



HAL
open science

Utilisation de la PCR-SSCP capillaire pour l'étude de la flore digestive de groupes de porcs EOPS

Maël Tanguy, Christine Pissavin-Castillo, Maryline Queguiner, Roland Cariolet, Gérald Le Diguierher, Christine Burel, Philippe Fravallo

► **To cite this version:**

Maël Tanguy, Christine Pissavin-Castillo, Maryline Queguiner, Roland Cariolet, Gérald Le Diguierher, et al.. Utilisation de la PCR-SSCP capillaire pour l'étude de la flore digestive de groupes de porcs EOPS. 39. Journées de la Recherche Porcine, Feb 2007, Paris, France. <hal-02052961>

HAL Id: hal-02052961

<https://hal.science/hal-02052961v1>

Submitted on 28 Feb 2019

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.



HAL Authorization

Utilisation de la PCR-SSCP capillaire pour l'étude de la flore digestive de groupes de porcs EOPS

Maël TANGUY (1), Christine PISSAVIN (1), Marilyne QUEGUINER (1), Roland CARIOLET (2), Gérald le DIGUERHER (2), Christine BUREL (3), Philippe FRAVALO (1)

(1) Unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins

(2) Service de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation, (3) Unité Alimentation Animale
AFSSA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Zoopôle des Côtes d'Armor, BP 53, 22440 Ploufragan

m.tanguy@afssa.fr

Utilisation de la PCR-SSCP capillaire pour l'étude de la flore digestive de groupes de porcs EOPS

Le maintien de l'équilibre de la flore digestive apparaît comme un facteur de prévention de problèmes relevant d'hygiène alimentaire et de santé animale. Cependant, pour caractériser des équilibres digestifs favorables ou défavorables, il faut s'affranchir de deux difficultés majeures. D'une part, la population bactérienne des contenus intestinaux est estimée entre 10^{10} et 10^{11} bactéries par gramme de contenu, mais seules 10 à 20 % seraient cultivables. D'autre part, il faut disposer d'une méthode capable de passer outre la variabilité inter-individuelle des animaux. L'utilisation d'une technique moléculaire de PCR-SSCP qui permette la détection des bactéries indépendamment de leur état physiologique et métabolique apparaît une bonne alternative à l'utilisation des techniques conventionnelles pour aborder les écosystèmes microbiens complexes. L'objectif de cette étude est de décrire la variabilité des contenus digestifs de porcs Exemptés d'Organismes Pathogènes Spécifiés (EOPS) de l'animalerie de l'AFSSA de Ploufragan par PCR-SSCP capillaire et d'approcher par mélange la notion de flore caractéristique d'un groupe. Les matières fécales de 6 truies EOPS ont été prélevées et des mélanges des ADN extraits ont été réalisés. Par ailleurs, douze porcelets EOPS issus de la même mère et n'ayant subi aucune médication ont été abattus 28, 56 et 84 jours post-partum et le caecum a été prélevé. L'analyse a été menée sur l'ADN des caeca et sur des pools d'ADN des caeca réalisés pour chacune des dates d'abattage. L'extraction des ADN a été effectuée avec le kit QIAamp DNA Stool Minikit, puis les produits PCR visant la région V3 de l'ADNr 16S ont été analysés par CE-SSCP (Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism). Les profils ont été classifiés à l'aide de dendrogrammes construits avec le logiciel Bionumerics en utilisant le coefficient Jaccard pour le calcul de la similarité. Après avoir vérifié la reproductibilité de la méthode, l'analyse des profils issus des matières fécales des truies a montré une variabilité inter-individuelle de 25 à 41 % entre les truies EOPS. La variabilité entre les profils diminue lorsqu'on étudie ceux obtenus par mélange et que le nombre de fèces constituant le mélange augmente. Pour une date donnée, le mélange des ADN des contenus caecaux de porcelets permet d'obtenir un profil caractéristique du groupe. De plus, le profil de groupe évolue avec l'âge des porcelets. En conclusion, ces résultats permettent de proposer un outil pour l'étude des équilibres digestifs de flore et de leur rupture dans les contextes de santé animale ou d'hygiène alimentaire.

Assessment of a molecular tool (CE-SSCP) to study balance of caecal flora of SPF piglet's groups.

