Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores : approche comparée vache/lapin

Rory Michelland

▶ **To cite this version:**

Rory Michelland. Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores : approche comparée vache/lapin. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2009. Français. NNT : 2009INPT006A . tel-04352966

HAL Id: tel-04352966

https://theses.hal.science/tel-04352966

Submitted on 19 Dec 2023

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.

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition*

Présentée et soutenue par *Rory MICHELLAND*
Le *01-10-2009*

Titre : *Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores: approche comparée vache/lapin*

JURY
L. Fortun-Lamothe Directrice de thèse
V. Monteils Co-encadrante
G. Fonty Rapporteur
P. Dabert Rapporteur
F. Garabetian Examinateur
J.J. Godon Examinateur

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries*
Unité de recherche : *UMR 1289 TANDEM*
Tissus, Animaux, Nutrition,Digestion, Ecosystème, Métabolisme
Directeur(s) de Thèse : *L. Fortun Lamothe*
Rapporteurs : *G. Fonty, P. Dabert*

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé à l'UMR 1289 TANDEM (Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème, Métabolisme).

Je tiens à remercier les personnes qui ont accepté de participer au jury de ce travail : G. Fonty (Microorganismes: génome et environnement, CNRS), P. Dabert (Gestion des effuents d'élevage et des déchets municipaux, CEMAGREF) qui me font l'honneur d'être rapporteurs et F. Garabetian (Environnements et Paléoenvironnements Océaniques, Université de Bordeaux) et J.J. Goddon (Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA) d'avoir accepté de participer à ce jury.

J'adresse mes remerciements à L. Fortun-Lamothe (Directeur de thèse), V. Monteils (Co-directeur de thèse), T. Gidenne (animateur de l'axe nutrition et écosystèmes digestifs) pour m'avoir fait confiance, encadré, soutenu et s'être investi au cours de ce projet. Je tiens à remercier S. Combes et L. Cauquil pour leur investissement dans ce travail. Je remercie également le directeur du laboratoire X. Fernandez. Je remercie S. Lek et la commission scientifique de l'école doctorale SEVAB pour leur confiance témoignée lors de l'attribution de la bourse MRT.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux :

- les membres du comité de pilotage pour le temps consacré et les discussions : E. Forano (Unité de Microbiologie, INRA) et J. Hamelin (Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, INRA).
- S. Dejean (Institut de Mathématiques de Toulouse, Université Paul Sabatier) pour son aide sur la partie bioinformatique et biostatistique de ce travail.
- le personnel de l'UMR qui m'a soutenu, s'est investi dans ce travail et pour la bonne ambiance : P. Aymard, C. Bannelier, V. Bataille, Jacques De Dapper, Jean De Dapper, C. Dufresne, R. Dufresne, B. Gabinaud, A. Lapanouse, H. Manse, C. Molette, B. Santacruz, M. Segura, S. Seidlinger et V. Tartie.
- le personnel de l'UMR que j'ai moins côtoyé pendant ces 3 ans. A. Auvergne, C. Bayourthe, R. Babile, M. Bouillet Oudot, M.L. Chemit, Y. Farizon, F. Enjalbert, N.

Marty-Gasset, M.C. Nicot, C. Pautot, H. Remignon, A. Troegeler, Z. Vitezica et Z. Whadi-moussa.

Enfin un grand remerciement aux personnes ayant séjournées au bureau E212 pour l'ambiance et les discussions : M. Kimse, M. Martignon, S. Murr, A. Zened, E. Oliveira, J. Garvanèse, I. Wane, U.N. Tran, F. Nice, C. Assemat, V. Soulie, A. Akoutey. Merci également aux (anciens) doctorants pour leur aide précieuse C. Julien, J.P. Marden, Y. Magloire et L. Theron.

Merci également à tous les amis, à la famille, pour leur aide permanente. Enfin, un merci tout particulier à E. Pillet, ma vieille branche, pour son soutien et ces discussions teintées de métaphysique sur le doctorat, la recherche et la vie en générale.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE DE RANG A

1. R.J. Michelland, V. Monteils, A. Zened, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, J. Hamelin, L. Fortun-Lamothe 2009 **Spatial and temporal dynamics of bacterial community in the bovine digestive tract**. Journal of applied microbiology. 107(45): 1642-1650

2. R.J. Michelland, S. Combes, V. Monteils, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe 2009 **Molecular analysis of the bacterial community in the digestive tract of rabbit.** Anaerobe (in press)

3. R.J. Michelland, S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, L. Cauquil 2009 **StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles**. Molecular ecology resources. 9(5): 1359-1363

4. R.J. Michelland, S. Combes, V. Monteils, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe **Comparison of the archaeal community in the fermentative compartments and feces of the cow and the rabbit**(in prep.)

5. R.J. Michelland, V. Monteils, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe **2-months dynamic of the rumen predominant bacterial divisions in response to a nutritional disturbance** (in prep.)

6. R.J. Michelland, S. Combes, V. Monteils, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe **Rapid adaptation of the bacterial community in the rabbit cæcum to a reduction of dietary fiber supply** (in prep.)

COMMUNICATIONS EN CONGRES ET JOURNEES D'ANIMATIONS

1. R.J. Michelland, V. Monteils, A. Zened, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe (2007) **Caractérisation des communautés bactériennes dans le rumen et les fecesde bovins adultes par PCR-SSCP**. Colloque d'écologie microbienne, La Grande Motte, France, pp.71.

2. R.J. Michelland, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, V. Monteils, L. Fortun-Lamothe (2007) **Caractérisation comparée des communautés bactériennes du contenu cæcal, des cæcotrophes et des feces dures chez le lapin adulte par CE-SSCP des gènes codant pour l'ARN 16S**. 12ème journée de la recherche cunicole, Le Mans, France, pp.77-80.

3. R.J. Michelland, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, V. Monteils, L. Fortun-Lamothe (2008) **Characterization of bacterial communities in cæcum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP)** 9th world rabbit congress, Verona, Italy, pp.294.

4. R.J. Michelland, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, V. Monteils, L. Fortun-Lamothe (2008) **Comparative study of archaeal community in the digestive ecosystem of the rabbit and cow reveals strong host species and compartment effects** Gut microbiome 6th INRA-RRI symposium, Clermont Ferrand, France, pp.50.

5. R.J. Michelland, S. Combes, L. Cauquil, V. Monteils, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe (2007) **Caractérisation comparée des communautés bactériennes du contenu cæcal, des cæcotrophes et des faeces dures chez le lapin par PCR-SSCP.** 2ème journée d'animation scientifique du département de physiologie animale et système d'élevage de l'INRA, Tours, France, pp.107.

6. R.J. Michelland, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, V. Monteils, L. Fortun-Lamothe (2009) **Comparative study of the archaeal community in the digestive tract of the**

rabbit and the cow reveals strong host species and compartment effects. Journée scientifique de la SEVAB, Castanet Tolosan, France.

7. R. J. Michelland, V. Monteils, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe (2009) **Les *archaea* dans le tube digestif des herbivores domestiques : comparaison vache / lapin**. 2ème journée de la recherche de l'ENSAT, Castanet Tolosan, France.

8. R.J. Michelland, S. Combes, V. Monteils, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe (2009, submitted) **Adaptation rapide de la communauté bactérienne cæcale du lapin à une réduction du taux de fibres alimentaires**. 3ème journée d'animation scientifique du département de physiologie animale et système d'élevage de l'INRA, Tours, France.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements **3**

Publications et communications issues de la thèse **5**
Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture de rang A 5
Communications en congrès et journées d'animations 6

Table des matières **9**
Liste des tableaux **15**
Liste des figures **17**
Liste des abbréviations **21**

INTRODUCTION GENERALE **23**

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **27**

Chapitre 1 - Les fermenteurs digestifs chez les mammifères herbivores **29**
I. Définition d'un fermenteur digestif 29
II. Rôle physiologique et Evolution des fermenteurs digestifs 29
III. Tractus gastro-intestinal et fermenteurs digestifs des mammifères 30
III.A. Particularités chez les carnivores et omnivores 31
III.B. Particularités chez les herbivores 33
III.B.1. Petits herbivores: stratégie du fermenteur cæcal 33
III.B.2. Grands herbivores : stratégie du fermenteur colique 33
III.B.3. Grands herbivores : stratégie du fermenteur stomacal 35
IV. Approche comparative : le choix des modèles « vache » et « lapin » 35
V. Le modèle vache 35
V.A. Le fermenteur majeur : le réticulo-rumen 35
V.A.1. Anatomie 35
V.A.2. Stratification du contenu réticulo-ruminal 37
V.A.3. Transit du bol alimentaire dans le réticulo-rumen et rumination 37
V.A.4. Absorption dans l'omasum 38
V.A.5. Dégradation des micro-organismes dans l'abomasum 38
V.B. Les fermentateurs mineurs : le côlon et le cæcum 38
VI. Le modele lapin 39
VI.A. Dégradation du bol alimentaire avant le cæcum 39
VI.B. Anatomie du cæcum 40
VI.C. Anatomie du côlon 41
VI.D. Cæcotrophie 42
VI.E. Cæcotrophes et crottes dures 43
VII. Comparaison des fermenteurs digestifs de la vache et du lapin 45

Chapitre 2 - écologie comparée des fermenteurs digestifs **47**
I. Le microbiote 47
I.A. Généralité 47
I.B. Les bactéries 49
I.B.1. Une forte proportion de bactéries 50
I.B.2. Une faible diversité au sein des grandes divisons taxonomiques 50
I.B.3. Une forte diversité au niveau spécifique et intra-spécifique 51
I.C. Les *archaea* 52
I.D. Les eucaryotes 55
I.D.1. Les protozoaires 55
I.D.1.1. Les ciliés 56
I.D.1.2. Les flagellés 57
I.D.2. Les champignons 57
I.D.2.1. Les Chytridiomycetes 57
I.D.2.2. Les Eurotiomycètes 58
I.D.2.3. Les Saccharomycetes 58
I.E. Les entités biologiques 58

I.F. Notion d'espèce chez les micro-organismes ... 59
II. Le biotope ... 60
II.A. Importance des contraintes ecologiques ... 60
II.B. Composition de l'intrant ... 61
II.C. Paramètres physico-chimique du milieu ... 63
III. Structuration de l'écosystème ... 66
III.A. Evolution temporelle ... 66
III.A.1. Mise en place de l'écosystème ... 66
III.A.2. Climax et équilibre dynamique ... 66
III.A.3. Réponse aux perturbations ... 66
III.B. Structuration spatiale ... 67
IV. Métabolismes principaux ... 70
IV.A. Dégradation des polymères végétaux ... 70
IV.A.1. Hydrolyse des polymères végétaux complexes ... 72
IV.A.2. Fermentation des oses simples ... 72
IV.A.3. Hdrogénotrophie ... 74
IV.B. Dégradation de la lignine ... 75
IV.C. Dégradation des protéines ... 75
IV.D. Dégradation des lipides ... 77
IV.D.1. Fermenteur en position antérieure : le cas de la vache ... 77
IV.D.2. Fermenteur en position postérieure : cas du lapin ... 77
IV.E. Capacités métaboliques des principales espèces bactériennes ... 78
V. Quelques facteurs de variabilité du microbiote ... 82
VI.A. Variabilité entre espèces Hotes ... 82
VI.B. Variabilité entre individus de la même espèce ... 82
VI.C. Perturbation alimentaire ... 83

Chapitre 3 - Méthode d'étude du microbiote des écosystèmes digestifs ... 85
I. Collecte des échantillons ... 85
II. Mise en évidence du microbiote ... 86
II.A. Le choix du gène ... 86
II.A.1. Approche neutre ... 86
II.A.2. Approche fonctionnelle ... 88
II.A.3. Approche métagénomique ... 89
II.B. Les techniques de détection et de quantification des espèces microbiennes ... 89
II.B.1. L'hybridation moléculaire : les biopuces ... 89
II.B.2. Le séquençage ... 90
II.B.2.1. Clonage et séquençage de Sanger ... 90
II.B.2.2. SARST ... 91
II.B.2.3. Le pyroséquençage ... 91
II.B.3. La PCR quantitative ... 93
II.B.3.1. Technologie SYBR Green ... 93
II.B.3.2. Technologie TaqMan ... 93
II.B.4. Les empreintes moléculaires ... 95
II.B.5. La CE-SSCP ... 97
II.B.5.1. Principe ... 97
II.B.5.2. L'information contenue dans les profils CE-SSCP ... 99
II.B.5.3. Biais d'extraction et d'amplification PCR ... 100
II.B.5.4. Biais de co-migration ... 101

Objectifs ... 105

ETUDE EXPERIMENTALE ... 109

Partie 1 : Traitement des données et Choix méthodologiques ... 111

Analyse des profils CE-SSCP ... 113
I. Traitement du signal ... 113
II. Estimation de la diversité à l'aide d'indices ... 115
II.A. Définition et limite des indices de diversité ... 116
II.B. Comparaison des indices de Shannon et de Simpson ... 116
II.C. Prise en compte du bruit de fond des profils CE-SSCP ... 118
II.D. Signification de l'indice de Simpson ... 119
II.D.1. Limite de l'indice de Simpson ... 120

II.D.2. Influence de la richesse et de l'abondance sur l'indice de Simpson ... 122
III. Analyse de la structure du profil CE-SSCP ... 124
III.A. Définition ... 124
III.B. Indice de proximité ... 124
III.C. Représentations graphiques ... 125
III.C.1. Les ordinations ... 126
III.C.2. le regroupement hiérarchique ... 126
III.D. Test statistiques basés sur une hypothèse ... 126

StatFingerprints: un programme de traitement et d'analyse des profils microbiens issus d'empreintes moléculaires ... 129
StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles ... 131
1. Abstract ... 133
2. Introduction ... 135
3. Import and export fingerprint profiles ... 137
4. Process fingerprint profiles ... 137
5. Estimation and analysis of diversity indexes ... 137
6. Analysis of the structure of community with multivariate statistics ... 138
7. Conclusion ... 140
8. Acknowledgements ... 140
9. References ... 141

Partie 2 Variabilité spatiale, temporelle, inter-individuelle et inter-spécifique des communautés procaryotiques ... 145

Variations spatiales et temporelles des communautés bactériennes dans le tractus digestif de la vache laitière ... 147
Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract ... 149
1. Abstract ... 151
2. Introduction ... 153
3. Materials and methods ... 154
3.1. Experimental design ... 154
3.2. Determination of environmental parameters ... 155
3.3. DNA extraction and PCR amplification ... 155
3.4. Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism ... 155
3.5. Diversity index and structure of communities ... 156
3.6. Statistical analyses of environmental parameters and diversity index ... 157
3.7. Statistical analyses of the structure of the bacterial communities ... 157
3.8. Relationships between bacterial communities and environmental parameters ... 158
4. Results ... 158
4.1. Environmental parameters of the ventral rumen ... 158
4.2. Effect of individual cow on bacterial communities ... 159
4.3. Comparison of the bacterial communities residing at different sites of the digestive tract ... 160
4.4. Dynamics of bacterial communities between weeks and after meals ... 162
4.5. Relationship between environmental parameters and bacterial communities ... 162
5. Discussion ... 163
6. Acknowledgments ... 166
7. References ... 167

Analyse moléculaire de la communauté bactérienne du tube digestif du lapin ... 171
Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit ... 173
1. Abstract ... 175
2. Introduction ... 177
3. Materials and methods ... 178
3.1. Experimental design and sampling ... 178
3.2. Determination of environmental parameters ... 178
3.3. DNA extraction, amplification and CE-SSCP ... 179
3.4. Diversity index and structure of communities ... 179
3.5. Statistical analysis ... 180
4. Results ... 181
4.1. The cæcal biotope ... 182

