.b.γ. L'amplification semi-quantitative et quantitative

L'amplification semi-quantitative est une amplification arrêtée en pleine phase exponentielle et donc avant le plateau. A ce stade de l'amplification, les quantités d'ADN peuvent être comparées et l'on peut ainsi estimer la différence des quantités d'ADN initiales existant entre deux échantillons. En outre, si l'on dispose d'un échantillon témoin dont la quantité initiale d'ADN est connue, il sera alors possible de quantifier l'ADN, avec une précision cependant toute relative. Dans le cas des études environnementales, il est ainsi possible, à condition d'utiliser le bon couple d'amorces, de déterminer de deux échantillons celui qui contient le plus ou le moins de tel ou tel taxon. L'amplification semi-quantitative se révèle extrêmement imprécise et c'est pourquoi on lui préfère aujourd'hui la vraie amplification quantitative (qPCR).

L'amplification quantitative ou amplification en temps réel ou encore qPCR en anglais abrégé est, comme son nom l'indique, une amplification d'ADN qui permet la quantification de l'ADN initialement présent dans l'échantillon. Technique apparue dès les années 1990, la qPCR sera employée pour la première fois dans une étude environnementale par Blok *et al.* en 1997 en utilisant le gène de l'ARN 16S. Dès lors, la qPCR a été utilisée pour détecter des variations de la masse bactérienne totale (Simmons *et al.*, 2007), d'un groupe ou taxon donné (Kloke *et al.*, 2006) ou encore des bactéries incultivables (Cassler *et al.*, 2008).

La PCR quantitative permet de définir avec précision et rapidité la quantité d'un taxon donné dans un échantillon mais elle ne peut en aucun cas définir les espèces présentes dans le cas où le taxon serait plus large que l'espèce. A ces fins, il faudra déployer autant de couples d'amorces que d'espèces à quantifier. De même, la qPCR ne permet pas l'identification bactérienne à proprement parler mais seulement une quantification. Si les populations bactériennes sont inconnues et qu'elles doivent être identifiées, ce n'est donc clairement pas la technique à employer.

III.B.2.b.δ. Le clonage

Le clonage, technique de biologie moléculaire dérivée de la transformation bactérienne, est de longue date utilisé en Biologie Moléculaire. Il fût la base de l'amplification *in-vivo* avant que la PCR ne soit mise au point par Mullis *et al.* en 1986.

Laborieux à ses débuts, l'arrivé de vecteur spécifique ont permis de faciliter le clonage particulièrement dans le criblage des clones (criblage blanc/bleu). Aujourd'hui, s'il n'est plus employé comme outil d'amplification d'ADN, supplanté alors par la PCR, il reste l'un des meilleurs outils de séparation et préhension moléculaires. Ainsi, face à un échantillon moléculaire complexe, comme cela peut être le cas dans une étude environnementale, le clonage permet d'isoler un fragment d'ADN d'un mélange puis de travailler sur celui-ci de manière plus aisée, comme réaliser son séquençage par exemple. En identification bactérienne, l'insert est une sémantide bactérienne comme le gène de l'ARN 16S (Verhelst *et al.*, 2004 ; Felske *et al.*, 1999). En outre, comme en atteste l'article de Schmidt *et al.* en 1991, le clonage fut l'une des premières méthodes d'exploration des flores complexes et environnementales.

Le clonage reste l'outil d'identification bactérienne des flores complexes le plus puissant mais aussi, compte tenu des séquençages redondants, le plus couteux. C'est pourquoi il est très souvent associé à une méthode de criblage des clones. L'auteur invite le lecteur à se référer à l'article sur la CSbyDG présenté en chapitre trois du présent manuscrit qui relate certains modes de criblages de banques de clones ainsi qu'une nouvelle méthode dédiée aux études bactériennes et environnementales utilisant pour base le clonage de l'ADNr 16S.

III.B.2.c. Identification bactérienne avec sondes oligonucléotidiques

Contrairement aux techniques employant des amorces oligonucléotidiques, les techniques d'identification bactérienne faisant appel à des sondes oligonucléotidiques ne nécessitent pas d'étape de pré-amplification d'ADN (PCR) et la séquence complémentaire de la sonde est toujours choisie dans une région conservée d'un taxon et uniquement de ce taxon (elle est alors dite « spécifique » de ce taxon) ou dans une région conservée sur l'ensemble du règne bactérien (elle est alors qualifiée d'« universelle »). Les régions variables n'ont donc

aucun intérêt dans ce type d'applications. En outre, une seule région est nécessaire de taille moyenne de 30-40 nt (sauf méthode de Rimour *et al.* (2005) décrit ci-après).

III.B.2.c.a. Hybridation in situ - Dot-Blot / Slot-Blot / FISH

L'hybridation *in situ* est une technique qui utilise la complémentarité des acides nucléiques pour hybrider des sondes oligonucléotides sur des séquences de sémantides spécifiques d'un genre bactérien (Giovanoni *et al.*, 1988; DeLong *et al.*, 1989).

L'hybridation peut être réalisée sur différents supports. En Dot-Blot ou Slot-Blot, l'échantillon à analyser est déposé sur une membrane de papier ou de nitro-cellulose. En FISH, l'échantillon est traité sans dépôt préalable.

L'hybridation fluorescente *in situ* (en anglais FISH pour Fluorescent In Situ Hybridization) profite d'un marquage fluorescent des sondes afin de permettre une lecture directe. En études environnementales, on retrouve son utilisation dans de nombreuses applications comme dans l'étude des biofilms (Regan *et al.*, 2003), des eaux de rivières (Kensaka *et al.*, 1998) ou encore des flores digestives (Zhu et Joerger, 2003). Nombre d'auteurs étudiant des flores bactériennes complexes emploient plusieurs sondes ciblant des groupes bactériens donnés (Franks *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 1997). Certains auteurs comme Manz *et al.* (1999) associent FISH et une analyse d'images microscopiques par laser.

L'hybridation fluorescente *in situ* peut être couplée à un compteur cellulaire par cytométrie de flux, permettant ainsi de lui offrir la dimension quantitative qui lui manquait (Bauman *et al.*, 1988 ; Amann, *et al.*, 1990 ; Joachimsthal *et al.*, 2004 ; Gerdtts et Luedke, 2006).

III.B.2.c.β. Puces à ADN – Microarray

Les microarrays sont une extension des techniques de Dot-Blot/Slot-Blot et donc du buvardage par Southern Blot. Il s'agit d'attacher des oligonucléotides à un support et de quantifier, généralement par fluorescence, leur hybridation avec un échantillon.

De récentes avancées dans le domaine de la robotisation ont permis la miniaturisation des blots et ainsi l'accroissement de leur nombre sur une surface restreinte. Schena *et al.* décrivent en 1995 une telle miniaturisation toujours pour de la recherche d'expression génique. En 1997, une nouvelle avancée est proposée avec tout le génome de *Saccharomyces cerevisiae* disponible sur une seule et même puce (Lashkari *et al.*, 1997).

Le champ d'applications des puces à ADN a été logiquement initié dans des domaines comme l'expression génique (Schena *et al.*, 1996) et la recherche de SNP (Lindroos *et al.*, 2002). Les perspectives des microarrays dans le diagnostic des cancers ou des maladies humaines sont très importants comme en atteste les publications de De Risi *et al.* (1996) sur les cancers humain, Heller *et al.* (1997) sur les maladies inflammatoires ou encore Dobrowolski *et al.* (1999) sur la recherche de maladies génétiques en médecine néonatale.

L'utilisation des microarrays dans des études à but environnemental ne fut que plus tardive, faute à un coût élevé et à une grande difficulté dans la définition des oligonucléotides. En effet, il a fallu attendre une meilleure connaissance des microflore complexes et l'élargissement des banques de données de séquences pour pouvoir réaliser des puces d'ADN représentatives en le domaine. Ainsi, la plupart des premières puces environnementales ne furent cantonner qu'à une famille bactérienne comme les Cyanobactéries (Castiglioni *et al.*, 2004), les Alphaprotéobactéries (Sanguin *et al.*, 2006) ou encore les Betaprotéobactéries (Loy *et al.*, 2005). Malgré la publication de Wilson *et al.* déjà en 2002 - publication présentant une ébauche de puce à spectre bactérien large -, ce ne sera que plus tardivement que verront le jour des puces à ADN censées englober l'ensemble du règne bactérien (Kim *et al.*, 2005 ; Brodie *et al.*, 2006 ; Palmer *et al.*, 2006 ; Sanguin *et al.*, 2006 ; Huyghe *et al.*, 2008).

En 2005, Rimour *et al.* ont mis sur pied une nouvelle stratégie pour le dessin des sondes de microarrays particulièrement habile pour les études bactériennes environnementales. Ils utilisent une séquence « linker » de 100 Nt qui relie deux oligonucléotides, permettant ainsi d'utiliser des régions cibles discontinues et séparées de plusieurs dizaines de bases. La sensibilité du microarray s'en retrouve alors accrue. Les mêmes auteurs proposeront en 2007 un nouvel algorithme de calcul des sondes basé sur cette stratégie (Milton *et al.*, 2007).

Tableau I. 4 : Tableau récapitulatif des différentes techniques disponibles en identification bactérienne moléculaire avec leurs avantages et inconvénients respectifs.

Nom	Données qualitatives	Données quantitatives	Coût temporel	Coût par échantillon	Equipement spécifique ?	Coût équipement
DGGE/TTGE	++	-	++	faible	oui	modéré
Clonage/séquençage	+++	+++	+++	très élevé	non	/
Hybridation in situ	+	+	+	faible	oui/non	modéré
Hybridation in situ couplé à une cytométrie de flux	+	+++	+++	élevé	oui	très élevé
tRFLP	+	-	++	faible à élevé	oui/non	modéré à élevé
PCRsq	+	+	++	faible	non	/
PCRq	+	+++	+	élevé	oui	élevé
microarray	+++	+	+	élevé à très élevé	oui/non	très élevé

L'avantage certain des puces à ADN est leur miniaturisation qui permet le traitement d'un nombre de séquences oligonucléotidiques très important. Aujourd'hui, certaines enseignes commercialisent des puces à plus d'un million d'oligonucléotides. Le coût des microarrays reste l'un des plus élevés en identification bactérienne, surtout si l'utilisateur désire acquérir un robot d'impression. En outre, bien que De Santis *et al.* (2007) aient fait état d'un microarray présentant une meilleure diversité qu'une banque de clones, les puces à ADN ne permettent pas, de part leur conception, d'identifier et surtout de classer des bactéries inconnues.

Le tableau I. 4 résume l'ensemble des avantages et inconvénients des techniques en identification bactérienne citées ci-avant.

Ce chapitre introductif nous a permis de mettre en relief les différentes interactions biologiques de type symbiotique existant au cœur des flores complexes et particulièrement celles des flores digestives. Nous avons prouvé que les interactions régnant au sein des flores digestives sont beaucoup plus complexes qu'il n'y paraît et qu'un seul élément de vocabulaire ne suffit pas à les qualifier. Les bactéries siégeant dans ces flores sont ainsi non seulement symbiotiques mais également commensales, saprophytes, mutualistes, etc...

A cette complexité d'interactions biologiques, les flores digestives connaissent également en leur sein une grande variabilité qualitative d'espèces bactériennes. Quantitativement, les taxons bactériens présents dans les flores digestives sont très variables selon l'âge, l'individu ou l'hôte considéré.

Nous avons présenté la panoplie d'outils disponibles à des tâches d'identification bactérienne, particulièrement sur flore complexe, et montré que si le clonage restait certainement l'une des meilleures méthodes, son coût, fortement élevé, faisait souvent préférer des techniques moins onéreuses comme celles des gels à gradient dénaturant.

Dans la suite du présent manuscrit, en chapitre deux, seront ainsi développés divers travaux d'investigation sur les flores digestives des galliformes, poulet et dinde, par l'usage des gels à gradient dénaturant et par clonage. Enfin, une nouvelle méthode d'identification alliant ces deux méthodes sera présentée en chapitre trois ainsi que l'outil informatique développé permettant l'emploi de cette nouvelle méthode.

CHAPITRE II

Etudes des flores digestives de Galliformes

Les pages qui suivent présentes les travaux d'un contrat de recherche-développement effectués pour le compte d'un industriel breton spécialisé en alimentation animale.

La principale mission du LMBA, laboratoire de l'auteur, était alors de fournir un protocole d'identification des espèces bactériennes présentes dans le microbiote digestif de Galliformes d'élevage (poulet et dinde). Ce protocole devait également permettre de faciliter les comparaisons entre échantillons et de définir les variations qualitatives de la flore au contact de diverses suppléments : antibiotiques, probiotiques, prébiotiques ou huiles essentielles.

Compte-tenu de ces exigences, nous nous sommes tout naturellement tournés vers les gels à gradient dénaturant qui, outre le fait d'avoir connu un important essor ces dernières années, offrent des avantages certains dans ce type d'étude : investissement peu élevé compte tenu du coût modeste de la machine et des analyses, coût temporel par échantillon relativement faible, possibilité de comparaisons immédiates entre échantillons et identification bactérienne par phylogénie permettant un classement des bactéries présentes dans l'échantillon même si elles sont jusqu'alors non renseignées dans les bases de données.

Ces travaux sont présentés sous quatre grandes parties. Une première partie est dédiée à la mise au point du protocole ad hoc visant à l'identification des bactéries des microflores digestives de galliformes par gels à gradient dénaturant et les différents problèmes surmontés. Une deuxième partie présente la recherche de variations des flores digestives du poulet d'élevage sous l'influence d'un antibiotique utilisé comme facteur de croissance avant son interdiction par l'Union Européenne en janvier 2006, l'avilamycine. Dans une troisième partie sont présentés les travaux, toujours sur le poulet d'élevage, recherchant des variations de la flore digestives non pas par des antibiotiques mais par des substitutifs de ceux-ci comme un prébiotique (scFOS) et des huiles essentielles de diverses origines et à diverses concentrations. Enfin, une quatrième et dernière partie illustre l'utilisation des gels à gradient dénaturant pour rechercher d'éventuels pathogènes digestifs dans le cas précis d'entérites non spécifiques chez la dinde d'élevage.

II. A Mise au point du protocole de DGGE

La mise au point des gels à gradient dénaturant est réputée fastidieuse et nous n'avons pas échappé à la règle. Pour arriver à nos fins, il nous a fallu nous adapter et opérer de nombreux changements protocolaires.

Désireux de réduire au maximum le temps de mise au point pour être opérationnels le plus tôt possible, nous avons donc choisi de nous calquer sur des travaux ayant déjà fait leur preuve par publications dans ce type même d'applications. Notre choix s'est alors posé sur les travaux de Walter *et al.* (2000 et 2001) qui présentaient à la fois une qualité et une résolution des gels intéressantes et aussi une spécificité taxinomique compatible avec nos échantillons. Ils utilisent deux couples d'amorces d'intérêt, l'un d'eux « universel » des eubactéries (HDA1-HDA2) offrant un fragment amplifié de 199 pb et l'autre spécifique du genre *Lactobacillus* (LAC1-LAC2) offrant un fragment amplifié d'environ 350 pb.

Nous nous sommes d'abord cantonné à suivre les indications mentionnées par ces auteurs, particulièrement dans le choix des gradients, à savoir 30-50 % pour les fragments amplifiés par les amorces HDA1-HDA2 et 40-65 % pour les fragments amplifiés par les amorces LAC1-LAC2. Le 100 % est défini historiquement par une concentration d'urée de 7 M et un pourcentage de formamide déionisée de 40 % (v/v). Néanmoins quelques ajustements de gradients ont été effectués. Ainsi, nos échantillons ont montrés de biens meilleurs résultats avec des gradients 30-55 % pour les fragments amplifiés par le jeu d'amorces HDA1-HDA2.

Nos premiers résultats en PCR simple ont montré une faiblesse du nombre de bandes observables sur les gels. Pour augmenter le signal, nous avons alors entrepris une PCR nichée en conservant les mêmes couples d'amorces pour la seconde PCR et en utilisant pour première PCR un couple d'amorces « universel » des eubactéries (PU1-PU2) décrit par Weisburg *et al.* en 1992. De plus, pour augmenter les quantités d'ADN déposées sur les gels, une concentration des amplifiats par évaporation sous pression réduite (2,6 kPa, 25°C) a permis d'augmenter la netteté des bandes et faciliter ainsi leur découpe.

Nous nous sommes également heurtés à de lourds problèmes de séquençages des bandes. Les séquençages effectués directement sur les bandes découpées sans purification préalable présentaient en effet des chromatogrammes avec des signaux multiples prouvant la

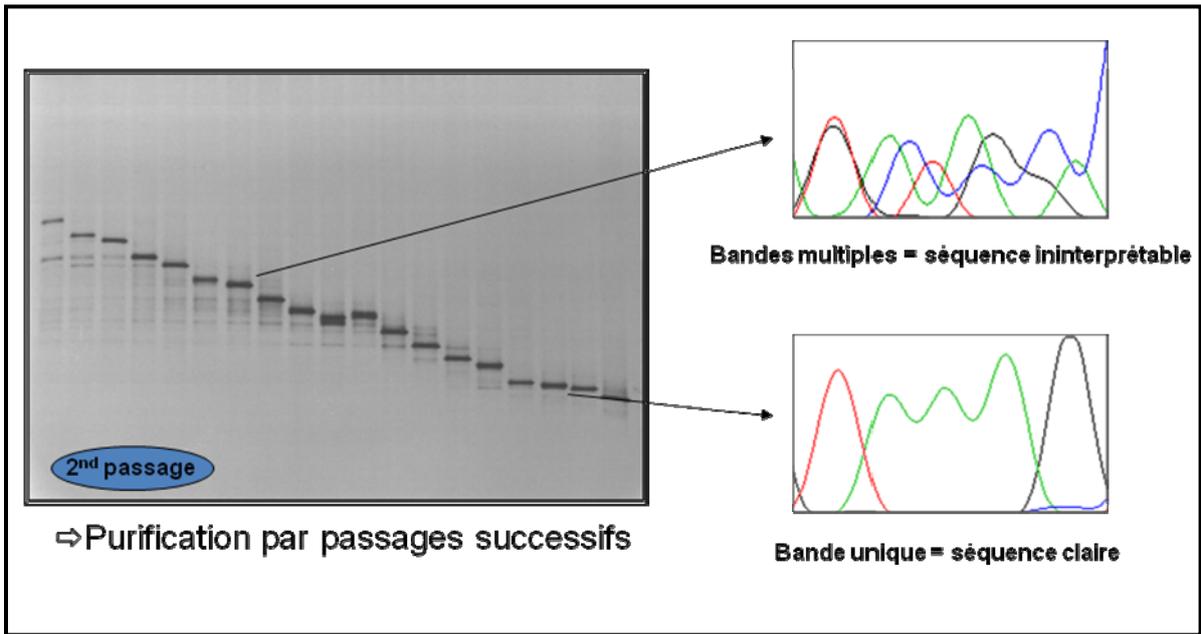


Figure II.1 : Illustration des problèmes rencontrés lors des séquençages des bandes DGGE.

présence de plusieurs séquences par bande (cf figure II .1). Pour purifier les bandes, nous avons alors entrepris des passages successifs sur gels des bandes. A ces fins, l'ADN des bandes découpées est extrait puis réamplifié afin de faire une nouvelle migration de la bande. Cette étape est renouvelée autant de fois que nécessaire pour obtenir une bande claire et supposée alors assez pure pour obtenir un séquençage présentant un chromatogramme avec un signal unique.

Enfin, - et c'est la raison d'être du second chapitre de ce manuscrit - la limite des gels à gradient dénaturant contraignant à l'utilisation de fragments PCR les plus petits possibles afin d'assurer une résolution correcte des profils migratoires entraîne inéluctablement une perte d'information par rapport à ce qu'il serait possible de faire avec la totalité de la séquence de la sémantide. Par exemple, dans le cas de l'ADNr 16S et du jeu d'amorces HDA1-HDA2, une perte de 87% de l'information totale possible de la sémantide est à déplorer, seul 199 pb de celle-ci étant amplifiées sur 1514. L'identification bactérienne qui en résulte est donc forcément tronquée et il n'est pas rare de voir des bandes de gels difficilement identifiables au niveau de l'espèce, se contentant alors de donner une information à peine suffisante pour classer la bactérie parmi un genre bactérien donné. Cette imprécision se révèle cependant toute relative par rapport à des résultats obtenus avec des techniques comme la tRFLP. Où la tRFLP donnent des identifications plus qu'hasardeuses, offrant certaines fois des résultats dans des genres différents, les gels à gradients dénaturants offrent *a contrario* des résultats certes imprécis mais cantonnés néanmoins à un genre donné. Pour parfaire les résultats d'identification, il nous a donc fallu entrevoir une nouvelle approche. Le clonage était une solution de choix et nous avons fournis deux outils afin de permettre un criblage et une sélection des clones présents dans une banque d'ADNr 16S. Ces deux outils, la CSbyDG bactérienne, outil de sélection de clones par profils DGGE et ProReg XL Tool, outil de regroupements de profils électrophorétiques, complémentaire du premier, ont été présentés en chapitre deux de ce manuscrit.

II.B. Matériel et Méthodes

II.B.1. Matériel biologique

Dès l'âge d'un jour, les oiseaux sont élevés en parcs dans une station expérimentale et leur régime est composé de blé, de maïs et de soja. Un anticoccidien (diclazuril à 1 ppm) est ajouté à la nourriture jusqu'à l'âge de 22 jours. La nourriture et l'eau étaient fournies *ad libitum*. Les animaux sont sacrifiés à l'âge de 21 et 35 jours et les échantillons de fèces digestives sont immédiatement prélevés, mélangés séparément et congelés à -20°C dans l'attente de leur utilisation future.

II.B.2. Extraction des ADN bactériens

Après leur décongélation à 4°C pendant une nuit, chaque échantillon (25 mg) est soumis à une extraction d'ADN bactérien en employant le QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, Californie, EUA), selon les instructions du fabricant. Néanmoins, afin de perfectionner la lyse bactérienne, une étape initiale est ajoutée où les échantillons sont traités pendant une heure à 37°C avec une solution tampon de Tris (0.1 mM, pH 8) contenant du lysozyme (10 mg/mL) et de la mutanolysine (10 Units/mL). L'étape finale de l'élution de la colonne, où l'ADN est récupéré, est réalisée en plaçant les colonnes à 60°C pendant 5 minutes et divisée en deux étapes : une première avec 100 µL de tampon AE et une seconde avec 50 µL. Les extraits d'ADN sont finalement vérifiés sur un gel d'agarose à 0.8 %, puis congelés à -20°C dans l'attente de leur futur usage.

II.B.3. Amplification d'ADN in vitro

Les extraits d'ADN sont soumis à une PCR « universelle » eubactérienne ciblant le gène de l'ARN 16S avec les amorces fD1=PU1 (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') et rD1=PU2 (5' – GGT TAC CTT GTT ACG ACT T - 3') décrit par Weisburg *et al.* en 1991. Les amplifications sont exécutées dans un thermocycler programmable iCycler (Bio-Rad,

Hercule, Californie, EUA). L'enzyme utilisée est la Taq polymérase de Qbiogen (Qbiogen, Irvine, Californie, EUA). Selon les recommandations du fabricant et la composition du tampon, les mix PCR sont composés de 200 nM de chaque amorce, 300 µM de chaque dNTP, 1 unité de Taq polymérase, 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 50 mM de KCl, 1.5mM de MgCl₂, 0.1 % de Triton X-100, 0.2 mg/ml de BSA et de 20 ng de l'ADN à amplifier pour un volume réactionnel final de 25 µL. Le protocole de PCR était le suivant : une première étape de dénaturation à 95°C pendant 4 minutes puis 30 cycles avec une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation à 52°C pendant 30 sec et une étape d'élongation à 72°C pendant 90 sec, et, à la finition, une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 mn. Une seconde PCR est alors réalisée sur cette première amplification (Nested). Le jeu d'amorces est alors soit « universels » des eubactéries (HDA1/HDA2 ou 63f/HDA2) soit spécifiques du genre *Lactobacillus* (LAC1/LAC2).

Tableau II.1 : Amorces utilisés dans les études présentées dans le chapitre II.

Nom	Séquence (5'-3')	Spécificité	Référence
PU1	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	universelle	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
PU2	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	universelle	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
HDA1	AC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	universelle	Walter <i>et al.</i> , 2000
HDA2	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	universelle	Walter <i>et al.</i> , 2000
63f	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	universelle	Hongoh <i>et al.</i> , 2003
LAC1	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A	<i>Lactobacillus</i>	Walter <i>et al.</i> , 2001
LAC2	ATT YCA CCG CTA CAC ATG	<i>Lactobacillus</i>	Walter <i>et al.</i> , 2001

II.B.4. DGGE

Les DGGE ont été conduites comme décrit précédemment (Muyzer *et al.*, 1993) sur un appareil D-Code (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis). Le rapport et la concentration d'acrylamide/bisacrylamide étaient respectivement 37.5: 1 et 8% en HDA1-HDA2 ou 6.5% en LAC1-LAC2. Le gradient était de 30- 55 % pour le jeu d'amorces HDA1-HDA2 ou 63f-HDA2, et de 20-60 % pour le jeu d'amorces LAC1-LAC2, avec 100 % signifiant une concentration en urée de 7 M et une concentration en formamide de 40 % (v/v). Les gels ont été coulés avec le formeur de gradient model 475 (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis). Les migrations ont été réalisées à tension constante de 130 V et à courant maximum de 75 mA par gel pendant approximativement 5 heures et 30 minutes (jusqu'à ce que le marqueur de migration de xylène cyanol atteigne le fond du gel). A la fin de la migration, les gels ont été plongés dans un bain de bromure d'éthidium à 10 mg/ml pendant vingt minutes puis ont directement été lus sur un transilluminateur à UV. Les images de gel ont été digitalisées pour de futurs traitements numériques sur ordinateur. Les bandes d'intérêt ont été découpées avec des lames de scalpel stériles et introduites séparément dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.

II.B.5. Séquençage des bandes

Dans chaque tube Eppendorf contenant une bande DGGE d'intérêt sont introduit 6 μ L d'eau milliQ stérile. Les bandes ont alors été écrasées grossièrement au cône de pipette dans cette eau. Un triple cycle de congélation/décongélation est alors réalisé pour extraire l'ADN des bandes. 1 μ L du mélange est alors utilisé comme échantillon pour réaliser une PCR avec les mêmes amorces qui ont servies à la DGGE et avec les mêmes conditions. 10 μ L de cette amplification avec 5 μ L de tampon de charge sont alors déposés sur une piste d'un nouveau gel DGGE. Si la bande d'origine est pure, le reste de la PCR est envoyé à séquencer sinon un nouveau cycle de « découpe/amplification/migration » est opéré et ce jusqu'à ce que la bande apparaisse pure et valable pour son séquençage. En moyenne, il faut compter entre 4 et 6 passages successifs pour obtenir le niveau de pureté requis pour le séquençage d'une bande. Les séquençages ont été effectués par la société Genome Express.

II.B.6. Réalisation des dendrogrammes

Les dendrogrammes illustrant les liens de parenté existant entre profils ont été réalisés à l'aide du programme Quantity One de Bio-Rad dans sa version 4.5 sur la base du modèle UPGMA.

II.B.7. Identification phylogénétique

Les séquences des bandes découpées sur gels DGGE ont été comparées à celle présentes dans la base de données RDPII. Ces comparaisons ont permis d'identifier les bactéries présentes dans l'échantillon.

II.B.8. Clonage

Lors de l'étude centrée sur la recherche de pathogène des entérites non spécifiques chez la dinde d'élevage, des ADNr 16S amplifié ont été insérés dans des vecteurs de clonage, à savoir les vecteurs pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, Californie, EUA). La ligature a été réalisée selon les instructions du fabricant. Après dessalage avec une dialyse sur microfiltre de 0.25 µm contre l'eau pure déionisée, 1 µL du résultat de ligature a été soumis à une transformation avec des cellules électrocompétentes d'*Escherichia coli* JM109 par l'intermédiaire d'un système électroporateur Pulser II (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis). Juste après la transformation, des cellules ont été incubées dans 300 µL de milieu liquide SOC à 37°C en agitation (250 t/min) pendant une heure pour exprimer la résistance antibiotique. Le criblage bleu/blanc a été effectué en deux temps : d'abord, pour chaque transformation, les 300 µL de SOC contenant les cellules transformées ont été étalées sur six boîtes de Pétri (50 mL par boîte) contenant du LB-agar avec IPTG, X-Gal et ampicilline ; deuxièmement, chaque colonie blanche a été repiquée dans une autre boîte de Petri avec les mêmes substances pour en confirmer la couleur. Puis, les colonies blanches confirmées ont été amplifiées afin de s'assurer de la présence de l'insert avec sa bonne taille. La PCR a été réalisée avec les amorces M13f (5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT - 3') et M13r (5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3') (séquences présentes dans le plasmide de clonage) suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose de 1 %. Les produits de cet amplification de PCR

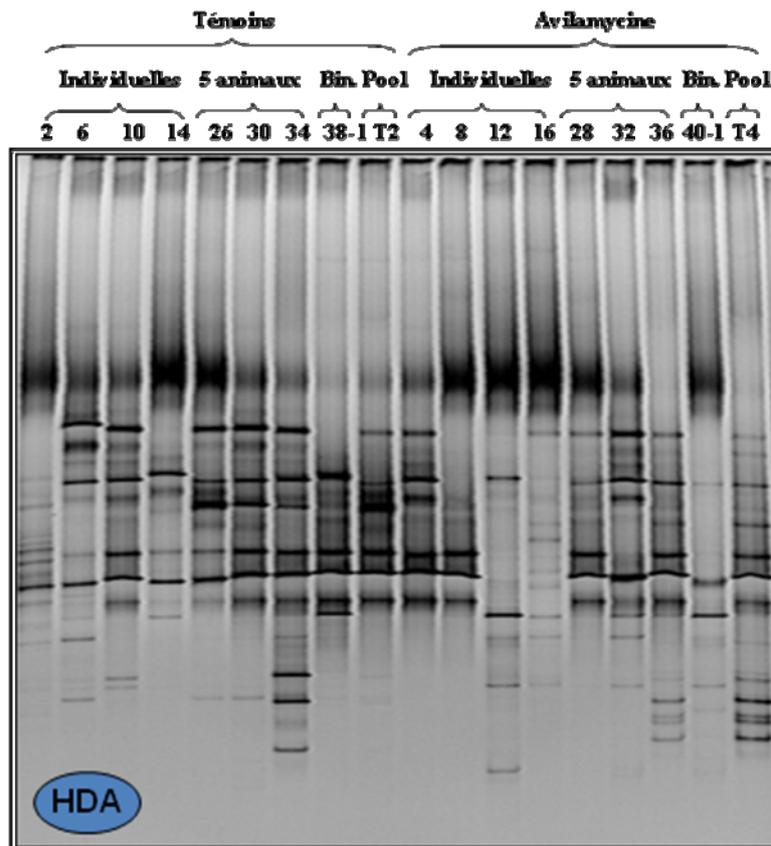


Figure II.2 : Illustration des différences inter-individuelles existantes dans les flores digestives du poulet à l'étage intestinal et de leur moyennage par pools.

Les chiffres représentent les numéros de lots d'animaux.

ont été conservés pour réaliser PCR nichée avec le couple d'amorce 63f-HDA2. Enfin cette amplification est utilisée sur gel DGGE pour rechercher la concordance avec la bande d'intérêt susceptible d'être un pathogène des entérites non spécifiques.

II.B.9. Arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique a été réalisé par Neighbor Joining et à l'aide du site de RDPII afin de classer les clones présentant la même migration que la bande suspectée d'être un pathogène dans l'étude sur la recherche d'un putatif pathogène bactérien des entérites non spécifiques chez la dinde.

II.B.10. Analyses statistiques

Bien qu'étant une technique semi-quantitative, des analyses statistiques par analyse de variance (ANOVA) ont été entreprises sur les résultats des gels DGGE. Les tests post-hoc de comparaisons multiples de Tukey et Dunnett ont été effectués avec un intervalle de confiance de 95 %.

Ces analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du programme de statistiques XL Stat 7.5.2 (AddinSoft, France).

II.C. Mode d'action des antibiotiques en alimentation animale

II.C. 1. Propos introductifs

Dans les lignes qui suivent, vont être présentés les travaux entrepris en vue de cerner et tenter de comprendre les actions des facteurs de croissance antibiotiques sur les flores digestives des animaux d'élevage et plus particulièrement sur les flores digestives du poulet d'élevage.

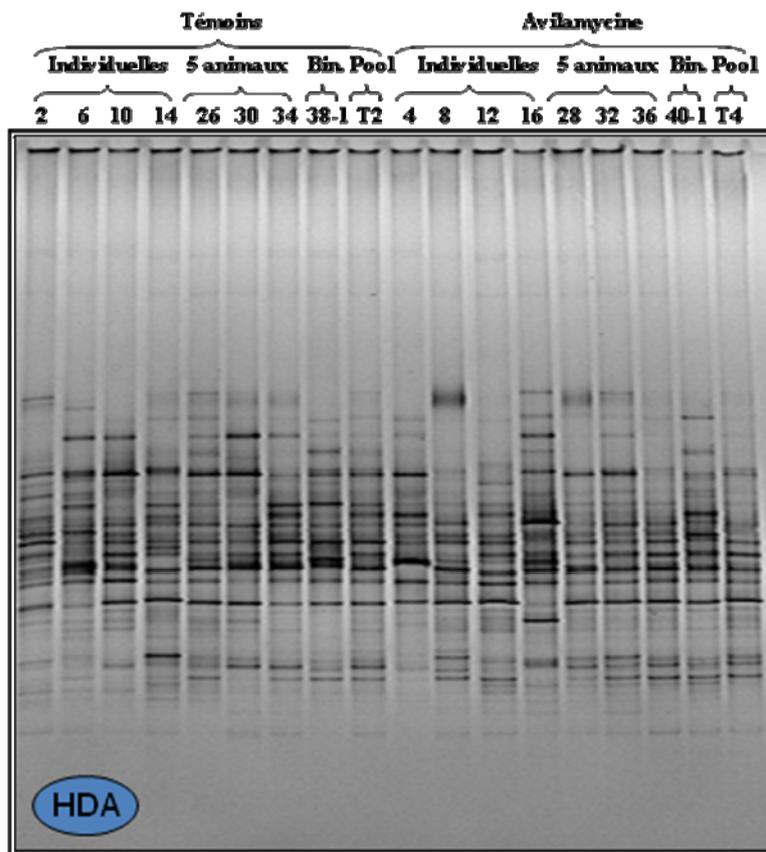


Figure II.3 : Illustration des différences inter-individuelles existantes dans les flores digestives du poulet à l'étage caecal et de leur moyennage par pools.

Les chiffres représentent les numéros de lots d'animaux.

Depuis les années 1950, des antibiotiques sont administrés à dose sous-thérapeutique aux animaux d'élevage par l'intermédiaire de leur alimentation. Outre le rôle prophylactique d'une telle administration, il existe un intérêt zootechnique à l'usage systématique des antibiotiques en alimentation animale. Ceux-ci permettent en effet un gain relatif de la masse de l'animal de 3 à 5% voire plus. L'effet semble en outre d'autant plus important que les conditions sanitaires de l'élevage sont dégradées. Aujourd'hui, le mode d'action des antibiotiques en tant que facteur de croissance reste peu connu et attribué à une modification de l'eubiosis du microbiote intestinal en faveur de l'hôte. En gros, les populations bactériennes disparaissant ou du moins diminuant sous l'effet bactéricide de l'antibiotique seraient celles rentrant en compétition trophique étroite avec leur hôte. Leur disparition entraînerait alors un surplus de nutriments disponible pour l'hôte et *in fine* un gain de sa croissance.

Malheureusement, l'utilisation systématique et donc abusive des antibiotiques en alimentation animale (et dans bon nombre d'autres domaines...) ont entraînés l'émergence de souches bactérienne multirésistantes. Ces souches représentent un problème de santé important tant humain qu'animal. Comme précisé dans le chapitre introductif de ce manuscrit, nombre de directives ont alors été entreprises par certains pays de l'Union Européenne ou de manière concertée par l'Union Européenne elle-même afin de limiter la consommation d'antibiotiques et plus récemment en janvier 2006 carrément les interdire dans le cas de l'alimentation des animaux d'élevage.

Cette interdiction de l'utilisation systématique des antibiotiques comme facteurs de croissance dans l'alimentation animale a entraîné des pertes dans les élevages dont les animaux n'avaient plus d'appui prophylactique. Il est donc indispensable aujourd'hui de connaître le mode d'action des antibiotiques et particulièrement de connaître les variations qu'ils entraînent sur les flores digestives. Cette connaissance devrait permettre à terme de mieux définir les propriétés nécessaires à de bons substitutifs des antibiotiques.