Stability of the digestive flora seems to be a key factor for the control of problems of both food safety and animal health. However, to assess a favourable or an unfavourable digestive balance, it is necessary to overcome two major difficulties. First, the bacterial population of the intestinal contents are estimated between 10^{10} and 10^{11} bacteria per gram of content, while only 10 to 20% would be cultivable. Second, it is necessary to have at our disposal a method able to pass beyond the inter-individual variability of the animals. The use of a molecular technique of CE-SSCP (Capillary-Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism), which allows the detection of the bacteria independently of their physiological and metabolic state, appeared a good alternative to the conventional bacteriological techniques for studying complex microbial ecosystems. The aims of this study was to describe by CE-SSCP the variability of the digestive contents of SPF (Specified Pathogenic Free) pigs from our experimental husbandry and to assess by mixing individual samples the concept of a flora's profile characteristic of a batch of animals. The faeces of 6 SPF sows were taken and the extracted DNA were mixed. In addition, the caecum of 12 SPF piglets, issued from a single sow and save of medication, were collected after slaughter at 28, 56 and 84 days postpartum. The DNA of each sample was extracted using the QIAamp DNA Stool Minikit. The PCR for amplifying the rDNA 16S V3 region was carried out on the individual DNAs and the mixed DNAs corresponding to each date of slaughtering. Then the PCR products were analysed by CE-SSCP. Profiles were classified via dendrograms build using the BioNumerics software and the Jaccard coefficient for similarity determination. The reproductibility of the method has been demonstrated, then the analysis of the profiles obtained from the faeces of the swines has showed an inter-individual variability of about 40% between SPF swines. Variability between the profiles decreases with increasing number of faeces constituting the mix of DNA. For each date of sampling, the mix of DNA of the piglet caecal contents allows to obtain a characteristic profile for the group of animals. Moreover, the profile of a group varied with the age of the piglets. In conclusion, these results allow to propose a tool for the study of the balances of digestive flora and their rupture at the batch level in the contexts of animal health or food hygiene.

INTRODUCTION

De nombreuses questions concernent la composition, la structure et la stabilité de l'écosystème digestif. Jusqu'à récemment, seules les techniques bactériologiques permettaient de décrire la variabilité de la flore intestinale d'un groupe de porcs élevés et nourris de façon équivalente. L'étude de la microflore intestinale à partir d'une matrice fécale par des techniques bactériologiques classiques de culture a ainsi révélé une grande diversité microbienne (Moore et al., 1987). La population bactérienne des contenus intestinaux est estimée entre 10^{10} et 10^{11} bactéries par gramme de contenus (Castillo et al., 2006). Cependant une contrainte majeure est liée à la cultivabilité des espèces étudiées (Leser et al., 2002). En effet, 80 à 90 % des bactéries présentes dans les matières fécales ne seraient pas cultivables car leurs exigences métaboliques ne sont pas connues (Suau et al., 1999 ; Zoetendal et al., 1998). De plus, malgré l'utilisation de milieux sélectifs de plus en plus performants, on ne peut à ce jour accéder par bactériologie qu'aux genres et espèces les plus fortement représentés (Konstantinov et al., 2006).

L'analyse phylogénétique par la comparaison de séquences d'ADN ribosomique 16S après amplification par PCR permet la détection des bactéries indépendamment de leur état physiologique et métabolique (Leser et al., 2002; Simpson et al., 1999 ; Simpson et al., 2003). Différentes techniques de séparation des produits d'amplification sont à ce jour utilisées pour l'analyse des écosystèmes complexes. Parmi celles-ci, la PCR-SSCP (Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism) ciblant la région V3 de l'ADNr 16S permettrait d'élargir le champ d'investigation par rapport aux techniques bactériologiques conventionnelles pour aborder les écosystèmes microbiens complexes. De plus, une étude récente a montré que la PCR-SSCP sur gel est plus discriminante pour l'étude des systèmes microbiens complexes que la PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) plus fréquemment utilisée (Hori et al., 2006). La SSCP capillaire est une technique haut-débit qui permet quant à elle de séparer les produits d'amplification de manière automatisa-

ble, limitant les problèmes de reproductibilité technique et de réaliser un traitement rapide des profils obtenus (Dabert et al., 2005). La PCR-SSCP capillaire consiste en l'amplification par PCR d'un gène cible, à la dénaturation des fragments doubles brins obtenus à la chaleur en présence de formamide puis à la séparation selon leur conformation tri-dimensionnelle des simples brins dans des capillaires en conditions non dénaturantes. Cette méthode est de plus en plus régulièrement utilisée dans la description de flores complexes par amplification de l'ADNr 16S et caractérisation des profils obtenus (Dabert et al., 2001a ; Dabert et al., 2001b ; King et al., 2005).

Le maintien de l'équilibre de la flore digestive est un facteur de prévention que ce soit en hygiène alimentaire (Fablet et al., 2003) ou en santé animale (Simpson et al., 2000). Cependant, avant de déterminer des équilibres favorables ou défavorables, il est nécessaire d'estimer la variabilité inter-individuelle des animaux (Simpson et al., 2000) puis de minimiser son influence. Le mélange de matières fécales issues d'individus appartenant à un groupe pourrait résoudre ce problème et permettre la mise en évidence des équilibres ou des déséquilibres de flores digestives de l'ensemble d'un lot ou d'une bande de porcs. L'utilisation d'une technique PCR-SSCP capillaire pourrait alors permettre de caractériser l'équilibre de l'écosystème digestif de groupes de porcs. Cette méthode n'ayant jamais été appliquée à l'étude de la flore digestive microbienne d'un groupe de porcs, il est cependant nécessaire d'en déterminer la pertinence lorsqu'elle est appliquée à l'étude des flores digestives de populations de porcs EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés) de l'AFSSA de Ploufragan (Cariolet et al., 2004).