4.2. Bacterial communities in cæcal content, soft and hard fæces ... 182
4.3. Individual effect on bacterial community ... 183
3.4. Stability over time and effect of surgery on bacterial communities ... 183
4.5. Relationships between bacterial community and environmental parameters in the cæcum ... 185
5. Discussion ... 185
6. Conclusions ... 186
7. Acknowledgments ... 187
8. References ... 188

Comparaison des communautés d'*Archaea* dans les fermenteurs digestifs et les fèces de la vache et du lapin ... 191
Comparison of the *archaeal* community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit ... 193
1. Abstract ... 195
2. Introduction ... 197
3. Materials and methods ... 198
3.1. Experimental design ... 198
3.2. DNA extraction, PCR and CE-SSCP ... 198
3.3. CE-SSCP profile processing ... 199
3.4. Data analysis ... 200
4. Results ... 201
4.1. Representativeness of the archaeal community of soft faeces to analyse the cæcal content ... 201
4.2. Host species' effect ... 202
4.3. Archaeal community of the cow ... 203
4.4. Archaeal community of the rabbit ... 204
5. Discussion ... 205
6. Conclusion ... 208
7. Acknowledgements ... 208
8. References ... 209

Partie 3 : Caractérisation de la réponse des communautés bactériennes à une perturbation nutritionnelle permanente : effet d'une augmentation du ratio amidon/fibres ... 215

Suivi dynamique sur 2 mois de l'évolution des populations bactériennes dominantes dans le rumen en réponse à une perturbation nutritionnelle ... 217
2-months dynamic of the rumen predominant bacterial divisions in response to a nutritional disturbance ... 219
1. Abstract ... 221
2. Introduction ... 223
3. Materials and methods ... 224
3.1. Experimental design ... 224
3.2. Sampling, measurement and determination of environmental parameters ... 224
3.3. DNA extraction ... 225
3.4. 16S rRNA gene PCR-CE-SSCP ... 225
3.5. Analysis of bacterial community ... 226
3.6. Real time qPCR ... 226
3.7. Statistical analysis ... 229
4. Results ... 230
4.1. Environmental parameters ... 230
4.2. Quantification of 16S rDNA copies number ... 234
4.3. Bacterial diversity index ... 234
4.4. Structure of the bacterial community ... 234
4.5. Correlation between the microbiota and the environmental parameters ... 237
5. Discussion ... 238
5.1. Environmental parameters ... 238
5.2. Effect of the nutritional disturbance on the bacterial community ... 239
5.3. Dynamic of the bacterial community ... 240
5.4. Bacterial community in the solid and liquid fraction of the rumen content ... 241
5.5. Correlation between the bacterial community and the rumen environment ... 241
6. Conclusion ... 242
7. Acknowledgments ... 242
8. References ... 243

Adaptation rapide de la communauté bactérienne du cæcum de lapin en réponse à une réduction des apports en fibres alimentaires 251
Rapid adaptation of the bacterial community in the rabbit cæcum to a reduction of dietary fiber supply 253
1. Abstract 255
2. Introduction 257
3. Material and methods 258
3.1. Experimental design 258
3.2. Sampling, measurement and determination of environmental parameters 258
3.3. DNA extraction 259
3.4. 16S rRNA gene PCR-CE-SSCP 259
3.5. Real time qPCR 259
3.6. Statistical analysis 262
4. Results 262
4.1. Effect of nutrient disturbance on environmental parameters 264
4.2 Effect of the nutrient disturbance on Quantification of 16S rDNA copies number 264
4.3. Effect of the nutrient disturbance on the bacterial diversity 264
4.4. Effect of the nutrient disturbance on the structure of the bacterial community 266
4.5. Correlation between bacterial group concentrations and environmental parameters 266
4.6. Correlation between the structure of the bacterial community and the environmental parameters 267
5. Discussion 268
5.1. Nutrient effect on the bacterial community 269
5.2. Nutrient effect on the cæcal parameters 269
5.3. Dynamic of bacterial community in the rabbit cæcum 270
5.4. Correlation between the bacterial community and the cæcal environment 270
6. Conclusion 271
7. Acknowledgments 271
8. References 272

Discussion générale 277
1. Analyse critique de la méthodologie 279
1.A. La technique CE-SSCP 280
1.A.1. Atouts et limites 280
1.A.2. Traitement du signal 282
1.A.3. Estimation de la diversité 282
1.A.4. Analyse de la structure des communautés microbiennes 283
1.B. La qPCR 284
1.B.1. Choix des divisions bactériennes étudiées 284
1.B.2. La qualité des amorces PCR 285
2. Comparaison des communautés procaryotiques chez la vache et le lapin 286
2.A. Intérêts et objectifs de l'approche comparée 286
2.B. Comparaison des communautés procaryotiques chez les deux espèces 287
2.C. Variabilité interindividuelle des communautés procaryotiques au sein d'une même espèce 290
2.C.1. Cas des bactéries 290
2.C.2. Cas des *Archaea* 292
2.D. Structuration spatiale des communautés procaryotiques 293
2.D.1. Comparaison des différents fermenteurs au sein du tube digestif d'une même espèce 293
2.D.2. Variabilité entre fractions au sein du compartiment ventral du rumen 297
2.E. évolutions temporelles 299
2.E.1. Dynamique naturelle des communautés procaryotiques 299
2.E.2. Dynamique des communautés bactériennes suite à une perturbation 300
3. Les relations entre les communautés bactériennes et leur environnement 303

Conclusions & Perspectives 305

Références bibliographiques 311

Abstract 359
Résumé 361

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison du tractus gastro-intestinal des mammifères. 32

Tableau 2. Comparaison du tractus gastro-intestinal des mammifères herbivores..... 34

Tableau 3. La dégradation des nutriments dans le tractus gastro-intestinal du lapin 39

Tableau 4. Comparaison de la composition des crottes dures et des cæcotrophes du lapin 44

Tableau 5. Physiologie comparative des fermenteurs de la vache et du lapin..... 45

Tableau 6. Groupes microbiens présents dans les fermenteurs digestifs des mammifères 47

Tableau 7. Paramètres physico-chimiques du rumen de la vache et du cæcum du lapin 64

Tableau 8. Composition des fermenteurs digestifs de la vache (rumen) et du lapin (cæcum) ainsi que de leur feces : bouse pour la vache, crotte, cæcotrophe pour le lapin. 65

Tableau 9. Les différentes divisions bactériennes présentes dans la phase liquide, solide et dans l'épithélium du rumen. 69

Tableau 10. Les voies d'hydrogénotrophie 74

Tableau 11. Fonctions in vitro des bactéries cultivables isolées du rumen. 79

Tableau 12. Comparaison des méthodes actuelles d'empreintes moléculaires pour étudier les écosystèmes microbiens..... 97

Tableau 13. Récapitulatif des différents travaux et expérimentations réalisés..... 108

Tableau 14. Effects of individual animal, week, and hour after meal in the ventral rumen and effect of sampling site on the structure of bacterial communities using ANOSIM 158

Tableau 15. Effects of individual animal, week, hour after meal and sampling site on diversity index of the bacterial communities 159

Tableau 16. Effects of environmental parameters on the structure of the bacterial community of the ventral rumen 3 h after a meal using 50-50 F-test..... 162

Tableau 17. Correlations between environmental parameters and diversity index of the bacterial community of the ventral rumen 3 h after a meal..... 163

Tableau 18. Effect of individual and sampling week on the bacterial community of cæcum, soft and hard fæces using global and pairwise ANOSIM statistical test..... 182

Tableau 19. Effect of host species, sample type and sampling week on the structure of the archaeal community 203

Tableau 20. PCR primers and probes used for qPCR assays 228

Tableau 21. Effects of the nutritional disturbance on the environmental parameters of the rumen. 230

Tableau 22. Effects of the nutritional disturbance and the ruminal fraction on the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and the bacterial diversity index. 236

Tableau 23. PCR primers and probes used for qPCR assays 261

Tableau 24. Effect of the diet on the cæcal environmental parameters, the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and the bacterial diversity index. 263

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Anatomie générale du réticulo-rumen (A) et de l'épithélium ruminal (B) et réticulaire (C). 37

Figure 2. Morphologie du cæcum du lapin. 41

Figure 3. Représentation schématique du côlon du lapin 42

Figure 4.Taxons microbiens mis en évidence dans les fermenteurs digestifs 48

Figure 5. Arbre phylogénétique des divisions bactériennes présentes dans le côlon humain au sein de toutes les divisions bactériennes existantes 50

Figure 6. Les principaux genres bactériens des fermenteurs digestifs: *Bacteroides* sp. (A), *Clostridium* sp. (B), *Fusobacterium* sp. (C), *Eubacterium* sp. (D), *Ruminococcus* sp. (E), *Peptostreptococcus* sp. (F) et *Bifidobacterium* sp. (G) 52

Figure 7. Les *Archaea* présentes dans les fermenteurs digestifs au sein de l'arbre phylogénétique des *Archaea*. 54

Figure 8. Cilié holotriche du genre *Isotricha* (couleur) associé avec des ciliés entodiniomorphes (gris, A), flagellés (B), *Chytridiomycetes* ou champignon anaérobie sur soja (C), moisissures du genre *Penicillium* (D) et *Aspergillus* (E), levure *saccharomyces cerevisiae* (F). 56

Figure 9. Fragilisation des polymères végétaux par un champignon. 58

Figure 10. Morphotypes viraux du rumen. 59

Figure 11. Les différents composants du bol alimentaire entrant dans le fermenteur digestif des mammifères herbivores 61

Figure 12. Méthode de dosage des fibres végétales et nature du résidu d'analyse 62

Figure 13. Principales voies métaboliques des glucides dans les fermenteurs digestifs. 71

Figure 14. Dégradation des protéines dans les fermenteurs digestifs 76

Figure 15. Consortium bactérien de différentes espèces sur des fibres végétales (Krause *et al.*, 2003) 80

Figure 16. Principe de la biopuce. 90

Figure 17. Principe du pyroséquençage 454. 92

Figure 18. Principe de la qPCR en technologie SYBR Green (A) et Taqman (B). 95

Figure 19. Principe de la CE-SSCP 98

Figure 20. Exemple de profil CE-SSCP. 99

Figure 21. Simulation de profils CE-SSCP avec une distribution uniforme de l'abondance des espèces 102

Figure 22. Traitement des profils CE-SSCP. 114

Figure 23. Analyse statistique de la structure et de la diversité d'une communauté à partir de profils d'empreintes moléculaires. 115

Figure 24. Calcul de l'indice de Simpson par simulation de profils CE-SSCP selon des richesses et des distributions de l'abondance des espèces variables. 118

Figure 25. Comparaison de la diversité de Simpson réelle et de celle estimée à partir de profils CE-SSCP simulés en fonction de la prise en compte ou non du bruit de fond. 119

Figure 26. Simulation de l'indice de diversité de Simpson en fonction de la richesse pour une abondance relative constante. 121

Figure 27. Exemple de méthode classique pour analyser la structure des profils CE-SSCP 127

Figure 28. Structure of the StatFingerprints program. 136

Figure 29. Analysis of CE-SSCP profiles of the *Archaeal* community of the digestive tract of the rabbit and the cow using StatFingerprints 138

Figure 30. Scheme of the experimental design. 154

Figure 31. Two-dimensional nMDS plot of the 50 CE-SSCP profiles from the 1st (○), 2nd (●) and 3rd (●) weeks. 160

Figure 32. Structure differences on average CE-SSCP profiles between two distinct bacterial communities: forestomach *vs* fæces (A), 1st *vs* 2nd week (B) and 2nd *vs* 3rd week (C)..... 161

Figure 33. Dynamics of the Simpson diversity index for cæcal content and soft and hard fæces. 181

Figure 34. Two-dimensional nMDS plot of the 158 CE-SSCP profiles set according to sample type and surgery. 183

Figure 35. Structure differences of bacterial community between cæcal content, and soft and hard fæces before surgery (A) and effect of surgery in bacterial community structure in cæcal content (B). 184

Figure 36. Richness index of the archaeal community according to fermentative compartment and faeces of cow and rabbit. 201

Figure 37. Two-dimensional nMDS plot of cow and rabbit CE-SSCP profiles of the archaeal community. 204

Figure 38. Localization archaeal in digestive tract of significant differences occurring along the CE-SSCP profile between the fermentative compartment (A) and faeces (B) of the two host species, between the rumen and the faeces of the cow (C), and between the soft and the hard faeces of the rabbit (D). 205

Figure 39. Dynamics of the pH (A), the redox potential (B), the NH3-N (C) and the total VFAs (D). 232

Figure 40. Dynamics of the number of gene copies of *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and of the bacterial diversity index in rumen liquid fraction (A, C, E and G respectively) and solid fraction (B, D, F, and H respectively). 233

Figure 41. Effect of the ruminal fraction on the structure of the bacterial community. 237

Figure 42. PCA plot of the seven environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* before (Δ) and after (▲) the nutritional disturbance. 238

Figure 43. Dynamics of the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and the bacterial diversity index in control (dashed line) and low-fiber diet rabbits (solid line). 265

Figure 44. Effect of the diet on the structure of the bacterial community. 266

Figure 45. PCA plot of the ten environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* assessed in the low-fiber diet (▲) and control (Δ) rabbits. 267

Figure 46. Variance partitioning with partial RDA of CE-SSCP data from control and low-fiber diet rabbits according to the stepwise selected environmental parameters. 268

Figure 47. Comparaison des communautés procaryotiques du rumen de la vache et du cæcum de lapin pour les bactéries et les *Archaea* en termes de richesse (A), de diversité de Simpson (B) et de densités de Bactéries, de *Firmicutes* et de *Bacteroides Prevotella* (C). 287

Figure 48. Comparaison des profils CE-SSCP moyens du rumen de la vache (A) et du cæcum du lapin (B).... 288

Figure 49. Comparaison de la structure de la communauté de bactérie (A) et d'*Archaea* (B) dans le rumen de la vache et le cæcum du lapin par nMDS. 289

Figure 50. Comparaison de la structure des communautés de bactéries (A) et d'*Archaea* (C) entre le rumen et les fèces de la vache. Comparaison des profils CE-SSCP moyens du rumen et des feces (B). 294

Figure 51. Comparaison de la structure des communautés bactériennes entre les compartiments du rumen (A) et entre les fractions (liquide, solide) au sein du sac ventral du rumen (B). Comparaison des profils CE-SSCP moyens de la fraction solide et de la fraction liquide au sein du sac ventral du rumen (C). 296

Figure 52. Comparaison de la structure des communautés de bactéries (A) et d'*Archaea* (C) entre le cæcum, les cæcotrophes et les crottes dures du lapin. Comparaison des profils CE-SSCP moyens du cæcum, des cæcotrophes et des crottes dures (B). 297

Figure 53. Comparaison de la richesse bactérienne (A), de la diversité de Simpson (B) et des densités de bactéries, *Firmicutes* et *Bacteroides Prevotella* (C) entre la fraction liquide et solide du contenu ruminal du sac ventral. 298

Figure 54. Structure de la communauté bactérienne du cæcum du lapin avant et après opération chirurgicale pour accéder au cæcum (A). Comparaison des profils CE-SSCP moyens des communautés bactériennes du cæcum avant et après la perturbation (B). 301

LISTE DES ABBREVIATIONS

AGV ou VFA	Acide Gras Volatil
IBD	Inflammatory Bowel Disease
OTU	Operational Taxonomic Unit
ARN ou RNA	Acide RiboNucléique
ADN ou DNA	Acide DésoxyriboNucléique
MO	Matière Organique
MS	Matière sèche
C2	Acide acétique
C3	Acide propionique
C4	Acide butyrique
HGT	Hydrogénotrophie
DAPI	4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole
SIP	Stable Isotope Probing
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DGE	Denaturing Gel Electrophoresis
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
CE	Capillary Electrohoresis
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
mcr	Méthyle coenzyme-M réductase
SSH	Suppressive soustractive
FISH	Fluorescent *In Situ* Hybridization
PCR	Polymerase Chain Reaction
dNTP	2'-3'désoxynucléosides
ddNTP	2'-3'didésoxynucléosides
ATP	Adénosine TriPhosphate
PPi	PyroPhosphate
qPCR	Quantitative PCR
MGB	Minor groove binder
AFLP	Amplified Fragment-Length Polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
ACP ou PCA	Analyse en Composante Principale
ANOSIM	Analysis Of SIMilarity
SIMPER	SIMilarity PERcentage procedure
MANOVA	Multivariate ANOVA
RDA	ReDundancy Analysis

INTRODUCTION GENERALE

Le tractus digestif des animaux comporte des compartiments spécifiques appelés fermenteurs digestifs qui contiennent des écosystèmes très complexes puisqu'ils abritent des milliards de micro-organismes appartenant à des centaines d'espèces différentes. Chez les mammifères herbivores, le microbiote est constitué de bactéries (10^{10}-10^{12} cellules ml^{-1}, 50% de la biomasse, quelques centaines d'espèces), d'*Archaea* (10^{7}-10^{9} cellules ml^{-1}, souvent un seul genre), de protozoaires (10^{5}-10^{6} individus ml^{-1}, 40 à 50% de la biomasse) et de bactériophages (10^{7}-10^{9} particules ml^{-1}).