II.C.2. Précision sur le matériel biologique

Au cours de cette phase d'essais, les animaux étaient élevés en cages de cinq individus. Six cages ont été réalisées par types d'échantillons. Des pools d'échantillons

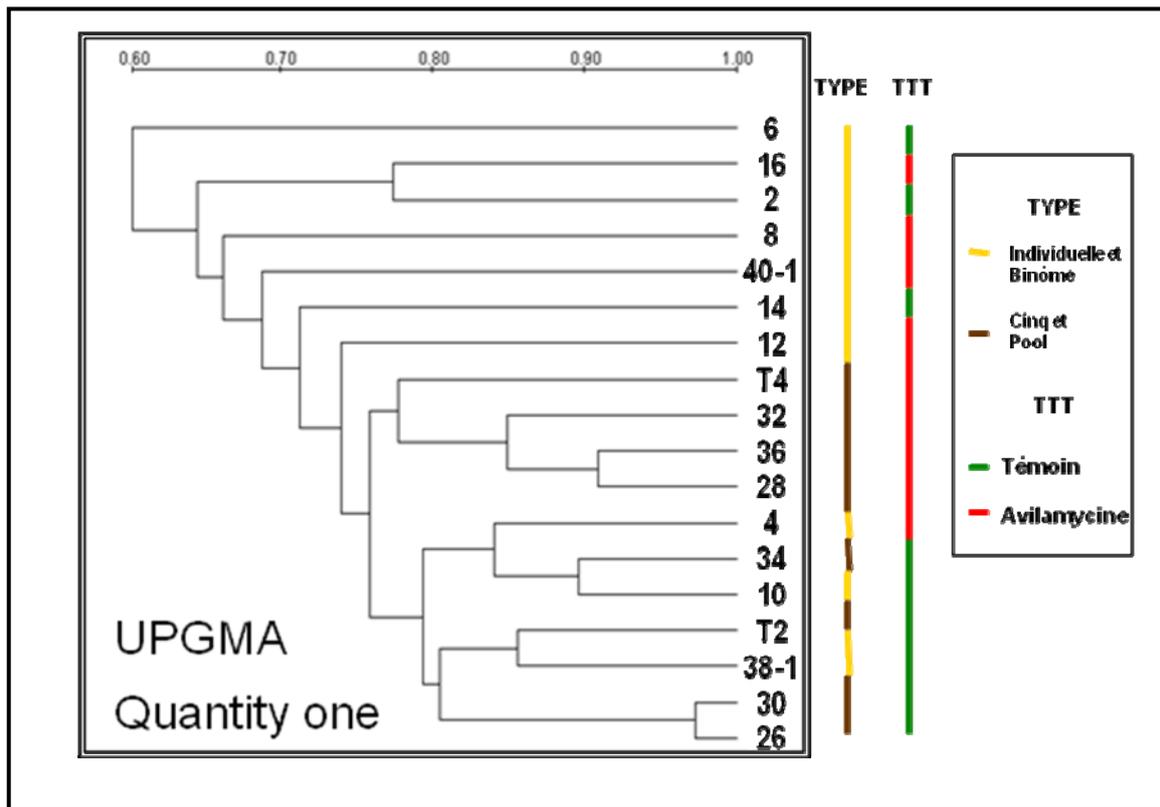


Figure II. 4 : Dendrogramme du gel DGGE présenté en figure II.2.

provenant de trente individus ont été réalisés. Les échantillons étaient constitués de fiente intestinale (FI), fiente caecale (FC), contenu intestinal (IG) et contenu caecal (CGD) et ce pour deux groupes d'animaux : témoins et traités à l'avilamycine. Les prélèvements ont été effectués à 21 et 35 jours d'âge.

II.C.3. Résultats et discussion

Ces travaux ont été les premiers initiés à la demande de l'industriel breton en alimentation animale et ont été à la base de la mise au point protocolaire des gels à gradient dénaturant au LMBA. Ils ont donc connus de nombreux essais avant d'obtenir la qualité recherchée.

Globalement ces travaux ont permis de déterminer la marche à suivre pour les futures études, notamment :

1) Ils ont permis, comme en atteste les figures II.2 et II.3, de mettre en évidence l'existence de fortes disparités des profils entre individus. Ces différences inter-individuelles, en l'absence de programme informatique d'analyses de profils, se révèlent très handicapantes pour cerner les variations réellement imputables à l'antibiotiques et non liées à l'individu. Sur les mêmes figures, on observe l'intérêt de moyenniser les profils en utilisant des pools d'échantillons où les différences inter-individuelles s'atténuent distinctement. Le dendrogramme présenté en figure II.4 – dendrogramme des résultats des comparaisons des individus et des pools à l'étage caecal – confirme les disparités des échantillons individuelles tandis que les pools sont plus facilement regroupables. Ainsi, dans la suite des études, nous emploierons uniquement des pools d'individus pour limiter l'effet des variations liés uniquement aux différences inter-individuelles.

2) Sur la figure II. 5 représentant le gel DGGE avec l'ensemble des pools de trente individus de l'étude, on observe une similarité des profils entre les fientes et les contenus correspondants, donc entre FI et IG et FC et CGD, FI présentant cependant quelques différences notables avec IG particulièrement quantitatives. Ainsi par mesures de simplification, les études suivantes seront réalisées uniquement avec des contenus intestinaux et caecaux.

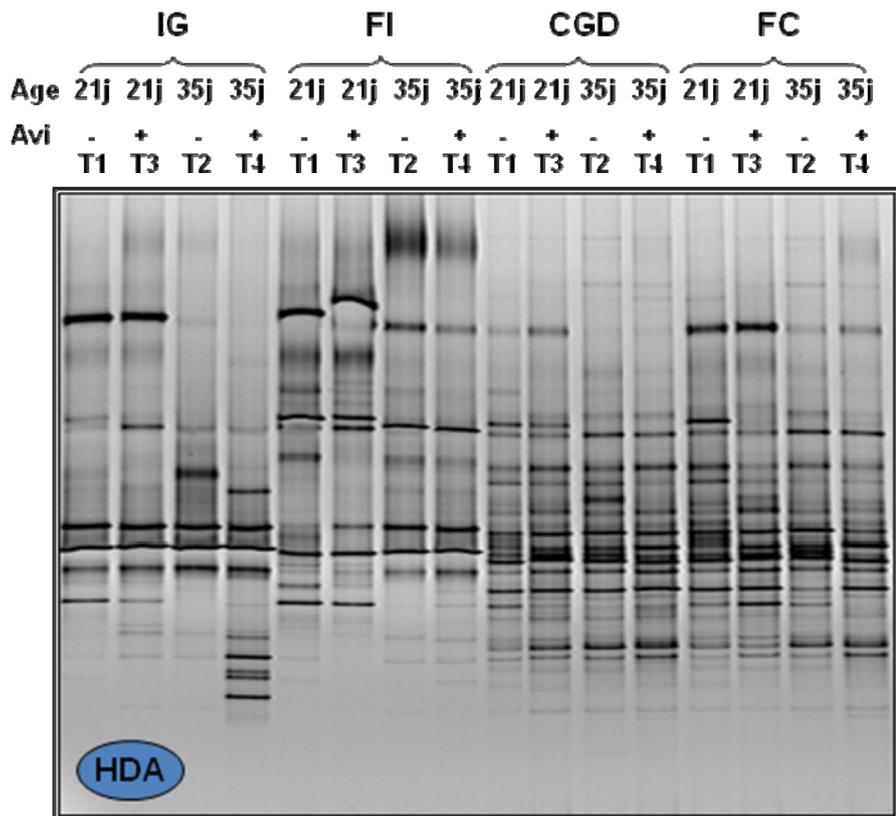


Figure II.5 : Gel DGGE eubactérien de l'ensemble des pools d'échantillons des flores digestives du poulet aux deux âges (21 et 35 jours) et traités ou non à l'avilamycine.

(IG : Intestin Grêle ; FI : Fientes Intestinales ; CGD : Caeca Gauche et Droit ; FC : Fientes Caeacales ; Avi : avilamycine)

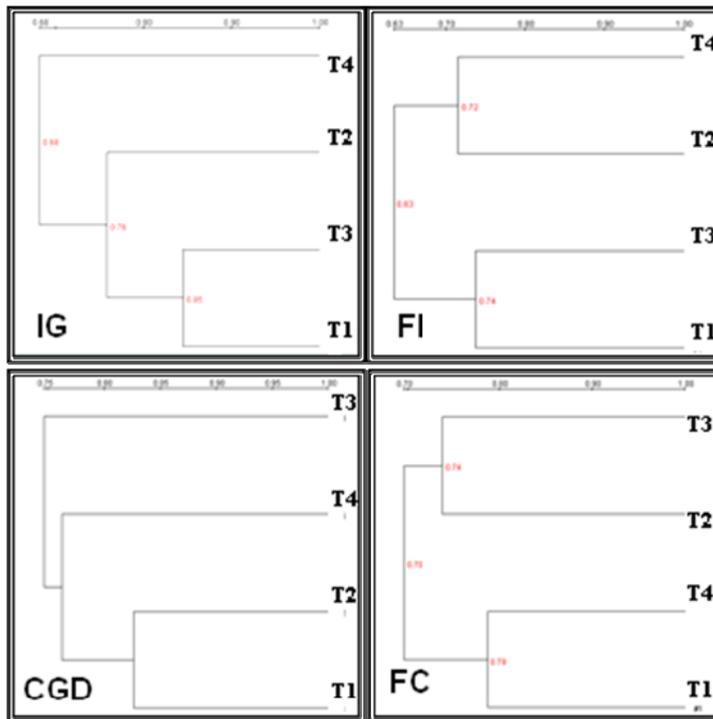


Figure II.6 : Dendrogrammes du gel DGGE présenté en figure II.5 ; les quatre dendrogrammes sont relatifs aux quatre types d'échantillons.

(IG : Intestin Grêle ; FI : Fientes Intestinales ;
 CGD : Caeca Gauche et Droit ; FC : Fientes Caecales)

3) Comme en atteste la figure II.5 ainsi que son dendrogramme en figure II.6, il existe une plus forte similarité des profils dans le même âge. Cette similarité est si forte que l'âge semble avoir un effet plus important sur les variations des flores digestives que l'avilamycine.

4) Enfin, même si elle est évidente, force est de constater que les profils entre les compartiments caecal et intestinal présentent une forte différence. Le compartiment caecal montre en outre une flore beaucoup plus complexe (cf figure II.5).

II.D. Action de substances non-antibiotiques sur les flores digestives du poulet

II.D.1. Propos introductifs

Comme précisé dans l'introduction de ce chapitre, l'arrivée de l'interdiction de l'usage des antibiotiques en alimentation animale exercée en janvier 2006 par l'Union Européenne a engendré de lourdes pertes dans le milieu des volailles notamment. La recherche de potentiels substitutifs aux antibiotiques est donc aujourd'hui indispensable à un maintien des taux de production qui existaient jusqu'alors en présence d'antibiotiques en tant que facteurs de croissance.

Nombre de substances non antibiotiques sont connues de longues dates pour leur capacité à faire varier l'équilibre bactérien des flores digestives. En introduction du présent manuscrit, le lecteur aura pu s'informer des actions en le domaine des huiles essentielles ou des prébiotiques.

Le but des travaux décrits dans ce paragraphe est de déterminer le spectre d'action de diverses suppléments alimentaires sur les flores digestives du poulet. Ces suppléments sont des huiles essentielles, des extraits de plantes mais également un prébiotique, le scFOS.

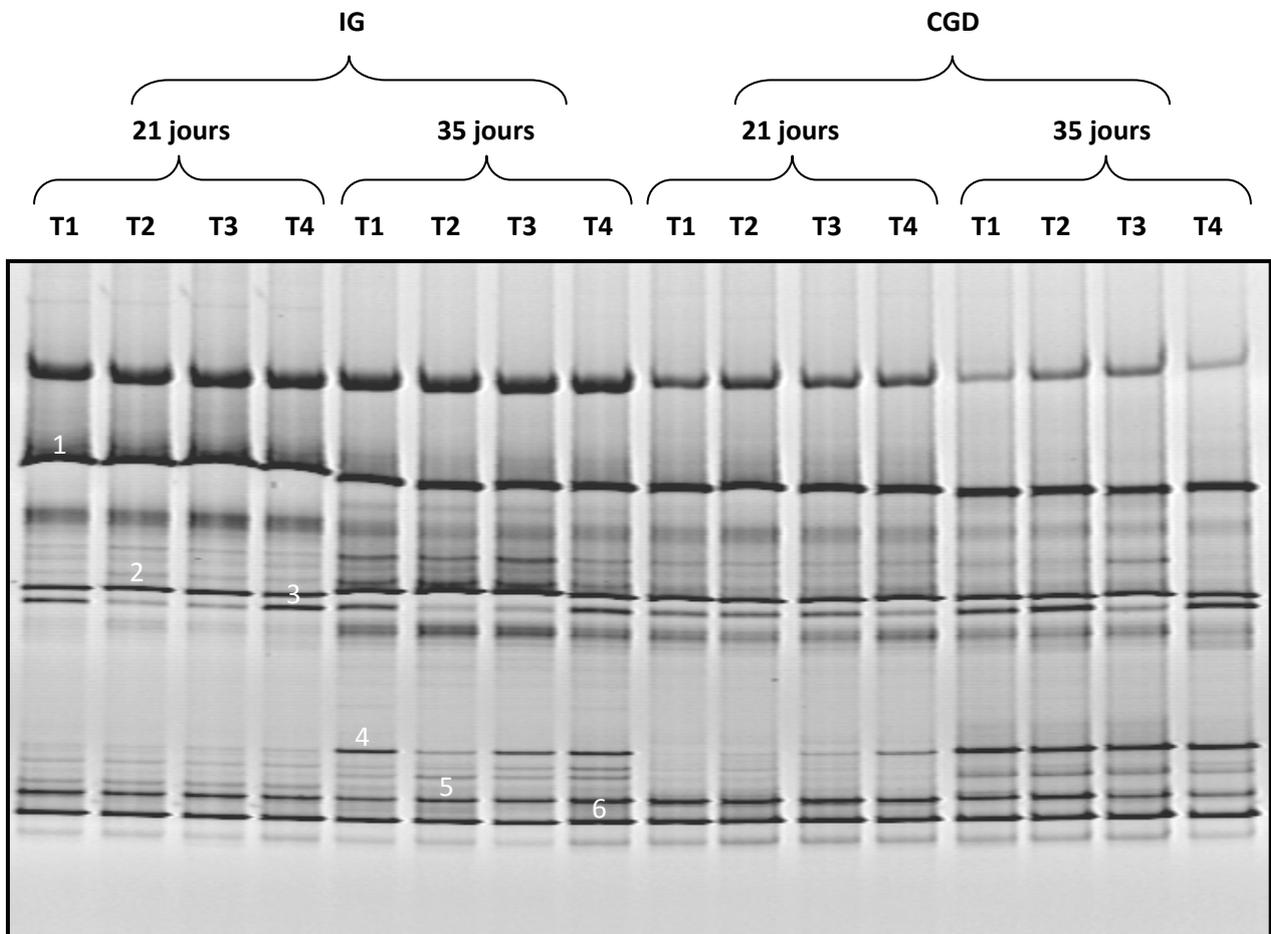


Figure II.7 : Profils DGGE des amplifiats lacto-spécifiques avec les quatre traitements (T1, T2, T3 et T4), sur les deux segments digestifs (IG et CGD) et aux deux âges (21 et 35 jours).

(IG : Intestin Grêle ; FI : Fientes Intestinales ; CGD : Caeca Gauche et Droit)

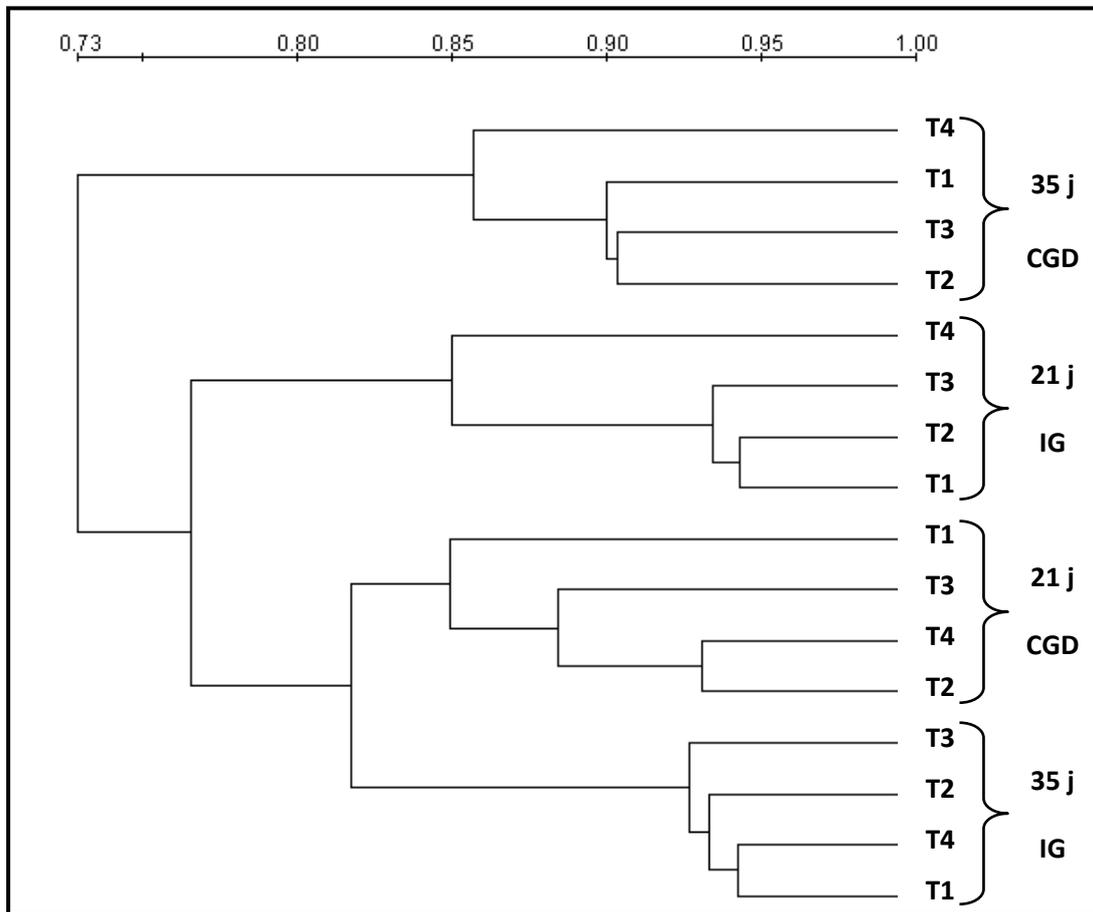


Figure II.8 : Dendrogramme du gel DGGE des amplifiats lacto-spécifiques, réalisé sur le programme Quantity One de Biorad avec la matrice UPGMA.

(IG : Intestin Grêle ; FI : Fientes Intestinales ; CGD : Caeca Gauche et Droit)

Tableau II.2 : Résultats des identifications des lactobacilles obtenus après croisement des données des séquençages avec la base de données d'ARN16S de RDPII.

Type	Match sous RDPII				Conclusion	
	Espèce	Souche-Type	Identité	Score	Genre	Espèce
1 306nt	<i>Lb. gasseri</i>	M58820	0,993/301	0,966	<i>Lactobacillus</i>	<i>gasseri</i>
	<i>Lb. johnsonii</i>	ATCC 33200	0,990/301	0,955		
2 306nt	<i>Lb. crispatus</i>	DSM 20584 T	0,996/301	0,980	<i>Lactobacillus</i>	<i>crispatus</i>
	<i>Lb. acidophilus</i>	M58802	0,993/301	0,962		
	<i>Lb. gallinarum</i>	ATCC 33199	0,990/302	0,949		
	<i>Lb. hamsteri</i>	DSM 5661 T	0,990/301	0,939		
	<i>Lb. amylolyticus</i>	DSM 1664 T	0,983/301	0,915		
3 303nt	<i>Lb. salivarius subsp. salivarius</i>	ATCC 11741	1,000/301	0,997	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	M59054	0,993/301	0,956		
4 299nt	<i>Lb. oris</i>	DSM 4864 T	0,993/298	0,966	<i>Lactobacillus</i>	<i>oris</i>
5 284nt	<i>Lb. reuteri</i>	DSM 20016 T	0,989/283	0,945	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>
	<i>Lb. frumentis</i>	TMW 1.666	0,982/283	0,924		
	<i>Lb. oris</i>	DSM 4864 T	0,982/283	0,909		
6 243nt	<i>Lb. reuteri</i>	DSM 20016 T	0,987/243	0,937	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>
	<i>Lb. frumentis</i>	TMW 1.666	0,983/243	0,933		
	<i>Lb. oris</i>	DSM 4864 T	0,983/283	0,920		
	<i>Lb. panis</i>	DSM 6035T	0,983/283	0,908		

II.D.2. Précisions sur les substances non antibiotiques testées

Quatre traitements sont à l'étude.

Le traitement T1 représente le traitement de référence de l'étude et est constitué de blé, de maïs, et de graines de soja. Les traitements T2, T3 et T4 disposent de la même base mais sont additionnés de suppléments alimentaires susceptibles d'être des substitutifs aux antibiotiques. Le traitement T2 est additionné d'huiles essentielles de plantes CRINA HC 735 (Crina SA, Switzerland), le traitement T3 de FructoOligoSaccharides à chaîne simple scFOS Profeed (Beghin Meiji, France) et le traitement T4 d'huiles essentielles et d'extraits de plantes (Phytosynthèse, France). Trente animaux de chaque parc sont sacrifiés à l'âge de 21 et 35 jours et leurs contenus iléal et caecal sont immédiatement collectés, mélangés en quantité égale puis congelés à - 20 °C. Un pool d'échantillon est ainsi constitué pour les quatre traitements, aux deux âges de prélèvements (21 et 35 jours) et avec les deux contenus intestinaux (iléal et caecal) ; un total de seize pools est donc défini.

II.D.3. Résultats et discussion

II.D.3.a. Amorçage lactobacille

Les amorces LAC1-LAC2 (Walter *et al.*, 2001) ont été définies de manière à amplifier spécifiquement les bactéries du genre *Lactobacillus*. Ce genre est connu pour être très représenté dans les flores intestinales et présente donc une cible de choix pour cette étude.

Le gel relatif aux pools IG et CGD à 21 et 35 jours d'âge des trois traitements (T2, T3, T4) et du témoin (T1) est présenté en figure II.7. Un dendrogramme a été réalisé sur ce dernier gel et est présenté en figure II.8. Enfin les résultats des séquençages des bandes sont présentés dans le tableau II.2.

Sur le dendrogramme, les compartiments (IG et CGD) aux différents âges (21 et 35 jours) se regroupent parfaitement, montrant une prévalence de l'effet de l'âge et du compartiment par rapport aux effets des traitements.

Globalement, la principale action des traitements observée sur la flore lactique est centrée sur une baisse du taux de *Lb. salivarius*. Pour le traitement T2 cette baisse est limitée

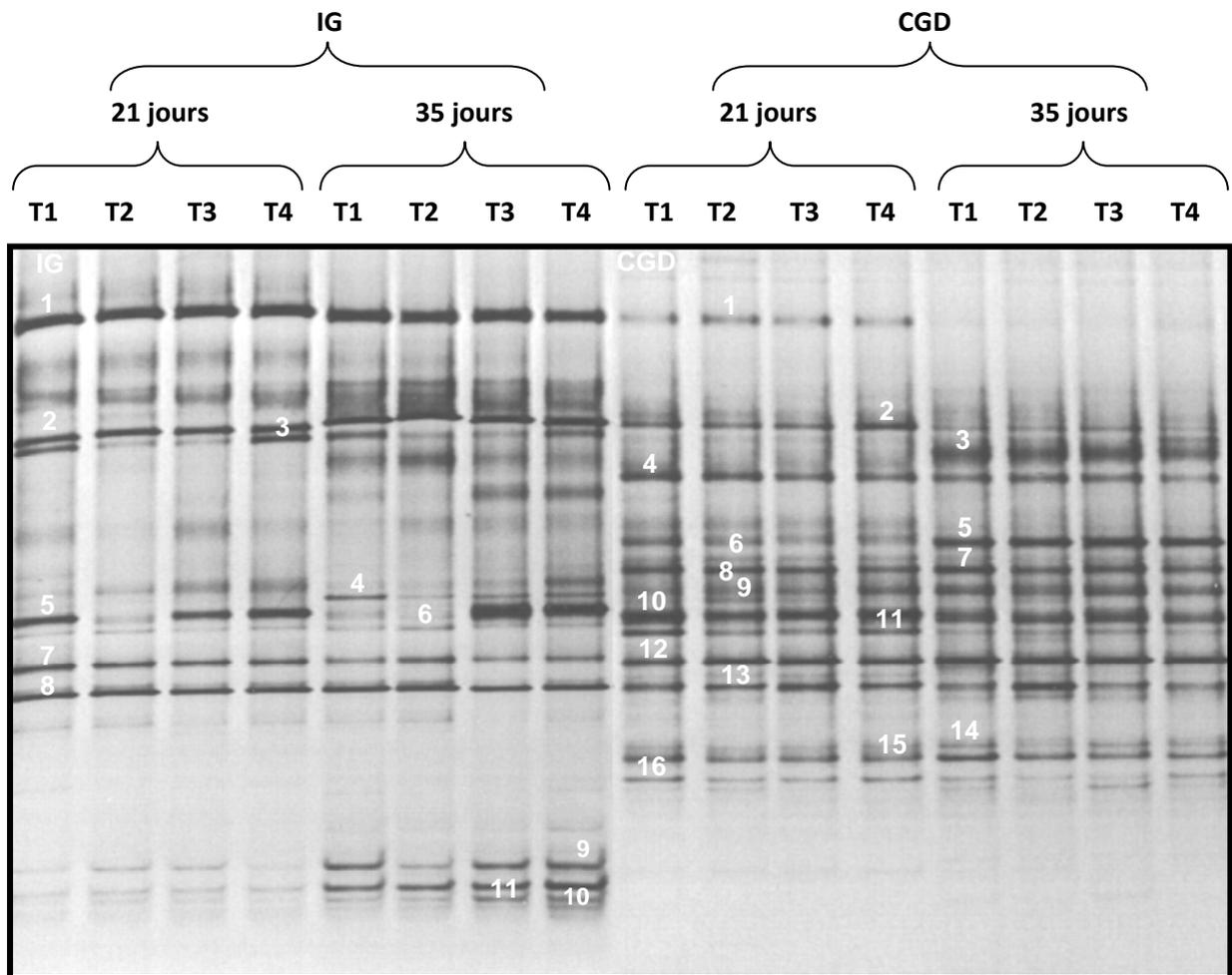


Figure II.9 : Profils DGGE des amplifiats des eubactéries avec les Témoins (T1) et les trois traitements (T2, T3 et T4), sur les deux segments digestifs (IG et CGD) et aux deux âges (21 et 35 jours). Les bandes d'intérêt sont indiquées par leur numéro.

(IG : Intestin Grêle ; FI : Fientes Intestinales ; CGD : Caeca Gauche et Droit)

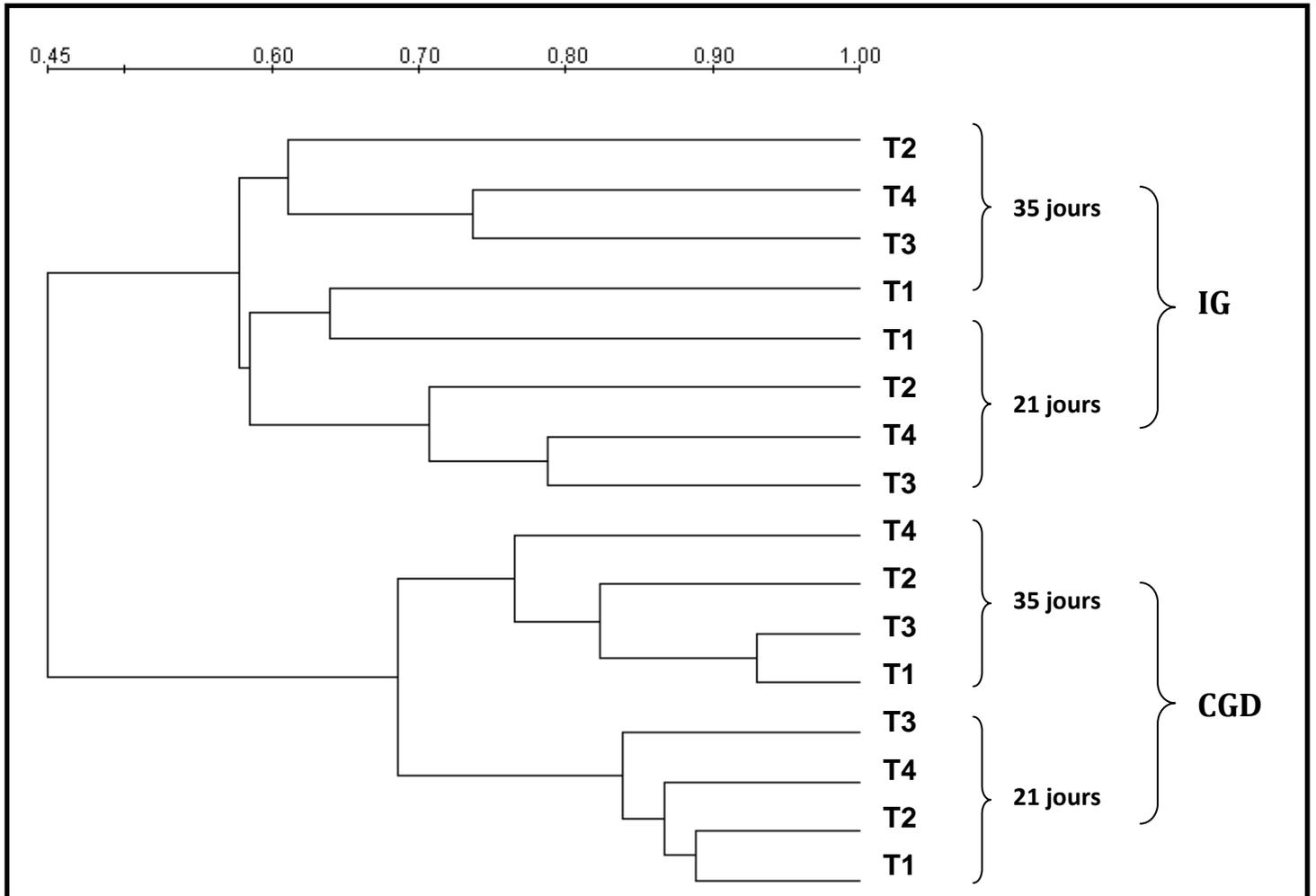


Figure II.10 : Dendrogramme du gel DGGE des amplifiats eubactéries réalisé sur le programme Quantity One de Biorad avec la matrice UPGMA.

(IG : Intestin Grêle ; FI : Fientes Intestinales ; CGD : Caeca Gauche et Droit)

Tableau II.3 : Résultats des identifications bactériennes des IG obtenus après croisement des données des séquençages avec la base de données d'ARN16S de RDPII.

Type	Match sous RDPII				Conclusion	
	Espèce	Souche-Type	Identité	Score	Genre	Espèce
1	<i>Lb. johnsonii</i>	ATCC 33200	1,000	1,000	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>
	<i>Lb. gasseri</i>	M58820	1,000	1,000		<i>gasseri</i>
2	<i>Lb. fornicalis</i>	TV1018	1,000	1,000	<i>Lactobacillus</i>	<i>sp.</i>
	<i>Lb. amylolyticus</i>	DSM 1664 T	1,000	1,000		
	<i>Lb. crispatus</i>	DSM 20584 T	1,000	1,000		
	<i>Lb. psitacci</i>	AJ272391	1,000	1,000		
	<i>Lb. hamsteri</i>	DSM 5661 T	1,000	1,000		
	<i>Lb. jensenii</i>	ATCC 25258	1,000	1,000		
	<i>Lb. acidophilus</i>	M58802	1,000	1,000		
3	<i>Lb. salivarius subsp. salivarius</i>	ATCC 11741	1,000	1,000	<i>Lactobacillus</i>	<i>salivarius</i>
4	<i>Lb. oris</i>	DSM 4864 T	1,000	1,000	<i>Lactobacillus</i>	<i>oris</i>
5	<i>E. coli</i>	ATCC 11775 T	1,000	1,000	<i>Escherichia</i> <i>Shigella</i>	<i>sp.</i>
	<i>E. vulneris</i>	ATCC 33821 T	1,000	1,000		<i>sp.</i>
	<i>E. albertii</i>	LMG 20976	1,000	1,000		
	<i>Shigella vulneris</i>	X96963	1,000	1,000		
	<i>Shigella dysenteriae</i>	X96966	1,000	1,000		
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ATCC 27768	0,940	0,726	<i>Faecalibacterium</i>	<i>prausnitzii</i>
7	<i>Clostridium kluyveri</i>	M59092	0,916	0,730	<i>Clostridium</i> <i>Bacillus</i>	<i>sp.</i>
	<i>Clostridium tertium</i>	ATCC 14573	0,907	0,676		<i>sp.</i>
	<i>Clostridium tertium</i>	DSM 2485	0,907	0,676		
	<i>Bacillusadius</i>	ATCC 14574	0,900	0,730		
8	<i>Lb. reuteri</i>	DSM 20016 T	0,986	0,906	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>
	<i>Lb. frumenti</i>	TMW 1.666	0,979	0,906		
	<i>Lb. oris</i>	DSM 4864 T	0,979	0,878		
	<i>Lb. mucosae</i>	CCVG 43179	0,979	0,885		
		DSM 13345				
9	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	CIP 101283	0,955	0,879	<i>Corynebacterium</i>	<i>sp.</i>
	<i>Corynebacterium flavescens</i>	NCDO 1320	0,924	0,806		
	<i>Corynebacterium mastitidis</i>	CECT 4843	0,961	0,742		
	<i>Corynebacterium macginleyi</i>	ATCC 104099 T CDC JCL2	0,923	0,774		
10	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	CIP 101283	0,943	0,881	<i>Corynebacterium</i>	<i>sp.</i>
	<i>Corynebacterium flavescens</i>	NCDO 1320	0,921	0,833		
	<i>Corynebacterium mastitidis</i>	CECT 4843	0,963	0,833		
11	<i>Brachybacterium faecium</i>	DSM 4810	1,0	1,0	<i>Brachybacterium</i>	<i>faecium</i>

Tableau II.4 : Résultats des identifications bactériennes des CGD obtenus après croisement des données des séquençages avec la base de données d'ARN16S de RDP II.

Type	Match				Conclusion	
	Espèce	Souche-Type	Identité	Score	Genre	Espèce
1	<i>Lb. johnsonii</i>	ATCC 33200	1,000	1,000	<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>
	<i>Lb. gasseri</i>	M58820	1,000	1,000		<i>gasseri</i>
2	<i>Lb. fornicalis</i>	TV1018	1,000	1,000	<i>Lactobacillus</i>	sp.
	<i>Lb. amyolyticus</i>	DSM 1664 T	1,000	1,000		
	<i>Lb. crispatus</i>	DSM 20584 T	1,000	1,000		
	<i>Lb. psitacci</i>	AJ272391	1,000	1,000		
	<i>Lb. hamsteri</i>	DSM 5661 T	1,000	1,000		
	<i>Lb. jensenii</i>	ATCC 25258	1,000	1,000		
	<i>Lb. acidophilus</i>	M58802	1,000	1,000		
3	<i>Rikenella microfusus</i>	ATCC 29728	0,952	0,758	<i>Rikenella</i>	<i>microfusus</i>
4	<i>Alistipes putredinis (Bacteroides)</i>	ATCC 29800	0,966	0,799	<i>Bacteroides</i>	<i>Alistipes putredinis</i>
	<i>Rikenella microfusus</i>	ATCC 29728	0,894	0,694		
5	<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340	1,000	1,000	<i>Ruminococcus</i>	sp.
	<i>Ruminococcus shinkii</i>	CIP 105464	1,000	1,000		
	<i>Ruminococcus luti</i>	DSM 10518 bln9	1,000	1,000		
6	<i>Ruminococcus productus</i>	ATCC 27340	0,992	0,941	<i>Ruminococcus</i>	sp.
	<i>Ruminococcus hydrogenotrophicus</i>	S5a36	0,983	0,941		
	<i>Ruminococcus shinkii</i>	CIP 105464	0,992	0,941		
	<i>Ruminococcus luti</i>	DSM 10518 bln9	0,992	0,941		
7	<i>Clostridium celerecens</i>	DSM 5628	0,971	0,919	<i>Clostridium</i>	sp.
	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	DSM 2544	0,971	0,919		
	<i>Clostridium xylanolyticum</i>	ATCC 4963	0,971	0,919		
	<i>Clostridium populeti</i>	ATCC 35295	0,971	0,919		
	<i>Clostridium aerotolerans</i>	DSM 5434	0,971	0,919		
	<i>Clostridium xylanolyticum</i>	DSM 6555	0,971	0,919		
	<i>Clostridium symbiosum</i>	M59112	0,971	0,919		
	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i>	DSM 4024	0,971	0,919		
	<i>Clostridium proteoclasticum</i>	B 316 T	0,901	0,939		
	<i>Anaerostipes caccae</i>	L1-92	0,971	0,929		
8	<i>Clostridium hylemonae (Dorea)</i>	TN-272	0,983	0,920	<i>Clostridium</i>	sp.
	<i>Dorea longicatena</i>	III-35	0,991	0,929		
	<i>Clostridium scindens</i>	DSM 5676	0,983	0,920		
	<i>Clostridium scindens</i>	ATCC 35704	0,983	0,920		
	<i>Clostridium oroticum</i>	M59109	0,991	0,929		
9	<i>Clostridium celerecens</i>	DSM 5628	0,990	1,000	<i>Ruminococcus</i>	<i>lactaris</i>
	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	DSM 2544	0,990	1,000		
	<i>Clostridium xylanolyticum</i>	ATCC 4963	0,990	1,000		
	<i>Clostridium populeti</i>	ATCC 35295	0,990	1,000		
	<i>Clostridium aerotolerans</i>	DSM 5434	0,990	1,000		
	<i>Clostridium xylanolyticum</i>	DSM 6555	0,990	1,000		
	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i>	DSM 4024	0,990	1,000		
	<i>Clostridium hatheway</i>	DSM 13479	0,990	1,000		
		CCUG43506				
	<i>Ruminococcus lactaris</i>	ATCC 29176	1,000	1,000		

10	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ATCC 27768	0,959	0,814	<i>Faecalibacterium</i>	<i>prausnitzii</i>
11	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ATCC 27768	0,959	0,814	<i>Faecalibacterium</i>	<i>prausnitzii</i>
12	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	ATCC 27768	0,907	0,760	<i>Faecalibacterium</i>	<i>prausnitzii</i>
13	<i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. frumenti</i> <i>Lb. oris</i> <i>Lb. mucosae</i>	DSM 20016 T TMW 1.666 DSM 4864 T CCVG 43179 DSM 13345	0,986 0,979 0,979 0,979	0,906 0,906 0,878 0,885	<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>
14	<i>Clostridium kluyveri</i> <i>Clostridium aldrichii</i> (<i>Acetovibrio</i>) <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> <i>Ruminococcus callidus</i> <i>Ruminococcus flavefaciens</i>	M59092 DSM 6159 L35515 L35516 ATCC 27760 ATCC 19208	0,881 0,881 0,881 0,881 0,881 0,881	0,674 0,674 0,674 0,674 0,674 0,674	<i>Clostridium</i> <i>Acetovibrio</i> <i>Ruminococcus</i>	<i>sp.</i> <i>sp.</i> <i>sp.</i>
15	<i>Clostridium sporophoroides</i>	M59116	0,932	0,691	<i>Clostridium</i>	<i>sporophoroides</i>
16	<i>Clostridium orbiscindens</i>	DSM 6740	0,911	0,754	<i>Clostridium</i>	<i>orbiscindens</i>

au compartiment intestinal à tous les âges. Pour le traitement T3, l'action est plus profonde et observable dans l'intestin grêle à tous les âges et aux caeca à 35 jours d'âge. Enfin, pour le traitement T4, une légère augmentation est observable pour *Lb. salivarius* en IG 21 jours tandis qu'une légère baisse est observable à 21 jours d'âge au niveau des caeca uniquement.