L'objectif de cette étude est de déterminer la faisabilité de la méthode puis d'appliquer la PCR-SSCP capillaire sur des matières fécales de porcs à haut statut sanitaire, de décrire la variabilité des contenus digestifs de porcs EOPS, de déterminer la possibilité de diminution de la variabilité afin d'approcher par mélange la notion de profil de flore représentatif d'un groupe d'individus.

Tableau 1 - Composition des aliments distribués aux animaux EOPS de l'AFSSA de Ploufragan

Aliment	Maïs	Blé	Orge	Avoine	Son	Luzerne	Paille	Soja	Poisson	Phosphate monobicalcique	Carbonate de calcium	Huile de soja	Composé minéral vitaminisé	Protéine de pomme de terre	Dextrose	Lysar	Lysine	Solubles de maïs
Premier Age	31,6	20,8	0	0	0	0	0	3,2	4,3	1,20	1,43	1	0,6	4,5	10	11	0,21	5
Croissance	21,4	0	45	4	0	10	0	16	0	2	1	0	0,5	0	0	0	0	0
Transition	16,3	0	47,5	4	3	5	0	20,5	0	1,6	1,4	0	0,5	0	0	0	0	0
Truie gestante	20,4	0	42	10	2,5	4	4,5	9,5	3	1,5	1,9	0	0,5	0	0	0	0	0
Truie allaitante	23,4	0	44,5	5	2,5	2	0	14	3	1,5	1,9	1,5	0,5	0	0	0	0	0

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et alimentation

Truies :

Les matières fécales de six truies EOPS ont été prélevées afin de tester la faisabilité de la méthode PCR-SSCP capillaire (répétabilité, variabilités inter-individuelles et inter-groupe). Les truies avaient des âges, des régimes alimentaires (Tableau 1) et des rangs de portées différents tel que :

- 1 : truie rang de portée n°4 (truie en gestation)
- 2 : truie rang de portée n°8 (truie en gestation)
- 3 : truie rang de portée n°2 (truie en lactation)
- 4 : truie rang de portée n°6 (truie en gestation)
- 5 : truie rang de portée n°1 (truie en gestation)
- 6 : truie rang de portée n°7 (truie en lactation)

Porcelets :

Douze porcelets EOPS de la porcherie protégée de l'AFSSA de Ploufragan, issus de la même mère et n'ayant reçu aucune médication, ont par ailleurs été utilisés au cours de cette étude afin d'étudier les profils de leur flore cœcale et son évolution au cours du temps. Les porcelets ont été randomisés en trois groupes le jour du sevrage, l'abattage du premier groupe pour prélever les contenus cœcaux ayant eu lieu ce même jour. Le deuxième et le troisième abattage ont eu lieu respectivement 28 et 56 jours post sevrage. Le temps entre l'abattage et la congélation des prélèvements n'a pas excédé deux heures.

Porcelets 1, 2, 3, 4 : abattage j28 postnatal

Porcelets 5, 6, 7, 8 : abattage j56 postnatal

Porcelets 9, 10, 11, 12 : abattage j84 postnatal

Les aliments distribués *ad libitum* aux porcelets étaient sous forme de granulés secs dépourvus de toute substance antimicrobienne. Un aliment premier âge a été distribué aux animaux depuis la première semaine d'âge en maternité jusque deux semaines après le sevrage (21 % de protéines, Tableau 1). L'aliment deuxième âge a été distribué à partir de 42 jours d'âge (durant une période de transition d'une dizaine de jours, 18 % de protéines). L'aliment de croissance a été distribué à partir du 56^{ième} jour d'âge et jusqu'à la fin de l'essai (16 % de protéines).

1.2. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des prélèvements a été réalisée à partir du kit QIAamp DNA Stool Minikit (Qiagen) (McOrist et al., 2002). Un gramme d'échantillon (matières fécales fraîches pour les truies et contenus cœcaux congelés de porcelets) ont été prélevés et gardés dans la glace, 7 ml de tampon de lyse ont alors été ajoutés. La solution obtenue a été vortexée jusqu'à homogénéisation complète de la suspension puis 1,6 ml de la suspension ont subi l'extraction suivant le protocole préconisé par le kit.

Les ADN des fèces des truies 1, 2, 3, 4, 5, 6 ont été extraits et les mélanges des ADN 1-2-3, 4-5-6, 1-2-3-4, 1-2-3-4-5 et 1-2-3-4-5-6 ont été réalisés. Les ADN des contenus cœcaux de porcelets ont été extraits et les mélanges suivants ont été réalisés : 1-2, 3-4, 1-2-3-4, 5-6, 7-8, 5-6-7-8, 9-10, 11-12, 9-10-11-12.