Les premiers travaux portant sur l'écologie microbienne du tube digestif ont été réalisés au début du XX^{ème} siècle par Metchnikoff mais ce n'est qu'à partir de 1950 que ces écosystèmes ont commencé à être explorés d'abord par culture puis plus intensivement dès les années 1980 par des méthodes moléculaires. La plupart des études ont été réalisées chez des animaux présentant un intérêt économique (ruminants, porcs, poulets), un intérêt biomédical (rongeurs) ou un intérêt écologique (termites). Chez les herbivores, ces micro-organismes ont un rôle fondamental pour l'hôte qui les héberge car ils hydrolysent et fermentent les fibres (cellulose, hémicellulose) qu'ils ingèrent mais qu'ils ne savent pas ou peu digérer par leurs propres moyens. Cette activité microbienne produit des acides gras volatils (AGV) et de l'ammoniac qui sont directement utilisables par l'hôte et qui permettent ainsi d'améliorer son efficacité digestive. D'un point de vue plus général, les micro-organismes des fermenteurs digestifs sont également indispensables pour le bon fonctionnement des méso-écosystèmes et de l'écosystème planétaire car ils contribuent au transfert de l'énergie et du carbone entre le règne animal et le règne végétal. En effet, ils permettent de rendre accessible aux consommateurs primaires et en conséquence aux niveaux trophiques supérieurs une partie du carbone et de l'énergie fixés dans les systèmes herbacés lors de la photosynthèse.

La caractérisation des communautés microbiennes et la compréhension du fonctionnement des écosystèmes digestifs représentent un enjeu considérable d'un point de vue cognitif mais aussi d'un point de vue finalisé (agronomique, médical et environnemental). D'un point de vue agronomique, la perspective d'une maîtrise et d'une orientation du microbiote vers une meilleure efficacité permettrait de mieux valoriser les ressources alimentaires mondiales et assurerait une meilleure rentabilité économique des systèmes d'élevage. Par ailleurs, l'Union Européenne affiche fortement sa volonté de réduire l'utilisation d'antibiotiques en élevage. Une meilleure compréhension du fonctionnement des écosystèmes digestifs chez les animaux de rente permettrait de proposer des stratégies d'alimentation ou d'élevage limitant l'apparition des pathologies digestives. D'un point de

vue médical, des études récentes ont mis en évidence le rôle des communautés microbiennes des fermenteurs digestifs dans le développement de certaines maladies émergentes: obésité, maladies inflammatoires du côlon (IBD avec notamment la maladie de Crohn), cancers colorectaux etc. Une meilleure connaissance et un éventuel contrôle du microbiote pourrait permettre de réduire la fréquence de ces maladies. D'un point de vue environnemental, les fermentations digestives des animaux d'élevage engendrent une importante production de méthane, puissant gaz à effet de serre. L'orientation métabolique du microbiote vers d'autres voies d'hydrogénotrophie comme l'acétogenèse réductrice permettrait de diminuer ces émissions de méthane. Tous ces questionnements sont porteurs d'enjeux sociétaux forts qui fournissent autant de challenges pour les nutritionnistes et les écologues.

L'activité fermentaire (AGV, ammoniac) et les principaux paramètres du milieu (pH, matière sèche etc.) des fermenteurs digestifs ont été bien décrits chez plusieurs espèces. En revanche, les méthodes de culture microbienne ne donnent qu'une image très partielle de la communauté microbienne qu'ils abritent et de son fonctionnement. Au contraire, les outils de biologie moléculaire permettent une vision globale et rapide de ces microbiotes. Dans un premier temps, il apparaît donc indispensable de caractériser le microbiote de ces écosystèmes en termes de composition, de structure et de diversité, et de comprendre ses facteurs de variabilité (entre espèces, entre individus, entre fermenteurs, dans le temps etc.). Dans un second temps, il conviendra de définir des stratégies permettant de modifier et de contrôler le fonctionnement de ces microbiotes.

Par conséquent, l'objectif de ce travail de thèse était de contribuer à une meilleure connaissance de l'écologie des communautés procaryotiques des fermenteurs digestifs des mammifères herbivores à l'aide des outils moléculaires. Nous nous sommes intéressés *i)* à caractériser la variabilité taxonomique (entre espèces animales, entre individus), spatiale (inter- et intra- fermenteurs digestifs) et temporelle des communautés procaryotiques, *ii)* à établir le lien entre ces communautés et leur environnement et *iii)* à étudier les conséquences d'une perturbation nutritionnelle sur ces écosystèmes. De plus, l'une des originalités de nos travaux réside dans la comparaison des communautés procaryotiques dans deux modèles animaux, la vache et le lapin, dont la physiologie digestive est très différente et représentative des deux principales stratégies évolutives rencontrées chez les mammifères herbivores actuels.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 - LES FERMENTEURS DIGESTIFS CHEZ LES MAMMIFERES HERBIVORES

I. DEFINITION D'UN FERMENTEUR DIGESTIF

Un fermenteur digestif se caractérise comme un organe du tube digestif dans lequel un ensemble de processus mécaniques, chimiques et biologiques convertissent l'énergie contenue dans les aliments en l'absence de dioxygène.

La particularité des fermenteurs digestifs en comparaison des autres organes digestifs réside dans la densité et la diversité des micro-organismes présents. A titre d'exemple, les bactéries du tube digestif de l'Homme sont dix fois plus nombreuses que les cellules constituant le corps humain (Corthier *et al.*, 2007). Chaque individu possédant un fermenteur digestif est donc un individu dit « mosaïque » car, bien que constitué de soi, il est surtout constitué de non soi.

II. ROLE PHYSIOLOGIQUE ET EVOLUTION DES FERMENTEURS DIGESTIFS

Par définition, les herbivores, se nourrissent de matières végétales. La paroi des matières végétales est principalement composée de cellulose et de lignine (Jarrige *et al.*, 1995b). La cellulose et la lignine assurent la structuration et la rigidité des végétaux. Or, l'énergie d'origine carbonée contenue dans ces polymères végétaux est difficilement accessible pour le niveau trophique supérieur, les consommateurs primaires. En effet, très peu d'organisme eucaryote hétérotrophe[1] ne possède l'équipement enzymatique permettant de dégrader ces polymères. Seule l'action synergique d'un assemblage complexe de micro-organismes permet de les dégrader (Pelmont, 1993). C'est donc pour permettre l'accès au carbone stocké dans les systèmes herbacés que certains animaux ont développé des fermenteurs digestifs. Leur importance est capitale car l'énergie emmagasinée lors de la photosynthèse devient alors accessible et permet de boucler les réseaux trophiques et les flux de carbone. Le fermenteur digestif est donc non seulement indispensable à l'hôte pour sa digestion mais est aussi important à l'échelle des méso-écosystèmes et de l'écosystème planétaire car il contribue aux transferts d'énergie et de carbone entre le règne animal et végétal.

[1] L'hétérotrophie est la nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants, d'origine animale ou végétale

D'un point de vue évolutif, indirectement, les fermenteurs digestifs auraient également contribué à la mise en place de la thermorégulation, à l'origine du succès évolutif des homéothermes grâce à la chaleur constante issue des fermentations (Mackie, 2002).

Les fermenteurs digestifs sont des écosystèmes d'origine beaucoup plus récente que la majorité des autres écosystèmes sur terre (Fenchel & Finlay, 1995; Thomasson & Voorhies, 1990). Les fermenteurs digestifs seraient apparus chez les premiers mammifères au milieu du Paléocène par colonisation de micro-organismes opportunistes (Collinson & Hooker, 1991 ; Farlow, 1987). Initialement, l'hôte et son microbiote étaient alors en compétition pour l'accès à l'énergie et aux nutriments. La coévolution entre le génome de l'hôte et son microbiome[2] ont permis le développement d'une relation compétitive mais à tendance coopérative que l'on retrouve chez la plupart des mammifères herbivores actuels. Ce modèle davantage coopératif s'illustre, par exemple, par la mise à disposition pour le microbiote du substrat cellulosique non digérable par l'hôte. L'action du microbiote sur ce substrat aboutit entre autres à la production d'AGV utilisés par l'hôte. Plus récemment, un mutualisme uniquement coopératif est apparu avec l'émergence des ruminants *sensu lacto* qui possède un fermenteur pré-stomacal (Mackie, 2002). De ce fait, les fermenteurs situés en fin de tube digestif (cæcum et/ou côlon) seraient apparus avant les fermenteurs pré-stomacaux (Hume & Warner, 1980; Langer, 1991). L'essor évolutif d'une digestion microbienne a nécessité la mise en place d'adaptations anatomiques et physiologiques chez l'hôte. En effet, la principale voie métabolique des micro-organismes étant la fermentation, il a fallu mettre en place des adaptations pour satisfaire leurs conditions écologiques. La fermentation est un processus qui se réalise en l'absence de dioxygène mais qui est surtout relativement lente. De ce fait, les mammifères herbivores ont allongé et élargie les organes de leur tube digestif en créant de véritable « poches » qui permettent une stase alimentaire en ralentissant mécaniquement le transit digestif (Mackie, 2002).

III. TRACTUS GASTRO-INTESTINAL ET FERMENTEURS DIGESTIFS DES MAMMIFERES

Le tractus gastro-intestinal des mammifères est structuré en une succession d'organes dont l'épithélium est en contact avec le bol alimentaire : la bouche, l'œsophage, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum puis iléon), le cæcum, le côlon (proximal et distal), puis le rectum abouchant à l'anus. A ces organes sont accolés quatre organes annexes : foie, vésicule biliaire, pancréas et glandes salivaires. La structuration du tube digestif est similaire chez tous les

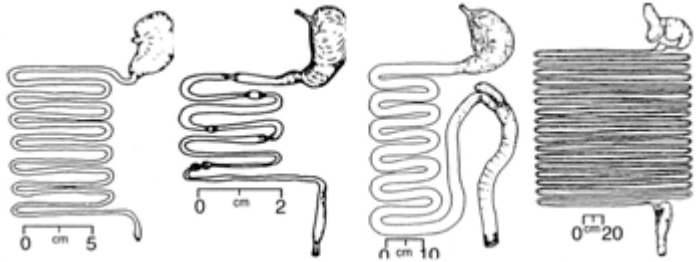
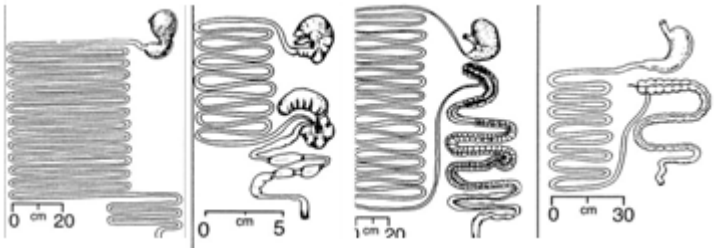
[2] le microbiome désigne la somme des génomes des micro-organismes vivant dans le fermenteur digestif

mammifères mais certains organes présentent des adaptations physiologiques et anatomiques en fonction des contraintes du régime alimentaire.

III.A. PARTICULARITES CHEZ LES CARNIVORES ET OMNIVORES

Le tractus gastro-intestinal de la plupart des mammifères carnivores est relativement court et simple (Tableau 1). L'estomac constitue généralement une dilatation unilatérale du tractus digestif. Seuls les cétacés (Milinkovitch *et al.*, 1993) et certaines chauves souris présentent des exceptions avec un estomac compartimenté et volumineux. Le côlon n'est généralement pas distinct de l'intestin grêle, et la valve de séparation est absente. Quand il est distinct, le côlon est court, et inclus parfois un cæcum (certains rongeurs) et/ou de nombreux *haustra* au niveau du côlon (Homme, singes, cochon).

Tableau 1. Comparaison du tractus gastro-intestinal des mammifères.

Régime alimentaire	Fermenteur	Estomac	Intestin grêle	Côlon-Cæcum	Schéma du tractus digestif
Carnivore	Souvent absent	Simple (sauf cétacé)	Court	Court et peu développé (sauf chien)	 Taupe Chauve souris Chien Cachalot
Omnivore	Souvent présent de type postérieur	Simple (sauf certains rongeurs)	Longueur variable	Longueur variable mais souvent large	 Ours noir Rat Cochon Homme

La taupe et la chauve souris d'après Stevens (1980), le chien et le rat d'après Stevens (1977), le cachalot, l'ours noir d'après Stevens et Hume (1995), le cochon d'après Argenzio et Southworth (1974), l'homme d'après Wrong *et al.* (1981).

III.B. PARTICULARITES CHEZ LES HERBIVORES

Chez les herbivores, on distingue (Damuth, 1992) :

- les herbivores se nourrissant exclusivement de fibres végétales : *Lagomorpha* (**lapin**, lièvre, pika), *Perissodactyla* (chevaux, rhinocéros, tapires), *Proboscidea* (éléphant), *Sirenia* (dugong, lamantin) et *Hyracoidea* (daman)
- les herbivores se nourrissant de fibres et contenus végétaux : *Artiodactyla* (cochon, hippopotame, camelidés, **ruminants**)
- des animaux partiellement herbivores se nourrissant parfois de fibres et/ou de contenus végétaux : Primates (lémurien, singes, homme, etc.), rongeurs (rat, hamster, écureuil etc.), *Edentata* (fourmilier, tatou, paresseux), marsupiaux (kangourou, opposssum, koala), certains carnivores (chien, ours, panda etc.).