Pour conclure, il semble que, sur la flore lactique, les traitements T2 et T3 aient une action similaire à savoir plutôt une baisse de *Lb. salivarius* observable à des échelles temporelle et spatiale différentes selon le traitement considéré. Il est clair que le traitement T3 présente l'action la plus large temporellement et spatialement parlant tandis que le traitement T2 et T4 se limitent à une action en IG à tous les âges pour le traitement T2 et en CGD à 35 jours d'âge seulement pour le traitement T4. Pour ces deux derniers traitements, l'importance de la zone d'action sur les performances zootechniques devra être définie pour déterminer le traitement le plus adéquat.

L'analyse statistique par ANOVA, effectué sur l'ensemble des échantillons du gel DGGE des amplifiats « lactobacilles », n'a révélé aucune différence significative entre les différents traitements.

II.D.3.b. Amorçage eubactérien

Les amorces HDA1-HDA2 (Walter *et al.*, 1999) permettent d'amplifier de manière aspécifique l'ensemble des eubactéries ; elles sont dites universelles des eubactéries. Elles permettent ainsi une exploration de la flore majoritaire du tractus intestinal.

Le gel relatif aux pools IG et CGD à 21 et 35 jours d'âge des trois traitements (T2, T3, T4) et du témoin (T1) est présenté en figure II.9. Un dendrogramme a été réalisé sur ce dernier gel et est présenté en figure II.10. Enfin les résultats des séquençages des bandes sont présentés dans le tableau II.3 pour les échantillons intestinaux et dans le tableau II.4 pour les échantillons caeaux.

Au niveau de l'intestin grêle, ce sont les bandes 3 (*Lb. salivarius*) et 5 (*Shigella sp. ou Escherichia sp.*) qui offrent le plus de variabilités lors de l'action des différents traitements. Ainsi, avec le traitement T2, toutes les deux se voient diminuer en IG à 21 jours d'âge et *Lb. salivarius* à 35 jours d'âge. Avec, le traitement T3, *Lb. salivarius* baisse en IG à 21 et 35 jours d'âge et le groupe *Shigella/Escherichia* augmente en IG à 35 jours d'âge. Enfin, avec le

traitement T4, ce même groupe augmente en IG à 35 jours d'âge. Bien que moins nettes, des différences spécifiques des CGD existent également. Ainsi, pour les traitements T2 et T3, la bande 11 (*F. prausnitzii*) baisse à 21 jours puis augmente à 35 jours. La bande 13 (*Lb. reuteri*), quant à elle, subit un important accroissement à 35 jours avec le traitement 2 et, bien que plus modéré, également à 21 jours avec le traitement 3.

Globalement, sur cette identification universelle des eubactéries, le traitement T2 est le traitement qui offre le plus grand spectre d'action avec près de 5 bactéries modulées (*Lb. salivarius* (bande 3), *Lb. oris* (bande 4) et *Escherichia/Shigella* (bande 5) en IG, et *F. prausnitzii* (bande 11) et *Lb. reuteri* (bande 13) en CGD), viennent ensuite le traitement T3 avec 3 bactéries modulées (bandes 3, 5 des IG et 13 des CGD) puis dernier, le traitement T4 avec seulement deux bactéries modulées (*Lb. oris* en IG et *Lb. salivarius* en CGD). Le tout est à présent de connaître le rôle respectif de chacune de ces bactéries afin de déterminer l'équilibre le plus favorable à de bonnes performances zootechniques.

L'analyse statistique par ANOVA a été réalisée sur le gel DGGE des amplifiats « eubactériens » en deux temps : un pour l'étage intestinal (IG) et un pour l'étage caecal (CGD).

A l'étage iléal, seules les bandes 4 et 5 offrent une différence significative sur le test post-hoc de comparaisons multiples de Tukey entre les traitements T2 et T4.

A l'étage caecal, le test de comparaisons multiples de Dunnett donne des différences significatives pour les bandes 13 et 14, pour la bande 13 uniquement entre le traitement témoin T1 et le traitement T2 et pour la bande 14 entre le traitement témoin T1 et l'ensemble des traitements T2, T3 et T4. Le test de comparaisons multiples de Tukey, à quand à lui, offre une différence significative pour la bande 14 entre le traitement témoin T1 et le traitement T4.

II.E. Recherche d'un pathogène digestif putatif de la dinde

II.E.1. Propos introductifs

Variante de la simple malnutrition, accompagnée d'une faible prise en poids, à d'importantes pertes liquidiennes pouvant entraîner la mort de l'animal, les symptômes des

troubles digestifs observés en élevages intensifs sont toujours associés à une importante baisse de la productivité et toutes les mesures de lutte doivent être prises dès les premiers signes décelables.

L'étiologie des troubles digestifs est diverse et rendue difficile par des symptômes toujours univoques (diarrhées, perte de poids, manque d'appétit, ...). L'origine infectieuse est souvent privilégiée bien que des origines génétiques comme celles de prédispositions aux stress ne soient pas rares. L'agent infectieux peut être d'origine variée (parasite, virus, bactérie ou champignon) mais la piste bactérienne est généralement incriminée. Deux grands types de pathogènes digestifs bactériens peuvent alors être rencontrés : les bactéries invasives des entérocytes ou sécrétrices d'exotoxines dont les plus courantes sont les *Shigella*, les *Campylobacter*, les salmonelles et certaines souches de *Yersinia*, et puis les bactéries sécrétrices d'exotoxines dont les plus fréquentes sont certains staphylocoques, les *Escherichia coli* entéropathogènes ou encore certains *Clostridium* dont le fameux *Clostridium perfringens*. Dans tous les cas un profond déséquilibre de la flore intestinale est observé en faveur du pathogène facilitant généralement son identification. Cependant, comme dans toutes études environnementales, bien que fortement présent, la culture du pathogène peut être fastidieuse, difficile voir impossible. Les techniques de métagénomique permettent alors de contourner ce problème car ne requérant aucune étape de culture bactériologique classique.

Les travaux qui suivent entrent dans le cadre de la recherche de l'agent étiologique des entérites non spécifiques de la dinde, entérites de plus en plus fréquentes dans les élevages français. L'étude est basée sur l'identification moléculaire des bactéries à l'aide de l'ADNr 16S, de la technique électrophorétique de DGGE et du clonage bactérien.

II.E.2. Précision sur le matériel et méthodes

Les animaux utilisés dans cette étude sont originaires de divers élevages de la région Bretagne. Certains souffrent d'entérites non-spécifiques et d'autres, considérés comme témoins, ne souffrent d'aucun trouble digestif. Des « pools » sont alors réalisés. Les échantillons étaient de deux types : contenu intestinal et contenu caecal.

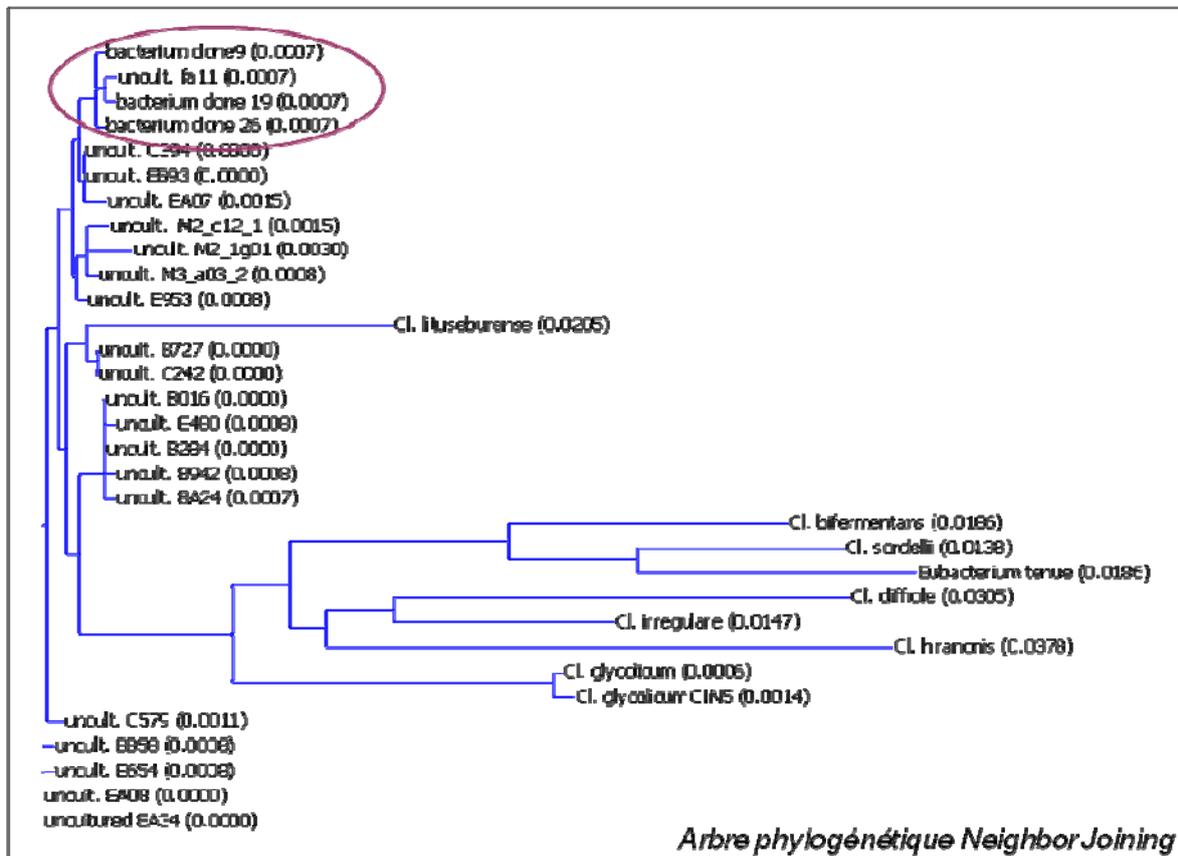


Figure II.11 : Arbre phylogénétique illustrant les liens de parenté entre les clones identifiés comme étant originaire de la bactérie incriminée dans les entérites non spécifiques de la dinde et les bactéries types et incultivés les plus proches.

L'identification s'est déroulée en plusieurs étapes. Premièrement, des gels DGGE sont réalisés sur les différents « pools » d'échantillons. Puis, en parallèle, un clonage de l'ensemble du gène de l'ADNr 16S est effectué. Les clones sont alors criblés par réamplification de leur insert avec le couple d'amorces DGGE et mis à migrer pour les confondre avec la bande incriminée être le possible pathogène.

Pour confirmer les observations quantitatives faites en DGGE sur la bactérie pathogène putative, des PCR semi-quantitatives ont été effectuées. A ces fins, un couple d'amorce spécifique de la séquence complète de l'ADNr 16S de la bactérie incriminée a été dessiné. Des dilutions décimales des ADN bactériens des pools de dindes saines et de dindes malades sont réalisées et des amplifications semi-quantitatives spécifiques de la bactérie incriminée sont alors entreprises sur ces dilutions.

II.E.3. Résultat et discussion

Les premiers gels DGGE avec le jeu d'amorces HDA1-HDA2 ont montré l'existence d'une bactérie relativement abondante dans les « pools » d'échantillons de dindes malades (données non présentées). Cette bactérie semblait relever du genre *Clostridium* sans plus de précision. Afin de parfaire son identification, nous avons décidé de reprendre les gels DGGE mais cette fois avec le jeu d'amorces 63f-HDA2. L'amorce 63f est connue pour privilégier le genre *Clostridium* et devait donc permettre une meilleure approche de la bactérie incriminée en offrant en outre un fragment plus important contenant donc plus d'information pour l'identification. Ce gel réalisé, une bande toujours abondante chez les dindes malades présentait une phylogénie avec *Clostridium lituseburensense* (données non montrées).

Afin de préciser les différences quantitatives de la bactérie incriminée existants entre des pools de dindes malades et de dindes saines et de fait alourdir l'implication de celle-ci dans la maladie, une approche par PCR semi-quantitative a été entreprise. A ces fins, la recherche d'amorces spécifiques de la bactérie en question était nécessaire et nous avons donc entrepris un clonage des gènes de l'ADNr 16S contenu dans un échantillon de pools de dindes malades. Les clones, criblés par migration DGGE, ont permis l'extraction complète de la séquence de l'ADNr 16S de la bactérie incriminée. De cette séquence, nous avons pu créer un jeu d'amorces spécifiques et dessiner l'arbre phylogénétique de la figure II.11. Sur ce dernier

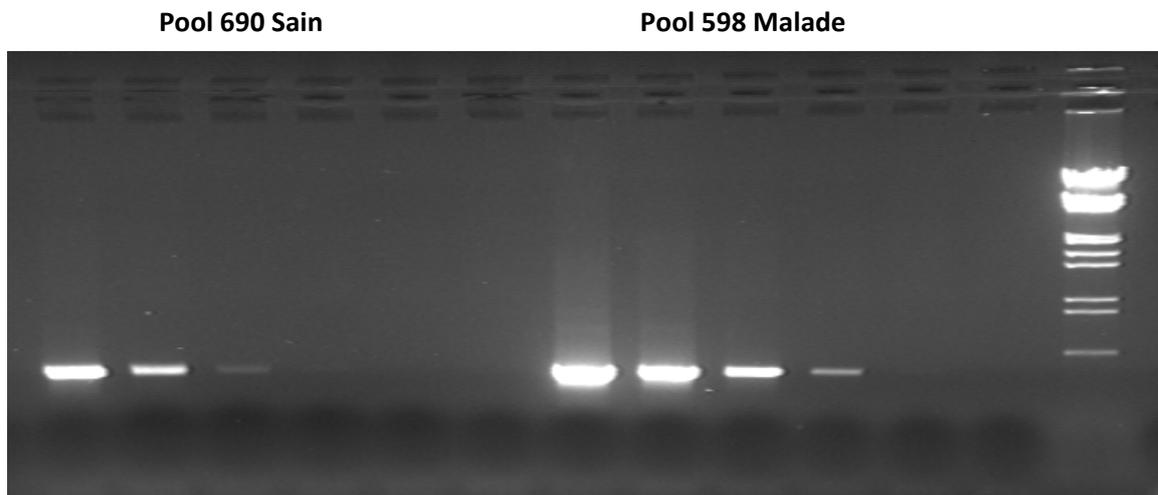


Figure II.12 : PCR semi-quantitative spécifique du *Clostridium* incriminé et effectuée à partir des contenus caecaux des pools d’animaux sains et d’animaux malades.

Des dilutions décimales sont effectuées à partir de la même quantité d’ADN pour tous les échantillons puis une PCR « spécifique » a été effectuée pour chaque dilution.

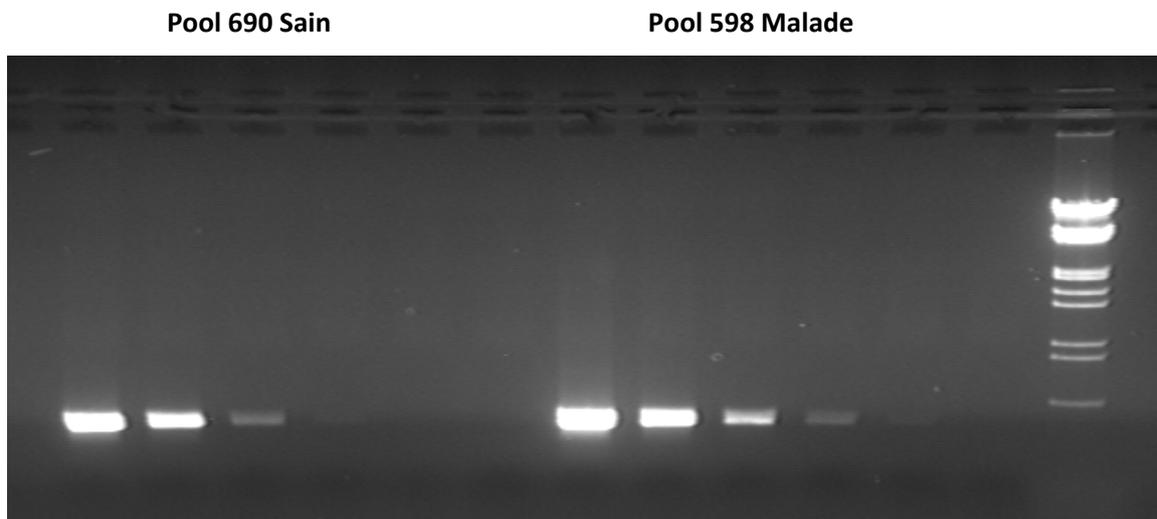


Figure II.13 : PCR semi-quantitative, spécifique du *Clostridium* incriminé et effectuée à partir des contenus intestinaux des pools d’animaux sains et d’animaux malades.

Des dilutions décimales sont effectuées à partir de la même quantité d’ADN pour tous les échantillons puis une PCR « spécifique » a été effectuée pour chaque dilution.

sont représentés les trois clones ayant été identifiés comme identique à la séquence de la bande DGGE initiale ainsi que les bactéries types et incultivées les plus proches. Les clones d'intérêt présentaient une identité de séquence de 99,63 % avec la souche type de *Clostridium lituseburense* et de 97 à 99,8% avec plusieurs bactéries incultivées.

Les PCR semi-quantitatives ont permis de mettre en évidence la présence de ce *Clostridium* incriminé de manière plus importante dans les « pools » d'échantillons de dindes malades : de près de 100 fois supérieur dans les contenus intestinaux et de près de 200 fois supérieurs dans les contenus intestinaux (cf figure II.12 et II.13).

Ce travail nous a permis de mettre en évidence la présence anormalement élevée d'une espèce de *Clostridium* proche de *Clostridium lituseburense* chez des dindes souffrant d'entérites non spécifiques. *Clostridium lituseburense* est connue pour son pouvoir pathogène. Il reste alors à déterminer le véritable rôle étiologique de ce *Clostridium* dans ces entérites non spécifiques et s'assurer que celui-ci n'est pas la résultante secondaire de symptômes déclenchés par tout autre facteur. Cette vérification passe obligatoirement par le contrôle des conditions culturales de cette bactérie afin de l'isoler, la caractériser et de définir son pouvoir pathogène par recherche de facteurs de virulence et par des essais d'inoculation sur dindes saines.

En conclusion de ce deuxième chapitre, nous pouvons dire que nous avons mis en œuvre un moyen moderne d'étude des flores complexes. Cette technique, les gels à gradient dénaturant, offre de nombreux atouts et nous a permis de réaliser de nombreux travaux très divers.

Si les travaux sur le mode d'action des antibiotiques en tant que facteurs de croissance doivent être approfondis pour clairement identifier les espèces bactériennes sensibles à leur action, ils ont d'ores et déjà permis de mettre sur pied un protocole d'identification bactérienne des flores digestives pleinement fonctionnel et peu coûteux.

Ce protocole a pu illustrer ses bienfaits sur l'étude des spectres d'action de différentes suppléments alimentaires susceptibles d'être qualifiés de substitutifs aux antibiotiques en tant que facteurs de croissance.

Enfin, nous avons montré les possibilités offertes par les gels à gradient dénaturant dans le domaine de l'identification de putatifs pathogènes liés à la sphère digestive. Dans le cas qui nous intéressait, un *Clostridium* proche de *Cl. lituseburensense* pourrait être impliqué dans les entérites non spécifiques retrouvées chez les dindes d'élevage.

Pour de plus amples détails sur l'ensemble de ce deuxième chapitre, l'auteur invite le lecteur à se référer aux annexes qui présentent les posters et l'ensemble des communications réalisés sur ces travaux.

CHAPITRE III

Apports à l'identification bactérienne et aux études environnementales

III. A. Introduction

Chronologiquement, les premiers travaux instaurés furent ceux présentés en chapitre II sur l'étude des flores digestives des gallinacés (poulet et dinde) ainsi que sur leur modulation par diverses suppléments d'origine antibiotique ou non, puis seulement après ceux présentés dans ce chapitre-ci sur le développement et la mise au point de nouveaux outils en identification bactérienne.

III.A.1. Limites des études bactériennes par gels à gradient dénaturant

Il est vrai que les résultats obtenus sur gels à gradient dénaturant souffrent d'une réelle faiblesse qualitative, particulièrement dans leur précision taxinomique, et ceci se révèle quelque peu frustrant surtout compte tenu du temps certain que demande la purification des bandes par passages successifs avant leur séquençage. Ainsi, insatisfait des résultats apportés par les gels à gradient dénaturant, l'auteur a souhaité préciser ses résultats en employant une autre méthode. La méthode choisie fut le clonage et la réalisation d'une banque des gènes de l'ARN 16S contenus dans l'échantillon à analyser. Cette technique a depuis longtemps fait ses preuves et, contrairement aux gels à gradient dénaturant, sa limitation dans la taille de l'insert surpasse largement celle des gels à gradient dénaturant où elle est approximativement de seulement 500 à 600 paires de bases. Par choix, nous avons opté pour un clonage quasi-complet de l'ADNr 16S (98 % chez *Escherichia coli*) en utilisant les amorces décrites par Weisburg en 1989, pour ne pas les nommer fd1 et rd1, que nous aimons à nommer plus simplement PU1 et PU2 respectivement. Nous souhaitons croiser et regrouper les informations de séquençage obtenues en DGGE et en clonage afin 1) de parfaire les identifications précédemment obtenues par le séquençage des bandes de DGGE en complétant cette information avec celles des clones, 2) de limiter le nombre d'échantillons à cloner en effectuant directement les comparaisons qualitatives sur les profils DGGE et 3), le cas échéant, de fournir une information qualitative et quantitative des flores digestives du poulet encore jamais atteinte.

Malheureusement, la méthode d'identification de microflore par clonage présente un obstacle de poids. La résolution des résultats d'identification étant grandement dépendante du nombre de clones de la banque, ce dernier doit donc être assez élevé pour être représentatif de la flore eubactérienne contenu dans l'échantillon d'étude. Le nombre élevé des clones entraîne

donc un coût de séquençage si important qu'une sélection des clones s'avère indispensable. Malencontreusement, les techniques de sélection de clones telle que la RFLP montre des lacunes résolutive et ne permettent pas toujours de discriminer des clones dont les inserts sont certes proches mais assez différents tout de même pour correspondre, dans le cas d'une banque d'ADNr 16S, à deux espèces bactériennes différentes. Il en résulte que certains clones sont mal regroupés et qu'une partie de l'information est ainsi perdue lors du séquençage.

Pour s'assurer d'une bonne sélection de nos clones et ainsi récupérer le maximum d'information de nos banques, sans toutefois séquencer l'ensemble de nos clones, il nous fallait mettre au point une nouvelle technique de criblage de clones qui soit à la fois efficace, rapide et peu coûteuse.

III.A.2. Mise au point de la CSbyDG et du programme ProReg XL Tool

Au départ, l'auteur eu l'idée comme bien d'autres (Burr *et al.* (2006), Shen *et al.* (2006) ou Hanschur *et al.* (2005)) de comparer et sélectionner ses clones en réamplifiant leur insert avec les mêmes amorces utilisées en DGGE et de comparer leur migration par rapport au profil DGGE de leur échantillon d'origine. Cette méthode s'est cependant révélée inefficace pour nos échantillons compte tenu de leur complexité. En effet, nombre de clones présentant des profils identiques ou très proches en première migration s'avéraient en fait totalement différent lors d'un second passage avec un gradient plus affiné et plus localisé. La seule information fournit par cette technique mono-bande était donc insuffisante pour cribler nos clones. Nous décidâmes alors d'augmenter le nombre de bandes par profil afin d'obtenir une information électrophorétique suffisante à la sélection de nos clones. Après mûres réflexions sur l'ensemble des possibilités offertes par les régions conservées de l'ADNr 16S eubactérien, nous optâmes pour une stratégie à trois bandes et nommâmes cette technique, la CSbyDG (pour l'anglais Clone Screening by Denaturing Gradient). La mise au point stratégique de cette technique est détaillée dans l'un des chapitres qui suit. Le contenu de ce chapitre est en fait le texte de l'article dédié à cette technique qui est, au moment de l'impression de ces lignes, en cours de soumission dans la revue « Applied and Environmental Microbiology ».

Bien que les profils obtenus en CSbyDG se révélaient relativement simple compte tenu du faible nombre de leur bande, leur nombre cependant ne permettait pas la sélection des clones manuellement et le recours à l'outil informatique était alors indispensable. Néanmoins, les programmes commerciaux d'analyses de profils électrophorétiques *in silico* n'offrent des possibilités de regroupements que par dendrogrammes, or ceux-ci restent très peu lisibles pour plusieurs centaines voire encore plus pour plusieurs milliers de profils. Nos banques représentant plus de 1600 clones au total, il est bien évident que regrouper nos clones à l'aide de ces programmes commerciaux se serait révéler très laborieux. En outre, l'acquisition de tels programmes représentent un coup non négligeable que nous ne pouvions nous permettre.

Le développement d'un outil informatique susceptible de réaliser des regroupements stricts a donc été entrepris. Ce programme, codé en Visual Basic Application et nommé ProReg XL Tool pour Profile Regrouping Excel Tool, est aujourd'hui fonctionnel et permet, outre les regroupements de profils, de déterminer l'atténuation du signal (épuisement), de juger de la qualité des gels et de dessiner des graphiques en camembert des résultats. Ce programme a fait l'objet d'une publication propre présentée dans le chapitre suivant et publiée dans la revue « Biotechniques ».

III.B. ProReg XL Tool : un outil de regroupement de profils électrophorétiques

III.B. 1. Introduction du programme ProReg XL Tool

ProReg XL Tool est un outil informatique destiné à regrouper des profils électrophorétiques présentant strictement les mêmes motifs de migration à un intervalle d'erreur prédéfini par l'utilisateur. Réalisé sous environnement Excel, il a donc été codé en Visual Basic Application et requiert le tableur de Microsoft pour fonctionner.

Ce programme a été développé pour permettre le regroupement des profils obtenus avec la technique de criblage de clones CSbyDG, technique détaillée dans le paragraphe « II.C ». Il peut néanmoins être employé avec toutes applications électrophorétiques où un regroupement strict des profils est nécessaire.

Les pages qui suivent exposent la publication présentant le programme ProReg XL Tool ; elle a été soumise en août 2008 et acceptée en octobre avec révisions mineures dans la revue « Biotechniques ».

ProReg XL Tool: an easy-to-use computer tool suite for rapidly regrouping a high number of identical electrophoretic profiles.

B. MASSIAS and M.C. URDACI.

UMR 5248 – Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée – ENITA de Bordeaux, 1, cours du Général de Gaulle – CS40201 – 33175 Gradignan Cedex, France

Contact: b-massias@enitab.fr

Key words: ProReg XL Tool; electrophoretic profile; regrouping; Excel application; environmental study; CSbyDG

ABSTRACT

ProReg XL Tool (for Profile Regrouping Excel Tool) is a new tool suite designed to rapidly regroup a high number of identical electrophoretic profiles of many kinds. This tool suite is coded in Visual Basic Application for Microsoft® Excel™ and thus requires this spreadsheet software to operate. It has first been designed to be used with a new screening strategy of clones from a *rrs* (16S rDNA) clone library but it may be also helpful in other electrophoretic applications. ProReg XL Tool is organized in different steps where the user has the possibility, in addition of regrouping electrophoretic profiles, to control the quality of gels, to determine signal attenuation and to draw pie-charts. ProReg XL Tool is provided freely for non-profit research purposes and available on line for download at the following internet address, “<http://www.enitab.fr/recherche/lmba/proreg.html>”.

INTRODUCTION

Gel electrophoresis is widely employed in Biology to separate and characterize biomolecules. It is used in proteomic (with proteins) or in molecular biology (with nucleic acids) applications. As an electrophoretic profile is characteristic of a given sample, comparing profiles makes it possible to classify and select a set of samples. In that sense, some commercial softwares are available for the scientific community that are able to regroup electrophoretic profile by different methods associated to a similarity or a distance matrix generally based on Dice's coefficient (1, 2). Profile regrouping abilities of some softwares were compared and published (3-6). However, in these softwares, regrouping results are often limited to a dendrogram representation that remains poorly readable for a large collection of profiles. Furthermore, these softwares are generally expensive.

Our laboratory developed recently a new technique for screening a large number of clones from *rrs* (16S rDNA) clone libraries. In brief, this technique, named CSbyDG for Clone Selection by Denaturant Gradient, permits to obtain a specific electrophoretic pattern for each inserted 16S rDNA gene. Regrouping the identical electrophoretic profiles can permit to limit the number of clones to sequence. However, such a regrouping is impossible with naked eye and required the help of a computer. Due to limitations of existing softwares, specialized in profile regrouping, we needed a software that could rapidly regroup in a strict way an important number of profiles.

ProReg XL Tool (for Profile Regrouping Excel Tool), a new easy-to-use tool suite designed for regrouping identical electrophoretic profiles from a large collection of gels, was devised. Studied gels may come from many diverse methods such as RAPD, AFLP, RFLP, allozymes, FIGE, PFGE or CSbyDG for example. The application is coded in Visual Basic Application for Microsoft® Excel™ and provided online freely to the community for non-profit research purposes. Regrouping is achieved with a score matrix and a multiple-pass strategy. Beyond regrouping, ProReg XL Tool can also do several other data analysis particularly helpful for environmental studies. It can control the quality of the gels according to statistical analysis of profile occurrence calculated for each gel and for all gels. It can also define the signal attenuation of new profile that permits to define the best sample number to analyze for the best result. In addition, ProReg XL Tool can draw pie-graphs of the regrouping results with the group designation given by the user.

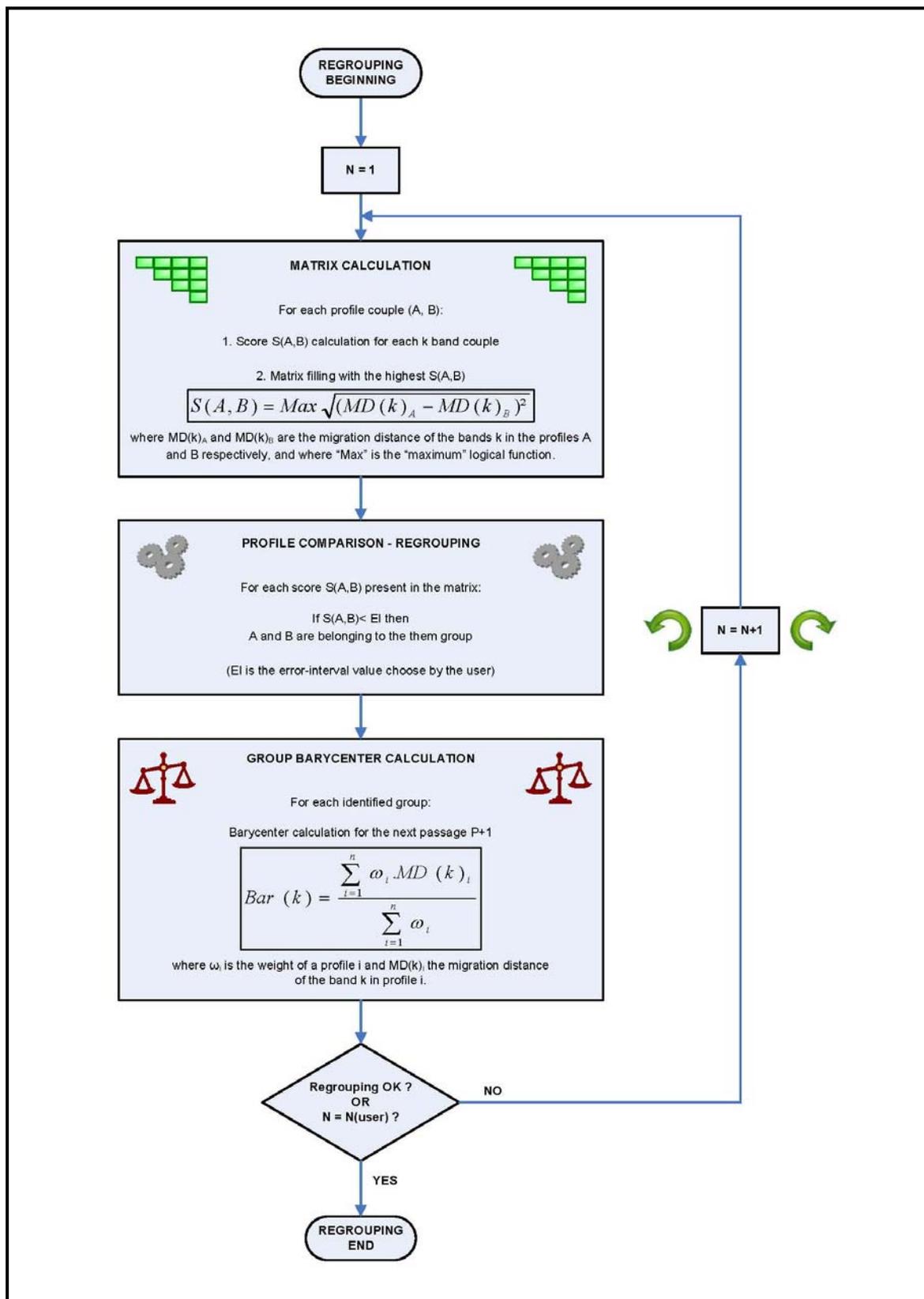


Figure 1: Simplified algorithm of regrouping step under ProReg XL Tool.

MATERIAL AND METHODS

System and programming language

The development of ProReg XL Tool was performed on a PC with a 2.6 GHz Intel® Pentium™ IV processor and 512 GB dual-channel SDRAM memory running Microsoft® Windows™ XP. As ProReg XL Tool is rich in tables (input data and output results) and in many kinds of graphs, ProReg XL Tool has been developed in Visual Basic Application for Microsoft Excel, Excel providing an easy-to-use spreadsheet software with advanced graphical capacities. Consequently, the user must have this spreadsheet software installed on his computer in order to operate ProReg XL Tool.

Regrouping algorithm

The regrouping algorithm is schematized in Figure 1.

Before any calculation, migration distances are put in an increasing order. For each profile, bands (k) are numbered from 1 to n. A score matrix is then built. Given two electrophoretic profiles A and B with N_A and N_B bands respectively, if N_A is equal to N_B then the score matrix coordinate (A,B) is filled with score $S(A,B)$. If N_A and N_B are different, no score $S(A,B)$ is computed and the profiles A and B will be considered as belonging to two different groups. Score $S(A,B)$ is defined as the maximum absolute deviation observed between all migration distances of band couples $k_{(A,B)}$ and thus can be written as followed:

$$S(A, B) = \text{Max}\sqrt{(MD(k)_A - MD(k)_B)^2}$$

where $MD(k)_A$ and $MD(k)_B$ are the migration distances of bands k in profiles A and B respectively. “Max” is the “maximum” logical function. When the half-matrix is complete, each score $S(A,B)$ is compared to the error-interval value chosen by the user and if lower,

then profiles A and B are considered to belong to the same group. The regrouping done, data are prepared for the next pass. To do so, weighted means (barycentre, $Bar(k)$) of band migration distances of same-group profiles (at pass P) are calculated in order to be used in pass P+1. In our case, the weight of a profile is the number of occurrence of this profile. The barycentre equation of band k in a given group can be written as follows:

$$Bar(k) = \frac{\sum_{i=1}^n \omega_i \cdot MD(k)_i}{\sum_{i=1}^n \omega_i}$$

where ω_i is the weight of a profile i and $MD(k)_i$ the migration distance of band k in profile i.

This regrouping algorithm may be repeated a number of times according to user's settings.

Gel quality analysis

Two parameters are used to evaluate the quality of a gel g: the average of the profile occurrences encountered in gel g (A) and the number of profiles with an occurrence number equal to one encountered in gel g (B). Gel quality is determined according to the derivation (D) observed between these two parameters in a given gel and their averages computed for all gels. The derivation is measured in standard-derivation (StD) units. The derivation $D(P)_g$ of a given parameter P in a gel g can thus be written as follows:

$$D(P)_g = \frac{P_g - m(P)_{ag}}{StD(P)_{ag}}$$

where P_g is the value of parameter P in gel g, $m(P)_{ag}$ is the average of parameter P computed for all gels and $StD(P)_{ag}$ the standard-derivation of parameter P for all gels. After computation, the two deviations $D(A)$ and $D(B)$ are used as coordinates in a pre-defined

quality score matrix. This matrix is visible in the “Gel Quality” sheet of the software. The gel thus receives a quality mark (bad, fair or good) corresponding to the coordinate junction (D(A), D(B)) of the quality score matrix.