1.3. Amplification génique

L'amplification génique des ADN et des mélanges d'ADN a été réalisée à partir de 1 µl de la solution d'ADN. Le couple d'amorce w49 (AGGTCCAGACTCTACGGG)-w104* (*TTACCGCGGCTGCTGGCAC) ciblant l'ADN codant pour la région V3 de l'ADNr 16S a été utilisé, l'amorce w104* étant marqué avec un fluorochrome 6-Fam sur l'extrémité 5'. Un µl d'ADN a été ajouté à 1,3 µl de dNTP (10mM), 5 µl de tampon 10 X, 1,3 µl de chaque primer (100 ng/µl), 0,5 µl de pfu Turbo (2,5 u/µl) et de l'eau UHQ qsp 50 µl. Les conditions PCR étaient : 2' à 94°C, puis 25 cycles de 30" à 94°C, 30" à 61°C, 30" à 72°C et une élongation finale de 10' à 72°C. Dix µl de chaque produit PCR (200 paires de bases) ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % pendant 30 minutes à 100V. Le marqueur de taille utilisé pour identifier les produits d'amplifications était le 100 pb (1µl) (Ozyme). La coloration a été effectuée dans un bain de BET 0,5 µg/ml pendant 20 minutes et l'analyse réalisée avec le système d'acquisition d'images BioCapt.

1.4. Migration des produits PCR

La SSCP capillaire consiste ici en la migration de simples brins d'ADN dans des capillaires de 50 cm du séquenceur 4 capillaires AbiPrism Genetic Analyser 3100 Avent (Applied Biosystems). Après dilution au 1/5 des produits d'amplification obtenus, 1 µl a été déposé par puit, puis 19 µl d'un mix contenant 18,5 µl de formamide (Applied Biosystems) et 0,5 µl de Standard interne Genescan standard HD 400 rox (Applied Biosystems) ont été ajoutés. Les produits d'amplification ont ensuite été dénaturés à la chaleur (5 minutes/95°C) sur un bloc chauffant, puis refroidi pendant 10 minutes dans de la glace additionnée d'eau. La plaque, brièvement centrifugée, a été placée dans le séquenceur. La migration se déroule dans du polymère constitué de 6,22 gr de CAP polymer (Applied Biosystems), de 1 gr de Glycérol (In Vitrogen), de 1 ml de tampon 10X (Applied Biosystems) et d'eau ppi (Cooper) qsp 10ml. La migration a été réalisée à une température de 32°C et une puissance de 15kV.

1.5. Analyse des résultats

Les analyses de profils ont ensuite été réalisées avec les logiciels GeneMapper (Applied Biosystems) et Bionumerics (Applied Maths). Le logiciel GeneMapper a permis d'aligner les profils obtenus à partir du standard interne de migration. La similarité des profils a été étudiée en analysant la présence/absence de bandes d'un profil à l'autre par Bionumerics. Le coefficient de Jaccard (Legendre and Legendre, 1998) a été sélectionné au cours de ce projet pour l'étude de la similarité des profils, sa formule est :

$$J_{\text{jaccard}} = \frac{n_{ab}}{n_a + n_b}$$

n_{ab} , nombre de fragments communs présents sur les deux profils A et B
 n_a , nombre total de fragments présents sur le profil A
 n_b , nombre total de fragments présents sur le profil B

Ce coefficient a été choisi car il considère que l'absence d'un fragment dans deux profils n'implique pas de ressemblance

entre les individus concernés. La mesure de similarité entre profils ne tient donc compte que des fragments communs. En effet, la double absence d'un type bactérien peut avoir des causes très différentes, alors que la double présence implique nécessairement une ressemblance entre les deux environnements, dont les conditions doivent permettre l'existence du même type bactérien. À partir de la matrice de similarité obtenue, un dendrogramme a été généré à l'aide de la méthode Unweighted Pair Group Method using Arithmetic average (UPGMA) (Legendre et Legendre, 1998 ; Sneath et Sokal, 1973).

2. RÉSULTATS

2.1. Analyse de la reproductibilité de la méthode

Des profils SSCP ont été obtenus à partir des matrices fécales. Chaque profil est constitué de 50 à 60 pics (Figure 1). La reproductibilité de la méthode a été évaluée en comparant plusieurs profils d'un même échantillon ayant subi différents protocoles. D'une part, deux extractions d'ADN ont été réalisées en parallèle sur un même pool de matières fécales des 6 truies et les PCR-SSCP capillaires correspondantes ont été effectuées. D'autre part, une extraction individuelle des ADN des fèces des 6 truies a été effectuée, puis le mélange des ADN a été réalisé *a posteriori* avant d'être soumis à des PCR-SSCP capillaires. Les profils SSCP sont illustrés sur la Figure 1. Les résultats ont montré que les profils sont totalement similaires (similarité de 100 %) après plusieurs migrations successives sur différents capillaires (résultats non présentés). Après deux PCR réalisées

en parallèle sur des pools d'ADN, les profils ont légèrement varié avec la disparition d'un pic (Figure 1). La similarité des profils a alors été évaluée à 98,2 %. Après deux extractions réalisées en parallèle sur un même pool de matières fécales, les profils SSCP sont strictement identiques. La PCR-SSCP capillaire est donc reproductible dès l'extraction des ADN et permet de générer des profils de flore à partir d'un prélèvement fécal de truies. Lorsque les profils issus d'un mélange d'ADN sont comparés à ceux issus de mélanges de matières fécales, on observe de légères variations avec l'apparition et la disparition de certaines bandes. L'analyse de la similarité des profils avec l'indice de Jaccard a évalué à 85,5 % la similitude entre les deux profils (résultats non présentés).