Exception faite du Panda (*Ailurinae*) qui possède un tube digestif très simple mais extrêmement long (Wei *et al.*, 1999), les mammifères herbivores dégradent les matières végétales dans des élargissements du tube digestif au niveau pré-stomacal, cæcal, ou colique.

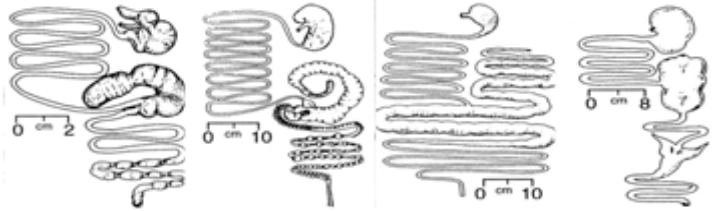
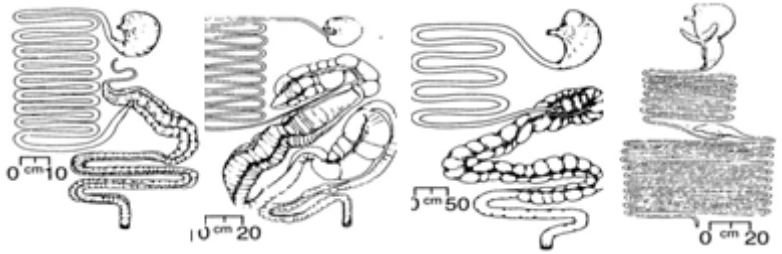
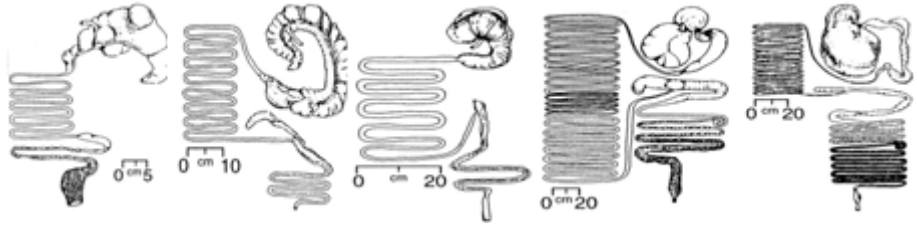
III.B.1. Petits herbivores: stratégie du fermenteur cæcal

La caractéristique prédominante de la physiologie digestive des petits herbivores (lagomorphe, daman, rongeurs herbivores, petits marsupiaux herbivores) est un large cæcum qui sert de fermenteur digestif (Tableau 2). Le tractus gastro-intestinal présente un estomac partiellement compartimenté chez certains rongeurs et chez les damans. Le daman possède en plus des appendices au niveau du côlon qui servent de fermenteurs digestifs supplémentaires.

III.B.2. Grands herbivores : stratégie du fermenteur colique

Beaucoup de mammifères herbivores de grande taille possèdent un côlon élargit qui sert de fermenteur digestif (*Périssodactyle,* éléphant, wombat, sirénien, orang-outang, gorille) (Tableau 2). Le côlon mais aussi le cæcum de la plupart de ces espèces possèdent des *haustra* sur toute leur longueur. Chez les *Périssodactyles* (équidés, rhinocéros) et les éléphants, les *haustra* du côlon se sont accentués pour devenir de véritables compartiments, assurant une meilleure efficacité en ralentissant le transit.

Tableau 2. Comparaison du tractus gastro-intestinal des mammifères herbivores.

Type	Fermenteur	Estomac	Intestin grêle	Côlon-Cæcum	Schéma
Petite taille	Type postérieur, très souvent le cæcum	Simple mais souvent compartimenté	Taille moyenne	Développé surtout le cæcum	 Hamster Lapin Koala Daman
Grande taille + fermenteur postérieur	Type postérieur, très souvent le côlon	Simple	Taille moyenne	Développé surtout le côlon	 Orang-outan Cheval Eléphant Dugong
Grande taille + fermenteur antérieur	Type antérieur, l'estomac ou le pré-estomac	Large, compartimenté chez paresseux, lamas, ruminants	Taille moyenne	Peu développé sauf chez lama.	 Paresseux Kangourou Colobe Ruminant Lama

Le hamster, l'orang outang, le cheval, le dugong, le lama d'après Stevens et Hume (1995), le lapin, le kangourou, la vache d'après Stevens (1977), le koala d'après Harrop et Hume (1980), le daman d'après Clemens (1977), l'éléphant d'après Clemens et Maloiy (1982), le paresseux d'après Stevens (1980), le colobe d'après Stevens (1983)

III.B.3. Grands herbivores : stratégie du fermenteur stomacal

Les autres grands mammifères herbivores (*artiodactyle*, paresseux, marsupiaux macropode, certains singes) comportent un estomac large, avec des *haustra* ou même compartimenté en guise de fermenteur digestif (Tableau 2). Les *Artiodactyles* comprennent les ruminants (bovin, ovin, caprin, girafe, antilope et cerf), les *Tylopodes* (chameaux, dromadaire, lama, alpaga) et les suiformes (hippopotame, porcin, pécari, babirussa). L'estomac des ruminants est le plus abouti et le plus efficace avec une division en 4 compartiments distincts qui agissent de façon complémentaire sur la dégradation du bol alimentaire.

IV. APPROCHE COMPARATIVE : LE CHOIX DES MODELES « VACHE » ET « LAPIN »

Comparer les fermenteurs digestifs des herbivores est une approche pertinente pour mieux appréhender le fonctionnement des fermenteurs digestifs et leurs réponses aux facteurs de variations. Aussi, nous avons choisi des modèles animaux qui possèdent des fermenteurs digestifs anatomiquement et physiologiquement très différents et qui sont représentatifs des principales stratégies évolutives rencontrées chez les mammifères herbivores actuels. Dans ce travail de thèse nous avons donc étudié :

- le modèle ruminant avec comme représentant spécifique la vache domestique (*Bos taurus*). Son fermenteur est de grande taille, en position antérieure, avec une complémentarité fonctionnelle de ces compartiments, et est basé sur le mutualisme coopératif entre l'hôte et son microbiote;
- le modèle lagomorphe avec comme représentant spécifique le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). Son fermenteur est de petite taille, en position postérieure, avec de légères haustrations, et est basé sur le mutualisme compétitif-coopératif entre l'hôte et son microbiote.

V. LE MODELE VACHE

V.A. LE FERMENTEUR MAJEUR : LE RETICULO-RUMEN

V.A.1. Anatomie

Le fermenteur digestif de la vache est le réticulo-rumen. Ce fermenteur se situe en amont de l'estomac (abomasum). Entre le rumen et l'abomasum se trouve un autre compartiment pré-stomacal : l'omasum (Comline *et al.*, 1968).

Le rumen pèse environ 100 kg chez la vache adulte (McDonald *et al.*, 1981). Il se subdivise en plusieurs poches : ventrale, dorsale, caudo-dorsale et caudo-ventrale (Figure 1A). La muqueuse du rumen est plissée et couverte de papilles aplaties plus ou moins denses de 5 × 3 mm en moyenne (hauteur × largeur ; Figure 1B). La densité et la taille de ces papilles sont liées à la stratification du digesta (Brownlee, 1956). Les papilles les plus hautes et les plus nombreuses sont au contact de la phase liquide, c'est à dire au niveau des sacs ventral, caudo-dorsal et caudo-ventral. Au niveau du sac dorsal, les papilles sont peu nombreuses et petites.

Le réticulum (ou bonnet –filet en latin-) est un fermenteur de plus petite taille (Figure 1A). Il est accolé au rumen et son contenu est en communication permanente avec celui-ci. D'un point de vue anatomique, son épithélium est garni d'arrêtes d'environ 0.2 × 5 mm (épaisseur × hauteur) qui forment un motif hexagonal (nid d'abeille) de 2 à 5 cm de large (Figure 1C).

Les papilles ruminales et les arrêtes du réticulum permettent d'augmenter la surface de contact entre l'intérieur du rumen et les cellules de l'hôte. Cette augmentation de la surface et donc de l'interface hôte/microbiote permet notamment d'absorber plus rapidement et donc plus efficacement les produits issus des fermentations microbiennes.

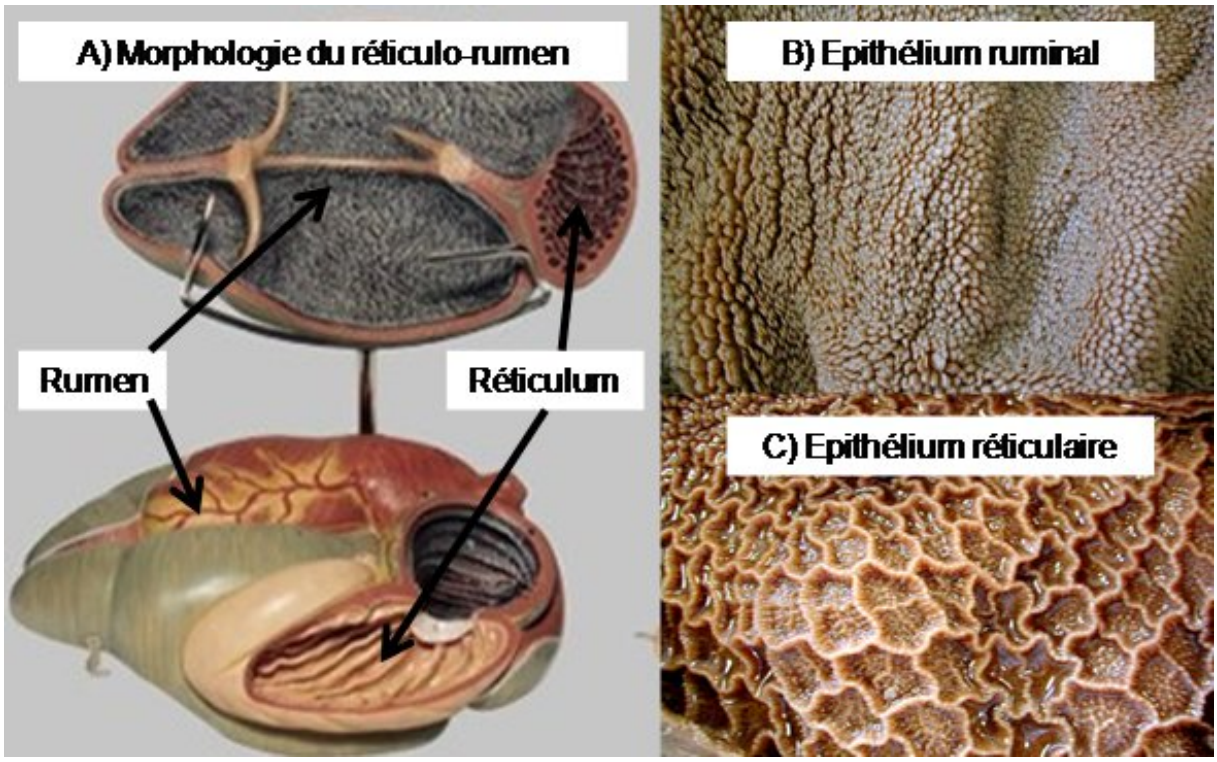


Figure 1. Anatomie générale du réticulo-rumen (A) et de l'épithélium ruminal (B) et réticulaire (C).

V.A.2. Stratification du contenu réticulo-ruminal

Le contenu du rumen n'est pas homogène mais stratifié en 3 couches appelées « phases » : *i)* la phase liquide dans la partie ventrale qui contient les fines particules alimentaires et le jus ruminal, *ii)* la phase solide dans la partie intermédiaire essentiellement composée de grosses particules et de gaz *iii)* et la phase gazeuse dans la partie dorsale du rumen (Welch, 1982). A l'inverse, le contenu du réticulum n'est pas stratifié et présente une seule phase liquide composée de fines particules et de jus.

V.A.3. Transit du bol alimentaire dans le réticulo-rumen et rumination

Une fois avalé, le bol alimentaire se dépose au niveau du réticulum. Les contractions du réticulum et du rumen poussent et mélangent le bol alimentaire dans la phase solide du contenu ruminal. La fermentation microbienne dégrade les particules alimentaires en libérant du gaz. Une partie de ces gaz est emprisonnée dans la phase solide, ce qui lui permet de « flotter » à la surface de la phase liquide. Une fois le substrat fermentescible du bol alimentaire épuisé, les diminutions de production de gaz et la diminution de la taille des particules entrainent une perte de flottabilité du bol alimentaire qui se dépose alors dans la phase liquide du rumen (Beaumont & Deswysen, 1991). Les contractions ruminales poussent cette phase liquide vers le réticulum. Dans le réticulum, les grosses particules restant du bol

alimentaire sont régurgitées dans la bouche pour être ruminées (mastication et ajout de salive) puis ré-avalées en suivant le cycle expliqué ci-dessus. Les petites particules sont acheminées dans le dans l'omasum (Clauss & Lechner-Doll, 2001). La partie liquide (eau, salive) est soit absorbée par l'épithélium du réticulum soit acheminée vers l'omasum avec les fines particules. La partie dorsale du rumen est remplis de gaz essentiellement libérés par l'activité microbienne. Ces gaz sont régulièrement éructés par la bouche.

V.A.4. Absorption dans l'omasum

L'omasum permet le recyclage de l'eau et de certains minéraux (surtout le sodium et le phosphore) qui sont absorbés dans le sang et retournent dans le rumen *via* la salive. En dépit de sa petite dimension, l'omasum a une grande capacité d'absorption. Cependant, l'omasum ne serait pas un organe essentiel puisqu'il est absent chez les *Tylopodes* (ruminant *sensu lato* : chameaux, lamas, alpagas etc.).

V.A.5. Dégradation des micro-organismes dans l'abomasum

L'abomasum des ruminants correspond au vrai estomac des espèces monogastriques et présente peu de différences avec celui de ces dernières : sécrétion de mucus, d'acide chlorhydrique et d'enzymes digestives respectivement par les gastrocytes, les cellules pariétales et les cellules principales. Cependant, l'épithélium stomacal des ruminants sécrète une enzyme essentielle au mode de digestion des ruminants : le lysozyme gastrique. La fonction initiale du lysozyme chez les mammifères était de protéger le tube digestif contre l'attaque des bactéries pathogènes allochtones en les lysant (Irwin & Wilson, 1990). Chez les ruminants, le lysozyme a évolué pour fonctionner dans le contenu stomacal : activation à un pH acide et résistance à la pepsine (Dobson *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1987). De ce fait, et contrairement à tous les autres mammifères (sauf les singes *Colobinae*), cette adaptation a permis aux ruminants d'utiliser les nutriments et l'énergie contenus dans les micro-organismes en plus de ceux issus de l'activité en amont de ces mêmes micro-organismes (Dobson *et al.*, 1984 ; Jolles *et al.*, 1989).

V.B. LES FERMENTATEURS MINEURS : LE COLON ET LE CÆCUM

Le cæcum et le côlon de la vache jouent un rôle secondaire dans la dégradation des polymères végétaux par rapport aux pré-estomacs qui assurent 80 à 90% de la capacité de fermentation du tube digestif (Hungate, 1966).

VI. LE MODELE LAPIN

VI.A. DEGRADATION DU BOL ALIMENTAIRE AVANT LE CÆCUM

Le cæcum est le fermenteur digestif principal du lapin. Du fait de sa position distale, le bol alimentaire entre dans le cæcum partiellement dégradé (Tableau 3).