The user is invited to check the gels with a “bad” or “fair” quality and, if he considers them deficient, to re-run them or to exclude them from the study. As gel quality is determined by a statistical approach, it is only provided as an indication and not an affirmation.

Attenuation determination

The sequencing of a clone library presents a signal attenuation of the qualitative information which is due to the repetition of the same sequences in the library. Determining attenuation makes thus possible to reduce the number of initial clones in repeated experimentations where samples are of the same type. In other words, attenuation gives the minimal number of clones to analyse for the best information rate. Attenuation determination is only relevant if the library is representative of the sample.

To determine attenuation, ProReg XL Tool uses two strategies based on chart representations. The first one presents the evolution (in percentage) of occurrences and identified groups during the scan of the library (from the first clone to the last clone). The second strategy consists in plotting the occurrence of all groups in a histogram chart and in drawing a moving average curve. The user can then identify visually the signal attenuation.

RESULTS AND DISCUSSION

ProReg XL Tool has been designed to rapidly regroup a high number of identical electrophoretic profiles. It works via Microsoft Excel spreadsheet software and is suitable for many kinds of electrophoretic applications where a strict regrouping is necessary. Beyond regrouping, ProReg XL Tool offers the possibilities to check gel quality, to determine signal

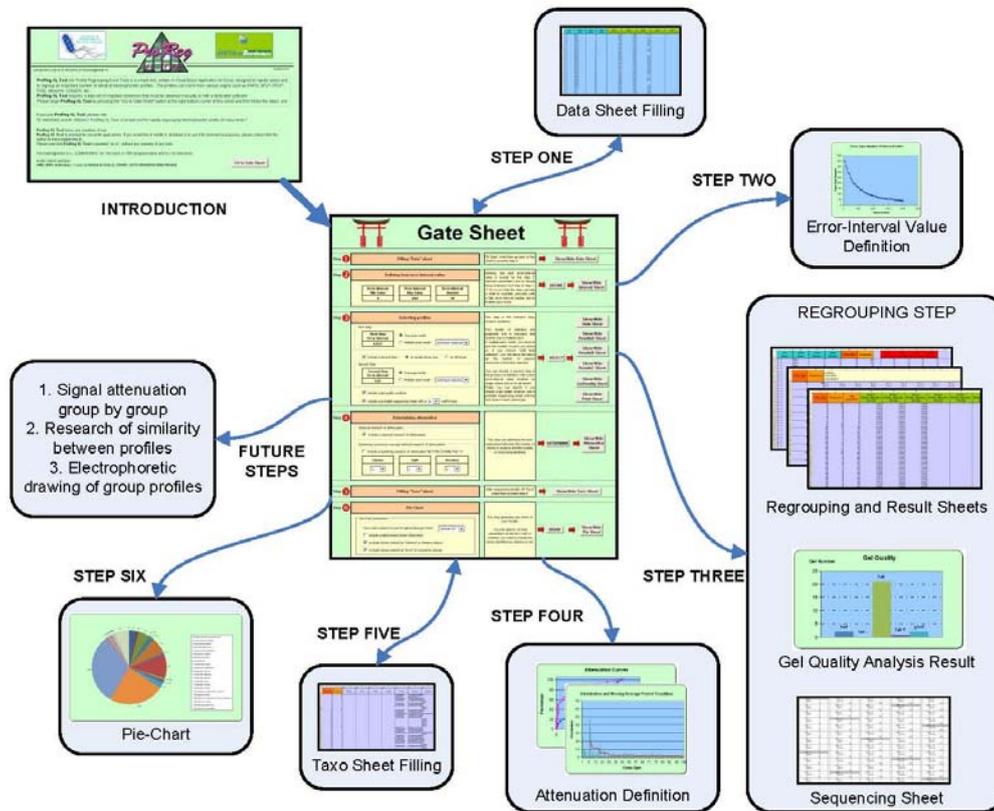


Figure 2: Development of an analysis undertaken with ProReg XL Tool.

A central sheet named “Gate Sheet” is the interface between ProReg XL Tool and the user. Six distinct steps are available for regrouping analysis, gel quality control, attenuation search and pie-chart drawing. Steps one and five make it possible to enter personal data.

attenuation and to draw pie-chart. In our tests, ProReg XL Tool performances were very acceptable as few seconds are sufficient to regroup one thousand clones with a profile complexity of about ten bands.

The development of an analysis under ProReg XL Tool is organized in six distinct steps (Figure 2). In step one, the user is invited to enter his data (the migration distances). He has the possibility to give a name to his profiles and the name of the gel where they come. Migration distances can be entered in real distance (in millimeter for example) or in normalized distance (from 0 to 1). In step two, ProReg XL Tool makes it possible to define the best error-interval value for the data set provided by the user. With this intention, this step realizes the regrouping analysis on a certain number of error-interval values in a certain range defined by the user. The result of this best error-interval definition is given by a curve representing the number of identified groups in function of the different chosen error-interval. Then, it is of the user's responsibility to choose the error-interval value that will best fit his data and his needs, according to his means and to the accuracy he desires. As the best error-interval value is variable between a given data set to another and between an electrophoretic application to another, the user must define his error-interval every time he changes his data set. The step three is the profile regrouping step, properly speaking. This step gives several sheets of results. Three sheets, named "ResultsA", "ResultsB" and "ResultsC", present the regrouping results in three different ways. In "ResultsA" sheet, the results are presented with the profiles in rows and a number of regrouping is assigned to all profiles as well as the corresponding occurrence of each group (named clone-type on the Excel sheet). The evolution of the regrouping during the different passes of the algorithm is also present on this "ResultsA" sheet. In "ResultsB" sheet, the results are presented with the identified groups in rows and with the profiles in columns. For a given identified group, all the profiles

Test	Electrophoretic Application	Number of Electrophoretic Profiles	Number of Gels	Number of Rejected Gels	Maximal Number of Band	Final Number of Identified Groups			
						Total	Minus groups with occurrence of		
							1	1 and 2	1 and 2 and 3
1	CSbyDG	431	28	2	3	106	44	27	21
2	CSbyDG	1252	82	4	3	271	147	106	83
3	RAPD	208	14	2	7	103	30	17	11

Table 1: Results of regrouping-tests undertaken with ProReg XL Tool on two kinds of electrophoretic applications, CSbyDG (tests 1 and 2) and RAPD (test 3).

^a CSbyDG is a new clone screening strategy. ^b after the gel quality control executed by ProReg XL Tool.

determined as belonging to this regroup are presented in the same row with their name, the name of their gel and their number. In “ResultsC” sheet, the results are presented with the identified groups in rows. This sheet gives the clone number of the first apparition and the migration distance weighted means (barycenter) of each identified groups. A “Stats” sheet is also generated and shows different characteristics of the selection, as the number of initial profiles, the number of identified groups and the total number of passes for example. Furthermore, the two additional “GelQuality” and “Print” sheets may be generated on user’s request. In the “Gelquality” sheet, the result of a statistical analysis about gel quality is presented. At last, the “Print” sheet presents a table aligning the first clone of each identified groups; this printable table is helpful to prepare sequencing plates. The next step – step four – is a step where the user could determine the signal attenuation of his data (see M&M). The step five is, as the step one, a step where the user is invited to enter his personal data. In this step the user may enter group denomination according to sequencing for example or all other method of identification. Last of all, the step six makes it possible to generate pie-charts of the results. The graph legend is then filled with the information provided by the user in step five.

ProReg XL Tool has been successfully tested and approved on three sets of data (Table1). The two first tested data sets come from CSbyDG profiles (see introduction for details on CSbyDG purposes), one with 1252 electrophoretic profiles and another one with 431. CSbyDG gives profiles with a triple-band complexity. ProReg XL Tool was able to regroup the first data set in 271 groups and the second one in 106 groups. The last set of tested data comes from RAPD profiles. 208 RAPD profiles with a 7-band complexity were successfully regrouped in 103 distinct groups. Table 1 shows also the possibility of lowering the group number by eliminating the groups with a weak occurrence. For example, in first

data set, the group number passes from 106 to 21 if only the groups with an occurrence higher to three are taken in consideration.

ProReg XL Tool requires a computer running Microsoft Excel. Our tests revealed a compatibility with its versions 2000, XP, 2003 and 2007. No particular recommendations are given about processor power; the faster, the better. About memory size, under Windows XP operating system, a 256 Mo memory size may be sufficient for most applications but we recommend at least 512 Mo. Under Windows Vista operating system, a minimum of 1 Go is required. Furthermore, as ProReg XL Tool has no possibility to extract migration distance data directly from gel photos, the user must retrieve them manually or with a dedicated software. The majority of the commercial softwares which are sold with image integration apparatus and digital cameras contain an option to extract migration distances. There are also possibilities to retrieve migration distances with free softwares such as NIH image ([“http://rsb.info.nih.gov/nih-image/”](http://rsb.info.nih.gov/nih-image/)), Scion Image ([“http://www.scioncorp.com/ “](http://www.scioncorp.com/)) or ImageJ ([“http://rsb.info.nih.gov/ij/“](http://rsb.info.nih.gov/ij/)) (7).

Several limitations of ProReg XL Tool are known at the moment where these lines are published. First, as previously said, ProReg XL Tool is unable to extract migration distance data from a gel picture, requiring the user to extract them manually or with a dedicated software. Second, ProReg XL Tool has been intentionally limited to analyse profiles with a maximum complexity of fifty bands. Thirdly, due to Excel column number limitations (in its earlier versions, before Excel 2007), the user may meet difficulties with complex profiles (higher than twenty bands) and in multiple-pass mode. In this case, we recommend reducing the number of passes manually to prevent such event.

According to the interest of the community vis-a-vis this tool, new options could be implemented rapidly. Namely, three additional steps may be implemented: the first one will

permit to affine the definition of attenuation according to one group and only one; the second will offer the possibility to define similarities between profiles; and the third and last one will permit to draw the profile of a given regroup according to the migration distance barycenters of its bands. Lastly, we project to recode ProReg XL Tool as a stand-alone software in Visual Basic or in Visual C++ in order to do without Excel spreadsheet software. In parallel, we plan to implement our software with an image analysis option that will prevent the combined use of ProReg XL Tool with an image analysis software.

ProReg XL Tool is freely available on line at the following internet address:
“<http://www.enitab.fr/recherche/lmba/proreg.html>”.

ABBREVIATIONS USED IN THIS ARTICLE

RAPD: Random Amplification Polymorphism DNA

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

FIGE: Field Inversion Gel Electrophoresis

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

CSbyDG: Clone Selection by Denaturing Gels

ACNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Loïc Commagnac for basis in VBA, Patrick A. D. Grimont for reading the manuscript and Aurélie Baliarda and Richard Tallon for beta-tests.

REFERENCES

1. **Dice, L. R.** 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297–302.
2. **Sneath, P. H. A., and R. R Sokal.** 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman, 573 p.
3. **Rementeria, A., L. Gallego, G. Quindós and J. Garaizar.** 2001. Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin Microbiol Infect.* 7:331-6.
4. **Cardinali, G. and A. Martini.** 1999. Critical observations on computerized analysis of banding patterns with commercial software packages. *J Clin Microbiol.* 37:876-7.
5. **Gerner-Smidt P., L. M. Graves, S. Hunter and B. Swaminathan.** 1998. Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns: comparative evaluation of two commercial software packages. *J Clin Microbiol.* 36:1318-23.
6. **Seward R. J., B. Ehrenstein, H. J. Grundmann and K. J. Towner.** 1997. Direct comparison of two commercially available computer programs for analysing DNA fingerprinting gels. *J Med Microbiol.* 46:314-20.
7. **Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., and Ram, S.J.** 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International.* 11:36-42.

III. B. 2. Conclusion sur le programme ProReg XL Tool

En l'état actuel de son avancement, le programme ProReg XL Tool propose un moyen rapide et efficace de regrouper un grand nombre de profils électrophorétiques identiques de toutes origines. Sa vitesse d'exécution, honorable et suffisante pour nombre d'applications, permet de cribler en quelques secondes un jeu de profils d'un millier d'unités avec une complexité d'une dizaine de bandes et ce sur n'importe quel type de machine datant de quelques années.

Conçu dans l'optique d'être utilisé en parallèle avec la technique de criblage de clones CSbyDG, ProReg XL Tool est son compagnon idéal. Ce programme permet en effet, non seulement de regrouper les profils identiques de CSbyDG et ainsi de cribler les clones mais également de déterminer la qualité des gels et le cas échéant de les rejeter ou les refaire, de connaître l'atténuation du signal permettant ainsi de définir la meilleure taille de l'échantillon pour les résultats escomptés et enfin de dessiner des graphiques en camemberts de la distribution bactérienne retrouvée dans la banque.

Comme l'utilisateur peut le constater, la feuille « Gate » de ProReg XL Tool présente des étapes supplémentaires qui ne sont pas encore opérationnelles. L'auteur souhaite en effet ajouter son lot d'améliorations au programme.

III. B. 3. Détails sur les perspectives possibles de ProReg XL Tool

ProReg XL Tool est, en l'état actuel (version 2.47), un programme écrit en VBA pour Excel capable de regrouper des profils électrophorétiques identiques selon les distances de migration de leurs bandes. Il est, en outre, apte à déterminer statistiquement la qualité des gels, à définir l'atténuation du signal et à produire des graphiques en camembert des résultats. Il a été tout particulièrement utile dans les travaux présentés dans le présent manuscrit pour regrouper et sélectionner les profils à trois bandes obtenus par la technique de sélection de clones CSbyDG. En outre, ce programme ne souffre à ce jour d'aucun bug connu et réalise les tâches qui lui incombent en quelques secondes à quelques dizaines de secondes selon la complexité des profils et leur nombre, ce qui est nettement suffisant pour les applications qui lui sont destinées.

Cependant, l'auteur ne considère pas la présente version comme finale et espère que de nombreuses améliorations et autres options supplémentaires voient le jour afin de parfaire les études entreprises avec ce programme, qu'elles soient d'origine environnementales (comme avec la CSbyDG par exemple) ou de toutes autres origines électrophorétiques.

Suivent de possibles modifications et options supplémentaires implémentables au programme ProReg XL Tool. Celles-ci vont du simple ajout pour faciliter la vie de l'utilisateur et l'analyse des données à un remaniement complet du code du programme en recodant celui-ci dans un autre langage.

III. B. 3. a. Les diverses options supplémentaires envisageables

Le principal élément faisant défaut au programme ProReg XL Tool, en l'état actuel de son avancement, reste certainement le manque d'une option de récupération des distances de migration directement possible sur les photos des gels. Actuellement, l'utilisateur du programme doit fournir ses distances de migration par lui-même, soit en les relevant manuellement soit en utilisant un programme tierce du type de ceux présents sur les kits d'acquisition d'images par caméra. Pour pallier ce manque, un module externe ou un module directement implémenté au programme initial devra être ajouté. Grossièrement, il s'agira de permettre l'ouverture de fichiers image, d'en trouver les pistes de migration, y définir les bandes par étude du spectre chromatique puis d'en extraire les distances de migration. L'algorithme de calcul des distances de migration pourra également être adapté pour tenir compte des variations de la linéarité des gels et donc corriger les distances par rapport à celles des marqueurs. En supposant les pistes parallèles et la déviation entre deux marqueurs linéaire, il s'agira simplement d'appliquer quelques théorèmes de géométrie de base.

De plus, comme il en est fait mention sur la feuille principale du programme, l'auteur souhaite également implémenté le programme ProReg XL Tool de plusieurs options supplémentaires.

Ainsi, dans un avenir proche, l'utilisateur pourra déterminer les similarités existant entre les profils-types, et ce en pourcentage du nombre de bandes identiques. Cela permettra de classer les profils selon leur ordre de similarité et, peut-être à terme, de définir, en particulier en CSbyDG, une corrélation entre profils et taxons. Ainsi, peut-être des espèces

d'un même genre donné, pouvant être regroupées par phylogénétique classique, pourraient être également regroupées par leur profils de CSbyDG.

La mise en place d'une représentation schématique des profils électrophorétiques est également à l'étude. Cette option, couplée à l'analyse de similarité décrite ci-avant, permettra de dessiner les profils électrophorétiques en les alignant selon leur ordre de similarité.

Il est également envisagé de fournir un outil de représentation de la répartition des profils. Il sera ainsi possible de connaître la répartition de certains profils au sein de la banque selon certaines de leurs caractéristiques : profil-type, occurrence des profils, taxon ou profils définis comme dérivant d'une chimère. Cette dernière implémentation n'est pas complexe à entreprendre mais devrait néanmoins apporter son lot d'informations pertinentes dans l'analyse de la structure de la banque étudiée. Il sera ainsi facile de définir les limites à entrevoir pour la réalisation de futures banques, en particulier si l'on souhaite se limiter à un taxon donné ou au minimum de chimères possible.

De même, la recherche de l'atténuation du signal, souvent également appelée épuisement du signal, pourrait disposer d'une nouvelle option de calcul. A savoir, l'épuisement pourrait également être représenté par une courbe avec pour axe des abscisses l'ensemble des clones de la banque et avec pour axe des ordonnées l'incrémentiel de chaque nouveau clone-type. Le résultat doit donner une courbe exponentielle interprétable de la même manière que les courbes présentées dans la première option de recherche de l'atténuation du programme. Pour les initiés, cette courbe se rapprocherait de la courbe initiale réalisée par le programme DOTUR sans l'ensemble de ses calculs annexes bien sûr.

Le rôle premier de ProReg XL Tool ayant été dévolu au simple regroupement de profils strictement identique, il n'y avait alors pas de raison de fournir une analyse de regroupement plus classique, par score de similarité. Cette méthode (ou plutôt ces méthodes...) offre l'avantage de pouvoir définir les liens de parenté existant entre profils et ainsi de pouvoir dessiner des dendrogrammes de ces relations. Pourtant, comme précisé dans l'introduction du programme ProReg XL Tool, les dendrogrammes ne permettent pas de réaliser des regroupements stricts, particulièrement avec un très grand nombre de profils comme c'est le cas avec la technique de CSbyDG. Cependant, dans d'autre type d'applications, les dendrogrammes peuvent se révéler utiles (cf. chapitre III) et implémenter une telle option au programme initial pourrait s'avérer utile et judicieuse. Il reste à définir la

ou les méthodes à pourvoir tant celles-ci sont nombreuses. Cette dernière option, si elle est réalisée, sera certainement la plus coûteuse en temps et en investissements.

III. B. 3. b. Le réencodage de ProReg XL Tool

Bien que coder ProReg XL Tool en Visual Basic Application fût un choix pertinent compte-tenu 1) de la facilité de maîtrise de ce langage pour un débutant en programmation comme l'est l'auteur, 2) du nombre important de tableaux et de graphiques présents en entrées et sorties du programme et 3) de la facilité de manipulation des données, le langage VBA reste cependant dévolu au tableur Excel et est reconnu pour sa relative faiblesse dans la rapidité d'exécution des macro-commandes.

D'autres langages, comme le C ou le Java, offrent une meilleure rapidité d'exécution sans avoir à recourir à un programme tiers. Recodé ProReg XL Tool en C++ permettrait donc de s'ajourner du tableur de Microsoft et augmenterait significativement sa vitesse (20 à 30 % de gain moyen constaté entre le VBA et le C++). D'un autre côté, passer en C++ annule tous les avantages offerts par Excel, en particulier les facilités de modifications des tableaux et des graphes ainsi que les commodités de transferts de données. Recoder en C l'ensemble de ces fonctionnalités reste difficile même s'il existe des bibliothèques de codes pour graphes et tableurs, ces bibliothèques restant tout de même moins complètes par rapport à ce qui est proposé sous Excel.

De fait, il est possible que dans un futur proche de nouvelles versions du programme ProReg XL Tool voient le jour et soient implémentées de l'ensemble ou d'une partie des fonctions et changements cités ci-avant. Le principal frein à cette avancée restera certainement la disponibilité temporelle de l'auteur, en particulier dans le cas d'un recodage complet du programme dans un autre langage ce qui engagera l'auteur dans une nouvelle entreprise linguistique.

III. B. CSbyDG : une nouvelle stratégie de criblage de clones

III. B. 1. Introduction sur la technique CSbyDG

Comme précisé dans l'introduction de ce chapitre, soucieux d'obtenir de meilleurs résultats qualitatifs qu'en DGGE, nous nous sommes tout logiquement tournés vers le clonage. L'inconvénient premier d'une telle technique est le coût prohibitif des séquençages qui lui sont associés. Afin de réduire les coûts, il est donc indispensable de cribler la banque et ainsi éviter les séquençages inutiles.

Une analyse de la littérature offre quelques possibilités de nature à cribler les clones d'une banque et particulièrement de banques d'origines environnementales (cf article qui suit). Néanmoins, aucune de ces techniques ne permet une sélection précise des clones et elles se limitent souvent au seul genre bactérien, difficilement à l'espèce.

La CSbyDG est l'alternative proposée ici pour permettre un criblage optimal d'une banque de clones. En CSbyDG, la discrimination des clones a lieu par l'intermédiaire de profils électrophorétiques obtenus en DGGE. Cette stratégie peut être utilisée avec toute banque où le clonage a été utilisé en tant qu'outil d'isolement moléculaire et où le polymorphisme des inserts la justifie.

Les pages qui suivent présentent la publication rédigée pour décrire et présenter la CSbyDG et particulièrement la CSbyDG bactérienne. Cette publication est complète à l'exception de l'analyse des résultats de la seconde banque de clones, celle du contenu caecal du poulet. Sont discutés notamment les différentes stratégies possibles et envisagées par les auteurs ainsi que les éventuelles perspectives techniques mais également appliquées particulièrement en identification bactérienne.

**CSbyDG, a new clone screening strategy, and environmental CSbyDG,
its application to environmental studies.**

B. MASSIAS and M.C. URDACI.

UMR 5248 – Laboratoire de Microbiologie et Biochimie Appliquée – ENITA de Bordeaux, 1,
cours du Général de Gaulle – CS40201 – 33175 Gradignan Cedex, France

Contact: b-massias@enitab.fr

Key words: clone screening; DGGE; environmental study; CSbyDG; environmental CDbyDG

INTRODUCTION

In the Molecular Biologist's tool pallet, molecular cloning is without any doubt, with PCR, one of the most employed. If it is obsolete today as a tool for DNA amplification, supplanted now advantageously by PCR (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988), molecular cloning remains of a great interest as a molecular isolation tool (Hershfield et al., 1974). This property is useful in many applications such as gene cloning and sequencing (Aiba et al., 1982), in-vivo gene expression (Kobilka et al., 1987), whole-genome sequencing (Fleischmann et al., 1995) or metagenomic (Gill et al., 2006) for example. In many cases, a clone library is generated and sequenced partially or in totality.

Clone libraries generated from complex DNA molecule populations always result in redundant sequencings and thus present a ratio information/cost very weak. To prevent useless sequencings and lower the cost, a clone screening may be undertaken. Most of the screening methods available in the literature target only known sequences and thus require a previous knowledge of the target-inserts. Such methods are for example oriented to flow cytometry (Davies et al., 1981; Nielsen et al., 2004), immunological screening (Shaper et al., 1986) or clone-FISH (Schramm et al., 2002). Others authors use RFLP (Restriction fragment Length Polymorphism) (Bowden et al., 1989) or tRFLP (t for terminal) (Moeseneder et al., 2001; Babcock et al., 2007)) as discriminating techniques but, as they used only partial sequence information, they remain inaccurate. In the particular case of environmental studies, Burr et al. (2006) report the potential of DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) profiles to discriminate library clones. Unfortunately, this method is only effective on libraries with a limited number of clones (lower to one hundred) and with a low complexity.

In this study, the authors describe a new clone screening strategy named CSbyDG for Clone Screening by Denaturing Gradient. This clone screening method is based on the

differential denaturation observed between clone inserts and uses it to discriminate library clones. To illustrate this technique, the authors chose to present its bacterial application. In bacterial CSbyDG, 16S rDNA clone libraries are screened by a triple amplification of their insert followed by a DGGE migration. Then a profile regroupment allows reducing sequencing number and cost. Possible strategies and perspectives of CSbyDG are discussed, particularly in bacterial identification.

MATERIALS AND METHODS

Biological material.

Bacterial CSbyDG clone selection method was tested with two samples of chicken gut content, one from small intestine contents (SIC) at the age of 35 days and the other one from caeca contents (CC) at the age of 21 days. Each sample is the result of a pool of thirteen individual samples. Chickens were *Gallus gallus* males of *Ross* breed. From one-day age, the birds were high in parks of an experimental station (Euronutrition SAS, France) and their diet consisted of wheat, maize and soybeans. An anticoccidian (1 ppm diclazuril) was added to the food until the age of 22 days. Food and water were provided *ad libitum*. Animals were sacrificed at the age of 21 and 35 days and their gut contents were immediately taken, mixed separately and frozen at -20°C in the waiting of further use.

Bacterial DNA extraction.

After having defrosted them at 4°C during one night, each sample (25 mg) were submitted to a bacterial DNA extraction by using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA), according to the manufacturer's instructions. Nevertheless, in order to perfect the bacterial lysis, an initial step was added where the samples were treated during one hour at 37°C with a Tris-buffered solution (0.1 mM, pH 8) containing lysozyme (10 mg/mL) and mutanolysine (10 Units/mL). Final step of column elution, where DNA is recovered, was operated by placing the columns at 60 °C during 5 minutes and divided into two stages: a first one with 100 µL of final buffer AE and a second one with 50 µL. The DNA extracts were finally checked on a 0.8 % agarose gel, and then frozen at -20°C in the waiting of further use.

DNA in-vitro amplification.

DNA extracts were subjected to a “universal” PCR of eubacterial 16S rDNA with primers fD1 (5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3') and rD1 (5' – ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT – 3') described by Weisburg *et al.* in 1991. The product of amplification corresponds to the positions 8 to 1512 of *Escherichia coli* 16S rDNA and so to a 1505-bp fragment (either 97.6 % of the total length of *Escherichia coli* 16S rDNA). Amplifications were performed in an iCycler programmable thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Enzyme used was the Qbiogen recombinant Taq DNA polymerase (Qbiogen, Irvine, California, USA). According to the manufacturer's recommendations and buffer composition, PCR mixes were composed of 200 nM each specific primer, 300 μ M each dNTP, 1 Unit Taq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.1 % TritonX-100, 0.2 mg/mL BSA and 20 ng DNA template for a 25 μ L final reaction volume. PCR protocol was as followed: an initial denaturation step at 95°C for 4 min then 30 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 sec and an annealing step at 52°C for 30 sec and an elongation step at 72°C for 90 sec, and, to finish, an final elongation step at 72°C for 7 min. Three replicates were done for each sample. The whole 25 μ L of each tri-replicate of each sample were applied on a 1 % agarose gel then gel purified and concentrated into 20 μ L volume using QIAquick Gel Extraction kits (Qiagen, Valencia, California, USA).

Amplified 16S rDNA cloning.

Fresh amplified 16S rDNA were inserted in cloning vectors with a TA strategy, namely pCR2.1 TOPO vectors (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Ligation was processed during 15 minutes in presence of salt. 6 μ L and 9 μ L of total ligation mix were used for SIC and CC initial samples respectively. After desaltation with a dialysis on micropore 0.25 μ m microfilter against deionized pure water, 1 μ L of ligation result was subjected to an insertion

in electrocompetent cells of *Escherichia coli* strain JM109 via an electroporation with an electroporator Gene Pulser II system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). This step of transformation was repeated two times for SIC initial sample and eight times with CC initial sample (that is to say with 2 μ L on 6 μ L and 8 μ L on 9 μ L of ligation result for SIC and CC initial samples respectively). Immediately after transformation, cells were incubated in 300 μ L SOC liquid medium at 37°C on a rocking plate (250 rpm/min) during one hour to express antibiotic resistance. Blue/white screening was performed in two times: first, for each transformation, the 300 μ L SOC containing transformed cells were spread out on six Petri dishes (50 μ L per dish) containing LB-agar supplemented with IPTG, X-Gal and Ampicilline; second, each white colony was applied in another LB plate with the same supplementations to confirm its color. After that, confirmed white colonies were tested for the presence of the correct-size insert by PCR with primers M13f (5' – TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3') and M13r (5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3') followed by an electrophoresis on 1 % agarose gel. PCR mix composition and apparatus used were the same as described before but with only 15 μ L for final volume reaction in order to reduce the cost. PCR protocol was as followed: an initial denaturation step at 95°C for 4 min then 30 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 sec and an annealing step at 58°C for 30 sec and an elongation step at 72°C for 2 min, and, to finish, an final elongation step at 72°C for 5 min. The products of this PCR amplification were conserved for a future nested PCR (see § “Bacterial CSbyDG primers and amplification” of this “materials and methods” chapter). When the presence of the correct-size insert was confirmed, clones were cultivated in 200 μ L wells of 96-well plates containing Ampicilline-LB during 24 hours at 37°C on a rocking plate (250 rpm/min), and then were put in collection by adding 20 % glycerol (v/v) and frozen at -80°C.

Bacterial CSbyDG primers and amplification.

On M13 test PCR products of each clone with correct-size insert, three nested PCRs were realized with three set of primers which produce fragments noted I, II and III. Primer sequences and strategy are presented in figure 1. A GC clamp (5' – CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG G- 3') is added in 5' of each reverse primers; it consists in a rich G/C sequence that permits to increase DGGE resolution (Sheffield et al., 1989). These three PCR are made in separated tubes and not in multiplex in order to increase the number of clones with a multiple-band profile (this point is discussed). PCR protocol was identical for all three sets of primers and was as followed: an initial denaturation step at 95°C for 4 min then 30 cycles with a denaturation step at 95°C for 30 sec and an annealing step at 52°C for 30 sec and an elongation step at 72°C for 30 sec, and, to finish, an final elongation step at 72°C for 5 min. PCR mix composition and apparatus used were the same as described before but with only 15 µL for final volume reaction in order to reduce the cost.

Denaturing gradient gel electrophoresis.

For each clone with correct-size insert, a mix composed of 4 µL of each fragment I, II and III and 5 µL loading buffer 2X was applied on a Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). DGGE were conducted as described previously on a D-Code apparatus (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Acrylamide/bisacrylamide ratio and concentration were respectively 37.5:1 and 5.5%. The gradient was a 32.5-50 %, with 100 % meaning a urea concentration of 7 M and a formamide concentration of 40 % (v/v). Gels were poured with the model 475 gradient former (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Migrations were realized at

130 V constant voltage and 75 mA maximum current per gel during approximately 5 hours and 30 minutes (until xylene cyanol migration marker reaches the bottom of the gel). After migration completion, gels were stained in a 10 mg/mL ethidium bromide bath during twenty minutes and then directly read on an UV transilluminator. Gel pictures were digitized for future digital treatments on computer.

Bacterial CSbyDG ladder marker.

CSbyDG markers were created from interesting bands discovered during an initial test on one hundred random clones of SIC sample. Finally, according to their migration distance and their quality (clear and sharp), twelve bands were selected to be compatible with a ladder marker for CSbyDG DGGE gels. A ladder marker lane is composed of 1 μ L of each twelve amplified band and of 5 μ L loading buffer 2X.

Migration distance definition of CSbyDG profiles.

Digitized pictures of CSbyDG gels were treated numerically by the Quantity One 4.5 software (Bio-Rad, Hercules, California, USA). After automatic definition of clone and ladder lanes and manual verification, normalized migration distances were retrieved from the “all lane report” of the software.

Profile regrouping.

CSbyDG tri-band profiles were regrouped by using ProReg XL Tool software (ref). Normalized migration distances retrieved from Quantity One were injected in the “Data

Sheet” of ProReg XL Tool software. A value of 0.152 was chosen for interval–error and algorithm parameter selection was defined with a unique step process in multiple-pass mode (until best regrouping).

Insert sequencing.

First clone of each ProReg XL Tool regrouping was sequenced on one strand with phred20 quality and on the whole sequence (two sequencings were necessary per clone). Plasmid extraction and sequencings were realized by the GATC society (GATC Biotech AG, Konstanz, Germany).

Chimera detection method.

16S rDNA amplifications generate chimeric sequences that must be eliminated of any environmental studies. In this study, the authors chose to use a combination of several chimera detection methods. First, all insert sequences were submitted to paralleled chimera checks by the following software: Bellerophon (Huber et al., 2004), Greengenes (DeSantis et al., 2006) and Mallard (Ashelford et al., 2006). If, for a given sequence, none of these softwares found a chimera, the sequence is considered as non-chimeric. On the contrary, if all the softwares declare that the sequence is a chimera, the sequence is directly considered as chimeric and rejected of the study. If only one or two chimera detection software declare a sequence as chimeric, a further control is realized with Chimera-Check software (Cole et al., 2003). At last, if there is always a doubt, the sequence is “blasted” in a personal sequence database containing only type-strain sequences with the help of the BioEdit software (Hall, 1999).

Bacterial identification.

Bacterial phylogeny of the insert sequences was determined according to comparisons with data provided by the RDPII database (Cole et al., 2007).

Nucleotide sequence accession numbers.

All 16S rDNA sequences retrieved from this study were injected to the GenBank database with the following accession numbers: à définir.

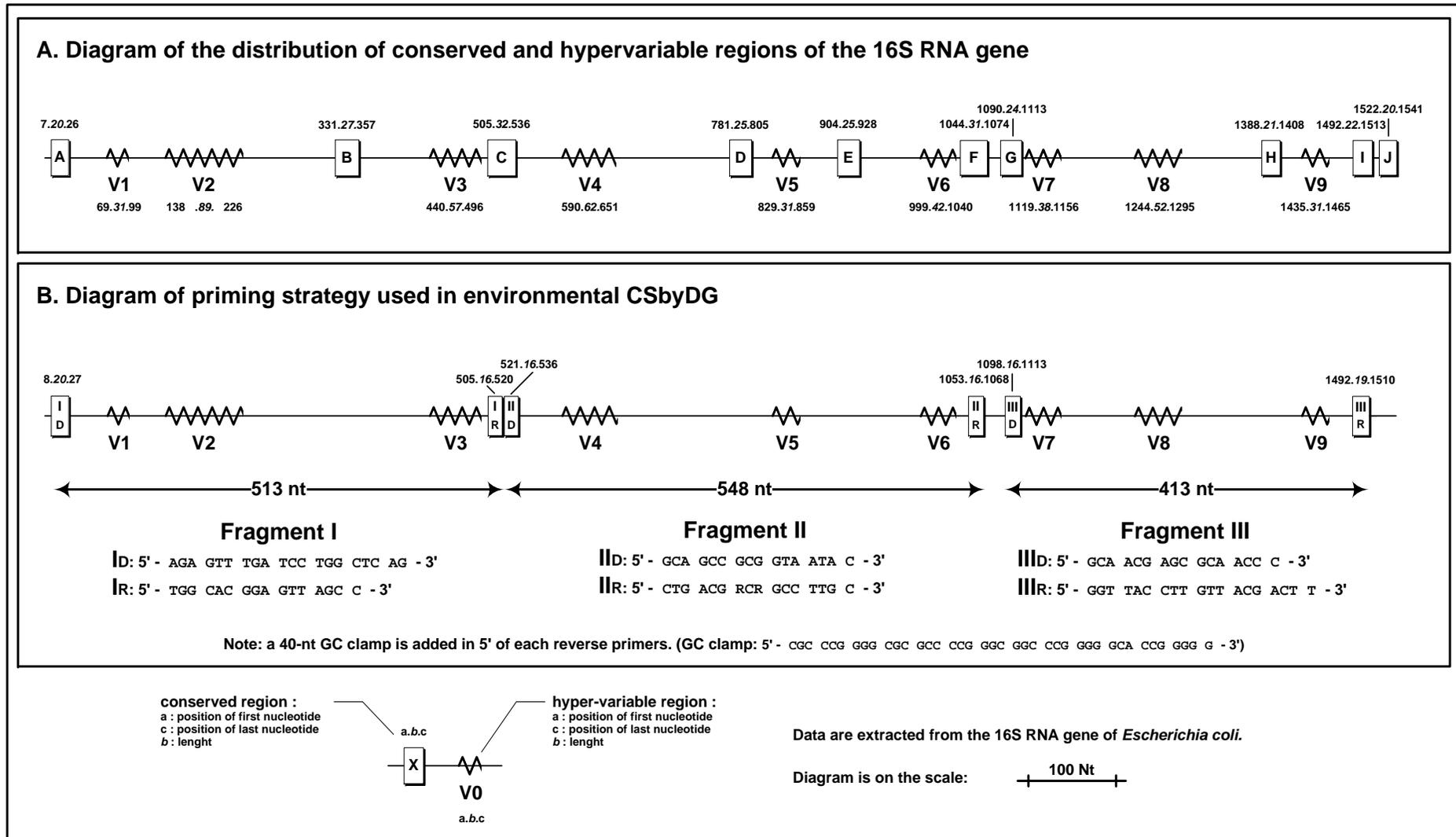


Figure 1 : Diagrams of 16S RNA gene with the possible eubacterial “universal” priming sites (A) and environmental CSbyDG priming strategy (B).

RESULTS

The clone screening strategy, CSbyDG, may have a utility in a wide range of molecular biology applications which use molecular cloning as a molecular isolation tool. Here, in this result section, the authors propose the development details of one of them, especially dedicated to environmental and bacterial studies: the bacterial CSbyDG.

Bacterial CSbyDG priming strategy.