2.2. Analyse des profils de truies

Les truies EOPS utilisées au cours de cette étude ne présentaient pas de pathologies, n'avaient subi aucune médication et recevaient deux régimes alimentaires en fonction de leur stade (gestation ou lactation). L'analyse des profils issus des matières fécales de ces truies a montré une faible similarité des profils individuels : elle est comprise entre 59 % et 75 %.

Les mélanges d'ADN ont montré une augmentation de la similarité des profils proportionnellement à l'augmentation du nombre d'individus constituant le mélange. Les profils des mélanges 1-2-3 et 4-5-6 possèdent ainsi une similarité de 81 %. Les profils 1-2-3-4, 1-2-3-4-5 et 1-2-3-4-5-6 possèdent une similarité proche ou supérieure à 90 % (Figure 2).

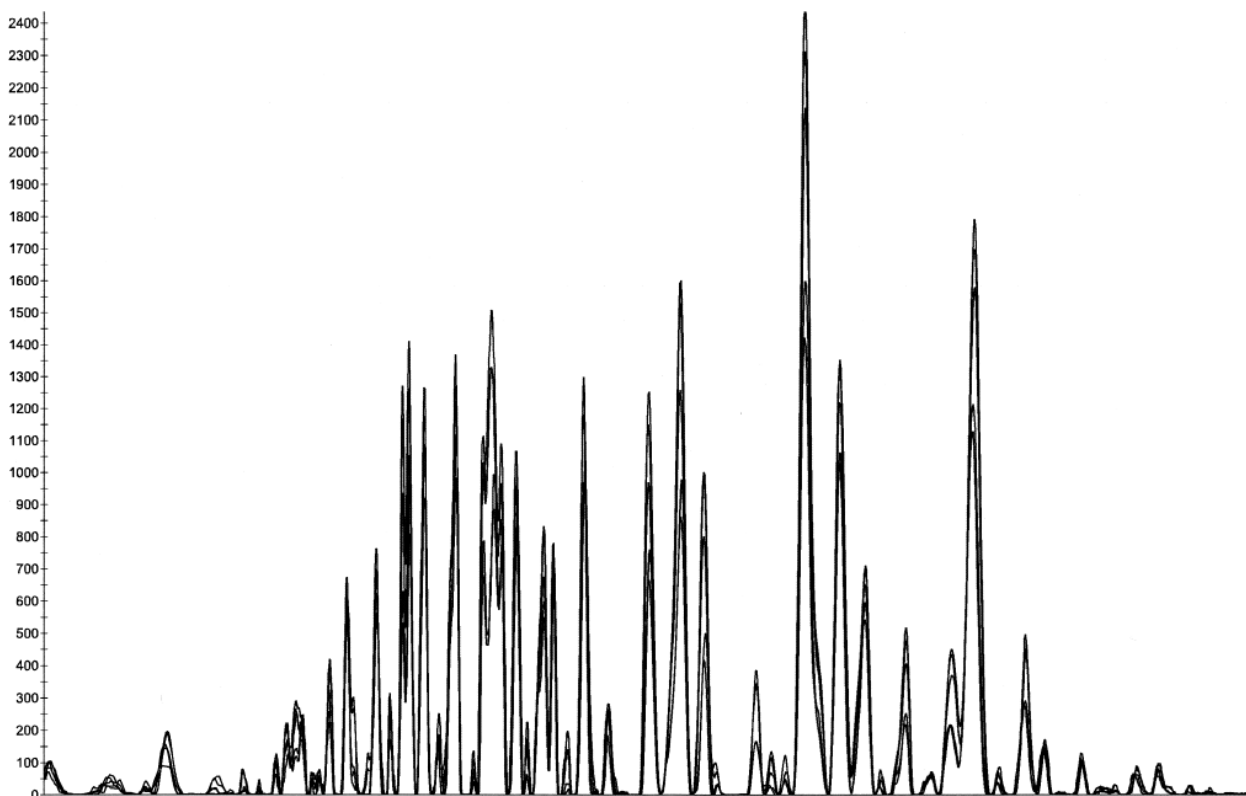


Figure 1 - Représentation des profils de deux extractions réalisées en parallèle sur un même pool de matières fécales des 6 truies et des profils de deux PCR réalisées après une extraction individuelle des ADN des fèces des 6 truies puis le mélange des ADN

2.3. Analyse des profils de porcelets

2.3.1. Santé des porcelets

Les porcelets utilisés au cours de cette étude ne présentaient pas de maladies. Les performances de croissance et l'état de santé des animaux était en concordance avec ceux habituellement observés dans la porcherie protégée de l'AFSSA de Ploufragan. Un épisode diarrhéique a cependant été observé sur le porcelet 12 au cours du 67^{ième} jour post-partum sans que la cause n'ait pu être déterminée (Recherches de *Salmonella* et de Rotavirus négatives).