Tableau 3. La dégradation des nutriments dans le tractus gastro-intestinal du lapin

	bouche	estomac	intestin	cæcum
Dégradation des protéines	-	+++	++	+
Dégradation des lipides	+	++	+++	+
Dégradation des glucides non fibreux	+	-	+++	+
Dégradation des fibres végétales	-	-	-	+++

Abbréviations : -, pas dégradé ; +, peu dégradé ; ++, en partie dégradé ; +++, majoritairement dégradé.

L'aliment entre dans la bouche où il est mastiqué (jusqu'à 120 mouvements de mâchoire par minute) pour réduire la taille des particules alimentaires. Une lipase linguale (Denigris *et al.*, 1988) et une enzyme amylolytique (Blas *et al.*, 1988) commencent la dégradation du bol alimentaire. Le bol alimentaire transite alors dans l'estomac où il y subit des transformations chimiques et un brassage important durant 1,7 et 4 heures (Gidenne, 1987). L'estomac assure :

- la dénaturation et la lyse des protéines en peptides par l'action conjuguée de la pepsine et d'acidité. L'acidité de l'estomac du lapin est très forte comparativement aux autres mammifères: pH=1,5 à 2,6 (Marounek *et al.*, 1995; Penney R.L., 1986) ;
- la lyse des acides gras à chaînes courtes ou moyennes par la lipase gastrique. La sécrétion de la lipase gastrique chez le lapin est proportionnellement plus importante que celle de la majorité des autres mammifères (Denigris *et al.*, 1988; Moreau *et al.*, 1988) ;
- l'utilisation de la vitamine B12 grâce à la sécrétion d'une glycoprotéine : facteur intrinsèque[3] (Serfilippi & Donaldson, 1986)
- la lyse des micro-organismes allochtones grâce aux sécrétions acides (Martinsen *et al.*, 2005).

[3] Le facteur intrinsèque est une glycoprotéine qui, en association avec la vitamine B12 elle-même, permet la maturation des érythrocytes en hématies

Le bol alimentaire transite de l'estomac vers l'intestin grêle. L'intestin grêle mesure environ 3 mètres de long. Le temps de transit du bol alimentaire dans l'intestin est estimé à 1 heure 30 (Vernay & Raynaud, 1975). La protéolyse amorcée dans l'estomac se poursuit sous l'action des protéases pancréatiques (trypsine, chymotrypsine et élastase pancréatique) et des peptidases. La lyse des lipides alimentaires se poursuit grâce à diverses enzymes pancréatiques :

- la lipase et la colipase pancréatique responsables de l'hydrolyse des triglycérides
- la phospholipase A2 et la cholestérol-estérase à l'origine de l'hydrolyse des autres composés lipidiques (phospholipide, cholestérol, ester de cholestérol etc.).

Les glucides non fibreux sont lysés notamment grâce à l'amylase pancréatique (Corring & Rérat, 1983).

VI.B. ANATOMIE DU CÆCUM

Le bol alimentaire transite de l'intestin grêle vers la base du cæcum par le *sacculus rotondus*. Le cæcum représente un compartiment en dérivation sur l'axe intestin grêle-côlon (Snipes, 1978). Il pèse 150 g et représente 49% du volume total du tube digestif (Portsmouth, 1977). Il est en forme de spirale comprenant 22 à 25 spires (Figure 2). A son extrémité se trouve l'appendice cæcal ou vermiforme de diamètre nettement plus faible (1cm contre 4-5cm), et constitué de tissu lymphoïde. Près de l'abouchement de l'intestin grêle se trouve le départ du côlon, au niveau de l'*ampulla coli*.

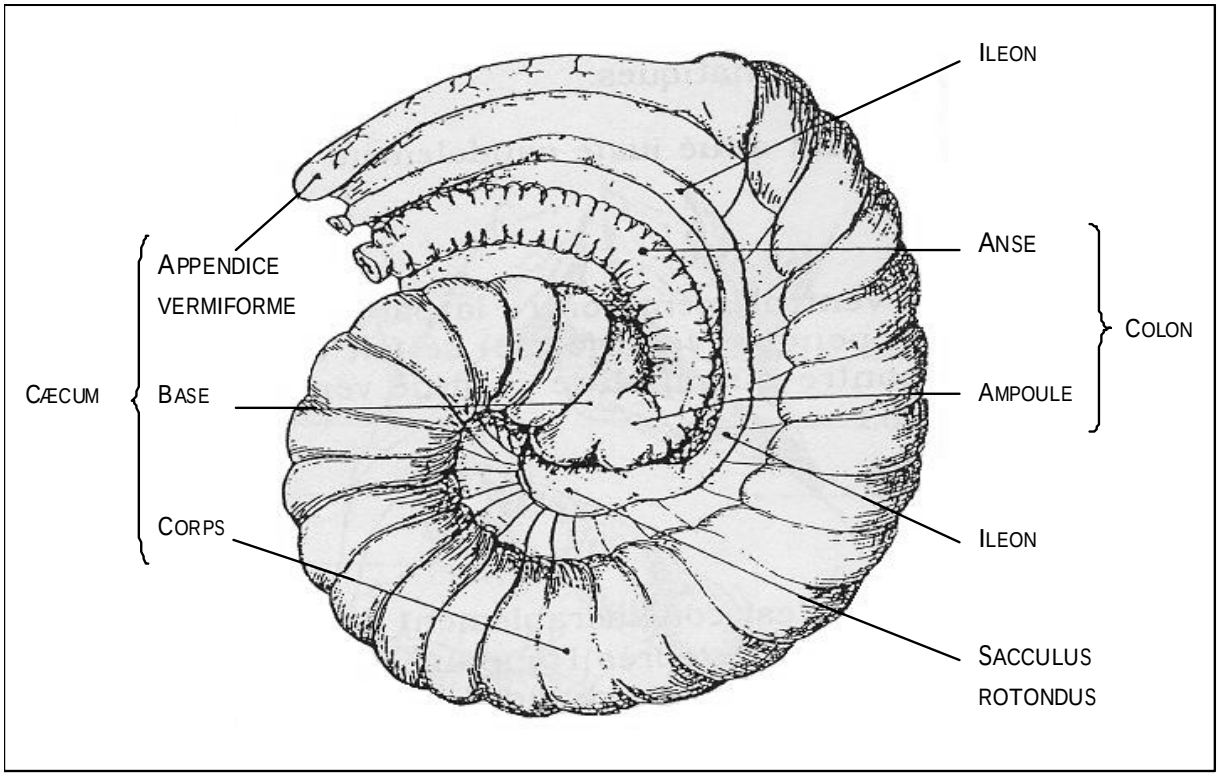


Figure 2. Morphologie du cæcum du lapin.
D'après Barone *et al.* (1973)

La muqueuse cæcale ne forme pas de villosités, à l'opposé du fermenteur digestif des ruminants, mais présente des cryptes. La surface luminale est composée d'un épithélium prismatique simple, présentant une bordure de microvillosités bien développée et tapissée d'un glycocalyx. Des cellules à mucus sont présentes en faible quantité et des lymphocytes et leucocytes ont également été identifiés. L'épithélium des cryptes comprend des cellules indifférenciées, des cellules à mucus, des cellules épithéliales immatures et des cellules endocrines. Des lymphocytes sont présents dans la *lamina propria* (Ross *et al.*, 1989).

VI.C. ANATOMIE DU COLON

Le côlon, qui fait suite au cæcum, mesure environ 115-135 cm de long. Il est subdivisé en 2 parties : le côlon proximal et le côlon distal, séparés par le *fusus coli* (Figure 3).

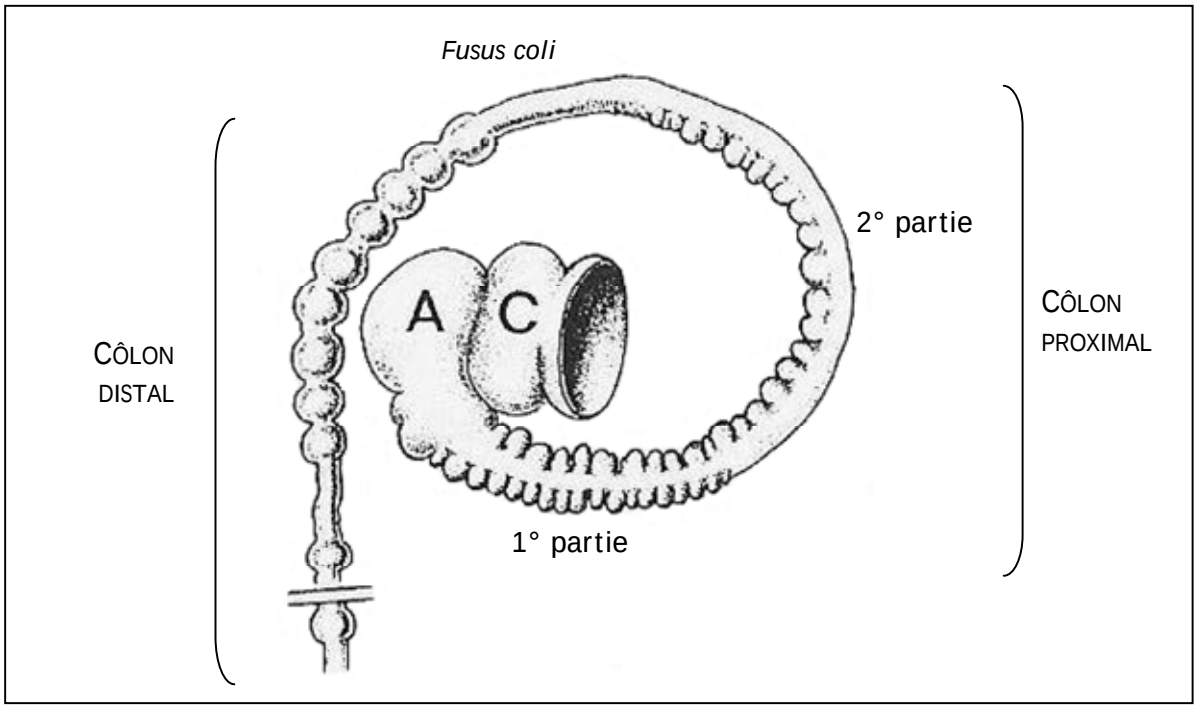


Figure 3. Représentation schématique du côlon du lapin
A = ampoule cæcale, C = cæcum; D'après Snipes *et al.* (1982)

Le côlon proximal est lui-même subdivisé en 2 segments. Le premier segment comporte des *haustra* sur tout son contour dont le rôle est d'aider à la séparation des phases solide et liquide lors de la production des crottes. Le deuxième segment présente des *haustra* plus accentués mais sur une seule rangée. Le *fusus coli*, long de 3 à 4 cm, possède une paroi très épaisse, densément nervée, lui permettant de jouer une activité de presse (pacemaker) et en évacuant l'eau de mouler les crottes dures. Le côlon distal possède une paroi fine et lisse se déformant au passage des crottes et cæcotrophes. Le côlon abouche ensuite sur le rectum, puis sur l'anus. La muqueuse colique contient de nombreuses cellules à mucus qui lubrifient et facilitent le passage des crottes dures (Snipes *et al.*, 1982).

VI.D. CÆCOTROPHIE

Le lapin produit deux types d'excréments (Tableau 4):

- les crottes dures qui sont éliminées dans le milieu environnant. Ces crottes dures sont assimilables aux excréments des autres animaux ;
- les cæcotrophes qui sont ingérés par l'animal puis stockés dans l'estomac (Gidenne & Poncet, 1985). L'ingestion des cæcotrophes permet au lapin d'utiliser l'énergie et les nutriments contenus dans les organismes microbiens, en plus de ceux produits par leur activité dans le cæcum. Ces micro-organismes sont alors majoritairement lysés dans l'estomac et absorbés dans l'intestin grêle. Cependant,

la majorité de l'énergie et des nutriments contenus dans les microorganismes microbiens sont perdus par l'excrétion des crottes dures.

La production de cæcotrophes et de crottes dures présente un rythme circadien régulé par la photopériode (Carabaño & Merino, 1996; Jilge, 1982) mais qui peut être affecté par le stade physiologique des animaux (Bellier *et al.*, 1995; Lorente *et al.*, 1988) ou la restriction alimentaire (Fioramonti & Ruckebusch, 1976).La cæcotrophie est généralement une activité diurne (de 9 h à 17 h) tandis que l'ingestion et la production de crottes est davantage une activité nocturne (4 h à 7 h et 15 h à 24 h ; Bellier & Gidenne, 1996; Lebas & Laplace, 1974).

La production des crottes dures résulte d'une séparation mécanique des différents composants du bol alimentaire au sein du côlon proximal (Björnhag, 1972; Pickard & Stevens, 1972). Durant l'excrétion de crottes dures, les substances solubles dans l'eau et les fines particules (<0.3 mm de diamètre) sont rapportées dans le cæcum par les mouvements péristaltiques du cæcum provoquant un flux inverse (rétrogradé). Les grosses particules (>0.3 mm) passent dans la partie distale du côlon. En revanche, lors de la production de cæcotrophes, les mouvements péristaltiques de la base du cæcum et surtout du côlon proximal diminuent (Ruckebusch & Hörnicke, 1977). Cette activité motrice serait régulée par les prostaglandines (Pairet *et al.*, 1986).

VI.E. CÆCOTROPHES ET CROTTES DURES

La composition des cæcotrophes et des crottes dures est différente (Tableau 4). Les cæcotrophes sont riches en protéines, vitamines et minéraux, tandis que les crottes dures sont majoritairement constituées de fibres. Les cæcotrophes constituent 9 à 15% de l'ingéré journalier dont 15-20% des apports azotés journaliers (Belenguer *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 1995). Ces protéines, d'origine microbienne, sont riches en acides aminés essentiels : lysine, thréonine et méthionine (Ferrando *et al.*, 1972). Les cæcotrophes sont également riches en vitamine K et B (Garcia *et al.*, 1995; Spreadbury, 1978).

Tableau 4. Comparaison de la composition des crottes dures et des cæcotrophes du lapin

	Crottes dures	Cæcotrophes
Eau (%)	43-48	61-71
Protéines brutes (% MS)	11-15	26-32
Lipide (% MS)	2.7	2.2
Cellulose brute (% MS)	29-30	17-18
Minéraux (% MS)	5-14	8-15

D'après Carabaño *et al.*, 1988, Fekete & Bokori, 1985, Fraga *et al.*, 1991, Proto, 1965

D'un point de vue morphologique, les crottes dures ressemblent à des agrégats de taille moyenne (8 à 12 mm), bruns, durs et secs. Les cæcotrophes se présentent toujours sous forme de grappe composée d'agrégats de petite taille (5 mm), foncés, mous et entourés de mucus.