Bacterial CSbyDG primer design was conducted by following several criteria. 1) bacterial CSbyDG primers must be as “universal” as possible of the *Eubacteria* kingdom. 16S rDNA gene contains ten conserved regions suitable for designing such “universal” primers, annotated A to J on figure 1.A) Furthermore, due to degradation of gel quality, DGGE imposes the migration of fragments lower to 600 bp. Thereby, CSbyDG primers must be chosen in order to produce PCR fragment lower to this limit; in other words, 16S rDNA conserved regions chosen to realize the primers must be distant of 600 bases maximum. 3) As much as possible, primers must amplify the 16S rDNA hyper-variable regions as a whole and be compatible with multiplex PCR.

On these bases, what strokes by examining the distribution of conserved and hyper-variable regions of the 16S RNA gene (see figure 1.A) is that only conserved regions F and G are adjacent (to the exception of conserved regions I and J but they are placed at the 3' extremity of the gene). Thus the area between hyper-variable regions V6 and V7 is the only one which allows the design of direct and reverse primers easily. In all other cases, designing direct and reverse primers will result in dividing a conserved region in half. On this noting, a first approach with four amplifications was tested by dividing conserved regions B and D in

two direct and reverse primers. The four fragments were then formed of amplification from conserved regions A to B, B to D, D to F and G to I. Unfortunately, this four-fragment strategy results in a weak proportion of CSbyDG multiple-band profile. Indeed, in a one hundred clone test, about 50% show only a one band profile. The authors decided to reject this four-band strategy which resolution was too weak and inspected possibilities in three-band strategies.

Finally, a three-band strategy retained authors' interest. This strategy is detailed in figure 1.B. Only conserved region C was divided in half to let the possibility to realize direct and reverse primers between hyper-variable regions V3 and V4. The three fragments were formed of amplification from conserved regions A to C, C to F and G to I. Primers were derived from previous works (I_D and III_R from Weisburg et al., 1991, II_R from Reysenbach and Pace, 1995 and III_D from DasSarma and Fleischmann, 1995) but two primers were originally designed in the conserved region C (I_R and II_D). This triple-band strategy achieves a better proportion of multiple-band profiles than the previous four-band strategy, in separated PCR and even in multiplex PCR. As well, this strategy allows a good cover: 100% of 16S hyper-variable regions are covered and about 96%.of 16S rDNA as a whole is covered.

Test library construction.

Bacterial CSbyDG strategy was tested on two independent samples of chicken gut contents. 1683 clones were obtained from Small Intestine Content (SIC) and Cecal Content (CC) libraries with 431 and 1252 clones respectively. Judging by the gel quality report from ProReg XL Tool software, two gels were rejected in SIC library and four in CC library,

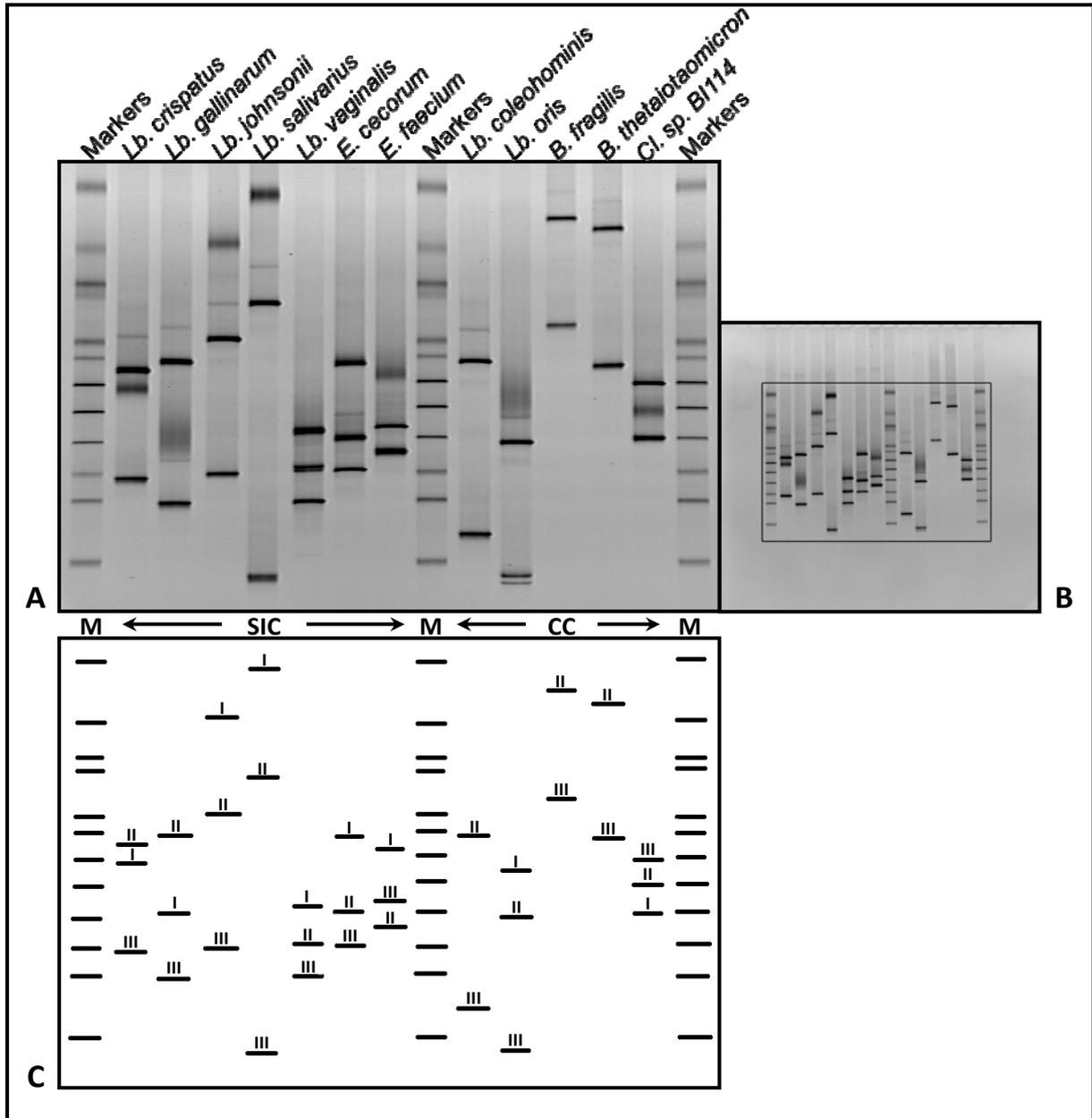


Figure 2 : Bacterial CSbyDG DGGE typical results. (A) Example of twelve patterns obtained by environmental CSbyDG of chicken gut microbiota clone libraries. The presented profiles were chosen because their sequences have an identity score higher than 99 % of a type strain. Seven of them come from a Small Intestine Content (SIC) library and five from a Cecal Content (CC) library. SIC and CC samples are separated by marker lanes (M). Genus abbreviations are “Lb.” for *Lactobacillus*, “E.” for *Enterococcus*, “B.” for *Bacteroides* and “Cl.” for *Clostridium*. (B) Overall picture of the DGGE gel with a framed showing the zone of interest. (C) Schematic representation of the corresponding DNA fingerprint with annotated bands. Band annotation was retrieved from secondary gels where bands migrated separately (data not shown).

retaining 399 and 1188 clones of each library respectively in the process of screening analysis, that is to say a total of 1587 clones.

Electrophoresis in bacterial CSbyDG.

Figure 2 presents an example of twelve typical bacterial CSbyDG profiles. With the chosen priming strategy, profiles were clear but all clones didn't show a triple-band pattern. Actually, on the whole clone profiles, 85.9% (1446) were constituted of three bands, 13.8% (232) of two bands and 0.3% (5) of only one band. No clone presented a profile without band. As seen on figure 2, it is usually fragment I band that is absent when profiles contain only two bands. On further tests on one hundred clones, when using multiplex PCR, the number of profiles with three bands decrease to about 55%, those with two bands to about 35% and those with one band to about 10% (data not shown).

Although DGGE can't discriminate fragment bands one from the others, there are some band particularities that can be mentioned. First, fragment I shows often a fuzzy band. Then, for an unexplained reason, fragment II presents usually a second weak "ghost" band to an approximate distance of 6 mm above the real band; this aspect is particularly visible on *Lactobacillus* species profiles of the figure 2. At last, fragment III bands are typically found at the last position but not every time.

Clone screening and identification.

A total of 106 DGGE was necessary to screen the 1683 clones obtained from the SIC and CC libraries.

According to their bacterial CSbyDG profiles, ProReg XL Tool was able to regroup the 399 SIC library clones in 106 distinct groups. It represents a direct diversity factor of 26.5%. On these 106 regroupings, sequencings reveal that 41.5% (44) must be considered as chimeric sequences while 58.5% (62) of sequences are non-chimeric sequences; that is to say in clone total number unit to respectively 34.3% and to 65.7%. Comparisons of non-chimeric sequences with data provided by the RDPII database allowed classifying them in 12 genus and in 22 bacterial species, with an average identity score higher to 99.6%. Only three phylum were found in the SIC library: *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. *Lactobacillus* genus was the most abundant genus with 59.9% of non-chimeric clone total number.

As well, ProReg XL Tool was able to regroup the 1188 CC library clones in 271 groups.

DISCUSSION

In this study, the authors describe a new clone screening strategy named CSbyDG for Clone Screening by Denaturing Gradient. With this technique, clone discrimination is based on differential denaturation of insert fragment(s). Actually, the authors used Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to realize discriminating profiles of clones from environmental libraries but CSbyDG may have others utilization fields whatsoever they use cloning as a molecular isolation tool where insert polymorphism justifies its employment.

The literature reports some clone screening strategies specially focused on environmental studies. For example, Clone-FISH proposed by Schramm et al. is a possibility for clone screening but, as it uses hybridization-in-situ method, its precision is confined in genus or family not in bacterial species. As well tRFLP screening used by Moeseneder et al. is unfortunately limited to only phylotypes. In 2006, Burr et al. show the potential of DGGE to display the diversity of a 16S rDNA clone library followed by Shen et al. in the same year but Hanschur et al. in 2005 were the first to employ such a strategy. These three groups of authors employed a single-band strategy on libraries limited to a maximum of 100 clones. Beyond this point, when clone number is higher to 100 and library insert polymorphism is very complex, one-band strategy remains poorly discriminating (data not shown).

In this study, the authors presented a specific application of CSbyDG especially helpful in environmental studies. This application, named bacterial CSbyDG, is able to screen a high number of clones from a 16S library. In bacterial CSbyDG, clone discrimination is based on the specificity of tri-band DGGE patterns. The priming strategy allows a 16S hyper-variable region cover of 100% which permit to use the maximum of sequence information for the screening process. Bacterial CSbyDG primers are compatible with multiplex PCR but, because of the high bacterial diversity that may prevent a good primer hybridization, the

Genus	Species	Best match	Accession Number	Identity (%)	Clone-type number	clone-type (%)	Clone number	clone total (%)
<i>Brachybacterium</i>	<i>paraconglomeratum</i>	<i>B. paraconglomeratum</i> LMG 16861 (T)	AJ415377	98.7-99.9	3	4.8	8	3.1
<i>Brevibacterium</i>	<i>epidermidis</i>	<i>B. epidermidis</i> NCDO 2286 (T)	X76565	99.6	1	1.6	3	1.1
<i>Brevibacterium</i>	<i>stationis</i>	<i>B. stationis</i> LMG 21670 (T)	AJ620367	99.8-99.9	3	4.8	13	5.0
<i>Clostridium</i>	<i>lituseburense</i>	uncultured bacterium CFT111G4 (U)*	DQ455971	99.7	1	1.6	1	0.4
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 (I)	BA000036	99.7	1	1.6	5	1.9
<i>Enterococcus</i>	<i>cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> ATCC 43198 (T)	AF061009	99.7-99.9	3	4.8	19	7.0
	<i>faecium</i>	<i>E. faecium</i> DSM 20477 (T)	AJ276355	99.9	1	1.6	2	0.8
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	<i>E. coli</i> ATCC 11775 (T)	X80725	98.3-98.4	3	4.8	27	10.3
<i>Facklamia</i>	<i>tabacinasalis</i>	<i>F. tabacinasalis</i> CCUG 30090 (T)	Y17820	99.8	1	1.6	2	0.8
<i>Jeotgalicoccus</i>	<i>halotolerans</i>	<i>J. halotolerans</i> 20 (I)	EF154260	97.4-99.9	3	4.8	4	1.6
<i>Lactobacillus</i>	<i>crispatus</i>	<i>L. crispatus</i> DSM 20584 (T)	Y17362	99.9	2	3.2	6	2.3
	<i>gallinarum</i>	<i>L. gallinarum</i> ATCC 33199 (I)	AJ417737	99.5-99.9	8	13.0	63	24.0
	<i>johnsonii</i>	<i>L. johnsonii</i> NCC 533 (I)	AE017198	99.7-100	12	19.6	81	30.9
	<i>reuteri</i>	<i>L. reuteri</i> F275 DSM 20016 (I)	CP000705	99.4-99.5	2	3.2	3	1.1
	<i>salivarius</i>	<i>L. salivarius</i> ATCC 11741 (T)	AF089108	99.1-99.7	2	3.2	2	0.8
	<i>vaginalis</i>	<i>L. vaginalis</i> MF2123 (I)	AB158767	99.5-99.6	2	3.2	2	0.8
<i>Staphylococcus</i>	<i>equorum subsp. equorum</i>	<i>S. equorum subsp. equorum</i> ATCC 43958 (T)	AB009939	99.8	1	1.6	1	0.4
	<i>lentus</i>	<i>S. lentus</i> ATCC 29070 (T)	D83370	99.9	1	1.6	2	0.8
	<i>saprophyticus subsp. saprophyticus</i>	<i>S. saprophyticus subsp. saprophyticus</i> ATCC 15305 (I)	AP008934	99.7	1	1.6	1	0.4
	<i>xyloso</i>	<i>S. xyloso</i> ATCC 29971 (T)	D83374	99.7	1	1.6	1	0.4
<i>Streptococcus</i>	<i>alactolyticus</i>	<i>S. alactolyticus</i> ATCC 43077 (I)	AF201899	99.6-100	8	13.0	10	3.8
		uncultured bacterium D5-02 (U)*	DQ113694	99.9	1	1.6	5	1.9
	<i>pluranimalium</i>	<i>S. pluranimalium</i> LMG 14257 (I)	Y18026	99.2	1	1.6	1	0.4
Sub-Total non-chimeric					62	58.5	262	65.7
chimeric					44	41.5	137	34.3
Total					106	100	399	100

Table I: Taxonomic distribution of the Small Intestine Content 16S clone library, according to environmental CSbyDG screening. Clone regrouping was done by ProReg XL Tool. Sequence match were obtained from the RDPII database.

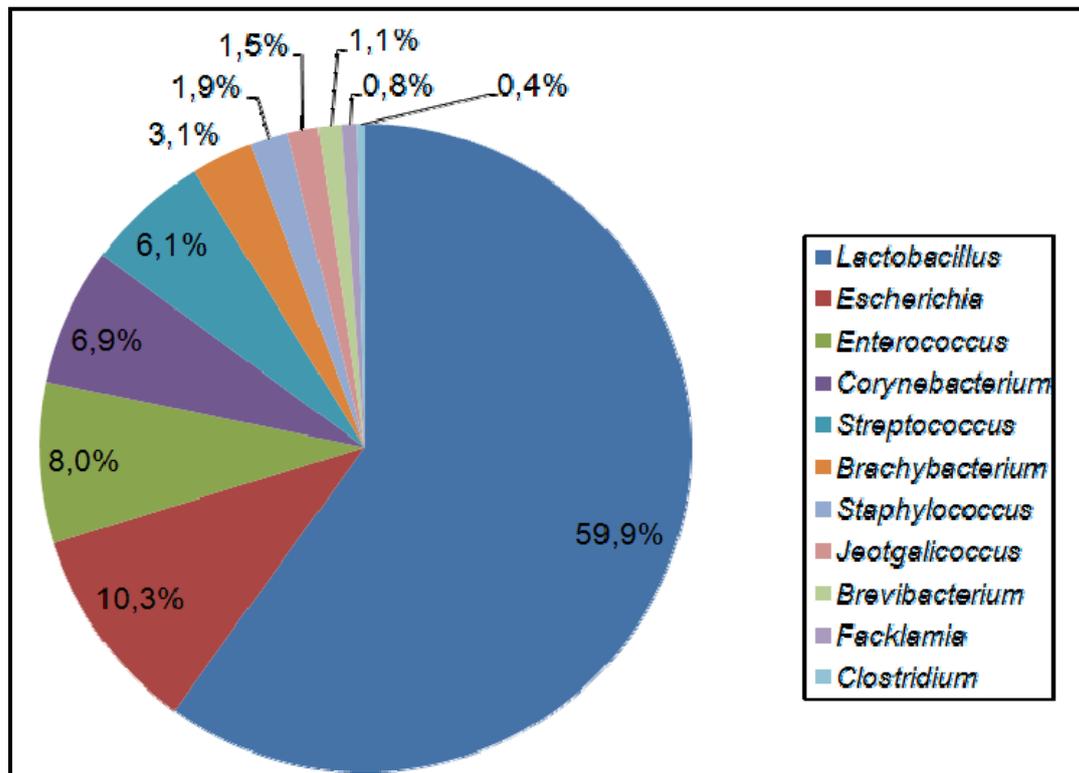


Figure 3: Pie-graph of the taxonomic distribution obtained from the Small Intestine Content 16S clone library.

authors recommend to perform PCR in separate tubes. PCR realized in separate tubes increase the proportion of multiple-band profiles and thus improve screening performance.

The screening made by bacterial CSbyDG was checked by comparisons of the results presented in this study and previous works on chicken gut microbiota using cloning/sequencing as bacterial identification tool. About the SIC library, screening and identification in bacterial CSbyDG lead to a bacterial distribution comparable to those presented by Dumonceaux et al. in the proximal ileum whereas they used cpn60 instead of 16S rDNA as semantide (figure 3 and table I). As well, Lu et al. describe a bacterial composition of the ileum very near of the SIC library identification results except for some differences and in the proportion between *Escherichia* and *Clostridium* genus which seems inversed. These differences may be explained by the fact that Lu et al. were less restrictive than the present study in chimeric sequence detection and that they use only partial 16S sequences for identification.

Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) is a variant of DGGE technique; actually their use is identical but TTGE uses a temporal temperature gradient as denaturant agent and DGGE a chemical gradient of urea and formamide. Thereby, CSbyDG can be employed as well as in DGGE as in TTGE. Due to recent advances by Righetti *et al.*, TTGE is now workable in nonisocratic capillary electrophoresis. This technique, called TG-CZE for Thermal Gradient-Capillary Zone Electrophoresis, uses the Joule effect to control capillary internal temperature. A temporal current gradient is then applied on the fused-silica capillaries during all the process of migration to induce an indirect temporal temperature gradient . At full term, the authors envisage to advantageously replace DGGE by TG-CZE in CSbyDG applications, which will thus increase profile reproducibility and decrease time consumption. Moreover, distinction between fragments could be easier in capillary

electrophoresis which provides an advanced fluorochrome detection. Annotating the fragments would increase the information provided and thus increase the power of CSbyDG screening.

As clone discrimination under CSbyDG is based on fragment differential denaturation, every technique able to discriminate fragments according to their T_m or simply determine T_m would be of interest in CSbyDG. Thus, DGGE could be advantageously replaced by quantitative PCR in CSbyDG application. qPCR could enhance reproducibility and reduce time consumption inherent in gel migration. In the present circumstances, primers used for bacterial CSbyDG and presented in this paper are incompatible with qPCR and therefore must be modified to justify their use with such a technique, not because of their sequences but rather because of the fragment size they generate, too big for a precise determination of T_m . Fragments compatible with a determination of their T_m by qPCR are generally lower to 200 bp and the distribution of 16S rDNA conserved regions offers some possibilities in that way.

If further experimentations confirm that bacterial CSbyDG profiles can be associated to a unique bacterial taxon and especially a unique bacterial species, CSbyDG important prospects could be born in bacterial identification. If so, in a near future, the authors desire to realize a bacterial CSbyDG profile database of their results. Thus, with the help of this database profile, bacteriologists, working on chicken gut microbiota and using molecular cloning, could easily identify their 16S rDNA inserts without the need of sequencing. Of course, databases of other microbiota could also be realized (human gut microbiota, soil microbiota, etc...). Besides, as mentioned before, if CSbyDG can be transposed from DGGE to DG-CZE or better qPCR, with a well documented database, bacterial CSbyDG could become a powerful mean of bacterial identification which could offer an identification of a bacterium in less than one or two hours.

REFERENCES

- Aiba H, Fujimoto S, Ozaki N. 1982. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* 10: 1345-1361.
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. 2006. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* 72: 5734-5741.
- Babcock DA, Wawrik B, Paul JH, McGuinness L, Kerkhof LJ. 2007. Rapid screening of a large insert BAC library for specific 16S rRNA genes using TRFLP. *J Microbiol Methods* 71: 156-161.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55: 541-555.
- Bowden DW, Muller-Kahle H, Gravius TC, Helms C, Watt-Morgan D, Green P, Donis-Keller H. 1989. Identification and characterization of 23 RFLP loci by screening random cosmid genomic clones. *Am J Hum Genet* 44: 671-678.
- Burr MD, Clark SJ, Spear CR, Camper AK. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microb Ecol* 51: 479-486.
- Cole JR, et al. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31: 442-443.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35: D169-172.
- Davies KE, Young BD, Elles RG, Hill ME, Williamson R. 1981. Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry. *Nature* 293: 374-376.

- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069-5072.
- Dumonceaux TJ, Hill JE, Hemmingsen SM, Van Kessel AG. 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 72: 2815-2823.
- Fleischmann RD, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
- Gelfi C, Cremonesi L, Ferrari M, Righetti PG. 1996. Temperature-programmed capillary electrophoresis for detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 21: 926-928, 930, 932.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355-1359.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Handschr M, Pinar G, Gallist B, Lubitz W, Haslberger AG. 2005. Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing. *Food Chem Toxicol* 43: 1595-1605.
- Hershfield V, Boyer HW, Yanofsky C, Lovett MA, Helinski DR. 1974. Plasmid ColEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 3455-3459.
- Hsia AP, Wen TJ, Chen HD, Liu Z, Yandau-Nelson MD, Wei Y, Guo L, Schnable PS. 2005. Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE)--a tool for the high-throughput discovery and mapping of SNPs and IDPs. *Theor Appl Genet* 111: 218-225.
- Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20: 2317-2319.

Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. 1987. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238: 650-656.

Lan PT, Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiol Immunol* 46: 371-382.

Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69: 6816-6824.

Moeseneder MM, Winter C, Arrieta JM, Herndl GJ. 2001. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J Microbiol Methods* 44: 159-172.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.

Nielsen JL, Schramm A, Bernhard AE, van den Engh GJ, Stahl DA. 2004. Flow cytometry-assisted cloning of specific sequence motifs from complex 16S rRNA gene libraries. *Appl Environ Microbiol* 70: 7550-7554.

Righetti PG, Gelfi C. 1997. Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis* 18: 1709-1714.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Schramm A, Fuchs BM, Nielsen JL, Tonolla M, Stahl DA. 2002. Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environ Microbiol* 4: 713-720.

Shaper NL, Shaper JH, Meuth JL, Fox JL, Chang H, Kirsch IR, Hollis GF. 1986. Bovine galactosyltransferase: identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1573-1577.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 232-236.

Shen J, Zhang B, Wei G, Pang X, Wei H, Li M, Zhang Y, Jia W, Zhao L. 2006. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol* 72: 5232-5238.

Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 24: 3381-3391.

Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 68: 124-137.

III. B. 2. Conclusion sur la technique CSbyDG

Sur les quelques stratégies déjà proposées par la littérature pour cribler les clones d'une banque, aucune ne fournit une « introspection » aussi poussée que celle proposée par la CSbyDG. Les résultats obtenus sur les deux banques tests prouvent que la CSbyDG environnementale permet une sélection juste des clones et qu'elle est capable de discriminer des clones dont le polymorphisme trop proche serait, avec d'autres techniques, considéré comme identique.

La CSbyDG pourrait donc offrir une capacité de criblage de clones d'intérêt dans de nombreuses applications où l'usage du clonage en tant qu'outil d'isolement moléculaire est employé. En outre, sa composante spécialement dédiée aux études environnementales, la CSbyDG environnementale, prouve dans cette étude toutes ses capacités en limitant très significativement le nombre de clones à séquencer et réduisant ainsi de fait le coût de l'étude.

Les perspectives d'une telle technique pourraient se révéler intéressantes dans nombre de domaines et particulièrement en identification bactérienne. Celles-ci sont discutées dans le paragraphe suivant.

III. B. 3. Perspectives d'utilisation de la technique de CSbyDG

De nombreuses perspectives sont envisageables à plus ou moins long terme pour la technique de CSbyDG, d'un point de vue applicatif et d'un point de vue technique.

Les applications pouvant profiter d'un outil de criblage de clones comme le propose la CSbyDG sont nombreuses. En fait, tout emploi du clonage comme outil d'isolement moléculaire peut trouver une utilité dans la CSbyDG à condition que le polymorphisme des inserts justifie son emploi. Dans l'article présenté, la CSbyDG a trouvé tout naturellement sa place dans un criblage des clones de banques issues d'études environnementales (CSbyDG environnementale).

D'un point de vue technique, l'article présenté relate les différentes améliorations possibles de la CSbyDG. Transposable tout d'abord en électrophorèse capillaire par la TG-CZE, la CSbyDG gagnerait alors en reproductibilité et bénéficierait d'un gain de temps appréciable particulièrement en 96 capillaires. De même, utiliser les capacités de la PCR

quantitative à déterminer les T_m des fragments amplifiés permettrait de réaliser les « profils » de la CSbyDG en un temps très limité. Il faudra cependant auparavant rendre compatible les jeux d'amorces avec la qPCR.

Enfin, le paragraphe qui suit va présenter l'une des perspectives de la CSbyDG certainement des plus intéressantes : la CSbyDG database.

III. C. CSbyDG database : une suite logique à la CSbyDG

Les profils tri-bandes obtenus en CSbyDG sont spécifiques d'un ADNr 16S donné et ainsi d'une bactérie donnée, une base de données des profils initialement acquis permettrait donc d'identifier la bactérie d'origine de l'insert sans séquençage. Le séquençage des inserts deviendrait ainsi inutile et seuls les clones présentant un profil inconnu de la base requerraient alors un séquençage.

Sur cette idée, nous envisageons donc de créer une base de données des profils déjà obtenus lors de l'étude des flores digestives du poulet. Ayant séquencé l'insert pour chaque groupe de profils identifié, il sera donc aisé d'associer un profil donné à une bactérie donnée ou du moins à la bactérie ou au groupe de bactéries le plus proche dans les bases de données du gène de l'ARN 16S. Par mesure de simplification, seuls les profils majoritaires seront exploités. Sur ces profils, de nouvelles migrations, au nombre de quatre, seront effectuées afin d'acquérir une bonne précision des distances de migration et une moyenne des distances de migration des quatre gels sera effectuée. En outre, afin d'affecter la bonne assignation à chaque bande (fragment A, B ou C), des migrations avec seulement une bande par puits seront effectués pour chaque groupe de profils identifié. Ainsi, disposant de cette information supplémentaire, les identifications ne devraient en être que plus précises.

Diverses questions restent cependant ouvertes quand à la validité d'une telle base de données :

1) Un profil CSbyDG est-il réellement spécifique d'une seule espèce bactérienne ou deux bactéries peuvent-elles présenter le même profil ? En d'autre terme peut-on affirmer que la base de données sera universelle ou sera-t-elle simplement valable pour un type

d'échantillon donné et uniquement sur ce type là (ex : flore digestive, flore humique, flore fromagère, base de pathogènes, etc...) ?

2) Qu'en est-il phylogénétiquement parlant ? Les profils obtenus en CSbyDG ont-ils un lien de parenté phylogénétique ? On pourrait le penser car les profils de CSbyDG sont dépendants du Tm des fragments et ce dernier est dépendant de la séquence de l'ADNr 16S, elle-même proposant un lien de parenté entre bactéries. Certes, la relation phylogénie/profil n'est pas directe et des biais doivent donc exister. L'important est de pouvoir quantifier et bien définir ces biais. Il s'agira donc, par exemple, de comparer la phylogénie obtenue sur un arbre phylogénétique classique de l'ensemble des individus connus d'un genre bactérien avec celle obtenue sur un arbre de type dendrogramme des profils CSbyDG des mêmes souches.

3) Si phylogénie des profils il existe, est-elle limitée aux souches, aux espèces, aux genres ou à un tout autre degré de parenté ? Autrement dit, quel est le degré de fiabilité des profils de CSbyDG ? Sont-ils fiables au niveau de l'espèce ? Divergent-ils au niveau des souches ? Pour répondre à ces interrogations, il nous faudra donc entreprendre des tests sur des souches différentes de la même espèce ainsi que sur des espèces connues pour la difficulté de leur discrimination sur la simple comparaison de la séquence de leur gène de l'ARN 16S. Ainsi, selon que les profils de CSbyDG de ces bactéries seront identiques ou discriminants, nous pourrons établir le degré de précision taxinomique de la technique.

En conclusion de ce troisième chapitre, l'ensemble formé par la technique de CSbyDG et par le programme ProReg XL Tool offre un nouvel outil de criblage de clones, de meilleure qualité et de meilleure efficacité que des techniques précédentes de criblage tel que la RFLP. Ce criblage permet alors, couplé au clonage du gène de l'ADNr 16S, de fournir un puissant outil d'identification bactérienne à la précision nettement meilleur qu'un simple gel à gradient dénaturant.

La CSbyDG, en tant que technique de criblage de clones moléculaires, peut être utilisée pour cribler tous types de banque de clones si ceux-ci sont compatibles avec les critères de la technique (cf. article). Son coût de revient par clone reste modeste (largement inférieur à celui d'un séquençage complet de la banque) et le temps nécessaire à sa complétion reste compétitif (de l'ordre de quelques dizaines à la centaine de clones criblés par jour, selon le type et le nombre de cuves DGGE dont disposent l'utilisateur). La CSbyDG, bien que totalement opérationnelle en l'état est efficace mais reste perfectible notamment dans l'amélioration de la reproductibilité des profils.

ProReg XL Tool est le compagnon indispensable à la technique de la CSbyDG. Il a en effet été pensé dans l'optique d'une utilisation croisée avec cette technique de criblage et permet donc de regrouper efficacement les profils à trois bandes obtenus par la CSbyDG ainsi que de déterminer l'épuisement d'une banque et dessiner des graphes en camembert des résultats des séquençages. Cependant, ProReg XL Tool peut également être employé avec toutes sortes d'applications électrophorétiques où un regroupement strict des profils est nécessaire.

D'un point de vue de l'exploration des flores digestives du poulet, la CSbyDG a permis, couplé au programme ProReg XL Tool, de sélectionner un nombre restreint de clones à séquencer afin de mettre en évidence les espèces bactériennes présentes dans les étages iléal et caecal de l'appareil digestif du poulet.

Enfin, il faut noter le possible futur emploi de la CSbyDG comme technique d'identification bactérienne. Cette dernière application reposerait sur l'emploi de bases de données de profils dont les séquençages seraient déjà connus et où le nom d'une bactérie y aurait été associé. De même, toujours dans un esprit d'innovation dans le domaine de l'identification bactérienne, la transcription de la CSbyDG, de la DGGE classique vers l'électrophorèse capillaire avec fluorochromes ou vers la PCR quantitative polychromatique,

offrirait de nouvelles possibilités fortement attractives aux vues de leur reproductibilité, de leur coût et de leur rapidité. A terme, une bactérie pourrait être identifiée en une à deux heures.

CONCLUSION GENERALE

La connaissance de la diversité du Vivant est un enjeu de taille tant sur le plan fondamental que sur les plans médical, industriel et biotechnologique. Connaître la biodiversité c'est un peu se connaître soi-même tant nos symbiotes bactériens nous sont indispensables et aussi un peu connaître l'univers dans lequel nous évoluons. Mais c'est aussi un avantage redoutable pour comprendre les origines de la Vie, son évolution et ses ressources inépuisables et inexploitées.

De cet engouement pour la connaissance de la biodiversité est né un nouvel intérêt pour les flores digestives. Peu connues car difficiles à investiguer jusqu'alors, regorgeant d'une diversité encore difficile à délimiter aujourd'hui et mise en cause dans de nombreux aspects de la santé de leur hôte, les microflore du tractus digestif connaissent un regain d'intérêt de plus en plus important.

Dans cet écrit, l'exploration des flores digestives du poulet par les techniques de DGGE et de CSbyDG ont permis d'affiner plus en profondeur les connaissances sur le microbiote du poulet. Sa méconnaissance incombe principalement au manque de moyens consacrés à son étude, les principaux travaux en le domaine étant entrepris par des industriels en agroalimentaire, peu enclin à des dépenses en recherche fondamentale sur le sujet. La CSbyDG a permis, par la relative modestie de ses coûts, de s'ajourner de ces problèmes pécuniaires et de décrypter un peu plus encore cette forêt vierge qu'est la microbiocénose du tractus digestif du poulet d'élevage. Aucune étude, jusqu'à présent, n'avait pratiqué un clonage aussi intensif sur des échantillons de fèces de poulet, avec près de 1200 clones pour l'échantillon du contenu caecal et près de 400 avec celui du contenu intestinal et ce en séquençage complet de l'ADNr 16S. L'utilisation combinée de la CSbyDG et de la DGGE, en croisant les données des séquençages obtenues par les deux techniques, a également permis de renforcer l'information taxinomique des bandes des profils DGGE tout en limitant le nombre de clonages à effectuer, les comparaisons étant directement effectuées sur les profils DGGE et non sur de multiples clonages. Ces travaux sont une base et un prérequis pour la réalisation de futures études sur les flores digestives des Galliformes où la DGGE pourra être avantageusement remplacée par des techniques plus rapides comme les microarrays.

L'action de l'antibiotique avilamycine, employé jusqu'à son interdiction en tant que facteur de croissance pour accroître le rendement des exploitations avicoles, a été examinée et

déterminée sur des échantillons de flores du poulet. Des effets sur l'équilibre de la flore digestive du poulet d'élevage de diverses suppléments alimentaires tel que des huiles essentielles de diverses plantes aromatiques et du scFOS ont pu également être démontrés par les travaux présentés. Leur action semble principalement s'appliquer sur le genre *Lactobacillus* à l'étage intestinal, peu de différences étant observables par exemple sur les échantillons de contenus caecaux. Ces suppléments offrent donc une alternative possible aux antibiotiques en tant que facteurs de croissance face à leur récente interdiction par l'Union Européenne en janvier 2006. Pour s'assurer de la pertinence de cet usage, des expérimentations complémentaires devront être entreprises comme des essais en bioréacteur (simulant le système digestif) et des suivis spécifiques des genres bactériens ayant montrés une sensibilité pour ces suppléments au cours des expériences passées.

Un putatif pathogène des entérites non-spécifiques de la dinde d'élevage a pu être mis en évidence dans le microbiote digestif de dindes malades. Cette bactérie a été découverte par l'association des techniques de DGGE et de clonage. Compte-tenu de la position de la séquence de son gène de l'ARN 16S dans l'arbre phylogénétique, ce pathogène serait apparenté avec *Clostridium lituseburense*, bactérie déjà connue pour sa virulence. Toujours à partir de la séquence de son ADNr 16S, des amorces spécifiques ont été dessinées et ont permis par PCR semi-quantitative d'observer sa présence 100 fois supérieure chez les dindes atteintes. Dans un futur proche, de nouveaux essais sur des dindes diarrhéiques doivent confirmer l'implication de cette bactérie dans cette pathologie digestive. L'isolement de cette souche pathogène permettrait également d'étudier sa virulence par des tests de contamination (« challenge-tests ») et par la recherche de gènes de virulence présents sur son génome.

Si le code de ProReg XL Tool mériterait certainement quelques remaniements de puriste, il n'en demeure pas moins fonctionnel et il jouit d'une rapidité d'exécution largement satisfaisante dans le cadre de ses applications et de ses limites (à savoir nombre de bandes limité à 50 et nombre de profils à 4000). Outre donc ces quelques modifications possibles, l'auteur souhaite implémenter ProReg XL Tool de nouvelles fonctionnalités. La principale représenterait un gain de temps considérable pour l'utilisateur puisqu'il s'agirait d'introduire un module de détection des distances de migration des bandes directement à partir des photos de gels sans avoir à passer par un programme tierce dédié à cette fonction.

La feuille principale d'interaction du programme présente deux étapes en cours de développement. La première d'entre elles permettra à terme de définir les similitudes observables entre profils. La seconde permettra tout simplement de réaliser des représentations schématiques des profils de migration organisés selon les résultats obtenus par la première étape en développement. Puis dans un avenir plus lointain, si le besoin en termes de performance s'en faisait ressentir, le programme pourrait être porté dans un langage plus performant, en C par exemple, en gagnant ainsi, d'un côté, en rapidité et ce sans nécessité son exécution exclusive sous environnement Windows et sous Excel mais, d'un autre côté, en perdant en flexibilité car nombre de fonctions propres à Excel ne pourraient être implémentées dans une telle version.

A ce jour, la technique de criblage de clones CSbyDG, comme présentée et décrite dans le présent manuscrit, est praticable sur des banques de clones dont l'insert est le gène de l'ARN 16S. Sa fiabilité et son efficacité en ce domaine ont été prouvées au cours de ces pages. Cette nouvelle approche pourrait, néanmoins, voir le champ de ses applications grandir. En effet, comme précisé dans l'article qui lui est dédié et exposé dans ce manuscrit, la CSbyDG peut être employée sur n'importe quelle banque de clones compatible, soit : 1) l'insert est de taille inférieure à 600 Nt, ou 2) l'insert contient au moins une séquence « universelle » qui permettrait l'amplification avec une amorce du vecteur d'au moins un fragment de moins de 600 Nt, ou, enfin 3) l'insert contient plusieurs sites « universels » permettant de générer des fragments inférieurs à 600 Nt. Ainsi, si l'une de ces trois conditions est remplie, n'importe quelle banque de clones peut être criblé par la technique de CSbyDG, qu'elle soit d'origine bactérienne ou autre ou qu'elle soit issue du gène de l'ADNr 16S ou d'un autre gène ou séquence.