2.3.2. Analyse des profils

L'analyse des profils issus des flores cœcales des porcelets, représentée sur la figure 3, montre l'apparition de trois clusters distincts en fonction de l'âge des porcelets. Les résultats sont en effet caractérisés par une faible variabilité inter-individuelle à chaque date d'abattage, le pourcentage de similitudes entre les individus étant au minimum de 68,8 %, 81,3 % et 88,6 % pour les individus des groupes de 1 à 4, de 5 à 8 et de 9 à 12, respectivement (Figure 3).

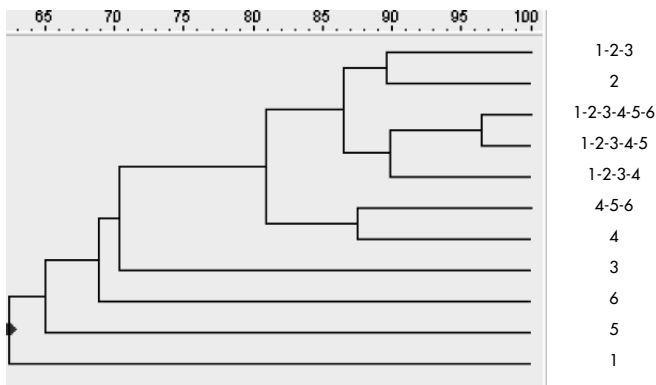


Figure 2 - Représentation de la similarité des profils de matières fécales individuelles ou en mélanges de 6 truies en utilisant le coefficient de Jaccard et la méthode UPGMA

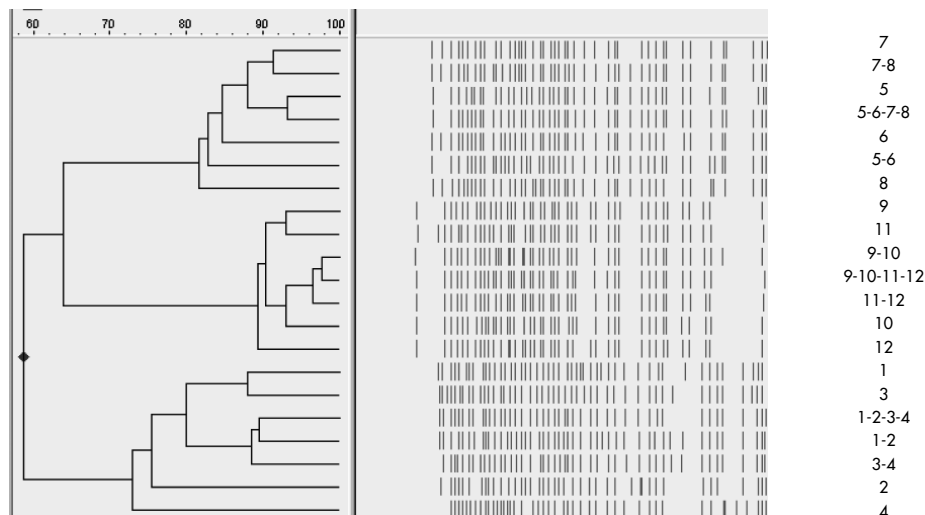


Figure 3 - Représentation de la similarité des profils des cæca individuels ou en mélanges des porcelets, pour des prélèvements effectués à 3 âges différents : 28j (porcelets 1, 2, 3, 4), 56j (porcelets 5, 6, 7, 8) et 84j (porcelets 9, 10, 11, 12), en utilisant le coefficient de Jaccard et la méthode UPGMA

Les profils des mélanges réalisés pour chaque date d'abattage s'intègrent par ailleurs dans les clusters. Ils sont caractéristiques du groupe de porcelets à chacune des dates d'abattage. Les profils 1-2, 3-4 et 1-2-3-4 sont ainsi représentatifs du groupe constitué des porcelets de 1 à 4 abattus à j28, les profils 5-6, 7-8 et 5-6-7-8 sont caractéristiques des porcelets du groupe de 5 à 8 abattus à j56 et les profils 9-10, 11-12 et 9-10-11-12 sont représentatifs des profils des individus de 9 à 12 abattus à j84. Le profil 9-10-11-12 qui possède par exemple une similitude de 90,3 %, 93,1 %, 90,3 % et 89,4 % respectivement par rapport aux porcelets 9, 10, 11 et 12 est donc représentatif des quatre porcelets constituant ce groupe.

L'évolution de la similarité observée dans le temps en fonction de l'âge des porcelets est par ailleurs renforcée lorsque l'analyse est réalisée sur les mélanges. La similarité du groupe 1-2-3-4 est ainsi évaluée à 58 % par rapport aux groupes 5-6-7-8 et 9-10-11-12 respectivement, une similarité de 64% étant observée entre les groupes 5-6-7-8 et 9-10-11-12. Ces résultats montrent que la variation des profils est inhérente à la date d'abattage du groupe, avec une augmentation de la similitude des profils entre les abattages j56 et j82 par rapport au premier abattage à j28.