VII. COMPARAISON DES FERMENTEURS DIGESTIFS DE LA VACHE ET DU LAPIN

Tableau 5. Physiologie comparative des fermenteurs de la vache et du lapin

	Rumen de la vache	Cæcum du lapin	Références
CUDa[4] de la cellulose brute	35-45%	16-18%	(Hintz, 1969)
Poids	100 kg	0.15kg	(McDonald *et al.*, 1981; Portsmouth, 1977)
Temps de rétention des particules	28-38h	Grosses : 7-16 Fines : 16-42h	(Gidenne, 1992; Hartnell & Scatter, 1979)
Utilisation de l'énergie produite par les micro-organismes	oui	oui	
Utilisation de l'énergie contenue dans les micro-organismes	oui	partielle	
Mutualisme	coopératif	compétitif-coopératif	(Mackie, 2002)

Le rumen de la vache et le cæcum du lapin possèdent une fonctionnalité commune : la dégradation des fibres végétales. Le cæcum du lapin assure essentiellement cette fonction tandis que le rumen de la vache permet aussi la dégradation des composés glucidiques non fibreux, des lipides et des protéines. Les positions respectives de ces fermenteurs au sein du tube digestif expliquent ces différences fonctionnelles. En effet, situé juste après l'œsophage, le rumen reçoit des aliments presque bruts et donc de composition très complexe. En revanche, situé après l'intestin grêle, le cæcum reçoit les nutriments restants qui n'ont pas été digérés dans l'estomac et l'intestin grêle et qui sont essentiellement des fibres végétales. L'intrant qui arrive dans le fermenteur cæcal est donc assez homogène et régulier tandis que celui du rumen subit les variations dues à la composition de la ration (matières premières), et comportement alimentaire (ingestion, rumination, abreuvement).

[4] CUDa : coefficient d'utilisation digestive apparent (net)

Le fermenteur digestif de la vache est deux fois plus efficace que celui du lapin pour la digestion des fibres pour 3 raisons principales (Hintz, 1969; Slade & Hintz, 1969):

- les conditions écologiques du rumen sont plus favorables pour le microbiote que celles du cæcum. En effet, le rumen est environ 650 fois plus volumineux que le cæcum (Tableau 5). De ce fait, le transit des polymères végétaux est ralentit et le temps de rétention des particules fibreuses est plus long (Pickard & Stevens, 1972). Or, les fermentations microbiennes (principales réactions dans les fermenteurs digestifs) sont des processus lents. Un temps de contact élevé entre les particules et les micro-organismes augmente leur pouvoir de dégradation.
- la rumination permet un broyage mécanique des grosses particules et « fissure » les fibres végétales rendant ainsi plus accessible au microbiote le contenu végétal.

L'utilisation de l'énergie et des nutriments contenus dans les micro-organismes est totale chez le ruminant alors qu'elle n'est que partielle chez le lapin (Tableau 5). En effet, chez la vache les micro-organismes transitent dans l'estomac et sont lysés efficacement sous l'action du lysozyme stomacale (Jolles *et al.*, 1989). Chez le lapin, seuls les micro-organismes présents dans les cæcotrophes lors de leurs émissions ponctuelles sont utilisés comme source de nutriment et d'énergie.

En résumé, au cours de l'évolution, les mammifères herbivores ont développé au sein de leur tube digestif des élargissements favorisant les fermentations, appelés fermenteurs digestifs. Ces fermenteurs accueillent un microbiote symbiotique qui leur permet d'utiliser l'énergie contenue dans les fibres végétales. Chez les mammifères herbivores actuels, on rencontre trois types de fermenteurs représentant trois stratégies évolutives : les fermenteurs cæcaux (animaux de petite taille), les fermenteurs coliques (animaux de gande taille) et les fermenteurs stomacaux (animaux de grande taille). Afin de mieux caractériser les écosystèmes présents dans ces fermenteurs, nous avons utilisé au cours de notre travail deux modèles animaux : le lapin, modèle des fermenteurs cæcaux et la vache, modèle des fermenteurs stomacaux. Ces deux types de fermenteurs présentent des différences importantes en terme de volume, compartimentation, type de mutualisme hôte/microbiote et composition des intrants.

CHAPITRE 2 - ECOLOGIE COMPAREE DES FERMENTEURS DIGESTIFS

I. LE MICROBIOTE

I.A. GENERALITE

Parmi la diversité du monde animal, bien peu d'écosystèmes digestifs ont été explorés. De ce fait, les connaissances actuelles proviennent uniquement de quelques animaux qui présentent un intérêt économique (ruminant, porc, volaille), expérimental (rat, souris) ou environnemental (termite). L'écosystème digestif de l'homme a aussi été très étudié pour des raisons cognitives et médicales (maladie de Crohn, Seksik *et al.*, 2003 ; obésité, Raoult, 2008).

Les micro-organismes qui peuplent les fermenteurs digestifs appartiennent aux trois domaines du vivant : *Bacteria* (procaryote), *Archaea* (procaryote) et *Eucarya* (Tableau 6 ; Figure 4). Les virus, non considérés comme être vivant mais comme entité biologique, sont également présents.

Tableau 6. Groupes microbiens présents dans les fermenteurs digestifs des mammifères

		Vache	Lapin	Cheval	Porc	Homme	Chien
Procaryote	Bactérie	+	+	+	+	+	+
	Archaea	+	+	+	+	+	+
Eucaryote	Protozoaire	+	+	+	-	-	-
	Champignon	+	-	+	-	-	-
	Levure	-/+	+	-	-	-	-
Entité biologique	Virus	+	?	+	?	+	?

D'après Fonty et Chaucheyras-Durand (2008c). Abbréviations : +, présent ; - , absent ; ?, pas encore étudié

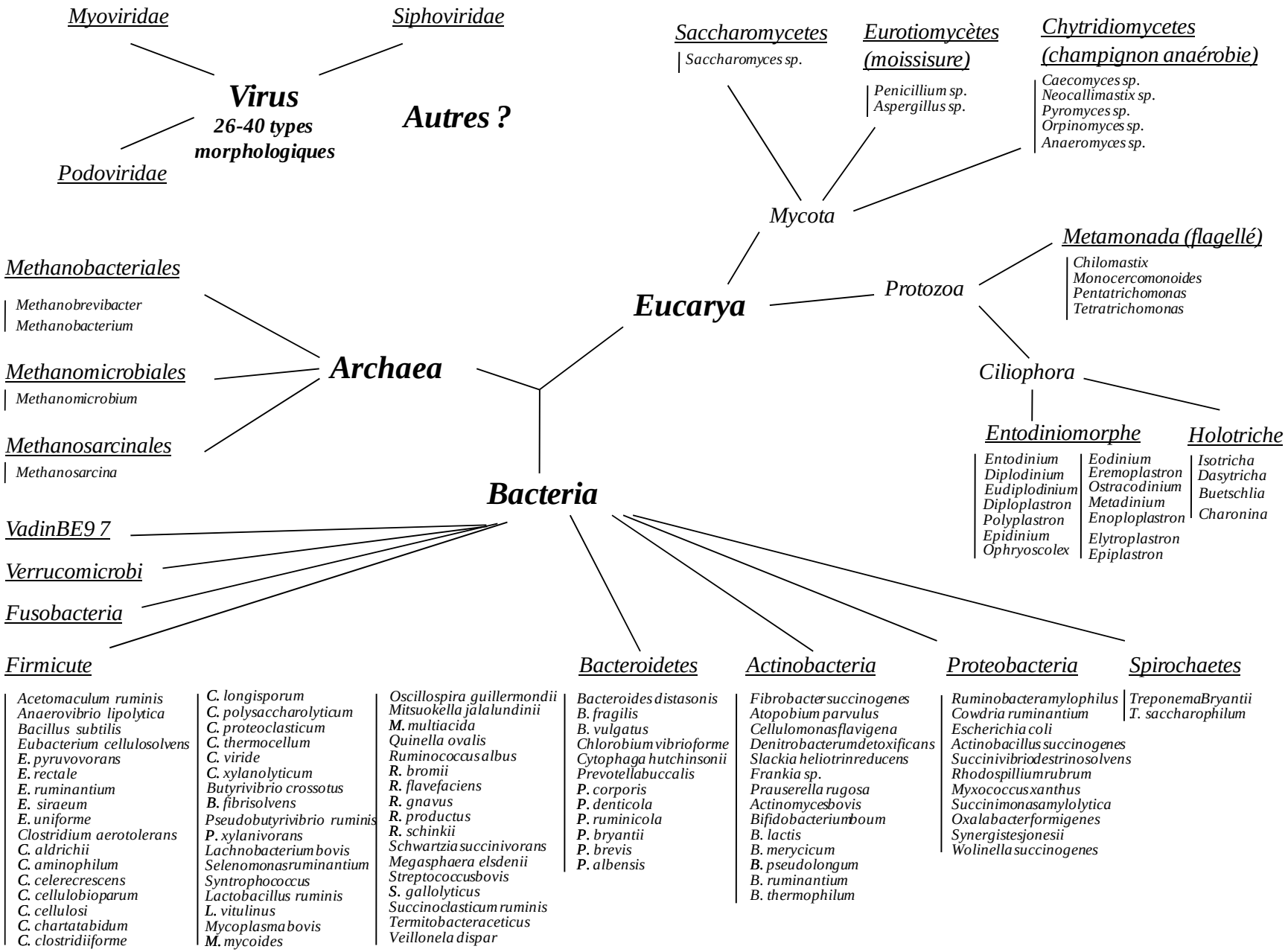


Figure 4.Taxons microbiens mis en évidence dans les fermenteurs digestifs

Toutefois, la présence de ces principaux groupes biologiques semble varier en fonction des espèces animales qui les abritent (Tableau 6). Les bactéries, les *Archaea* et les eucaryotes ont été détectés chez toutes les espèces de mammifères herbivores étudiés (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008c) : ruminant, lapin, cheval etc. En revanche, aucune espèce n'appartenant au domaine eucaryote n'a été mise en évidence dans les fermentateurs digestifs des mammifères carnivores et de certains omnivores tel l'Homme, le porc, ou le chien (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008c). Des virus ont été détectés à la fois dans les fermenteurs de certains herbivores (vache ; Klieve & Swain, 1993 ; cheval, Cann *et al.*, 2005), et de certains omnivores (Homme, Zhang *et al.*, 2006). Toutefois, les entités biologiques de type viral ou autre ont été rarement recherchées.

En ce qui concerne nos deux modèles : le rumen de la vache contient 10^{10} à 10^{11} bacteries, 10^{7} à 10^{9} *Archaea*, 10^{8} à 10^{9} protozoaires (ciliés et flagellés), 10^{3}-10^{5} zoospores de champignon et 10^{9} à 10^{10} particules virales par millilitre (Klieve & Swain, 1993; Mackie *et al.*, 1997) ; le cæcum du lapin contient 10^{9} à 10^{10} bacteries par gramme (Gouet & Fonty, 1979; Padilha *et al.*, 1995), des *Archaea* (Bennegadi *et al.*, 2003), des protozoaires (cilié et flagellé ; Lelkes & Chang, 1987) mais ne semble pas contenir de champignons (Bennegadi *et al.*, 2003). A notre connaissance aucune étude ne s'est attachée à mettre en évidence la présence de virus dans le cæcum du lapin. Des travaux complémentaires seraient nécessaires chez le lapin pour quantifier les communautés d'*Archaea* et de protozoaires et confirmer l'absence de champignons.

I.B. LES BACTERIES

La communauté bactérienne des fermenteurs digestifs se distingue des autres écosystèmes microbiens par :

- une proportion importante de bactéries par rapport aux autres domaines du vivant (*Archaea*, eucaryote) ;
- des espèces appartenant à très peu de divisions taxonomiques;
- une forte diversité spécifique et intra-spécifique.

I.B.1. Une forte proportion de bactéries

La communauté bactérienne des fermenteurs digestifs est largement majoritaire par rapport aux *Archaea* et aux eucaryotes. La densité de la communauté bactérienne est estimée à 10^{10}-10^{11} cellules par gramme, dans le rumen de la vache (Habel, 1975; Hungate, 1966), le côlon du porc (Butine & Leedle, 1989), le côlon humain (Cummings *et al.*, 1990) et le cæcum du lapin (Bonnafous & Raynaud, 1970; Forsythe & Parker, 1985a; Gouet & Fonty, 1979; Penney R.L., 1986). Toutefois, les densités bactériennes varient en fonction des individus au sein d'une même espèce hôte mais aussi en fonction de la technique d'estimation utilisée.

I.B.2. Une faible diversité au sein des grandes divisons taxonomiques

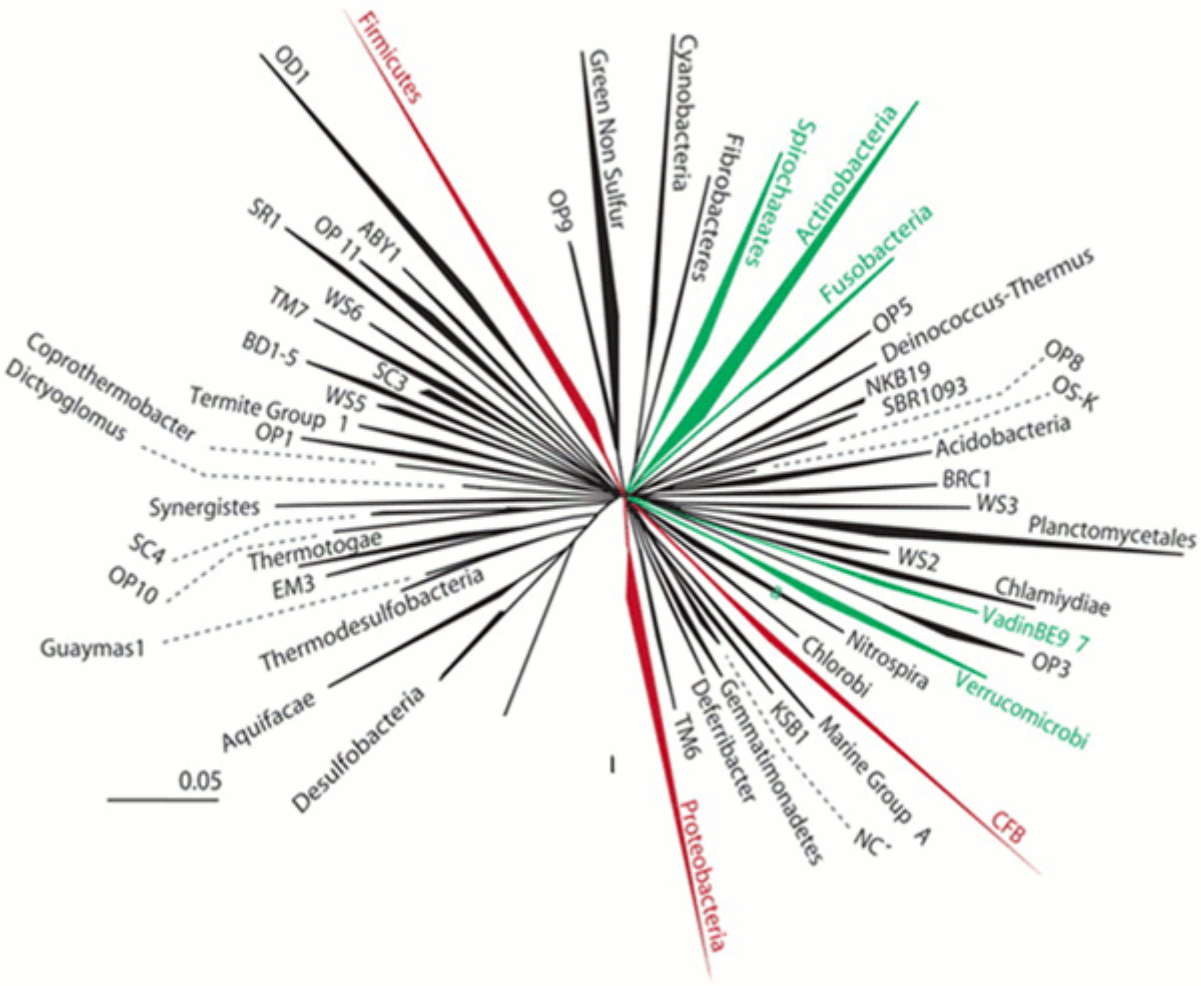


Figure 5. Arbre phylogénétique des divisions bactériennes présentes dans le côlon humain au sein de toutes les divisions bactériennes existantes.
D'après Backhed *et al.* (2005). Les divisions majoritaires, rares et absentes sont respectivement en rouge, vert et noir.