En outre, un déplacement de la technique, des gels à gradients dénaturants vers l'électrophorèse capillaire ou la PCR quantitative, permettrait un gain de reproductivité et de temps plus qu'intéressant. Couplé à ces techniques et une base de données de profils, la CSbyDG pourrait devenir un puissant outil d'identification bactérienne. A terme, une bactérie pourrait être identifiée en quelques heures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1927. The Influence of Symbiosis on Micro-Organisms: The Evolution of Parasitism. *Cal West Med* 26: 80-81.
- Ahmadjian V. 1965. Lichens. *Annu Rev Microbiol* 19: 1-20.
- Aiba H, Fujimoto S, Ozaki N. 1982. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res* 10: 1345-1361.
- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* 112 Pt 18: 2993-3002.
- Alpert C, Sczesny S, Gruhl B, Blaut M. 2008. Long-term stability of the human gut microbiota in two different rat strains. *Curr Issues Mol Biol* 10: 17-24.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919-1925.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.
- Anthony FJ, Baker KB, Miller DJ, Young RC, Baird JH. 2003. Antibiotic growth promoters. *Vet Rec* 153: 408.
- Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, Jones AJ, Weightman AJ. 2006. New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Appl Environ Microbiol* 72: 5734-5741.
- Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Löffler T, Buchler MW, Schmidt J. 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54: 944-949.
- Babcock DA, Wawrik B, Paul JH, McGuinness L, Kerkhof LJ. 2007. Rapid screening of a large insert BAC library for specific 16S rRNA genes using TRFLP. *J Microbiol Methods* 71: 156-161.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-1920.
- Baer JG. 1956. The taxonomic position of *Taenia madagascariensis* Davaine, 1870, a tapeworm parasite of man and rodents. *Ann Trop Med Parasitol* 50: 152-156.
- Bain MD, Jones M, Borriello SP, Reed PJ, Tracey BM, Chalmers RA, Stacey TE. 1988. Contribution of gut bacterial metabolism to human metabolic disease. *Lancet* 1: 1078-1079.
- Bajzer M, Seeley RJ. 2006. Physiology: obesity and gut flora. *Nature* 444: 1009-1010.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods* 55: 541-555.
- Barik S, Brulla WJ, Bryant MP. 1985. PA-1, a Versatile Anaerobe Obtained in Pure Culture, Catabolizes Benzenoids and Other Compounds in Syntrophy with Hydrogenotrophs, and P-2 plus *Wolinella* sp. Degrades Benzenoids. *Appl Environ Microbiol* 50: 304-310.
- Barker SC. 1996. Lice, cospeciation and parasitism. *Int J Parasitol* 26: 219-222.
- Barreto M, Barreto P, Burbano ME. 2001. Phoresy of a louse (*Mallophaga: Philopteridae*) on a mosquito from Cali, Colombia. *J Am Mosq Control Assoc* 17: 84.
- Bauman JG, Bentvelzen P. 1988. Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent in situ hybridization. *Cytometry* 9: 517-524.

- Belyi Y. 1999. Intracellular parasitism and molecular determinants of *Legionella* virulence. *Int Microbiol* 2: 145-154.
- Bevilacqua A, Cibelli F, Cardillo D, Altieri C, Sinigaglia M. 2008. Metabiotic effects of *Fusarium spp.* on *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on raw portioned tomatoes. *J Food Prot* 71: 1366-1371.
- Bibiloni R, Simon MA, Albright C, Sartor B, Tannock GW. 2005. Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. *Lett Appl Microbiol* 41: 45-51.
- Bittner AC, Croffut RM, Stranahan MC. 2005. Prescript-Assist probiotic-prebiotic treatment for irritable bowel syndrome: a methodologically oriented, 2-week, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical study. *Clin Ther* 27: 755-761.
- Blaut M, Collins MD, Welling GW, Dore J, van Loo J, de Vos W. 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *Br J Nutr* 87 Suppl 2: S203-211.
- Blok HJ, Gohlke AM, Akkermans AD. 1997. Quantitative analysis of 16S rDNA using competitive PCR and the QPCR System 5000. *Biotechniques* 22: 700-704.
- Boedeker EC. 2000. Crohn's mucosa harbors adherent-invasive *E. coli*. *Inflamm Bowel Dis* 6: 155.
- Bornstein S. 1940. Action of Penicillin on *Enterococci* and Other *Streptococci*. *J Bacteriol* 39: 383-387.
- Bories G, Louisot P. 1998. Rapport concernant l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance en alimentation animale.
- Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris DJ, Spais AB. 2002. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br Poult Sci* 43: 223-230.
- Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Giannenas I, Spais AB. 2004. Performance of rabbits and oxidative stability of muscle tissues as affected by dietary supplementation with oregano essential oil. *Arch Anim Nutr* 58: 209-218.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. 1999. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun* 67: 4499-4509.
- Bourlioux P. 1994. Ecologie Microbienne du Tractus Digestif Humain. *Bactéries lactiques* Vol.1: 369-381.
- Bowden DW, Muller-Kahle H, Gravius TC, Helms C, Watt-Morgan D, Green P, Donis-Keller H. 1989. Identification and characterization of 23 RFLP loci by screening random cosmid genomic clones. *Am J Hum Genet* 44: 671-678.
- Brisbin JT, Gong J, Sharif S. 2008. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Anim Health Res Rev* 9: 101-110.
- Britaev TA, Zamyshlyak EA. 1994. The biology of a commensal polychaete *Gastrolepidia clavigera* (*Polychaeta, Polynoidae*) with remarks on the biology of host holothurians (*Holothuriidae, Stichopodidae*). *Zoologicheskii Zhurnal* 73: 39-53.
- Brodie EL, et al. 2006. Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Appl Environ Microbiol* 72: 6288-6298.
- Bruyer D, Giec R, Mombaerts R, Korniewicz A. 2001. Effect of a bacterial xylanase and/or antibiotic growth promoter on zootechnical performances of piglets fed arabinoxylan rich diets. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* 66: 467-468.
- Burr MD, Clark SJ, Spear CR, Camper AK. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microb Ecol* 51: 479-486.

Cai SP, Kan YW. 1990. Identification of the multiple beta-thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Invest* 85: 550-553.

Carraminana JJ, Rota C, Burillo J, Herrera A. 2008. Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. *J Food Prot* 71: 502-508.

Cartwright RY. 1974. Commensal bacteria of the human gastro-intestinal tract. *Nurs Times* 70: 705-706.

Cassler M, Peterson CL, Ledger A, Pomponi SA, Wright AE, Winegar R, McCarthy PJ, Lopez JV. 2008. Use of real-time qPCR to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. *Microb Ecol* 55: 384-394.

Castanon JI. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 86: 2466-2471.

Castiglioni B, et al. 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rna gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 7161-7172.

Chapkin RS, Ziboh VA, McCullough JL. 1987. Dietary influences of evening primrose and fish oil on the skin of essential fatty acid-deficient guinea pigs. *J Nutr* 117: 1360-1370.

Choe J, Guo HH, van den Engh G. 2005. A dual-fluorescence reporter system for high-throughput clone characterization and selection by cell sorting. *Nucleic Acids Res* 33: e49.

Clarke L, Carbon J. 1975. Biochemical construction and selection of hybrid plasmids containing specific segments of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 4361-4365.

Cleveland LR. 1923. Symbiosis between Termites and Their Intestinal Protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9: 424-428.

Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 3240-3244.

Cole JR, et al. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31: 442-443.

Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* 35: D169-172.

Colin R. Jackson EER, and Perry F. Churchill. 2000. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Can Fail to Separate 16S rDNA Fragments with Multiple Base Differences. *Molecular Biology Today* 1: 49-51.

Collignon P. 2004. Antibiotic growth promoters. *J Antimicrob Chemother* 54: 272; author reply 276-278.

Collins M, Wolf SF, Haines LL, Mitsock L. 1989. The use of denaturing gradient gel electrophoresis to screen for DNA sequence polymorphisms in the human factor VIII gene. *Electrophoresis* 10: 390-396.

Corthier G. 2004. The health benefits of probiotics. *Danone Nutritopics* 29:1-17.

Cruz T, Cabo MP, Cabo MM, Jimenez J, Cabo J, Ruiz C. 1989. In vitro antibacterial effect of the essential oil of *Thymus longiflorus* Boiss. *Microbios* 60: 59-61.

Dainty RH, Edwards RA, Hibbard CM, Ramantanis SV. 1986. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. *J Appl Bacteriol* 61: 117-123.

Dalby AB, Frank DN, St Amand AL, Bendele AM, Pace NR. 2006. Culture-independent analysis of indomethacin-induced alterations in the rat gastrointestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 72: 6707-6715.

- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. 1998. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 115: 1405-1413.
- Davies KE, Young BD, Elles RG, Hill ME, Williamson R. 1981. Cloning of a representative genomic library of the human X chromosome after sorting by flow cytometry. *Nature* 293: 374-376.
- Day IN, O'Dell SD, Cash ID, Humphries SE, Weavind GP. 1995. Electrophoresis for genotyping: temporal thermal gradient gel electrophoresis for profiling of oligonucleotide dissociation. *Nucleic Acids Res* 23: 2404-2412.
- de Vrese M, Marteau PR. 2007. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr* 137: 803S-811S.
- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol* 10: 37-54.
- DeLong EF, Wickham GS, Pace NR. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.
- Demerec M. 1948. Origin of Bacterial Resistance to Antibiotics. *J Bacteriol* 56: 63-74.
- DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14: 457-460.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72: 5069-5072.
- DeSantis TZ, Brodie EL, Moberg JP, Zubieta IX, Piceno YM, Andersen GL. 2007. High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb Ecol* 53: 371-383.
- Deslauriers N, Coulombe C, Carre B, Goulet JP. 1995. Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 11: 45-55.
- Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 449: 811-818.
- Dinoto A, Suksomcheep A, Ishizuka S, Kimura H, Hanada S, Kamagata Y, Asano K, Tomita F, Yokota A. 2006. Modulation of rat cecal microbiota by administration of raffinose and encapsulated *Bifidobacterium breve*. *Appl Environ Microbiol* 72: 784-792.
- Dobrowolski SF, Banas RA, Naylor EW, Powdrill T, Thakkar D. 1999. DNA microarray technology for neonatal screening. *Acta Paediatr Suppl* 88: 61-64.
- Drancourt M, Raoult D. 2002. rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 40: 1333-1338.
- Dumonceaux TJ, Hill JE, Hemmingsen SM, Van Kessel AG. 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 72: 2815-2823.
- Edwards RA, Dainty RH, Hibbard CM. 1985. Putrescine and cadaverine formation in vacuum packed beef. *J Appl Bacteriol* 58: 13-19.

- Elwinger K, Berndtson E, Engstrom B, Fossum O, Waldenstedt L. 1998. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. *Acta Vet Scand* 39: 433-441.
- Engster HM, Carew LB, Jr., Cunningham FJ. 1978. Effects of an essential fatty acid deficiency, pair-feeding and level of dietary corn oil on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and other physiological parameters in the male chicken. *J Nutr* 108: 889-900.
- Evason DJ, Claydon MA, Gordon DB. 2001. Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 12: 49-54.
- Fava F, Lovegrove JA, Gitau R, Jackson KG, Tuohy KM. 2006. The gut microbiota and lipid metabolism: implications for human health and coronary heart disease. *Curr Med Chem* 13: 3005-3021.
- Felske A, Wolterink A, van Lis R, de Vos WM, Akkermans AD. 1999. Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. *FEMS Microbiol Ecol* 30: 137-145.
- Fink JK, Peacock ML, Warren JTJ, Roses AD, Prusiner SB. 1994. Detecting prion protein gene mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 4: 42-50.
- Fischer SG, Lerman LS. 1983. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1579-1583.
- Flammang P, Ribesse J, Jangoux M. 2002. Biomechanics of adhesion in sea cucumber cuvierian tubules (*echinodermata, holothuroidea*). *Integrative and Comparative Biology*.
- Fleischmann RD, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
- Fodde R, Losekoot M. 1994. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat* 3: 83-94.
- Fontana C, Vignolo G, Coconcelli PS. 2005. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *J Microbiol Methods* 63: 254-263.
- Forcione DG, Rosen MJ, Kisiel JB, Sands BE. 2004. Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibody (ASCA) positivity is associated with increased risk for early surgery in Crohn's disease. *Gut* 53: 1117-1122.
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64: 3336-3345.
- Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, Kobayashi T, Sekita Y, Seo T, Sakamoto C. 2007. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 22: 1199-1204.
- Füller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365-378.
- Garcia-Martinez J, Bescos I, Rodriguez-Sala JJ, Rodriguez-Valera F. 2001. RISSC: a novel database for ribosomal 16S-23S RNA genes spacer regions. *Nucleic Acids Res* 29: 178-180.
- Gelfi C, Righetti PG, Cremonesi L, Ferrari M. 1994. Detection of point mutations by capillary electrophoresis in liquid polymers in temporal thermal gradients. *Electrophoresis* 15: 1506-1511.
- Gelfi C, Cremonesi L, Ferrari M, Righetti PG. 1996. Temperature-programmed capillary electrophoresis for detection of DNA point mutations. *Biotechniques* 21: 926-928, 930, 932.
- Gelfi C, Righetti PG, Travi M, Fattore S. 1997. Temperature-programmed capillary electrophoresis for the analysis of high-melting point mutants in thalassemias. *Electrophoresis* 18: 724-731.

- Gelfi C, Cremonesi L, Ferrari M, Righetti PG. 2001. Point mutation detection by temperature-programmed capillary electrophoresis. *Methods Mol Biol* 163: 73-88.
- Gerard P, Brezillon C, Quere F, Salmon A, Rabot S. 2008. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered *Lactobacillus* probiotic strain in the broiler chicken. *J Mol Microbiol Biotechnol* 14: 115-122.
- Gerds G, Luedke G. 2006. FISH and chips: marine bacterial communities analyzed by flow cytometry based on microfluidics. *J Microbiol Methods* 64: 232-240.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312: 1355-1359.
- Gilmore MS, Ferretti JJ. 2003. Microbiology. The thin line between gut commensal and pathogen. *Science* 299: 1999-2002.
- Ginovart M, Lopez D, Valls J, Silbert M. 2002. Simulation modelling of bacterial growth in yoghurt. *Int J Food Microbiol* 73: 415-425.
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol* 170: 720-726.
- Gong J, Si W, Forster RJ, Huang R, Yu H, Yin Y, Yang C, Han Y. 2007. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol Ecol* 59: 147-157.
- Gram L, Ravn L, Rasch M, Bruhn JB, Christensen AB, Givskov M. 2002. Food spoilage--interactions between food spoilage bacteria. *Int J Food Microbiol* 78: 79-97.
- Gurtler V, Stanisich VA. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142 (Pt 1): 3-16.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hamel JF, Mercier A. 1999. Life cycle of the pea crab *Pinnotheres halingi* sp nov., an obligate symbiont of the sea cucumber *Holothuria scabra* Jaeger. *Ophelia* 50: 149-175.
- Handschr M, Pinar G, Gallist B, Lubitz W, Haslberger AG. 2005. Culture free DGGE and cloning based monitoring of changes in bacterial communities of salad due to processing. *Food Chem Toxicol* 43: 1595-1605.
- Hanske L, Hussong R, Frank N, Gerhauser C, Blaut M, Braune A. 2005. Xanthohumol does not affect the composition of rat intestinal microbiota. *Mol Nutr Food Res* 49: 868-873.
- Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. 1993. Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res Microbiol* 144: 489-493.
- Hardman WE, Cameron IL. 1995. Site specific reduction of colon cancer incidence, without a concomitant reduction in cryptal cell proliferation, in 1,2-dimethylhydrazine treated rats by diets containing 10% pectin with 5% or 20% corn oil. *Carcinogenesis* 16: 1425-1431.
- Harley JL, Smith SE. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press Inc., London and New-York.
- Harmsen H, Prieur D, Jeanthon C. 1997. Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes To Identify Thermophilic Bacteria in Marine Hydrothermal Vents. *Appl Environ Microbiol* 63: 4061-4068.
- Haslam S. 2003. Antibiotic growth promoters. *Vet Rec* 153: 692.

- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. 2002. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 46: 535-548.
- Helinski DR. 1977. Plasmids as vectors for gene cloning. *Basic Life Sci* 9: 19-49.
- Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. 1997. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2150-2155.
- Hershfield V, Boyer HW, Yanofsky C, Lovett MA, Helinski DR. 1974. Plasmid ColEI as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71: 3455-3459.
- Herz G. 1976. Bacterial flora of the healthy skin in children. *J Int Med Res* 4: 367-374.
- Heyrman J, Balcaen A, De Vos P, Schumann P, Swings J. 2002. *Brachybacterium fresconis* sp. nov. and *Brachybacterium sacelli* sp. nov., isolated from deteriorated parts of a medieval wall painting of the chapel of Castle Herberstein (Austria). *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1641-1646.
- Higuchi M, Antonarakis SE, Kasch L, Oldenburg J, Economou-Petersen E, Olek K, Arai M, Inaba H, Kazazian HHJ. 1991. Molecular characterization of mild-to-moderate hemophilia A: detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8307-8311.
- Hill JE, Paccagnella A, Law K, Melito PL, Woodward DL, Price L, Leung AH, Ng LK, Hemmingsen SM, Goh SH. 2006. Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *J Med Microbiol* 55: 393-399.
- Hirayama K, Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2: 681-686.
- Hooper LV, Gordon JI. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115-1118.
- Hovig E, Smith-Sorensen B, Brogger A, Borresen AL. 1991. Constant denaturant gel electrophoresis, a modification of denaturing gradient gel electrophoresis, in mutation detection. *Mutat Res* 262: 63-71.
- Hsia AP, Wen TJ, Chen HD, Liu Z, Yandean-Nelson MD, Wei Y, Guo L, Schnable PS. 2005. Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE)--a tool for the high-throughput discovery and mapping of SNPs and IDPs. *Theor Appl Genet* 111: 218-225.
- Hubener K, Vahjen W, Simon O. 2002. Bacterial responses to different dietary cereal types and xylanase supplementation in the intestine of broiler chicken. *Arch Tierernahr* 56: 167-187.
- Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics* 20: 2317-2319.
- Hughes-Stamm SR, Cribb TH, Jones MK. 1999. Structure of the tegument and ectocommensal microorganisms of *Gyliachen nahaensis* (*Digenea: Gyliachenidae*), an inhabitant of herbivorous fish of the Great Barrier Reef, Australia. *J Parasitol* 85: 1047-1052.
- Huss HH, Pedersen A. 1979. *Clostridium botulinum* in fish. *Nord Vet Med* 31: 214-221.
- Huyghe A, Francois P, Charbonnier Y, Tangomo-Bento M, Bonetti EJ, Paster BJ, Bolivar I, Baratti-Mayer D, Pittet D, Schrenzel J. 2008. Novel microarray design strategy to study complex bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 74: 1876-1885.
- Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW. 2005. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7952-7957.

- Iizuka M, Konno S, Itou H, Chihara J, Toyoshima I, Horie Y, Sasaki K, Sato A, Shindo K, Watanabe S. 2004. Novel evidence suggesting *Clostridium difficile* is present in human gut microbiota more frequently than previously suspected. *Microbiol Immunol* 48: 889-892.
- Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. 2001. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73: 444S-450S.
- Jameson JE. 1962. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *J Hyg (Lond)* 60: 193-207.
- Jarman KH, Cebula ST, Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Kingsley MT, Wahl KL. 2000. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72: 1217-1223.
- Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM. 1998. Comparison of ARDRA and recA-RFLP analysis for genomic species identification of *Acinetobacter spp.* *FEMS Microbiol Lett* 165: 357-362.
- Joachimsthal EL, Ivanov V, Tay ST, Tay JH. 2004. Bacteriological examination of ballast water in Singapore Harbour by flow cytometry with FISH. *Mar Pollut Bull* 49: 334-343.
- Jorgensen LV, Huss HH, Dalgaard P. 2000. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J Appl Microbiol* 89: 920-934.
- Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* 76: 626-631.
- Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus strain*. *Pediatr Res* 32: 141-144.
- Kaliszewski M, Athias-Binche F, Lindquist EE. 1995. Parasitism and parasitoidism in *Tarsonemina (Acari: Heterostigmata)* and evolutionary considerations. *Adv Parasitol* 35: 335-367.
- Kapoor KK, Jain MK, Mishra MM, Singh CP. 1978. Cellulase activity, degradation of cellulose and lignin and humus formation by cellulolytic fungi. *Ann Microbiol (Paris)* 129 B: 613-620.
- Kenzaka T, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. 1998. rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiology* 144 (Pt 8): 2085-2093.
- Khamis A, Raoult D, La Scola B. 2004. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol* 42: 3925-3931.
- Khan M, Raoult D, Richet H, Lepidi H, La Scola B. 2007. Growth-promoting effects of single-dose intragastrically administered probiotics in chickens. *Br Poult Sci* 48: 732-735.
- Kibe R, Sakamoto M, Yokota H, Ishikawa H, Aiba Y, Koga Y, Benno Y. 2005. Movement and fixation of intestinal microbiota after administration of human feces to germfree mice. *Appl Environ Microbiol* 71: 3171-3178.
- Kilibarda V, Nanusevic N, Dogovic N, Ivanic R, Savin K. 1996. Content of the essential oil of the carrot and its antibacterial activity. *Pharmazie* 51: 777-778.
- Kim BC, Park JH, Gu MB. 2005. Multiple and simultaneous detection of specific bacteria in enriched bacterial communities using a DNA microarray chip with randomly generated genomic DNA probes. *Anal Chem* 77: 2311-2317.
- Kim MN, et al. 2008. The effects of probiotics on PPI-triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter* 13: 261-268.
- Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. 2001. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 29: 181-184.

- Klocke M, Mundt K, Idler C, McEniry J, O'Kiely P, Barth S. 2006. Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. *Syst Appl Microbiol* 29: 49-58.
- Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. 1987. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238: 650-656.
- Krasnov BR, Stanko M, Morand S. 2006. Age-dependent flea (*Siphonaptera*) parasitism in rodents: a host's life history matters. *J Parasitol* 92: 242-248.
- Krieg NR, Pelczar MJ, Jr. 1961. Analysis of a syntrophic growth of *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus faecalis*. *J Gen Microbiol* 25: 77-86.
- Kristensen AT, Bjorheim J, Ekstrom PO. 2002. Detection of mutations in exon 8 of TP53 by temperature gradient 96-capillary array electrophoresis. *Biotechniques* 33: 650-653.
- Kulesh DA, Clive DR, Zarlenga DS, Greene JJ. 1987. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8453-8457.
- La Scola B, Bui LT, Baranton G, Khamis A, Raoult D. 2006. Partial rpoB gene sequencing for identification of *Leptospira* species. *FEMS Microbiol Lett* 263: 142-147.
- Lan PT, Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. 2002. Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiol Immunol* 46: 371-382.
- Lan PT, Sakamoto M, Benno Y. 2004. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiol Immunol* 48: 917-929.
- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6955-6959.
- Larkin TA, Astheimer LB, Price WE. 2007. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total and LDL cholesterol in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr*.
- Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, Brown PO, Davis RW. 1997. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13057-13062.
- Le Blay GM, Michel CD, Blottiere HM, Cherbut CJ. 2003. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J Appl Microbiol* 94: 312-320.
- Le Bourhis AG, Saunier K, Dore J, Carlier JP, Chamba JF, Popoff MR, Tholozan JL. 2005. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium spp.* in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 71: 29-38.
- Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. 2003. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br Poult Sci* 44: 450-457.
- Lenoir-Wijnkoop I, et al. 2007. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutr Rev* 65: 469-489.
- Lepargneur JP, Rousseau V. 2002. [Protective role of the Doderlein flora]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 31: 485-494.

- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68: 673-690.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023.
- Li Q, Liu Z, Monroe H, Cuiat CT. 2002. Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis* 23: 1499-1511.
- Li F, Hullar MA, Lampe JW. 2007. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota. *J Microbiol Methods* 68: 303-311.
- Licht TR, Hansen M, Poulsen M, Dragsted LO. 2006. Dietary carbohydrate source influences molecular fingerprints of the rat faecal microbiota. *BMC Microbiol* 6: 98.
- Lidicker WZ. 1979. Analyses of two free-growing enclosed populations of the California vole. *J Mamm* 60: 447-466.
- Lindroos K, Sigurdsson S, Johansson K, Ronnblom L, Syvanen AC. 2002. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res* 30: e70.
- Linton AH, Hinton MH, Al-Chalaby ZA. 1985. Monitoring for antibiotic resistance in *enterococci* consequent upon feeding growth promoters active against gram-positive bacteria. *J Vet Pharmacol Ther* 8: 62-70.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63: 4516-4522.
- Liu G, Amemiya T, Itoh K. 2008. Two-dimensional DNA gel electrophoresis mapping: a novel approach to diversity analysis of bacterial communities in environmental soil. *J Biosci Bioeng* 105: 127-133.
- Long H, Song W, Wang Y, Li J. 2007. Morphological redescription of two endocommensal ciliates, *Entorhipidium fukuii* Uyemura, 1934 and *Madsenia indomita* (Madsen, 1931) Kahl, 1934 from digestive tracts of sea urchins of the Yellow Sea, China (*Ciliophora*; *Scuticociliatida*). *Eur J Protistol* 43: 101-114.
- Loy A, Schulz C, Lucker S, Schopfer-Wendels A, Stoecker K, Baranyi C, Lehner A, Wagner M. 2005. 16S rRNA gene-based oligonucleotide microarray for environmental monitoring of the *betaproteobacterial* order "*Rhodocyclales*". *Appl Environ Microbiol* 71: 1373-1386.
- Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* 69: 6816-6824.
- Macchioni F. 2007. Importance of phoresy in the transmission of *Acarina*. *Parassitologia* 49: 17-22.
- Macfarlane S, Macfarlane GT. 2004. Bacterial diversity in the human gut. *Adv Appl Microbiol* 54: 261-289.
- . 2006. Composition and metabolic activities of bacterial biofilms colonizing food residues in the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72: 6204-6211.
- Macfarlane G. 2008. Existing knowledge of the human gut microbiota. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 46 Suppl 1: E10.
- Macura AB. 1995. Dermatophytes, pathogens or saprophytes. *Int J Dermatol* 34: 529-530.
- Madden JA, Hunter JO. 2002. A review of the role of the gut microflora in irritable bowel syndrome and the effects of probiotics. *Br J Nutr* 88 Suppl 1: S67-72.
- Maher PM, Chou HH, Hahn E, Wen TJ, Schnable PS. 2006. GRAMA: genetic mapping analysis of temperature gradient capillary electrophoresis data. *Theor Appl Genet*.

- Majamaa H, Isolauri E. 1997. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 99: 179-185.
- Malchow HA. 1997. Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease? *J Clin Gastroenterol* 25: 653-658.
- Mangani S, Guerrini S, Granchi L, Vincenzini M. 2005. Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Curr Microbiol* 51: 6-10.
- Manz W, Szewzyk U, Ericsson P, Amann R, Schleifer KH, Stenstrom TA. 1993. In situ identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 59: 2293-2298.
- Manz W, Wendt-Potthoff K, Neu TR, Szewzyk U, Lawrence JR. 1999. Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms Investigated by Fluorescent in Situ Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microb Ecol* 37: 225-237.
- Margraf RL, Erali M, Liew M, Wittwer CT. 2004. Genotyping hepatitis C virus by heteroduplex mobility analysis using temperature gradient capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol* 42: 4545-4551.
- Marsh TL. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 2: 323-327.
- Marteau P, Seksik P, Jian R. 2002. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br J Nutr* 88 Suppl 1: S51-57.
- Marteau P, Seksik P, Lepage P, Dore J. 2004. Cellular and physiological effects of probiotics and prebiotics. *Mini Rev Med Chem* 4: 889-896.
- Matsumoto M, Sakamoto M, Hayashi H, Benno Y. 2005. Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota. *J Microbiol Methods* 61: 305-319.
- Matsumoto M, Inoue R, Tsukahara T, Ushida K, Chiji H, Matsubara N, Hara H. 2008. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem* 72: 572-576.
- McDonald MI, Graham I, Harvey KJ, Sinclair A. 1981. Antibacterial activity of hydrolysed linseed oil and linolenic acid against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Lancet* 2: 1056.
- McInerney MJ, Struchtemeyer CG, Sieber J, Mouttaki H, Stams AJ, Schink B, Rohlin L, Gunsalus RP. 2008. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1125: 58-72.
- Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R, 3rd, Lehoux B, Fairbrother JM. 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* 71: 494-503.
- Messing J. 1993. M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing. *Methods Mol Biol* 23: 9-22.
- Meyer MC. 1949. On the parasitism of the leech, *Piscicola salmositica Meyer*, 1946. *J Parasitol* 35: 215.
- Miles JS, Wolf CR. 1989. Principles of DNA cloning. *BMJ* 299: 1019-1022.
- Miles RD, Butcher GD, Henry PR, Littell RC. 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poult Sci* 85: 476-485.

- Milton C, et al. 2007. PhylArray: phylogenetic probe design algorithm for microarray. *Bioinformatics* 23: 2550-2557.
- Minamida K, Shiga K, Sujaya IN, Sone T, Yokota A, Hara H, Asano K, Tomita F. 2005. Effects of difructose anhydride III (DFA III) administration on rat intestinal microbiota. *J Biosci Bioeng* 99: 230-236.
- Mishra MM, Singh CP, Kapoor KK, Jain MK. 1979. Degradation of lignocellulosic material and humus formation by fungi. *Ann Microbiol (Paris)* 130 A: 481-486.
- Mizrahi B, Shapira L, Domb AJ, Hourri-Haddad Y. 2006. Citrus oil and MgCl₂ as antibacterial and anti-inflammatory agents. *J Periodontol* 77: 963-968.
- Moayyedi P. 2007. Review: eradication therapy supplemented by probiotics increased eradication rates and reduced side effects in *H. pylori* infection. *ACP J Club* 146: 63.
- Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, Winter C, Herndl GJ. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 65: 3518-3525.
- Moeseneder MM, Winter C, Arrieta JM, Herndl GJ. 2001. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J Microbiol Methods* 44: 159-172.
- Moleyar V, Narasimham P. 1992. Antibacterial activity of essential oil components. *Int J Food Microbiol* 16: 337-342.
- Mollet C, Drancourt M, Raoult D. 1997. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 26: 1005-1011.
- Montville TJ. 1982. Metabiotic effect of *Bacillus licheniformis* on *Clostridium botulinum*: implications for home-canned tomatoes. *Appl Environ Microbiol* 44: 334-338.
- Moreau MC, Hudault S, Bridonneau C. 1990. Systemic antibody response to ovalbumin in gnotobiotic C3H/HeJ mice with *Bifidobacterium bifidum* or *Escherichia coli*. *Microecol Ther* 20: 309-312.
- Moreira D, Lopez-Garcia P. 1998. Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol* 47: 517-530.
- Mudd AJ, Walters J. 2003. Antibiotic growth promoters. *Vet Rec* 153: 308.
- Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. 2006. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 60: 464-468.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Muramatsu T, Nakajima S, Okumura J. 1994. Modification of energy metabolism by the presence of the gut microflora in the chicken. *Br J Nutr* 71: 709-717.
- Murphy KM, Berg KD. 2003. Mutation and single nucleotide polymorphism detection using temperature gradient capillary electrophoresis. *Expert Rev Mol Diagn* 3: 811-818.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

- Myers RM, Fischer SG, Maniatis T, Lerman LS. 1985. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 13: 3111-3129.
- Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, Maniatis T. 1985. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 13: 3131-3145.
- Nakanishi S, Kataoka K, Kuwahara T, Ohnishi Y. 2003. Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiol Immunol* 47: 951-958.
- Nangia-Makker P, Hogan V, Honjo Y, Baccarini S, Tait L, Bresalier R, Raz A. 2002. Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. *J Natl Cancer Inst* 94: 1854-1862.
- Naser SA, Shafran I, Schwartz D, El-Zaatari F, Biggerstaff J. 2002. In situ identification of *mycobacteria* in Crohn's disease patient tissue using confocal scanning laser microscopy. *Mol Cell Probes* 16: 41-48.
- Nee S. 2000. Mutualism, parasitism and competition in the evolution of coviruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1607-1613.
- Nelson N. 1996. Microarrays pave the way to 21st century medicine. *J Natl Cancer Inst* 88: 1803-1805.
- Nelson GM, Swank AE, Brooks LR, Bailey KC, George SE. 2001. Metabolism, microflora effects, and genotoxicity in haloacetic acid-treated cultures of rat cecal microbiota. *Toxicol Sci* 60: 232-241.
- Nielsen JL, Schramm A, Bernhard AE, van den Engh GJ, Stahl DA. 2004. Flow cytometry-assisted cloning of specific sequence motifs from complex 16S rRNA gene libraries. *Appl Environ Microbiol* 70: 7550-7554.
- Noll WW, Collins M. 1987. Detection of human DNA polymorphisms with a simplified denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3339-3343.
- Nova E, Warnberg J, Gomez-Martinez S, Diaz LE, Romeo J, Marcos A. 2007. Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life. *Br J Nutr* 98 Suppl 1: S90-95.
- O'Dea EE, Fasenko GM, Allison GE, Korver DR, Tannock GW, Guan LL. 2006. Investigating the effects of commercial probiotics on broiler chick quality and production efficiency. *Poult Sci* 85: 1855-1863.
- Ohara-Nemoto Y, Tajika S, Sasaki M, Kaneko M. 1997. Identification of *Abiotrophia adiacens* and *Abiotrophia defectiva* by 16S rRNA gene PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 35: 2458-2463.
- Olsen KN, Henriksen M, Bisgaard M, Nielsen OL, Christensen H. 2008. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94: 423-437.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289.
- Ouwehand AC. 2007. Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 137: 794S-797S.
- Ozutsumi Y, Hayashi H, Sakamoto M, Itabashi H, Benno Y. 2005. Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1793-1797.
- Palmer C, Bik EM, Eisen MB, Eckburg PB, Sana TR, Wolber PK, Relman DA, Brown PO. 2006. Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Res* 34: e5.

- Pang X, Hua X, Yang Q, Ding D, Che C, Cui L, Jia W, Bucheli P, Zhao L. 2007. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME J* 1: 156-162.
- Parker GH. 1926. The Inquiline Fish *Fierasfer* at Key West, Florida. *Proc Natl Acad Sci U S A* 12: 421-422.
- Parker RB. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 29:4-8.
- Parmentier E, Chardon M, Poulicek M, Bussers JC, Vandewalle P. 1998. Morphology of the buccal apparatus and related structures in four species of *Carapidae*. *Aust J Zoo* 46: 391-404.
- Parra D, Martinez JA. 2007. Amino acid uptake from a probiotic milk in lactose intolerant subjects. *Br J Nutr* 98 Suppl 1: S101-104.
- Payne S, Gibson G, Wynne A, Hudspith B, Brostoff J, Tuohy K. 2003. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. *Curr Issues Intest Microbiol* 4: 1-8.
- Peacock ML, Fink JK. 1994. ApoE epsilon 4 allelic association with Alzheimer's disease: independent confirmation using denaturing gradient gel electrophoresis. *Neurology* 44: 339-341.
- Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AA. 1986. Effect of perorally administered *lactobacilli* on macrophage activation in mice. *Infect Immun* 53: 404-410.
- Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. 1988. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology* 63: 17-23.
- Perlemuter G, Bigorgne A, Cassard-Doulier AM, Naveau S. 2007. Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 458-469.
- Pernthaler A, Dekas AE, Brown CT, Goffredi SK, Embaye T, Orphan VJ. 2008. Diverse syntrophic partnerships from deep-sea methane vents revealed by direct cell capture and metagenomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7052-7057.
- Pessoa OD, de Carvalho CB, Silvestre JO, Lima MC, Neto RM, Matos FJ, Lemos TL. 2005. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracillis*. *Fitoterapia* 76: 712-714.
- Pettigrew JE. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 1. *Anim Biotechnol* 17: 207-215.
- Phillips I. 1999. Assessing the evidence that antibiotic growth promoters influence human infections. *J Hosp Infect* 43: 173-178.
- Pichette A, Larouche PL, Lebrun M, Legault J. 2006. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytother Res* 20: 371-373.
- Poddar SK, Maniloff J. 1989. Determination of microbial genome sizes by two-dimensional denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 17: 2889-2895.
- Pruthi JS. 1980. Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology. *Adv Food Res Suppl* 4: 1-449.
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2007. bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7: 355-364.
- Regan JM, Oldenburg PS, Park HD, Harrington GW, Noguera DR. 2003. Simultaneous determination of bacterial viability and identity in biofilms using ethidium monoazide and fluorescent in situ hybridization. *Water Sci Technol* 47: 123-128.

- Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D. 2001. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 39: 430-437.
- Rhodes JM. 2007. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 610-612.
- Richards GM, Beuchat LR. 2005. Metabiotic associations of molds and *Salmonella Poona* on intact and wounded cantaloupe rind. *Int J Food Microbiol* 97: 327-339.
- Righetti PG, Gelfi C. 1997. Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics. *Electrophoresis* 18: 1709-1714.
- . 1999. Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics: an update. *J Capill Electrophor Microchip Technol* 6: 119-124.
- . 1999. Capillary electrophoresis of DNA in the 20-500 bp range: recent developments. *J Biochem Biophys Methods* 41: 75-90.
- Rimour S, Hill D, Militon C, Peyret P. 2005. GoArrays: highly dynamic and efficient microarray probe design. *Bioinformatics* 21: 1094-1103.
- Ross T, Dalgaard P, Tienungoon S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* 62: 231-245.
- Rossi PG, Bao L, Luciani A, Panighi J, Desjobert JM, Costa J, Casanova J, Bolla JM, Berti L. 2007. (E)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *J Agric Food Chem* 55: 7332-7336.
- Rowan R, Knowlton N. 1995. Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2850-2853.
- Ruelle V, El Moulaj B, Zorzi W, Ledent P, Pauw ED. 2004. Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 2013-2019.
- Sacks O. 1992. L'homme qui prenait sa femme pour un chapeau. Seuil.
- Saemann MD, Bohmig GA, Zlabinger GJ. 2002. Short-chain fatty acids: bacterial mediators of a balanced host-microbial relationship in the human gut. *Wien Klin Wochenschr* 114: 289-300.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sanchez MA, Vasquez M, Gonzalez B. 2004. A previously unexposed forest soil microbial community degrades high levels of the pollutant 2,4,6-trichlorophenol. *Appl Environ Microbiol* 70: 7567-7570.
- Sanguin H, Remenant B, Dechesne A, Thioulouse J, Vogel TM, Nesme X, Moenne-Loccoz Y, Grundmann GL. 2006. Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium spp.* and bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 72: 4302-4312.
- Sanguin H, Herrera A, Oger-Desfeux C, Dechesne A, Simonet P, Navarro E, Vogel TM, Moenne-Loccoz Y, Nesme X, Grundmann GL. 2006. Development and validation of a prototype 16S rRNA-based taxonomic microarray for *Alphaproteobacteria*. *Environ Microbiol* 8: 289-307.
- Santos SR, Ochman H. 2004. Identification and phylogenetic sorting of bacterial lineages with universally conserved genes and proteins. *Environ Microbiol* 6: 754-759.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.

- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. 1996. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10614-10619.
- Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM, Donnet-Hughes A. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78: 491-497.
- Schmid O, Ball G, Lancashire L, Culak R, Shah H. 2005. New approaches to identification of bacterial pathogens by surface enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in concert with artificial neural networks, with special reference to *Neisseria gonorrhoeae*. *J Med Microbiol* 54: 1205-1211.
- Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* 173: 4371-4378.
- Schmolovsky I, Hefter H. 1972. Long-term growth of *haemophilus influenzae* in broth due to metabiosis with *streptomyces*. *Isr J Med Sci* 8: 1942-1943.
- Schnurer A, Schink B, Svensson BH. 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 46: 1145-1152.
- Schramm A, Fuchs BM, Nielsen JL, Tonolla M, Stahl DA. 2002. Fluorescence in situ hybridization of 16S rRNA gene clones (Clone-FISH) for probe validation and screening of clone libraries. *Environ Microbiol* 4: 713-720.
- Schrezenmeir J and de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73(2supl):361S-364S.
- Scott GD. 1964. Studies of the Lichen Symbiosis. 2. Ascospore Germination in the Genus *Peltigera*. *Z Allg Mikrobiol* 64: 326-336.
- Scupham AJ, Jones JA, Wesley IV. 2007. Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *J Appl Microbiol* 102: 401-409.
- Seminiano EN, Frazier WC. 1966. Effect of *pseudomonas* and *Achromobacteraceae* on growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Milk Food Technol* 29: 161-164.
- Shaper NL, Shaper JH, Meuth JL, Fox JL, Chang H, Kirsch IR, Hollis GF. 1986. Bovine galactosyltransferase: identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 1573-1577.
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 232-236.
- Shen J, Zhang B, Wei G, Pang X, Wei H, Li M, Zhang Y, Jia W, Zhao L. 2006. Molecular profiling of the *Clostridium leptum* subgroup in human fecal microflora by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. *Appl Environ Microbiol* 72: 5232-5238.
- Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Kvetnaya AS. 2008. Antibacterial activity of *Chamomilla recutita* oil extract against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res* 22: 252-253.
- Shinzato N, Muramatsu M, Matsui T, Watanabe Y. 2005. Molecular phylogenetic diversity of the bacterial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1145-1155.
- Si H, Hu J, Liu Z, Zeng ZL. 2008. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53: 190-194.

- Simmons SL, Bazylinski DA, Edwards KJ. 2007. Population dynamics of marine magnetotactic bacteria in a meromictic salt pond described with qPCR. *Environ Microbiol* 9: 2162-2174.
- Singh S, Malhotra M, Majumdar DK. 2005. Antibacterial activity of *Ocimum sanctum* L. fixed oil. *Indian J Exp Biol* 43: 835-837.
- Skanseng B, Kaldhusdal M, Rudi K. 2006. Comparison of chicken gut colonisation by the pathogens *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringens* by real-time quantitative PCR. *Mol Cell Probes* 20: 269-279.
- Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. 2005. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotic and antibiotic growth promoter supplementation. *J Nutr* 135: 187-192.
- Smith DC. 1975. Symbiosis and the biology of lichenised fungi. *Symp Soc Exp Biol*: 373-405.
- Smith FI, Parvin JD, Palese P. 1986. Detection of single base substitutions in influenza virus RNA molecules by denaturing gradient gel electrophoresis of RNA-RNA or DNA-RNA heteroduplexes. *Virology* 150: 55-64.
- Smith SM. 1996. Biological control with *Trichogramma*: advances, successes, and potential of their use. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 375-406.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. San Diego, CA, USA : Academic Press.
- Snelling AM. 2005. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. *Curr Opin Infect Dis* 18: 420-426.
- Soderquist CJ. 1973. Juglone and allelopathy. *J Chem Educ* 50: 782-783.
- Solga SF, Diehl AM. 2003. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol* 38: 681-687.
- Sousa DZ, Smidt H, Alves MM, Stams AJ. 2007. *Syntrophomonas zehnderi* sp. nov., an anaerobe that degrades long-chain fatty acids in co-culture with *Methanobacterium formicicum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 609-615.
- Stafford WH, Baker GC, Brown SA, Burton SG, Cowan DA. 2005. Bacterial diversity in the rhizosphere of *Proteaceae* species. *Environ Microbiol* 7: 1755-1768.
- Stein HH, Kil DY. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. *Anim Biotechnol* 17: 217-231.
- Stephens PJ, Joynson JA, Davies KW, Holbrook R, Lappin-Scott HM, Humphrey TJ. 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J Appl Microbiol* 83: 445-455.
- Stevens CE, Hume ID. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol Rev* 78: 393-427.
- Sugita-Konishi Y, Sakanaka S, Sasaki K, Juneja LR, Noda T, Amano F. 2002. Inhibition of bacterial adhesion and *salmonella* infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. *J Agric Food Chem* 50: 3607-3613.
- Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettelheim KA. 1978. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 19: 108-113.
- Takeda S, Tamura S, M. W. 1997. Relationship between the pea crab *Pinnixa tumida* and its endobenthic holothurian host *Paracaudina chilensis*. *Marine Ecology-Progress Series* 149: 143-154.
- Talarico TL, Dobrogosz WJ. 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* 33: 674-679.

- Tanaka M, Iwao Y, Sasaki S, Okamoto S, Ogata H, Hibi T, Kazuma K. 2007. Moderate dietary temperance effectively prevents relapse of Crohn disease: a prospective study of patients in remission. *Gastroenterol Nurs* 30: 202-210.
- Taylor DJ. 1999. EU ban on four antibiotic growth promoters. *Vet Rec* 144: 158.
- Thilly WG. 1985. Potential use of gradient denaturing gel electrophoresis in obtaining mutational spectra from human cells. *Carcinog Compr Surv* 10: 511-528.
- Top B. 1992. A simple method to attach a universal 50-bp GC-clamp to PCR fragments used for mutation analysis by DGGE. *PCR Methods Appl* 2: 83-85.
- Torok VA, Ophel-Keller K, Loo M, Hughes RJ. 2008. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Appl Environ Microbiol* 74: 783-791.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-1031.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The human microbiome project. *Nature* 449: 804-810.
- Uitterlinden AG, Vijg J. 1990. Denaturing gradient gel electrophoretic analysis of the human cHa-ras1 proto-oncogene. *Appl Theor Electrophor* 1: 175-179.
- Upchurch DA, Shankarappa R, Mullins JI. 2000. Position and degree of mismatches and the mobility of DNA heteroduplexes. *Nucleic Acids Res* 28: E69.
- Vaarala O. 2003. Immunological effects of probiotics with special reference to *Lactobacilli*. *Clin Exp Allergy* 33: 1634-1640.
- Vahjen W, Jadamus A, Simon O. 2002. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults. *Arch Tierernahr* 56: 419-429.
- Vaidyanathan S, Kell DB, Goodacre R. 2002. Flow-injection electrospray ionization mass spectrometry of crude cell extracts for high-throughput bacterial identification. *J Am Soc Mass Spectrom* 13: 118-128.
- Van de Peer Y, Chapelle S, De Wachter R. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res* 24: 3381-3391.
- Van Deun K, Pasmans F, Ducatelle R, Flahou B, Vissenberg K, Martel A, Van den Broeck W, Van Immerseel F, Haesebrouck F. 2008. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol* 130: 285-297.
- Vergin F. 1954. Anti- und probiotika. *Hippokrates* 25:16-119.
- Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vaneechoutte M. 2004. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol* 4: 16.
- Vigre H, Larsen PB, Andreassen M, Christensen J, Jorsal SE. 2008. The effect of discontinued use of antimicrobial growth promoters on the risk of therapeutic antibiotic treatment in Danish farrow-to-finish pig farms. *Epidemiol Infect* 136: 92-107.
- von Wintzingerode F, Bocker S, Schlotelburg C, Chiu NH, Storm N, Jurinke C, Cantor CR, Gobel UB, van den Boom D. 2002. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7039-7044.

- Wade WN, Beuchat LR. 2003. Metabiosis of proteolytic moulds and *Salmonella* in raw, ripe tomatoes. *J Appl Microbiol* 95: 437-450.
- Wade WN, Vasdinnyei R, Deak T, Beuchat LR. 2003. Proteolytic yeasts isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of *Geotrichum candidum* with *Salmonella*. *Int J Food Microbiol* 86: 101-111.
- Wade WN, Beuchat LR. 2003. Proteolytic fungi isolated from decayed and damaged raw tomatoes and implications associated with changes in pericarp pH favorable for survival and growth of foodborne pathogens. *J Food Prot* 66: 911-917.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatosava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 66: 297-303.
- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67: 2578-2585.
- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 74: 4985-4996.
- Wang M, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G. 2005. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol Ecol* 54: 219-231.
- Warscheid B, Fenselau C. 2004. A targeted proteomics approach to the rapid identification of bacterial cell mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 4: 2877-2892.
- Watanabe K, Nelson J, Harayama S, Kasai H. 2001. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. *Nucleic Acids Res* 29: 344-345.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
- Williams P, Neaves P. 1999. Managing the use of unpasteurised milk. *International Food Safety News*.
- Wilson KH, Wilson WJ, Radosevich JL, DeSantis TZ, Viswanathan VS, Kuczmariski TA, Andersen GL. 2002. High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes. *Appl Environ Microbiol* 68: 2535-2541.
- Wood GS, et al. 1994. Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sézary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 103: 34-41.
- Wuyts J, Van de Peer Y, De Wachter R. 2001. Distribution of substitution rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 29: 5017-5028.
- Yamaguchi S, Yokoe M. 2000. A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Appl Environ Microbiol* 66: 3337-3343.
- Yasui H, Nagaoka N, Mike A, Hayakawa K, Ohwaki M. 1992. Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA. *Microb Ecol Health Dis* 5: 155-162.
- Younes R, Yousfi M, Ghorra C, Khalife S, Igondjo-Tchen-Changotade S, Willig C, Senni K, Charpiot P, Naaman N, Godeau G. 2008. The defensive role of lysozyme in human gingiva in inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res*.
- Yun J, Kang S, Park S, Yoon H, Kim MJ, Heu S, Ryu S. 2004. Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* 70: 7229-7235.
- Zelmer DA. 1998. An evolutionary definition of parasitism. *Int J Parasitol* 28: 531-533.

Zhou H, Gong J, Brisbin JT, Yu H, Sanei B, Sabour P, Sharif S. 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Poult Sci* 86: 2541-2549.

Zhu L, Lee HK, Lin B, Yeung ES. 2001. Spatial temperature gradient capillary electrophoresis for DNA mutation detection. *Electrophoresis* 22: 3683-3687.

Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* 68: 124-137.

Zhu XY, Joerger RD. 2003. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poult Sci* 82: 1242-1249.

Zohri AN, Abdel-Gawad K, Saber S. 1995. Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa L.*) oil. *Microbiol Res* 150: 167-172.

Zuckermandl E, Pauling L. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J Theor Biol* 8: 357-366.

366 références

ANNEXES

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet de diverses communications dont deux ont fait l'objet de publications dans **The World's Poultry Science Journal** (précisé pour chacun dans la liste qui suit) :

2006

Massias B, Arturo-Schaan M., Elie A.M., Bebin K., Hocde V., Denayrolles M. and Urdaci MC. 2006. Effects of non-antibiotic additives on the microbial equilibrium of broiler chicken intestine. Fifth Joint RRI-INRA gastrointestinal tract microbiology symposium, Gut microbiology research to improve health, immune response and nutrition, 21-23 June 2006, Aberdeen, UK.

- Ce poster reprend les résultats présentés en chapitre deux § II.D du présent manuscrit. Y sont donc présentés les modulations de la flore digestive du poulet en relation avec différentes supplémentsations comme des prébiotiques ou des huiles essentielles.

2007

Massias B, Arturo-Schaan, M, Urdaci MC. 2007. Efecto de suplementos no-antibioticos sobre el equilibrio de la microflora del tubo digestivo en pollos. Congreso Latino-americano en nutricion animal, 2007. Brasil.

- Ce « proceeding », écrit en espagnol, est une nouvelle déclinaison du poster présenté juste avant.

Denayrolles M, Arturo-Schaan M, Massias B, Bebin K, Elie AM, Panheleux, Urdaci MC. 2007. Effect of diets with different fibrous contents on broiler gut microflora and short-chain fatty acid (SFCA) production. European WPSA. 2007. France. **(publié dans WPSAJ)**

- Dans ce « proceeding » sont présentés l'effet de divers régimes riches en fibres sur les flores digestives du poulet d'élevage et l'évolution des proportions en acides gras à chaînes courtes qui en découle.

Massias B, Arturo-Schaan M., Elie AM., Reveillere E., Rocaboy G, and Urdaci MC. 2007. Microbial equilibrium in Gastro-intestinal tract of *Meleagris gallopavo* Turkey and its modulation by non-antibiotic feed supplementations. European WPSA, 2007. France. **(publié dans WPSAJ)**

- Ce « proceeding » présentent les modulations de la flore digestive de la dinde en relation avec différentes supplémentsations comme des prébiotiques ou des huiles essentielles.

2008

Massias B., Urdaci MC. 2008. CSbyDG, a new clone screening strategy - Application to the exploration of chicken gut microbiota. 6th Joint Symposium INRA-RRI. Gut Microbiome: Functionality, Interaction with the host and impact on the environment. Clermont-Ferrand-June 18-20, 2008.

- Dans ce poster est présenté la technique de sélection de clones, CSbyDG, qui est décrite dans le chapitre trois du présent manuscrit. Le poster détaille son protocole et fait la démonstration de son utilisation pour cribler des banques de clones d'ADNr 16S provenant de flores digestives de poulets d'élevage.

Massias B., Arturo-Schaan M., Elie AM., Rocaboy G., Denayrolles M, and Urdaci MC. 2008. An experimental approach to determine a putative pathogen of turkey hen non specific enteritis associate pathology. 23rd World's Poultry Congress - Queensland, Australia - 30 June - 4 July 2008.

- Dans ce poster est fait la démonstration du pouvoir des gels à gradient dénaturant couplés au clonage moléculaire afin d'identifier de putatif pathogène digestif. Cette stratégie a été appliquée aux entérites non spécifiques de la dinde d'élevage. En fait ce poster reprend les résultats évoqués dans le chapitre deux § II.E du présent manuscrit.



Effects of non-antibiotic supplementations on the microbial equilibrium of broiler chicken gut



B. MASSIAS ⁽¹⁾, M. ARTURO-SCHAAN ⁽²⁾, A.-M. ELIE ⁽¹⁾, K. BEBIN ⁽²⁾, V. HOCDE ⁽³⁾, M. DENAYROLLES ⁽¹⁾, M. C. URDACI ⁽¹⁾

ENITA de Bordeaux

⁽¹⁾ ENITAB, LMBA, 1, cours du Général de GAULLE, 33170 Gradignan, France; ⁽²⁾ CCPA and ⁽³⁾ DELTAVIT Z.A. Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France.



Topic Study

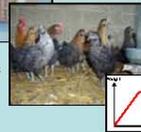


January the 1st 2006

Ban of the use of antibiotics as growth promoters in animal feeding



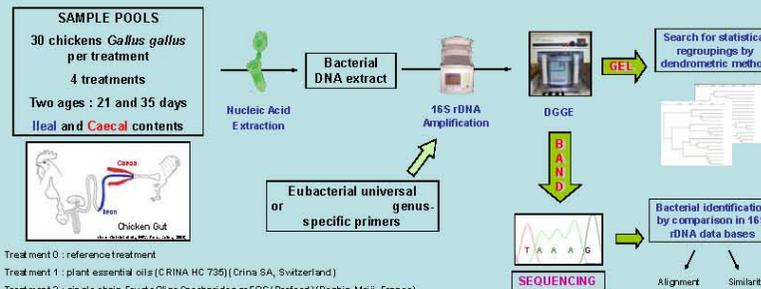
Lower production



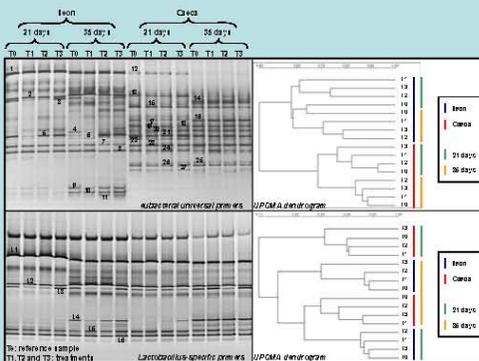
Search for new feed additives or ingredients as flora regulators and growth promoters



Materials and Methods



Results



• More than twenty bacteria were identified in four principal genera: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus* and *Ruminococcus*.

• According to DGGE analysis, most variations are observed with age but treatment-dependent modulations are also present especially within the *Lactobacillus* genus.

• scFOS and plant essential oil treatments show flora variation activities principally on ileal segment of the chicken gut.

Sequenced bands are numbered in the gel photos and genus identifications are given below:

genus *Bacteroides*: 14 and 15 ; genus *Clostridium* : 6, 7, 18, 19, 21, 22, 23, 26 and 27 ; genus *Lactobacillus* : 1, 2, 3, 4, 8, 12, 13, 24 and Lx ; genus *Ruminococcus* : 16, 17, 20 and 25 and other genera : 5, 9, 10 and 11.

Because of confidentiality, specie information is not presented.

Conclusion and Future Prospects

- The used technique is effective in distinguishing flora modulations and thus effects of non-antibiotic supplementations on chicken intestinal microbiocenose.
- These results prove the efficiency of scFOS, essential oils and plant extracts in flora modulation and regulation.
- Future works will be engaged to determine the potential of this supplementations as growth-promoter substitutes.

The authors would like to thank:

Conseil Régional de Bretagne, Beghin Meiji (France), CRINA S.A., Gland (Switzerland), Phyto-synthèse (France)

References:

1. Gabriel L, Millet S and Sibille P (2005) La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal. INRA Productions Animales 18 (6): 309-322.
2. Handelsman J (2004) Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 869-886.
3. Muzer G, Smala K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Leeuwenhoek 73: 127-141.
4. Walter J, Hentel C, Tannock G W, Liu C M, Munro K and Hammes W P (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Podococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 67: 2578-2585.
5. Walter J, Tannock G W, Tislaia-Timisjarvi A, Rodborg S, Loach D M, Munro K and Platossava T (2000) Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. Applied and Environmental Microbiology 66: 297-303.

Efecto de suplementos no-antibióticos sobre el equilibrio de la microflora del tubo digestivo en pollos.

B. MASSIAS⁽¹⁾, M. ARTURO-SCHAAN^{*(2)}, M. C. URDACI⁽¹⁾

⁽¹⁾ ENITAB, LMBA, 1, cours du Général de GAULLE, 33170 Gradignan, France;

⁽²⁾ CCPA ZA Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France.

Resumen

Las autoridades europeas han prohibido recientemente la utilización de antibióticos como factores de crecimiento. Debido a la pérdida de productividad ocasionada, las industrias de nutrición animal buscan productos sustitutivos. El trabajo presentado describe las investigaciones llevadas a cabo sobre tres aditivos alimentarios con el fin de determinar su potencial como reguladores de la microflora del pollo. Un estudio filogenético, basado en la amplificación de los ADNr 16S y separación por DGGE, ha sido utilizado para poder identificar las principales bacterias moduladas por los tres suplementos alimentarios. Más de una veintena de bacterias han sido identificadas. Los resultados revelan una modulación particularmente importante del género *Lactobacillus* en el ileon lo que prueba el efecto regulador de dichos suplementos sobre la microflora.

Introducción

La aparición de nuevas resistencias a los antibióticos (AT) es actualmente una de las mayores amenazas de la salud humana y animal. Este hecho ha conllevado a las autoridades sanitarias de numerosos países a tomar medidas con el fin de reducir la expansión llevada a cabo durante estos últimos veinte años. Así, desde 1986, Suecia prohibió el uso de los antibióticos como factores de crecimiento de manera sistemática en las producciones intensivas a lo que siguió la comunidad europea con interdicciones sucesivas hasta que fueron totalmente prohibidos el 1^{er} de enero del 2006.

Estas medidas han tenido consecuencias económicas importantes en los criaderos intensivos debido a las pérdidas de producción engendradas. En efecto, a causa de varias decenas de años sin selección animal, una dependencia a los antibióticos se había instalado. Otra constatación importante, el uso de AT terapéuticos ha aumentado desde la prohibición del uso de los ATs como factores de crecimiento. En el contexto actual, la búsqueda de sustitutivos a los factores de crecimiento ATs es una prioridad.

Nuestro trabajo estudia el potencial de tres suplementos alimentarios como moduladores de la microflora intestinal del pollo. El seguimiento de la microflora eubacteriana intestinal y fecal ha sido realizado usando una filogenia comparativa basada en los ADNs 16S (Handelsman, 2004). La técnica separativa utilizada a sido la DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer y Smalla, 1998) mejorada por Massias et al., (comunicación personal).

Material y Métodos

Animales, tratamientos y muestreo. El estudio ha sido realizado con pollos machos *Gallus gallus* de raza Ross. En 6480 pollos de un día se distribuidos aleatoriamente en 24 parques (station experimental Euronutrition SAS- France) se probaron cuatro tratamientos denominados T0, T1, T2, T3. Cada tratamiento se distribuyo a 1620 animales repartidos en 6 parqués de 270 animales.

El alimento y el agua se distribuyeron *ad libitum*. El programa alimentario fue el siguiente: alimento de inicio de 13 a 21 días y alimento de crecimiento de 22 a 35 días. Todos los regimenes alimentarios contienen 1 ppm de diclazuril (anticoccidien). El tratamiento T0 es la referencia del estudio y esta constituido de trigo, maíz y granos de soja. Los tratamientos T1, T2 et T3 están constituidos de la misma base pero se les añadió los distintos suplementados. En el tratamiento T1 se añadieron aceites esenciales (CRINA HC 735 - Crina SA, Switzerland), en el tratamiento T2 FructoOligoSaccharides de cadena simple scFOS (Profeed - Beghin Meiji, France) y en el tratamiento T3 aceites esenciales y extractos de plantas (Phytosynthèse, France). Treinta animales por tratamiento (5 por parqué) fueron sacrificados a 21 y 35 días de edad. Se recuperaron los contenidos ileal y fecal de cada individuo separadamente, se prepararon los pools (utilizando la misma cantidad por individuo) y se conservaron a -20°C. Un total de 16 pools fueron constituidos, un pool por cada tratamiento, por cada edad (21 y 35 días) y por cada contenido intestinal (íleo y caeca).

Extracción del ADN eubacteriano. Después de descongelar, se extrajo el ADN de 25 mg de los diferentes pools utilizando el kit comercial DNA mini kit (Qiagen, California, USA).

Amplificación del ADN, geles DGGE y secuencias. Se realizo una doble amplificación de los genes ADNr 16S. La primera usando los cebadores universales de eubacterias PU1-PU2 (Weisburg *et al.*, 1990) y la segunda con los cebadores HDA1-HDA2 (Walter *et al.*, 2000) o con los cebadores específicos de *Lactobacillus* LAC1-LAC2 (Walter *et al.*, 2001). La separación de los fragmentos PCR se realizo en geles DGGE usando diferentes gradientes, 30 a 55 % (HDA1-HDA2), 22,5 a 55 % (LAC1-LAC2). El 100% representa una concentración de 7 M de urea y de 40% de formamida desionizada. Después de la migración y lectura del gel, las bandas de interés son cortadas, réamplificadas y secuenciadas (Genome Express, France). Las secuencias son analizadas segun Cole *et al.* (2007).

Análisis cuantitativo diferencial. Las diferencias cuantitativas y densitométricas observadas en las bandas de interés entre el tratamiento T0 y los otros tratamientos se han ilustrado en forma de histogramas (figura 2).

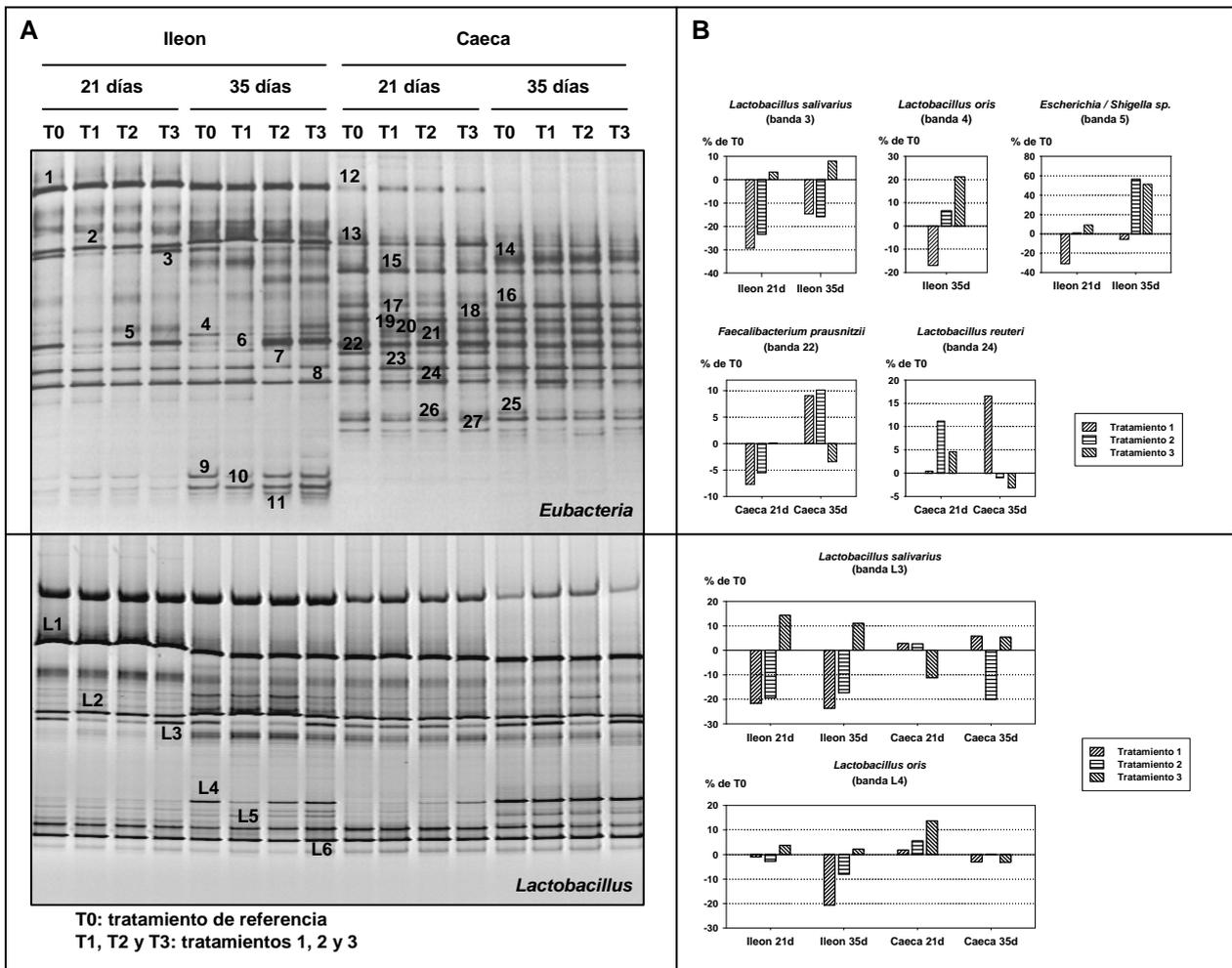


Figura 1. (A) Geles DGGE de las amplificaciones eubacteriana y *Lactobacillus*-específica del gen ADNr 16S. (B) Variaciones cuantitativas de las principales bacterias moduladas, en porcentaje del tratamiento de referencia T0.

Gel DGGE <i>Eubacteria</i>							
N°	Género y especie	Sim	S_ab	N°	Género y especie	Sim	S_ab
1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1,000	1,000	15	<i>Alistipes putredinis</i>	0,966	0,799
2	<i>Lactobacillus sp.</i>	1,000	1,000	16	<i>Ruminococcus sp.</i>	1,000	1,000
3	<i>Lactobacillus salivarius</i>	1,000	1,000	17	<i>Ruminococcus sp.</i>	0,992	0,941
4	<i>Lactobacillus oris</i>	1,000	1,000	18	<i>Clostridium sp.</i>	0,971	0,919
5	<i>Escherichia sp. / Shigella sp.</i>	1,000	1,000	19	<i>Clostridium / Dorea sp.</i>	0,983	0,920
6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,940	0,726	20	<i>Ruminococcus lactaris / Clostridium sp.</i>	0,990	1,000
7	<i>Clostridium sp. / Bacillus sp.</i>	0,916	0,730	21	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,959	0,814
8	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,986	0,906	22	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,938	0,789
9	<i>Corynebacterium sp.</i>	0,955	0,879	23	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,907	0,760
10	<i>Corynebacterium sp.</i>	0,943	0,881	24	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,986	0,906
11	<i>Brachy bacterium faecium</i>	1,000	1,000	25	<i>Clostridium / Ruminococcus / Acetovibrio sp</i>	0,881	0,674
12	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1,000	1,000	26	<i>Clostridium sporophoroides</i>	0,932	0,691
13	<i>Lactobacillus sp.</i>	1,000	1,000	27	<i>Clostridium orbiscindens</i>	0,911	0,754
14	<i>Rikenella microfusus</i>	0,952	0,758				
Gel DGGE <i>Lactobacillus</i>							
N°	Género y especie	Sim	S_ab	N°	Género y especie	Sim	S_ab
1	<i>Lactobacillus gasseri</i>	0,993	0,966	4	<i>Lactobacillus oris</i>	0,993	0,966
2	<i>Lactobacillus cripatus</i>	0,996	0,980	5	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,989	0,945
3	<i>Lactobacillus salivarius</i>	1,000	0,997	6	<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,987	0,937

Tabla 1. Identificación de las bandas de los geles DGGE presentados en la figura 1 según secuencias y comparaciones con la base RDPII. (Sim = % de similarité ; S_ab = seqmatch score)

Resultados y Discusión

Los perfiles DGGE obtenidos están presentados en la figura 1. Se observa una gran variabilidad entre los perfiles del contenido intestinal, tanto entre edades como entre tratamientos. La variabilidad en el contenido caecal es menor y principalmente observada entre edades. La secuenciación de las bandas de interés a partir de los geles DGGE ha permitido la identificación de 27 bacterias usando los cebadores eubacterias y de 6 bacterias usando los cebadores de bacterias lácticas. Se obtuvieron un total de 23 identificaciones bacterianas (ver tabla 1), principalmente de 4 géneros: *Bacteroidetes*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus* y *Clostridium*. Cinco bacterias fueron moduladas principalmente: *Lb. oris*, *Lb. reuteri*, *Lb. salivarius*, *Escherichia / Shigella sp.* y *F. prausnitzii*. El tratamiento T1 provoca en el ileon una disminución de *Lb. salivarius* a las dos edades, de *Lb. oris* a 35 días y de *Escherichia / Shigella sp.* a 21 días ; a nivel del caeca y a 35 días se observo una aumentación de *Lb. reuteri* y de *F. prausnitzii*. El tratamiento T2 a nivel de l'ileon, da un efecto parecido al T1 sobre *Lb. salivarius* a las dos edades y esta también menos presente en los caeca de 35 días. Por otro lado el T2 provoca una aumentación de *Escherichia / Shigella sp.* en el Ileon a 35 días, de *F. prausnitzii* en el caeca a 35 días y de *Lb. reuteri* en el Caeca a 21 días. El T3 produce menos modulación pudiendo observarse una aumentación de *Lb. oris*, de *Lb. salivarius* y de *Escherichia / Shigella sp.* en el Ileon a 35 días y una disminución de *Lb. salivarius* en el caeca a 21 días. Globalmente, las principales variaciones se observaron en el genero *Lactobacillus* asi que de *F. prausnitzii* lo que podría favorecer la salud y el desarrollo de los animales.

Conclusión

La técnica de DGGE permite un seguimiento eficaz de las modulaciones producidas en la flora digestiva del pollo. Los scFOS y los aceites esenciales prueban aquí su capacidad como reguladores de la flora digestiva. Actualmente el CCPA realiza otros trabajos en el terreno con el fin de validar las observaciones obtenidas sobre la flora digestiva con los distintos regimenes.

Referencias Bibliográficas

1. Cole J R, Chai B, Farris R J, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen A S, McGarrell D M, Bandela A M, Cardenas E, Garrity G M, Tiedje J M (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* 35 (Database issue): D169-D172
2. Handelsman J (2004) Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68: 669-685.
3. Muyzer G, Smalla K (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* 73: 127-141.
4. Walter J, Hertel C, Tannock G W, Lis C M, Munro K and Hammes W P (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2578-2585.

5. Walter J, Tannock G W, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach D M, Munro K and Alatossava T (2000) Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 297-303.
6. Weisburg W G, Barns S M, Peleletier D A and Lane D J (1990) 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

Effect of diets with different fibrous contents on broiler gut microflora and short-chain fatty acid (SCFA) production.

M. DENAYROLLES¹, M. ARTURO-SCHAAN², B. MASSIAS¹, K. BEBIN², AM. ELIE¹, M. PANHELEUX-LEBASTARD² and MC. URDACI¹

¹ ENITAB, LMBA, UMR5248, 1, cours du Général de GAULLE, 33170 Gradignan, France

² CCPA, Z.A. Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France

* Corresponding author: m_urdaci@yahoo.fr

Fibers are dietary indigestible carbohydrates supplements which play an important role in avian digestive physiology and thus in production performances. In this study, we examined effects of diets on intestinal and cecal microflora and on production of SCFA in 21-day-old broilers. Diets differed in fibrous content (3, 4.5 or 6% of crude fiber, e.g. T1, T3, and T5, respectively) or in nature of fiber (T6 and T7). Five birds per diet were sacrificed at day 21 and microflora of their intestinal and cecal contents were analyzed using PCR-DGGE method with universal eubacterial 16S rDNA primers. In intestines, lactobacilli were the major bacterial population. However, several supplementary high intensity bands were found in the T5 diet. In ceca, profiles were rather constant, but some new bands appeared in the three experimental group diets T5, T6 and T7. Variations in SCFA were more significant in ceca samples. A significant increase in butyrate was observed in broilers from diets T5, T6 and T7. In contrast, acetate and lactate were the major SCFA observed for broilers on diet T1 and T3. In conclusion, these results provide insights into effect of fiber on the modulation of the broiler gut microbiota and on the SCFA production.

Keywords: broiler; fiber; gut microflora; short-chain fatty acid; PCR-DGGE.

Introduction

The importance of understanding the dynamics of intestinal microbial ecology has been recognized for a long time (Savage, 1977). Since the ban of using antibiotics as growth-promoters in the animal feed, the concept of digestive flora and the management of bacterial balance of digestive tract have become more important. Digestive disorders have increased in parallel to this withdrawal (Van Immerseel *et al.*, 2004) and are often sources of under performances due to healthy problem as necrotic enteritis or coccidiosis (Williams, 2005).

Thus, nutritional balance of feeds takes great significance. Among nutrients constituting poultries' feeds, the fibrous fraction is very low. Some studies have nevertheless indicated that increasing levels of fiber may enhance performance in chickens and turkeys hens (Ricke *et al.*, 1982; Sklan *et al.*, 2003). Jorgensen *et al.* (1995) showed that the source of fibers has an impact on the development of the gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broiler chickens. Intestinal microflora can ferment fibers to SCFA and gas, however, the effect of fiber compounds on gut microflora modulation is poorly studied and understood.

Therefore, in the present study we evaluate the effects of increasing fiber levels and fiber source on SCFA production and on bacterial community of broiler gut using a DNA-based analytical method independent of cultivation. Among the different molecular methods, 16S rDNA-based PCR-DGGE, providing band profiles corresponding to the major bacterial strains and permitting the identification from the excised bands, was used.

Material and Methods

Growth trial. A total of 240 male broilers of commercial strain (ROSS PM3) were randomly allocated to 120 cages of 2 animals. They were given a starter diet from 0 to 8 days, and then received 5 different diets (24 cages of 2 animals per group) from 8 to 28 days. Five experimental diets were formulated with different crude fiber levels. The table 1 presents the fiber composition (list of incorporated fibrous raw materials) and the table 2 presents the diets nutritional analyses (% as fed basis).