3. DISCUSSION

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir du kit QIAamp DNA Stool Minikit. Nous avons au préalable comparé l'efficacité de ce kit à celle de deux extractions conventionnelles phénol-chloroforme parmi les 19 techniques testées sur des contenus digestifs de porcs et décrites dans la littérature scientifique (Anderson and Lebepe-Mazur, 2003). Les résultats, tant au niveau quantitatif et qualitatif, que par la rapidité de l'extraction, nous ont incité à utiliser ce kit pour l'extraction d'ADN. Son efficacité supérieure a également été montrée par rapport à d'autres kits commerciaux (Li et al., 2003). Nous avons par ailleurs ciblé la région V3 de l'ADNr 16S. Cette région apparaît comme la région variable cible la plus utilisée pour l'étude des flores complexes et plus

particulièrement les flores digestives par des techniques de biologie moléculaire (Dabert et al., 2005 ; Peu et al., 2006 ; Simpson et al., 2000 ; Simpson et al., 1999).

Afin de déterminer des équilibres digestifs favorables ou défavorables que ce soit en hygiène alimentaire ou en santé animale, il faut disposer d'une technique qui puisse passer outre la variabilité inter-individuelle des animaux. Les techniques de biologie moléculaires ont par exemple été appliquées sur des études de cinétique de flores intestinale chez les nouveaux-nés (Favier et al., 2002), ou sur les flores digestives de patients contractant le syndrome de Bowel (Ott et al., 2004). Ces études montrent cependant la difficulté d'appréhender l'étude des flores digestives de part la variabilité inter-individuelle de la composition microbienne des écosystèmes digestifs, que ce soit chez l'homme (Ott et al., 2004) ou chez le porc (Simpson et al., 1999). Le principe du mélange de contenus intestinaux permettant de mettre en évidence des équilibres ou des déséquilibres de flores digestives de lots ou de bandes de porcs par des techniques de biologie moléculaire n'avait jamais été approché et c'est pourquoi nous l'avons testée au cours de cette étude.

La SSCP capillaire utilisée pour l'étude des écosystèmes digestifs de porcs est reproductible dès l'extraction. L'utilisation au cours de cette étude de la SSCP capillaire plutôt que la SSCP sur gel a de plus permis d'augmenter la rapidité et la sensibilité de la méthode tout en s'affranchissant des difficultés techniques liées à la coloration au nitrate d'argent des gels. La SSCP sur gel avait déjà permis de déterminer les profils de flores digestives humains (Ott et al., 2004) alors que la SSCP capillaire a permis de réaliser un suivi dynamique des flores microbiennes majoritaires de lisier de porcs (Peu et al., 2006). Notre étude a montré que la technique est reproductible que le mélange soit réalisé avant ou après l'extraction des ADN. Cependant, au sein d'une même étude, la constitution du mélange doit être standardisée afin qu'il soit toujours réalisé au même stade, que ce soit avant ou après l'extraction des ADN.

L'analyse des profils de flore digestive des truies a permis de montrer la présence de variabilité inter-individuelle entre des truies à haut statut sanitaire en bonne santé (similarité de 59 à 75 %). Deux des truies ont changé de régime alimentaire les dix jours précédents l'étude (aliment gestation remplacé par un aliment lactation), mais ce changement n'a pas affecté de manière significative leurs profils de flore individuels par rapport à ceux des autres truies. Il est vrai que les aliments gestation et lactation sont très similaires. En effet, les matières premières utilisées étaient quasiment identiques, seules les proportions de chacune permettant de faire varier de 2 % le taux de protéines entre les deux aliments. Le mélange des ADN, qui a permis de passer outre la variabilité entre les truies, a montré qu'il est possible de tendre vers un profil de flore digestive caractéristique d'une bande de porcs ou de truies (similarité supérieure à 90 % avec un mélange des fèces d'au moins 4 truies).

L'analyse de l'ensemble des profils de contenus cœcaux des porcelets a montré que les profils s'organisent en trois clusters en fonction de l'âge des porcelets. La similitude (68,8 %) des profils au sein du cluster des porcelets au sevrage (j28) s'est cependant avérée plus faible que celles des clusters obtenus pour la période de transition (81,3 %) (distribution de l'aliment deuxième âge ; J56) et la période de croissance (88,6 %) (distribution de l'aliment croissance ; J85). L'alimentation des porcelets en période de pré-sevrage n'est pas exclusivement constituée du lait de la mère mais aussi d'un libre accès à l'aliment premier âge. Le régime alimentaire, et donc la mise en place de la flore des porcelets pourrait alors être déterminée en fonction de la curiosité des porcelets vis-à-vis de l'aliment premier âge, et pourrait alors expliquer la similitude plus faible entre les profils des animaux de cet âge.