La classification actuelle décompose le domaine des bactéries en un premier rang taxonomique appelé division. A l'heure actuelle, 55 divisions bactériennes ont été reconnues. Dans les fermenteurs digestifs, seules 3 divisions sont présentes : les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes* (ou CFB[5]) et les *Proteobacteria* (Figure 5). Cette diversité bactérienne est la plus faible de tous les écosystèmes microbiens étudiés. A titre de comparaison, les communautés bactériennes des sols contiennent régulièrement plus de 20 divisions (Dunbar *et al.*, 2002). Cette faible diversité traduit probablement les fortes contraintes écologiques (pH, potentiel redox, anaérobiose) et la spécialisation fonctionnelle des écosystèmes digestifs.

Les *Firmicutes* sont toujours majoritaires et représentent entre la moitié et les deux tiers des espèces bactériennes présentes dans les écosystèmes digestifs. Elles sont généralement accompagnées d'environ un tiers de *Bacteroidetes*. Les *Proteobacteria* sont également communes mais elles ne sont jamais dominantes chez les individus sains (Seksik *et al.*, 2003). Dans le rumen de la vache, on observe 49% (phase liquide) à 69% (phase solide) de *Firmicutes*, 39% (phase liquide) à 29% (phase solide) de *Bacteroidetes* (Tajima *et al.*, 1999) alors que chez le lapin les *Firmicutes* représentent 93% du microbiote et les *Bacteroidetes* en représentent 4% (Monteils *et al.*, 2008).

I.B.3. Une forte diversité au niveau spécifique et intra-spécifique

Différentes méthodes ont été utilisées pour déterminer le nombre d'espèces bactériennes présentes dans les fermenteurs digestifs : microscope, estimation à partir de séquençage aléatoire de banque de clone ou plus récemment détermination par un pyroséquençage exhaustif. Bien que la quantité estimée varie en fonction de la méthode utilisée, tous les travaux convergent vers un nombre de 300 à 1000 espèces bactériennes en fonction des espèces animales et même des individus au sein de la même espèce. Les récents travaux utilisant la technologie du pyroséquençage indiquent 274 espèces bactériennes dans la bouse des ruminants (Dowd *et al.*, 2008), entre 609 et 5600 OTUs (97% de similarité) chez l'Homme (Andersson *et al.*, 2008; Dethlefsen *et al.*, 2008), environ 5000 OTUs (97% de similarité) chez le macaque (McKenna *et al.*, 2008).

La quasi-totalité des bactéries des fermenteurs digestifs provient des 8 genres suivants : *Bacteroides* (division : *Bacteroidetes*), *Clostridium* (division : *Firmicutes*), *Fusobacterium* (division : *Fusobacteria*), *Eubacterium* (division : *Firmicutes*), *Ruminococcus* (division : *Firmicutes*), *Peptococcus* (division : *Firmicutes*), *Peptostreptococcus* (division :

[5] pour *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*

Firmicutes), et *Bifidobacterium* (division : *Actinobacteria*) (Figure 5 ; Figure 6). D'autres genres comme *Escherichia* (division : *Proteobacteria*) et *Lactobacillus* (division : *Firmicutes*) sont présents mais dans une moindre mesure.

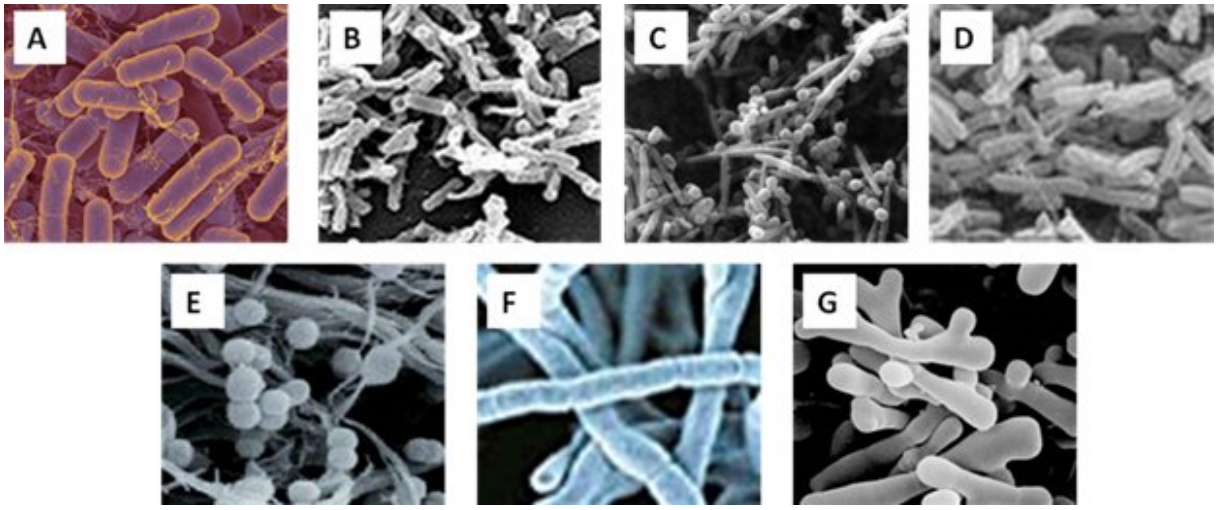


Figure 6. Les principaux genres bactériens des fermenteurs digestifs: *Bacteroides* sp. (A), *Clostridium* sp. (B), *Fusobacterium* sp. (C), *Eubacterium* sp. (D), *Ruminococcus* sp. (E), *Peptostreptococcus* sp. (F) et *Bifidobacterium* sp. (G).

A l'échelle spécifique et intra-spécifique, la communauté bactérienne des fermenteurs digestifs est extrêmement diversifiée. Les approches culturales ont mis en évidence une grande variabilité phénotypique des isolats au sein d'une même espèce bactérienne (Piknova *et al.*, 2004). Ces bactéries sont souvent endémiques[6] aux fermenteurs digestifs suggérant une forte coévolution microbiote-hôte (Hedlund & Staley, 2002).

I.C. LES *ARCHAEA*

Les *Archaea* possèdent des métabolismes très variés et se retrouvent dans de nombreux écosystèmes (Delong & Pace, 2001). Cependant, celles présentes dans les fermenteurs digestifs sont strictement anaérobies et toutes méthanogènes (Jones *et al.*, 1987).

Historiquement, les *Archaea* ont été très peu étudiées dans les fermenteurs digestifs en raison de leur forte exigence quant à l'anaérobiose, rendant leur culture difficile. Récemment, le développement des outils moléculaires associé à l'intérêt accru pour les organismes responsables de la méthanogènese chez les animaux d'élevage ont permis la réalisation de nombreuses études sur ces micro-organismes. La méthanogènese est la principale activité métabolique des *Archaea* des fermenteurs digestifs. Cette réaction utilise le dihydrogène produit par l'hydrolyse et la fermentation de la matière organique pour réduire le dioxyde de carbone en méthane ($4H_2 + CO_2 => CH_4 + H_2O$; Demeyer & Fievez, 2000). Certaines

[6] la présence naturelle d'un groupe biologique exclusivement dans une zone géographiquement délimitée.

espèces d'*Archaea* utilisent également le dihydrogène pour réduire le formate dans les systèmes digestifs (*Methanobrevibacter ruminatium, Methanobacterium formicum, Methanomicrobium mobile* ; Rea *et al.*, 2007). La réduction de l'acide acétique, du méthanol et les méthylamines n'ont pas, à l'heure actuelle, été mise en évidence dans le rumen (Yanagita *et al.*, 2000).

Les *Archaea* représentent une faible proportion des micro-organismes présents dans les fermenteurs digestifs. L'ARN ssu[7] des *Archaea* ne représente que 0.3 à 3.3% de l'ARN ssu total dans les fermenteurs digestifs (Lin *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1998; Ziemer *et al.*, 2000). La communauté d'*Archaea* semble être, en proportion, deux fois plus importante dans le cæcum du lapin (3.4% de l'ARN ssu total ; Bennegadi *et al.*, 2003) que dans le rumen de la vache (1.5% de l'ARN ssu total ; Sharp *et al.*, 1998).

Dans les fermenteurs digestifs des mammifères, la communauté des *Archaea* est très peu diverse (Figure 7). Le genre qui prédomine est *Methanobrevibacter* (ordre : *Methanobacteriales*) parfois associé avec quelques *Methanomicrobium* (ordre : *Methanomicrobiales*), *Methanobacterium* (ordre : *Methanobacteriales*) et *Methanosarcina* (ordre : *Methanosarcinales* ; Garcia *et al.*, 2000; Jarvis *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2008). Par exemple, un inventaire récent démontre que dans le rumen du mouton seulement 14 OTUs (97% similarité) sont présents (Wright *et al.*, 2008). 95,2% et 39.4% des clones appartiennent respectivement au genre *Methanobrevibacter* et à l'espèce *Methanobrevibacter gottschalkii*.

Le méthane issu de l'activité des *Archaea* est un puissant gaz à effet de serre (Moss *et al.*, 2000; Moss, 1993), ce qui rend la connaissance des *Archaea* et de leur fonctionnement important dans le contexte de réchauffement climatique actuel. En plus de cet intérêt environemental global, le méthane émis par les fermenteurs digestifs représente également une perte de 6 à 8% de l'énergie et du carbone ingérés par l'animal et présente donc un enjeu économique pour l'agriculture (Boadi *et al.*, 2004; Johnson & Johnson, 1995). Cependant, l'élimination du dihydrogène inhérent à la réaction de méthanogenèse est indispensable à un fonctionnement optimal des fermenteurs digestifs. En effet, l'élimination du dihydrogène permet, en diminuant le potentiel réducteur de l'écosystème, de rendre possible et de favoriser thermodynamiquement les hydrolyses et les fermentations de la matière organique (Lange *et al.*, 2004). Une des perspectives pour la réduction des émissions de méthane serait de favoriser la consommation du dihydrogène par des espèces bactériennes hydrogénotrophes par la voie de l'acétogenèse réductrice (*Ruminococcus hydrogenotrophicus, Clostridium spp.*,

[7] 16S et 18S

Streptococcus spp. ; Joblin, 1999). De récents travaux ont aussi démontré que certaines espèces d'*Archaea* pourraient être impliquées dans des événements pathologiques (Cavicchioli *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2003; Vianna *et al.*, 2006).

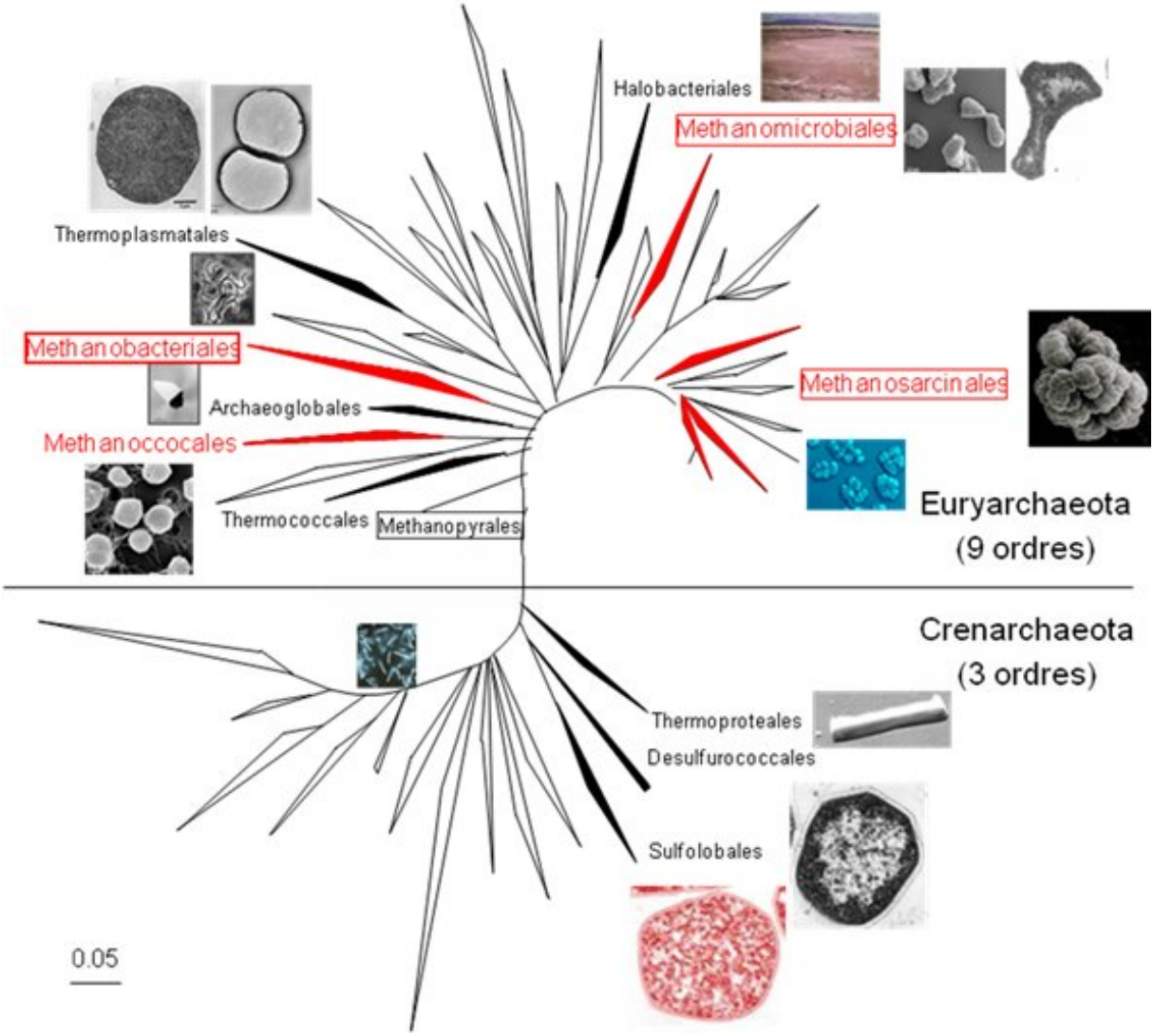


Figure 7. Les *Archaea* présentes dans les fermenteurs digestifs au sein de l'arbre phylogénétique des *Archaea.*
En rouge encadré, les ordres d'*Archaea* méthanogènes présents dans les fermenteurs digestifs.

I.D. LES EUCARYOTES

Du fait de leurs grandes tailles (20 à 100 fois plus grands que les bactéries ; Jouany, 1994) et de leurs identifications faciles au microscope, les eucaryotes colonisant les fermenteurs digestifs ont été très étudiés, et plus particulièrement chez les ruminants. La communauté eucaryote a été évaluée de 10^5 à 10^6 cellules par millilitre dans le contenu ruminal (McAllister & Cheng, 1996). Chez le lapin, les eucaryotes représentent 7% de l'ARN ssu total du microbiote cæcal (Bennegadi *et al.*, 2003).

Deux règnes d'organisme du domaine des eucaryotes vivent dans les fermenteurs digestifs (Figure 4):

- les protozoaires : organismes unicellulaires eucaryotes ;
- les champignons : organismes pluricellulaires eucaryotes (sauf la levure qui est unicellulaire).