Table 1: Diets composition (list of fibrous raw materials in decreasing order)

T1	T3	T5	T6	T7
Corn	Corn	Wheat	Wheat	Corn
Soybean meal	Wheat	Corn	Soybean meal	Soybean meal
Wheat	Soybean meal	Soybean meal	Corn	Wheat
	Sunflower meal	Sunflower meal	Sunflower meal	Sunflower meal
	Soybean hulls	Soybean hulls	Wheat Bran	Alfalfa
	Wheat bran	Wheat bran	Soybean hulls	Soybean hulls
			Sugar beat pulp	Wheat bran

Table 2 : Diets nutritional analyses (% as fed basis)

	T1	T3	T5	T6	T7
ME (kcal/kg)	2900	2900	2900	2900	2900
Analysed Crude Fiber (%)	3.10	4.70	5.40	5.70	4.40
Analysed Crude Fat (%)	3.40	4.80	6.80	6.40	5.30
Analysed Crude protein (%)	18.80	18.90	19.40	19.10	19.20

Samples collections. Five birds per diet were killed on day 21. The small intestine was rapidly excised from Meckel's diverticulum to the ileocecal junction (ileum). The ileal content was collected and pooled per diet. The two ceca were removed from each bird and the contents pooled per treatment. Samples were collected in sterile tubes, immediately frozen and stored at -20°C until microflora profile analysis.

Eubacterial DNA extraction. Samples DNA extraction (25 mg) was realized using QIAamp DNA mini kit (Qiagen, California, USA). DNA extracts were quantified with a spectrophotometer (Victor plate reader, (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

DNA amplification and DGGE. A nested PCR on 16S rDNA genes was realized using eubacterial universal primer set (PU1 and PU2) for the first step and universal primer set targeted to V2-V3

region of 16S rDNA (HDA1 and HDA2-GC) for the second step. PCR-products were separated by DGGE with a 30 to 55% denaturing gradient and revealed by ethidium bromide staining. Bands of interest were cut with sterile scalpel blades and frozen at -20°C .

Sequencing and bacterial identification. After re-amplification, bands of interest were sequenced and sequence results were compared with the RDPII 16S rDNA database (Cole *et al.*, 2007). The bacterial identification is thus deduced from the best similarity percentage and best S_{ab} score.

Analysis of the SCFAs concentrations. The method of Morales *et al.* (1998) was used with some adaptations. Intestinal contents were diluted at $300\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in a solution of H_2SO_4 5mM. The 3-methylvaleric acid was used as internal standard. Samples were HPLC analyzed in an Aminex HPX-87H column using a 215 nm detector. The results are expressed in mg of SCFA/g of sample.

Results and discussion

Figure 1 represents DGGE results. In intestines, lactobacilli were the major bacterial populations. *Lb. salivarius* and *Lb. crispatus* were the most represented species. Supplementary high intensity bands (13, 14) founded in the T5 diet corresponds to variants of *Lb. salivarius* 16S rDNA sequence. In diets T1, T3 and T7 *Lb. reuteri*, *Lb. mucosae* and *Lb. antri* are most represented that in diets T5 and T6. In T5 diet, which corresponds to the highest level of crude fiber, *C. perfringens* was retrieved (Band 15).

In ceca, profiles were constant, but some specific bands appeared principally in T5, T6 and T7 diets. It's interesting to note that these treatments correspond to the highest levels of crude fiber and differed by the fiber's quality (raw material profiles). This is in agreement with previous study which showed that fiber's quality (in diet with high levels of fiber) influence bacterial profile (Dunkley *et al.*, 2007). Moreover, Green (1988) postulated that intestinal bacteria may be responsible of degradation of some non-cellulose fraction of the crude fibers in broilers. It may influence fecal fermentations too.

Variations in SCFA were greater in cecal samples. An increase in the butyrate was observed in broilers'ceca from diets T5, T6 and T7. In contrast, the acetate and lactate were the major bacterial SCFA observed for broilers on diet T1 and T3 (Fig. 2). Quantitatively, T7 diet produces the most SCFAs (51 mg/g caeca) and diets T1 and T3 the lowest quantity (21.5 and 22 mg/g of cecal samples). In other animal species (rabbit), Jehl and Gidenne (1996) demonstrated that the incorporation of high levels of pectin in the feed (beet pulp for example) induces an elevation of SCFA. In our study, we observed quantitative and qualitative variations in SCFAs in relation with fiber diets. The greater production of SCFA in the ceca, particularly in some fiber diets are very interesting, since SCFA production was linked with a bacteriostatic effect to some enteric bacteria without effect on *Lactobacillus* (Van der Wielen *et al.*, 2000). Therefore, we demonstrate that microflora variations depend of fiber nature and concentration principally in the intestinal compartment. Interesting, in T5 diet, *Cl. perfringens* was present, fact that may indicate that fiber nature may modulate their growth.

In conclusion, these results provide insights in understanding the effect of fiber on the gut microbiota of broilers. Nevertheless further studies will be necessary to understand the possible effect of crude fiber on gut microflora and its impact on broiler growth and health status.

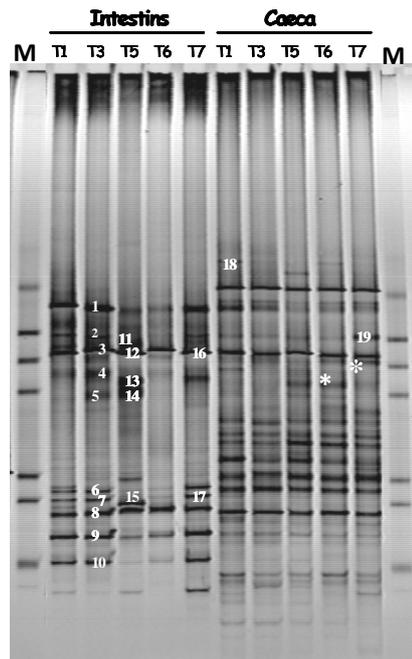


Figure 1. DGGE gel of eubacterial 16S rDNA gene amplifications. M: Marker. Bands: 1, 2, 3 (*Lactobacillus crispatus*); 4 (*Lb. salivarius* chimera); 5 (*Enterococcus cecorum* chimera); 6, 8, 9 (*Lb. reuteri*); 7 (*Lb. antri*); 10 (*Lb. mucosae*); 11, 12, 13, 14, 16 (*Lb. salivarius*); 15 (*Clostridium perfringens*); 17 (SFB); 18 (uncultured bacteria); 19 (*Clostridium* sp); * (identification in process).

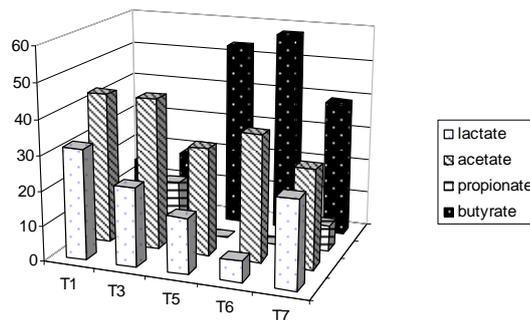


Figure 2. Relative concentration (%) of SCFA in cecal samples from the different diets (T1 to T7)

References

- COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM-SYED-MOHIDEEN A.S., MCGARRELL D.M., BANDELA A.M., CARDENAS E., GARRITY G.M. and TIEDJE J.M.** (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* **35** (Database issue): D169-D172.
- DUNKLEY, K.D., DUNKLEY, C.S., NJONGMETA, N.L., CALLAWAY, T.R., HUME, M.E., KUBENA, L.F., NISBET, D.J.** (2007) Comparison of in Vitro fermentation and molecular microbial profiles of high-fiber feed substrates incubated with chicken cecal inocula. *Poultry Sciences* **86(5)**:801-810
- GREEN, S.** (1988) Effect of dietary fibre and caeectomy on the excretion of endogenous amino acids from adult cockerels. *British Poultry Science* **29**: 419-429.
- HANDELSMAN J.** (2004) Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 669-685.
- JEHL N. and GIDENNE T.** (1996) Replacement of starch by digestible fibre in the feed for the growing rabbit. 2) Consequences on microbial activity in the caecum and on incidence on digestive disorders. *Animal Feed Science Technology* **61**: 193-204.
- JORGENSEN, H., ZHAO, X.Q., BACH KNUDSEN, K.E. and EGGUM, B.O.** (1995). The influence of dietary fibre source and level on the development of gastrointestinal tract, digestibility and energy metabolism in broilers chickens. *British Journal Nutrition* **75**: 379-395.
- LE GOFF G. VAN MILGEN J. and NOBLET J.** (2002). Influence of dietary fibre on digestive utilisation and rate passage in growing pig, finishing pig and adult sows. *Animal Science* **74**:503-515.
- MORALES, M.L., GONZALEZ, A.G. and TRONCOSO, A.M.** (1998) Ion-exclusion chromatographic determination of organic acids in vinegars. *Journal of Chromatography A* **822**: 45-51.
- RICKE, S.C., VAN DEN AAR, P.J., FAHEY, G.C. and BERGER, L.L.** (1982) Influence of dietary fibers on performance and fermentation characteristics of gut contents from growing chicks. *Poultry Science* **61**: 1335-1343.
- SAVAGE, D.C.** (1977) Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology* **31**:107-133.
- SKLAN, D., SMIRNOV, A. and PLAVNIK, I.** (2003) The effect of dietary fibre on the small intestines and apparent digestion in the turkey. *British Poultry Science* **44**: 735-740.
- VAN DER WIELEN, P.W., BIESTERVELD, S., NOTERMANS, S., HOFSTRA, H., URLINGS, B.A.P. and F. VAN KNAPENF.** (2000) Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Applied Environmental Microbiology* **66**:2536-2540.
- VAN IMMERSSEL, F., J. DE BUCK, F. PASMANS, G. HUYGHEBAERT, F. HAESBROUCK, and R. DUCATELLE** (2004) *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathology* **33**:537-549.

WILLIAMS, R.B. (2005) Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathology* **34**:159-180.

TURKEY HEN NON SPECIFIC ENTERITIS : AN EXPERIMENTAL APPROACH TO DETERMINE A PUTATIVE BACTERIAL PATHOGEN

B. MASSIAS¹, M. ARTURO-SCHAAN^{2*}, A.-M. ELIE¹, G. ROCABOY², M. DENAYROLLES¹ and M. C. URDACI¹

Summary

Over the last decades, cases of turkey hen non specific enteritis significantly increase and generate considerable economic losses. The goal of this study was to determine the putative pathogen agent from turkey with non specific enteritis using molecular methods. Nested PCR with different primers sets was performed to amplify the eubacterial 16S rDNA and amplicons were separated by DGGE. A specific band detected in the caeca from affected birds was re-amplified and sequenced. Sequence was compared to the RDPII database and corresponds to the *Clostridium* genus. To confirm the role of this *Clostridium* in the observed symptoms and to design specie specific primers, the cloning of whole 16S rDNA amplified fragment was undertaken to recover complete *Clostridium* sequence. Semi-Quantitative PCR was performed in order to validate this bacterium as pathogen associated with enteritis.

I. INTRODUCTION

Since the ban of using antibiotics as growth-promoters in the animal feed, the concept of digestive microflora and management of the bacterial balance of the digestive tract has become more important. In turkey, digestive disorders have increased in parallel to this withdrawal and are often sources of under performances and economic losses due to healthy problem as non specific enteritis (Dahiya *et al.*, 2006). The pathophysiology of the disease is associated with gaseous caecal content and diarrhea which result more often than not in animal death. Until today, no microbial agent has been identified and characterized as the etiologic agent of this pathology.

In the present study, we investigate the microflora of small intestine and caecal contents from healthy control turkey and from turkey with non specific enteritis symptoms in the hope to identify a specific bacteria involved in the disease. We use a combined experimental approach based on the determination of flora diversity by PCR-DGGE and

bands sequencing, the cloning (and sequencing) of entire 16S rDNA from the putative pathogen and the research of the pathogen by semi-quantitative PCR.

II. METHODS

Samples were taken from two commercial farmhouses in Brittany, France. The small intestine and caecal contents of five animals per farm were collected and pooled separately. Bacterial DNA were extracted from each pool of five animals by using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA), according to the manufacturer's instructions. DNA extracts were subjected to a "universal" Nested PCR of eubacterial 16S rDNA with fD1 and rD1 primers (Weisburg *et al.*, 1991) in first time (PCR1) and 63f-HDA2 primer set in second time (PCR2). Amplified fragments were separated in a 30-50% Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer and Smalla, 1998). A solution of 100 % chemical denaturant consists of 7 M urea and 40 % formamide. Interesting bands from DGGE profiles were cloned and sequenced. Cloning was also undertaken on DNA extracts amplified by PCR1 for which presence of the putative pathogen was revealed by DGGE. The cloning vector used was the pCR[®] 2.1 TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

Three clone inserts, that present a DGGE co-migrated band with the putative pathogen, were totally sequenced. Sequences were compared to the ones present in the Ribosomal Database Project II (RDP) (Cole *et al.*, 2007) and a phylogenetic tree with neighbor-joining method was built with the three clone sequences and the nearest RDP sequences. Lastly, specific primers were designed from the clone sequences and used in semi-quantitative PCR experimentations.

III. RESULTS

DGGE realized on samples of small intestine and caecal contents of turkey affected by non specific enteritis symptoms show a specific band compared to samples from healthy turkey. 63f-HDA2 DGGE band sequence (* in figure 1) reveals a sequence that matches with *Clostridium* genus. Cloning of 16S rDNA genes from samples of turkey affected by the disease reveal 3 clones with the same DGGE migration as the incriminated band. The sequence of those clones was identical and match at 96,6 % with *Clostridium lituseburense* and at 97-99.8% with several uncultured bacteria. Phylogenetic tree (data not show) reveal

that our sequence is regrouped with several uncultured bacterium sequences, demonstrating that this bacterium is certainly not yet isolated and available in collection. Derived from the obtained sequences, a specific set of primers were designed and the semi-quantitative PCR made with this couple of primers reveals presence of the incriminated bacterium by approx. 50 fold higher in turkey affected by the disease compared to the healthy ones (Figure 2).

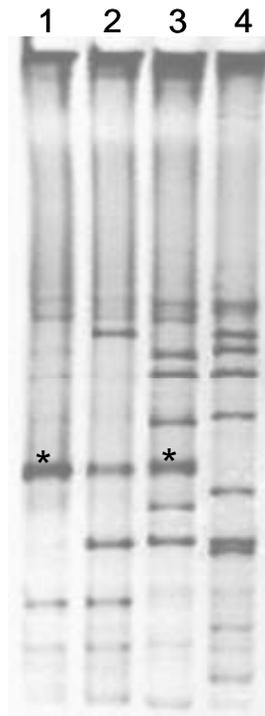


Figure 1. DGGE gel of 16S rDNA gene amplifications using the 63f-HDA2 primer set. Lanes 1-2: small intestine. Lanes 3-4: caeca. Lanes 1-3 diarrheic turkeys. Lanes 2-4: healthy turkey

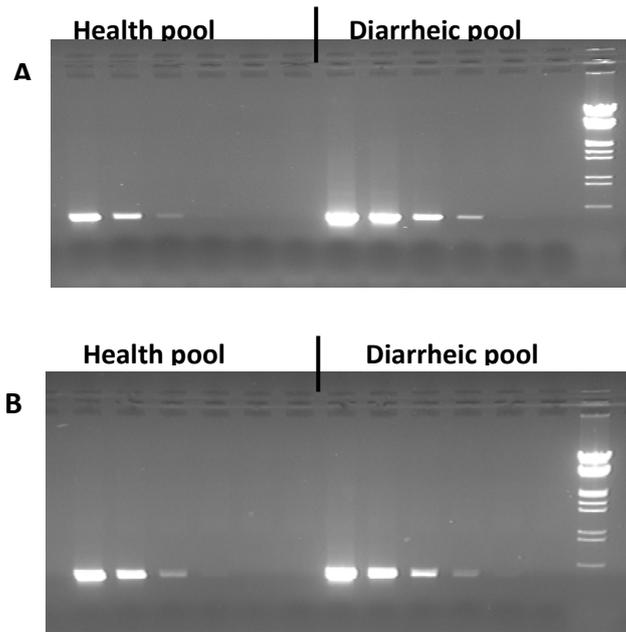


Figure 2. Semi-quantitative PCR using the *Clostridium* sp. specific primers. A: caeca. B: small intestines. Decimal dilutions of extracted DNA were submitted to PCR analysis.

IV. DISCUSSION

This study focused on a putative etiologic bacterial agent of non specific enteritis in turkey. This bacterium closed to *Clostridium lituseburens* has been identified in quantity in turkeys which are affected by non specific enteritis symptoms. The 16S rDNA sequence of this bacterium is now known at 95 % and specific primers designed from this sequence will help to understand its pathology.

A quantitative PCR will be undertaken in a near future with the same set of primers in order to refine the results obtained with semi-quantitative PCR. When this step will be operated, a significant number of samples will be analyzed to confirm the implication of this identified bacterium in non specific enteritis in turkey. Fluorescence *in situ* hybridization will be conducted to investigate tissue or organ colonization. After all, isolation attempts of this bacterium could be undertaken in order to characterize it and to fight against the associated disease.

REFERENCES

Cole, J. R., Chai, B. Farris, R. J. Wang, Q. Kulam-Syed-Mohideen, A. S. McGarrell, D. M. Bandela, A. M. Cardenas, E. Garrity, G. M. and Tiedje, J. M. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research*, **35** (Database issue): D169-D172.

Dahiya J., Wilkie D., Van Kessel A., and Drew, M. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology*, **129**: 60-88.

[Muyzer, G.](#) and [Smalla, K.](#) (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. [Antonie Van Leeuwenhoek](#), **73**: 127-41.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pellettier D. A., and Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, **173**: 697-703.

Microbial equilibrium of *Meleagris gallopavo* Turkey intestine and its modulation by non-antibiotic feed supplementations

B. MASSIAS¹, M. ARTURO-SCHAAN^{2*}, M. DENAYROLLES, A.-M. ELIE¹, E. REVEILLERE², G. ROCABOY² and M. C. URDACI¹

¹ ENITAB, LMBA, UMR 5248. 1, cours du Général de GAULLE, 33170 Gradignan, France;

² CCPA, Z.A. Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France.

* Corresponding author: marturo-schaan@ccpa.fr

Turkey is the second produced poultry in Europe after broiler chicken. As animal health and development is dependent on gastrointestinal (GI) microflora, antibiotics were used as growth-promoters until the recent European authority ban. Thus, alternative substitutes are welcome.

In present study we evaluate effects of non-antibiotic feed supplementations on modulation of microbial equilibrium in GI tract of *Meleagris gallopavo*. Five different diets were used: (1) Fructooligosaccharides (sc FOS); (2) essential oil compounds (EO); (3) essential oil extracts (EOX); (4) association of natural plants and EOX; (5) CCPA diet (used as a reference). Ten birds in each diet group were sacrificed at age of 4-wk- and 7-wk- and their intestinal and caecal contents were analyzed. Microbial community was analyzed by using DGGE method with universal eubacterial and *Lactobacillus* genus-specific 16S rDNA primers.

The majority of identified bacteria belong to four genera: *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Ruminococcus*. We observed modulation in *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Clostridium* microflora depending on age, GI compartment and used diet. These results are relevant and provide insights in understanding of the mechanism of action of the different non-antibiotic feed supplementations on the gut microbiota of turkey.

Keywords: turkey hen; microbial equilibrium; gastrointestinal tract; non-antibiotic feed supplementation; DGGE.

Introduction

An important rise in bacterial resistance to antibiotics has appeared over the last two decades presenting a significant danger for human and animal health. This resistance is mostly due to the abusive use of antibiotics in animal industry field. To limit its expansion, several measures were engaged and, for example, the systematic use of antibiotics as growth promoters in animal feed was banned by the European Union in January the 1st 2006. Since this date, poultry production particularly in turkey knows economical difficulties due to a lower production and to increasing digestive disorders. Therefore, search for alternative feed strategies to antibiotics became a priority for the animal industry.

This work presents the investigations undertaken to determine the effect of several dietary supplementations on microbial equilibrium in GI tract of *Meleagris gallopavo*. The dietary supplementations used included essential oils, natural plants and/or fructooligosaccharides (sc FOS) prebiotic. Microbial equilibrium in the turkey GI tract was studied by using phylogenetic analysis with amplification of the eubacterial 16S rDNA genes (Handelsman, 2004) and their separation in DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer and Smalla, 1998).

Material and Methods

Animals, treatments, and sampling. Turkey were housed in the same farmhouse in five different building in Brittany, France.

In each building, the same number of 1-day-old turkeys (BUT 9) (equally number of males and females) were randomly allocated in each different building. The birds were raised on floor at a stocking density of 7 turkey per building. Feeds were offered *ad libitum* and constant access to water was provided via one bell type drinker per pen. The feeding program for all treatments was based on a seven-based starter to withdrawal regime from 0 to slaughter age (112 days). The starter diet were fed 0-14 days, grower diet up to 15 days, the finisher diet up to 57 days. The diets used were based on wheat, maize and soybean meal. The starter and first grower diets were offered as a crumb and all other diets were fed as pellet. All starter and grower diets contained coccidiostat, Elancoban (70 ppm). No antibiotics were used until the GI samples were taken from the animals.

Treatments were: (1) Fructooligosaccharides (sc FOS); (2) essential oil compounds (EO) at equal doses; (3) essential oils extracts (EOX) - at decreasing doses; (4) association of natural plants and EOX and (5) CCPA reference diet.

All of the additives were premixed in calcium carbonate and wheat before being added at 0.2 % to the respective diet.

Ten birds in each diet group were killed by cervical dislocation at age of 4-weeks and 7-weeks respectively. The small intestine was rapidly excised at Meckel's diverticulum to the ileocecal junction (ileum). The ileal content was collected and pooled for the turkeys within each five different diets at each sampling time. The two caeca were also removed from each bird and the contents pooled for the turkeys within each diet at each sampling time in the same way that it was done for the small intestine.

Samples were collected in sterile tubes, immediately frozen and stored at -20°C until analysed for the microflora profile.

Eubacterial DNA extraction. 25 mg of the twenty different pool samples are subjected to a DNA extraction with QIAamp DNA mini kit (Qiagen, California, USA). Extraction efficiency is thus controlled by electrophoresis on a 1 % agarose gel and DNA extracts are quantified by spectrophotometry on a Victor plate reader (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

DNA amplification and DGGE. A nested PCR on 16S rDNA genes is carried out on each of the twenty DNA extracts. First amplification is realized with PU1-PU2 eubacterial universal primer set (Weisburg *et al.*, 1990) and the second with HDA1-HDA2 eubacterial universal primer set (Walter *et al.*, 2000) or with LAC1-LAC2 Lactic Acid Bacteria-specific primer set (Walter *et al.*, 2001). HDA1-HDA2 and LAC1-LAC2 fragments are separated electrophoretically in DGGE which denaturant gradient lies between 30 to 55 % and between 22.5 to 55 % respectively. Migration is realized at 130 V until xylene cyanol reach the bottom of the gel. The revelation of the gels is assured by an ethidium bromure bath at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and their reading under an UV transilluminator. Bands of interest are cut with sterile scalpel blades.

Sequencing and bacterial identification. After reamplification, bands of interest are sequenced (Genome Express, France) and the sequence results are compared with the RDPII 16S rDNA database (Cole *et al.*, 2007). The bacterial identification is thus deduced from the best similarity percentage and best S_{ab} score.

Results and discussion

Figure 1 represents the DGGE gel analyses of intestinal segments sampled at 4 and 7 weeks by using different primer sets. Seventeen bacterial species were identified by using the eubacteria specific primer set (Figure 1A). Six bacterial spp. were identified by using the Lactic Acid Bacteria (LAB)-specific primer sets (Figure 1B). Principal genus that has been modulated by used diet treatments were: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Lactobacillus* and *Ruminococcus* (Table 1). The profile of bacteria belonging to the *Clostridium* and *Lactobacillus* genus was highly depend on the type of used diet. Variability of the bacterial profiles was also depending on the bird age and intestinal compartment. The highest eubacterial variability depending on the age and diet type was observed in the caecal compartment (CC). Minor modulation of the eubacterial composition in the intestinal compartment (IC) was also observed. Importantly, analysis of the DGGE gel by using

eubacterial primer set demonstrated that bacteria from the *Lactobacillus* genus follow the same variations observed in the LAB-specific gels. Bacteria from the *Clostridium* genus demonstrated a high variability between treatments particularly in CC. The appearance of the *Bacteroides* spp in CC was associated with the *Ruminococcus* microflora decrease in P1, P4 and P5 treatments at the both ages. Some variability in bifidobacteria profile depending on the used diet was detected in CC in 4 wk old birds. Effectively, this genus is more represented in CCPA reference diet. In LAB-specific gels, the variation of LAB was observed in the IC. In the treatment P2, band L3 appears while band L5 disappears. Moreover, a reversion in the presence/absence of L1 was observed between control and treatments at the both ages.

In summary, P2 treatment leads to the highest modulation of the analyzed microflora when compared to reference treatment P5. For example, the identified *Ruminococcus* and *Lactobacillus* L3 are highly associable with the treatment P2 in CC and IC respectively at the 4 wk old birds. These results prove the potential of certain non-antibiotic feed supplementations to modulate the microflora equilibrium.

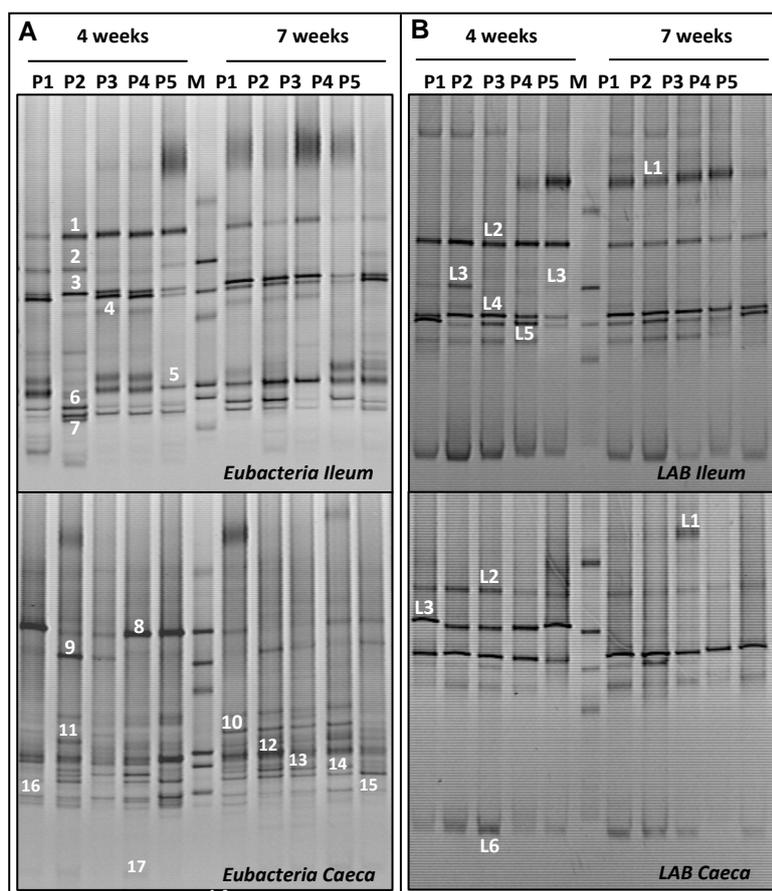


Figure 1. DGGE gels of 16S rDNA gene eubacterial (A) or Lactic Acid Bacteria-specific (B) amplifications. (P1 to P4: treatments 1 to 4; P5: CCPA reference treatment; M: Markers)

Table 1. Match results of the excised band sequences (Specie information remains confidential).

DGGE bands	Identified genus
1 to 4 and L1 to L6	<i>Lactobacillus</i>
5	<i>Escherichia</i>
6, 7 and 10 to 15	<i>Clostridium</i>
8	<i>Bacteroides</i>
9	<i>Ruminococcus</i>
16, 17	<i>Bifidobacterium</i>

As little information about the turkey gut microflora is available in the literature, data comparison and correlation are almost difficult. On the contrary, broiler chicken microflora is well documented and information on the microflora of this poultry provided by Gong *et al.* (2006) or Lu *et al.* (2003) is related with the data given in this study for the turkey gut microflora. For example, *Lactobacillus* in ileum and *Clostridium* and *Bacteroides* in caeca are the majority genus in turkey as well as in broiler chicken.

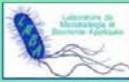
Conclusion

DGGE technique is efficient to monitor the principal modulations of the eubacterial intestinal microflora of the turkey. In present work we proved that feed supplementations as sc FOS, essential oil and natural plants have a potential as digestive flora regulators. Future works, conducted by CCPA, will determine the relation between microflora modulation of these non-antibiotic feed supplementations and the zootechnical performances of the animals.

References

- COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM-SYED-MOHIDEEN A.S., MCGARRELL D.M., BANDELA A.M., CARDENAS E., GARRITY G.M. and TIEDJE J.M.** (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* **35** (Database issue): D169-D172.
- GONG J., SIL W., FORSTER R.J., HUANG R., YUL H., YIN Y., YANG C., and HAN Y.** (2006) 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to caeca. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 147-157.
- HANDELSMAN J.** (2004) Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 669-685.
- LU J., IDRIS U., HARMON B., HOFACRE C., MAURER J., LEE, M.D.** (2003) Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied Environmental Microbiology* **69**: 6816-6824.
- MUYZER G. and SMALLA K.** (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- WALTER J., HERTEL C., TANNOCK G.W., LIS C.M., MUNRO K. and HAMMES W.P.** (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology* **67**: 2578-2585.
- WALTER J., TANNOCK G.W., TILSALA-TIMISJARVI A., RODTONG S., LOACH D.M., MUNRO K. and ALATOSSAVA T.** (2000) Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied Environmental Microbiology* **66**: 297-303.
- WEISBURG W.G., BARNS S.M., PELLETTIER D.A. and LANE D.J.** (1990) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.

CSbyDG : a new clone screening strategy. Application to the exploration of chicken gut microbiota.



B. MASSIAS and M. C. URDACI
LMBA, UMR 5248, ENITAB, 1, cours du Général de GAULLE, 33170 GRADIGNAN, FRANCE
Contact: b-massias@enitab.fr

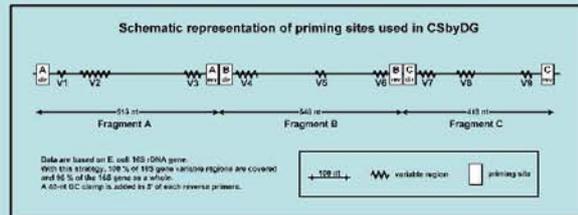
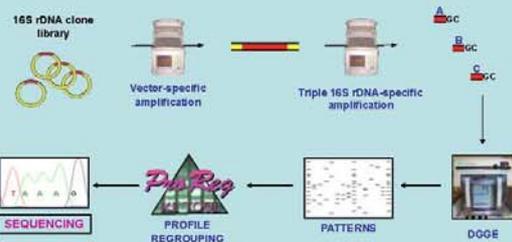


? Introduction ?

• Cloning is a powerful mean to explore microbiota but also (**very**) expensive. To limit sequencing cost, different methods of clone selection are available which, unfortunately, suffer from a poor resolution, particularly with complex samples.

• CSbyDG (for Clone Selection by Denaturing Gradient) is a new strategy for clone selection, based on previous works by Burr *et al.* (2005), which provides a sharp and efficient clone selection. The strategy consists in a triple amplification of 16S rDNA insert and in a DGGE migration to obtain 16S rDNA sequence-specific patterns.

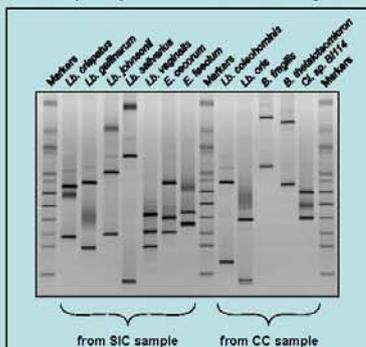
Strategy



Application to chicken gut microbiota

Results obtained with samples from small intestine (SIC) and caecal contents (CC) of the chicken gut:

Exemple of patterns obtained with CSbyDG



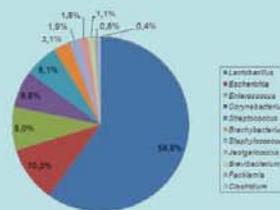
All profiles are derived from 16S rDNA sequences that present an identity score higher to 99 % with a type strain.

SIC

431 clones
431 profiles

Profile Regrouping

106 different patterns regrouped

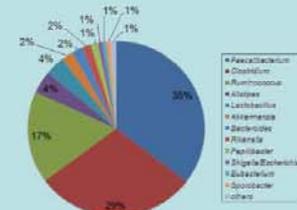


CC

1252 clones
1252 profiles

Profile Regrouping

271 different patterns regrouped



Conclusion and Future Prospects

- CSbyDG make it possible to screen a large clone library from complex samples and finally to reduce sequencing cost.
- In a near future, the realization of a pattern database may permit to identify a bacterium without sequencing.

References: 1. BURR M.D., CLARK S.J., SPEAR C.J. and CAMP E.A.H. (2005) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. *Microb. Ecol.* **51**, 479-486.
2. COLE J.R., CHAI B., FARRIS R.D., VIANO Q., KULAM S.Y.E., MOHIDEEN A.S., MCGARRKELL D.M., BANDELA A.M., CARDENAS E., GARRITY G.M. and TREDE J.M. (2007) The Ribosomal Database Project (RDP-2): introducing rDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* **35** (Database issue) D116-D122.
3. MASSIAS B. and URDACI M. (2008) *ProfReg XL* tool: a simple tool suite for regrouping a high number of identical electrophoretic profiles of many kinds. *Bioinformatics* (submitted).
4. MUYZER G. and SMALINKA L. (1990) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* **72**, 127-141.
5. SUCHEBANKI E., PAULINO L. (1995) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **162**, 387-396.



Turkey hen non specific enteritis



An experimental approach to determine a putative bacterial pathogen

B. MASSIAS¹, M. ARTURO-SCHAAN^{2*}, A.-M. ELIE¹, G. ROCABOY², M. DENAYROLLES¹ and M. C. URDAD¹

¹ENTAB, LMBA, UMR5248, 1, cours du Général de GAULLE, 33170 Gradignan, France

²CCPA, Z.A. Nord Est du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France.



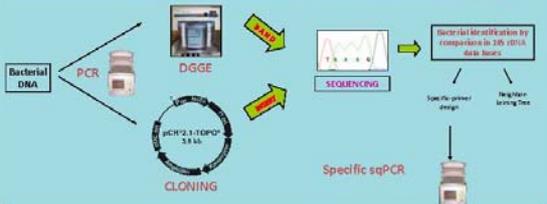
M & M



Sample pools

Two commercial farm houses in Brittany, France /Five male *Meleagris gallopavo* turkey per farm/One farm : healthy control turkeys and the other turkey with non specific enteritis symptoms/One age of sampling between 8-9 weeks/ ileal and caecal contents.

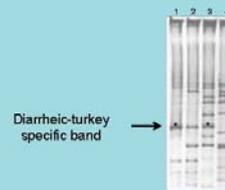
Experimental approach to determine a putative bacterial pathogen:



Results



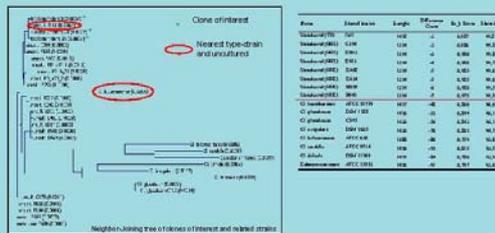
DGGE Results:



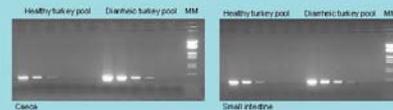
DGGE gel of 16S rDNA gene amplifications using the 63f-HDA2 primer set.

Lanes 1-2: small intestine. Lanes 3-4: caeca. Lanes 1-3 diarrheic turkeys. Lanes 2-4: healthy turkey

CLONING Results:



Specific sqPCR Results:



50-fold higher in diarrheic turkey pool

Conclusion and Future Prospects

- This study focused on a putative etiologic bacterial agent of non specific enteritis in turkey
- This bacterium closed to *Clostridium lituseburense* has been identified in quantity in turkeys which are affected by non specific enteritis symptoms by DGGE
- Specific primers designed from the 16S rDNA sequence of this bacteria will help to understand its pathology
- In the near future, a quantitative PCR will be undertaken with the same set of primers in order to refine the results obtained with semi-quantitative PCR.
- Otherwise future works will be engaged by CCPA with the LMBA collaboration in order to analyzed a significant number of samples to confirm the implication of this identified bacterium in non specific enteritis in turkey.
- Fluorescence *in situ* hybridization will be conducted to investigate tissue or organ colonization. After all, isolation attempts of this bacterium could be undertaken in order to characterize it and to fight against the associated disease.

Acknowledgments:

The authors would like to thank XXXX for their sponsor participation

Cola J R, B. Chai R, J. Paris, Q. Wang, A. S. Kibazo-Syed-Mohamed, D. M. McGivell, A. M. Barakati, E. Cardeas, G. M. Gentry and J. M. Tiedje. 2007. The ribosomal database project (RDP) introducing mpRDP: open and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 35 (Database issue) D660-D72.

Meyer, G. and Stahl, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73: 127-41.

Wang W, C. Burns S M, P. Bittner D A, and Lasa D J. (1995). 16S rDNA based DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology* 175: 697-703.