Les profils des mélanges des 3 groupes s'intègrent au sein des clusters des porcelets traités individuellement, ils sont donc représentatifs des porcelets présents dans ces clusters. Les résultats montrent donc que les profils de flores cœcales possèdent une forte similarité inter-individuelle entre les porcelets du même âge, évoluant de manière identique au sein du groupe avec l'âge des porcelets. Ces résultats vont à l'encontre de la plupart des études sur les flores digestives qui montrent une variabilité inter-individuelle relativement élevée mais stable dans le temps. Ainsi, l'équipe de Simpson a montré que 9 porcelets étudiés par DGGE possédaient des profils de flores très différents mais stables dans le temps sur une période de 3 semaines (Simpson et al., 2000). Mais nos résultats confirment cependant ceux obtenus au cours d'une autre étude de cette même équipe (technique DGGE) qui avait montré une variation des profils de matières fécales poolées entre 6 porcelets pré-sevrés, 5 porcelets sevrés âgés de 6 semaines et un porc adulte (Simpson et al., 1999).

CONCLUSION

En conclusion, la SSCP capillaire est une méthode qui permet de décrire la variabilité des contenus digestifs de truies et de porcelets de la porcherie EOPS de l'AFSSA de Ploufragan. Elle a par ailleurs permis de mettre en évidence la variation du profil d'un groupe de porcelets au cours du temps (du post-sevrage à la phase de croissance). Elle a enfin permis d'approcher par mélange des contenus intestinaux la notion de flore de groupe en proposant un outil pour l'étude des équilibres de flore digestive et de leur rupture dans les contextes de santé animale ou d'hygiène alimentaire, l'utilisation de cette technique dans des conditions d'élevage conventionnel restant toutefois à valider.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Patrick Dabert (Cemagref-Rennes), Yves Desdevises (Université Pierre et Marie Curie - Banyuls-sur-Mer) ainsi que toutes les personnes ayant participé au projet pour leur collaboration. Ils remercient également la Région Bretagne pour son soutien financier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson K., Lebepe-Mazur S. 2003. Comparison of rapid methods for the extraction of bacterial DNA from colonic and caecal lumen contents of the pig. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 6, 988-93.
- Cariolet R., Le Digerher G., Ecobichon P., Julou P., Jolly J. P., Madec F. 2004. Production of long term, low-cost specific pathogen free pigs. *International Society for Animal Hygiene*, 1, 149.
- Castillo M., Martín-Orue S. M., Manzanilla E. G., Badiola I., Martín M., Gasa J. 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet. Microbiol.*, 114, 165-70.
- Dabert P., Delgenes J. P., Godon J. J. 2005. Monitoring the impact of bioaugmentation on the start up of biological phosphorus removal in a laboratory scale activated sludge ecosystem. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 575-88.
- Dabert P., Fleurat-Lessard A., Mounier E., Delgenes J. P., Moletta R., Godon J. J. 2001a. Monitoring of the microbial community of a sequencing batch reactor bioaugmented to improve its phosphorus removal capabilities. *Water Sci. Technol.*, 43, 1-8.
- Dabert P., Sialve B., Delgenes J. P., Moletta R., Godon J. J. 2001b. Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 500-9.
- Fablet C., Boloel J., Fravallo P., Jolly J., Eveno E., Hascoet Y., Salvat G., Madec F. 2003. Etude des circonstances associées à l'excrétion de *Salmonella enterica* par les porcs en croissance. *Journées Rech. Porcine*, 35, 401-408.
- Favier C., Vaughan E., De Vos W., Akkermans A. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 1, 219-26.
- Hori T., Haruta S., Ueno Y., Ishii M., Igarashi Y. 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. *J. Microbiol. Methods*, 66, 165-9.
- King S., McCord B. R., Riefler R. G. 2005. Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 60, 83-92.
- Konstantinov S. R., Awati A. A., Williams B. A., Miller B. G., Jones P., Stokes C. R., Akkermans A. D., Smidt H., de Vos W. M. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.*, 8, 1191-9.
- Legendre and Legendre. 1998. Numerical ecology. Second English edition. Elsevier.
- Leser T. D., Ament J. Z., Jensen T. K., Lindcrone R. H., Boye M., Moller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 673-90.
- Li M., Gong J., Cottrill M., Yu H., de Lange C., Burton J., ToppE. 2003. Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *J. Microbiol. Methods*, 54, 1, 13-20.
- McCrist A., Jackson M., Bird A. 2002. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *J. Microbiol. Methods*, 50, 2, 131-9.
- Moore W., Moore L., Cato E., Wilkins T., Kornegay E. 1987. Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 7, 1638-44.
- Ott S. J., Musfeldt M., Wenderoth D. F., Hampe J., Brant O., Folsch U. R., Timmis K. N., Schreiber S. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53, 685-93.
- Peu P., Brugere H., Pourcher A. M., Kerouredan M., Godon J. J., Delgenes J. P., Dabert P. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 3578-85.
- Simpson J., McCracken V., Gaskins H., Mackie R. 2000. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 11, 4705-14.
- Simpson J., McCracken V., White B., Gaskins H., Mackie R. 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods*, 36, 3, 167-79.
- Simpson P., Stanton C., Fitzgerald G., Ross R. 2003. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J. Bacteriol.*, 185, 8, 2571-81.
- Sneath P. H. A., Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy - The principles and practices of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J., Gibson G., Collins M., Dore J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 11, 4799-807.
- Zoetendal E., Akkermans A., De Vos W. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 10, 3854-9.