I.D.1. Les protozoaires

Les protozoaires colonisent les fermenteurs digestifs des mammifères herbivores et de certains mammifères omnivores. Deux des quinze taxons du règne des protozoaires sont présents dans les fermenteurs digestifs : les *Ciliophora* (ou ciliés) et les *Metamonada* (organismes flagellés des tubes digestifs). Les protozoaires des fermenteurs digestifs sont tous des organismes anaérobies stricts. De nombreux travaux réalisés sur animaux gnotobiotiques[8] démontrent que la défaunation[9] n'entraine pas de conséquences pathologiques sur l'hôte (Fonty *et al.*, 1995; Jouany, 1991). L'implantation des protozoaires dans le rumen ne peut se faire que par contact direct (salive) ou très proche avec un animal conventionnel, possédant déjà des protozoaires (Coleman, 1979).

[8] animaux axéniques (sans aucun micro-organisme) ou d'animaux à microbiote contrôlé pour l'étude des interactions entre l'hôte, sa flore et les aliments qu'ils ingèrent.
[9] suppression des protozoaires.

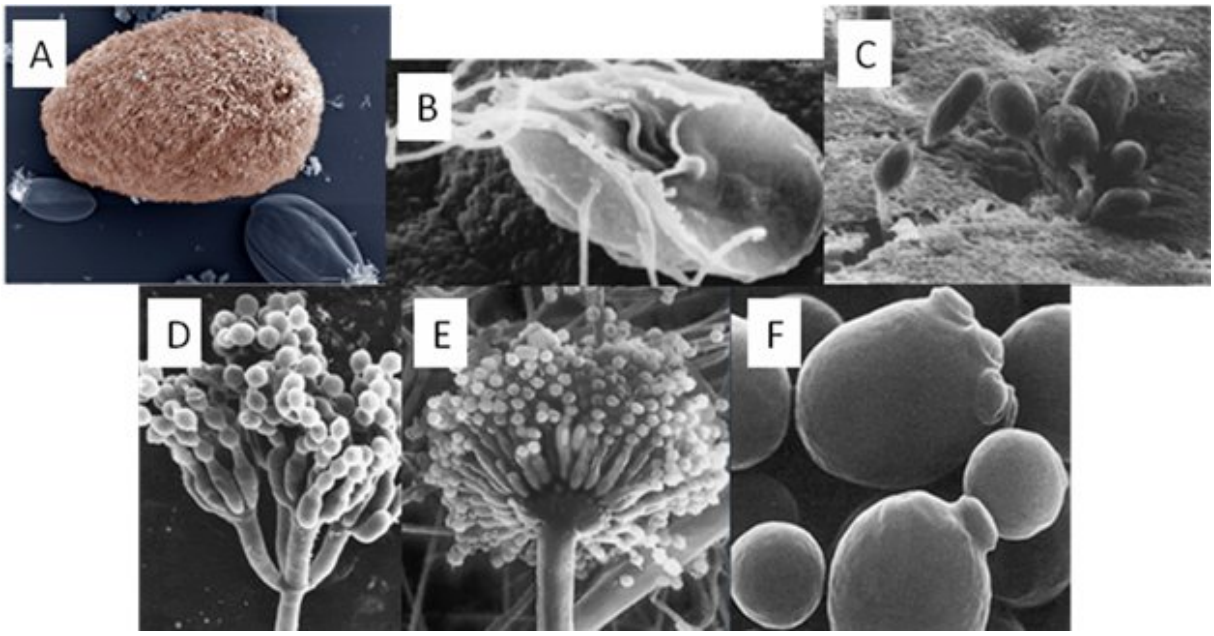


Figure 8. Cilié holotriche du genre *Isotricha* (couleur) associé avec des ciliés entodiniomorphes (gris, A), flagellés (B), *Chytridiomycetes* ou champignon anaérobie sur soja (C), moisissures du genre *Penicillium* (D) et *Aspergillus* (E), levure *saccharomyces cerevisiae* (F).

I.D.1.1. Les ciliés

Les ciliés représentent près de la moitié de la biomasse microbienne et leur densité varie de 10^4 à 10^6 organismes.ml^{-1} (Jouany, 1978 ; Figure 8). Les protozoaires ciliés participent à la dégradation de la matière organique grâce à leurs enzymes hydrolytiques. On distingue deux groupes de ciliés dans les fermenteurs digestifs:

- les holotriches avec 2 genres majoritaires : *Isotricha sp., Dasytricha sp.*, (Karnati *et al.*, 2003; Williams & Coleman, 1997) et deux genres minoritaires : *Buetschlia sp., Charonina sp.*. La population de ciliés holotriches tend à augmenter avec une ration riche en sucres solubles (Jouany & Ushida, 1998). La population de ciliés se déplace au cours de la journée par chimiotactisme et notamment du réticulum au rumen après l'ingestion de l'aliment (Abe *et al.*, 1981).
- les entodiniomorphes avec 7 genres majoritaires : *Entodinium sp.* (prédominant ; Karnati *et al.*, 2003), *Diplodinium sp.*, *Eudiplodinium sp.*, *Diploplastron sp.*, *Polyplastron sp.*, *Epidinium sp.*, *Ophryoscolex sp.*, et 7 genres minoritaires : *Eodinium sp., Eremoplastron sp., Ostracodinium sp., Metadinium sp., Enoploplastron sp., Elytroplastron sp.* et *Epiplastron sp.* (De Puytorac *et al.*, 1987; Jouany, 1996). Les entodiniomorphes ont une grande capacité à absorber des particules solides de petites tailles (grain amidon, cellulose). Ils absorbent aussi continuellement des bactéries.

I.D.1.2. Les flagellés

Par rapport aux protozoaires ciliés, les protozoaires flagellés sont peu nombreux dans les fermenteurs digestifs. On distingue quatre espèces : *Chilomastix sp.*, *Monocercomonas sp.*, *Pentatrichomonas sp.,* et *Tetratrichomonas sp.* (De Puytorac *et al.*, 1987). Le rôle des protozoaires flagellés dans les fermenteurs digestifs reste méconnu.

I.D.2. Les champignons

Le règne des champignons (*Mycota*) se rencontre principalement dans les fermenteurs digestifs des mammifères herbivores. Toutefois, les champignons semblent être absents du cæcum du lapin (Bennegadi *et al.*, 2003). Ce sont des organismes eucaryotes pluricellulaires à l'exception des levures qui sont unicellulaires. Parmi les 32 classes d'Eumycota, seulement trois se retrouvent dans les fermenteurs digestifs : les *Chytridiomycetes*, *Eurotiomycètes* et les *Saccharomycetes* (Akin & Borneman, 1990 ; Windham & Akin, 1984).

I.D.2.1. Les Chytridiomycetes

Les *Chytridiomycetes* des fermenteurs digestifs, aussi appelés champignons anaérobies, sont estimés chez les ruminants entre 10^3 et 10^4 zoospores/ml[10] (McAllister & Cheng, 1996) suivant le régime alimentaire ou le délai post-prandial (Grenet *et al.*, 1989a; Grenet *et al.*, 1989b; Orpin, 1977). Bien qu'inférieurs en nombre par rapport aux bactéries et aux *Archaea*, ils représentent 8% de la biomasse microbienne (Orpin, 1981). Dans les fermenteurs digestifs, on retrouve 5 genres : *Cæcomyces sp.* (monocentrique, 1-2 flagelles), *Neocallimastix sp.* (monocentrique, 4-20 flagelles), *Pyromyces sp.* (monocentrique, 1-4 flagelles), *Orpinomyces sp.* (polycentrique, multiflagellé) et *Anaeromyces sp.* (polycentrique, 1 flagelle).

La fonction écologique majeure des champignons anaérobies se situe au niveau de la dégradation des parois végétales par une action à la fois enzymatique et mécanique (Windham & Akin, 1984). Les champignons anaérobies sont les premiers micro-organismes à coloniser les parois végétales dès que celles-ci entrent dans le fermenteur digestif. Ils possèdent des activités hydrolytiques à l'égard de nombreux polymères structuraux : cellulose, hémicellulose, pectine etc. Ces enzymes sont produites par les champignons à la fois dans leurs stades végétatifs et les zoospores. Les champignons exercent aussi une action mécanique grâce à la fixation de leurs rhizoïdes sur les particules qui fragilise les polymères structuraux

[10] Spores biflagellées mobiles dans l'eau et caractéristiques des *Oomycètes*

(Fonty *et al.*, 1999). La fixation des rhizoïdes dans les polymères structuraux est profonde et tenace (Figure 9). Cette fragilisation permet d'ouvrir des « brèches » par lesquelles les bactéries accèdent aux tissus sous jacents (Figure 9). Cette potentialité les fait souvent qualifier par les écologues d' « organismes ingénieurs ». Ils se fixent préférentiellement sur les tissus lignifiés (Akin, 1994).

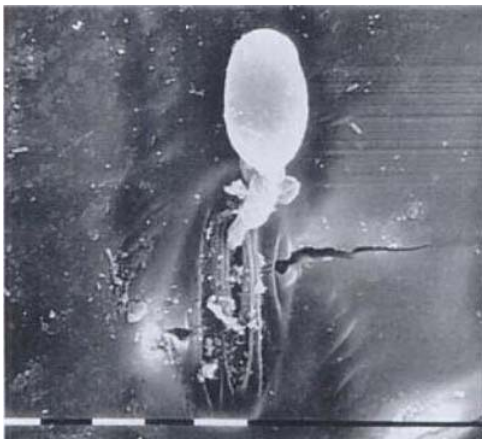


Figure 9. Fragilisation des polymères végétaux par un champignon.
D'après Jarrige *et al.* (1995a ; photo de E. Grenet)

I.D.2.2. Les Eurotiomycètes

Les 2 genres d'*Eurotiomycètes*, également appelés moisissures, que l'on rencontre dans les fermenteurs digestifs font partie du genre *Penicillium* sp. et *Aspergillus* sp. Peu de travaux ont été consacrés à leurs études. Elles sont généralement considérées comme des organismes allochtones en transit, apportés par les aliments (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008c).

I.D.2.3. Les Saccharomycetes

La classe des *Saccharomycetes* comporte un genre unique d'organismes unicellulaires *Saccharomyces* sp. communément appelés « levures ». Plusieurs espèces de levures ont été observées dans les fermenteurs digestifs mais leur rôle au sein de ces écosystèmes demeure inconnu. Leur caractère aérobie laisse supposer qu'ils sont négligeables. Chez de nombreux mammifères herbivores, ces micro-organismes seraient allochtones et donc apportés par l'alimentation en transit (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008c).

I.E. LES ENTITES BIOLOGIQUES

Seule l'existence d'entités biologiques de type virale a été mise en évidence dans les fermenteurs digestifs (Klieve & Swain, 1993; Paynter *et al.*, 1969; Zhang *et al.*, 2006). Ces virus semblent être essentiellement des bactériophages. Ils pourraient donc jouer un rôle

important dans la régulation des communautés bactériennes comme cela a été observé en milieu aquatique (Bettarel *et al.*, 2004). Cette capacité de lyse a été mise en évidence dans le rumen sur les bactéries cellulolytiques (Klieve *et al.*, 2004). Vingt six types morphologiques de virus ont été observés (Klieve & Bauchop, 1988 ; Figure 10). Leur concentration est estimée à 10^9-10^{10} phages ml^{-1} de contenu ruminal (Klieve & Swain, 1993). A notre connaissance, aucune étude ne s'est attachée à mettre en évidence des virus dans le cæcum du lapin.

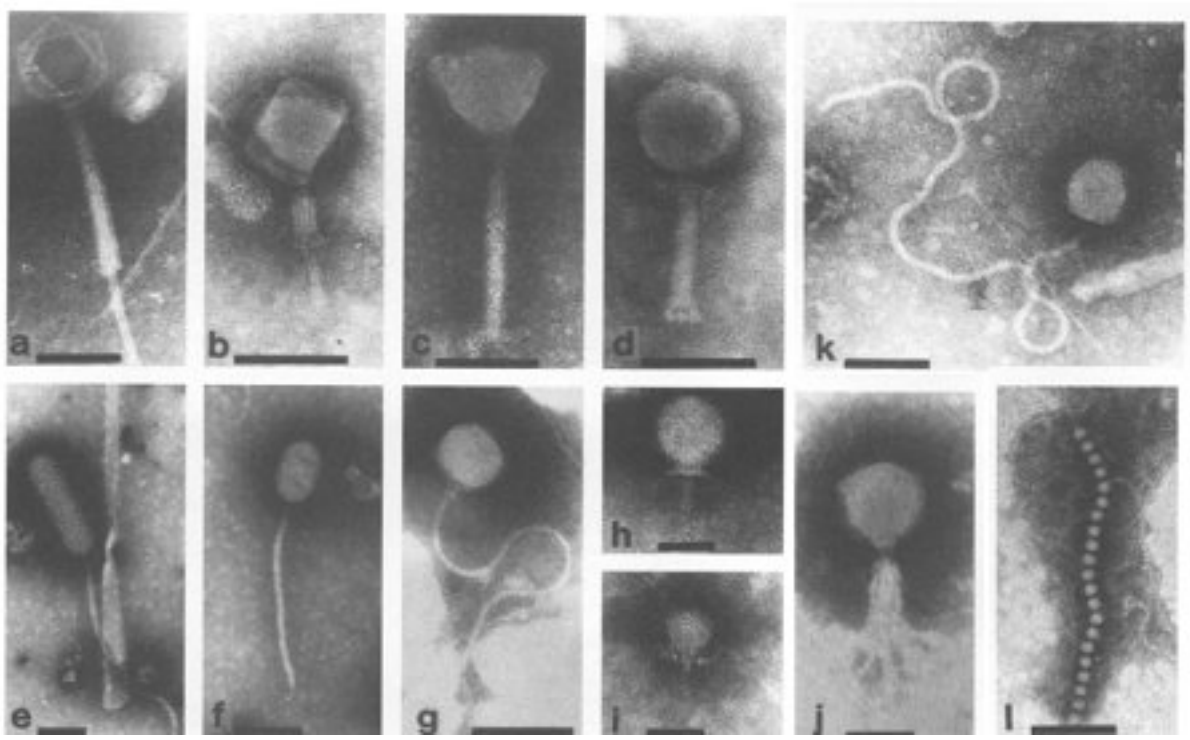


Figure 10. Morphotypes viraux du rumen.
D'après Klieve et Bauchop (1988)

I.F. NOTION D'ESPECE CHEZ LES MICRO-ORGANISMES

L'espèce constitue l'unité de base de la classification des êtres vivants. La définition actuellement reconnue de l'espèce est celle formulée par Ernst Mayr (1963). « une espèce biologique se définit comme une communauté d'êtres vivants reconnaissables par leurs caractères et capables de se reproduire sexuellement entre eux en donnant naissance à une progéniture fertile. » Cette définition relativement bien adaptée aux organismes pluricellulaires est beaucoup moins applicable pour les organismes unicellulaires. En effet, la simplicité morphologique des bactéries rend leur distinction difficile sur ces critères. De plus, ces organismes sont asexués, et leurs capacités de transfert horizontal des gènes ne permet pas de les distinguer sur des critères reproductifs ou de brassage génétique supposés par la définition de l'espèce.

En microbiologie, on préfère utiliser le terme d' « espèce génomique » (genomospecies en anglais) proposé par Brenner *et al.* (Brenner *et al.*, 1993). Cependant, pour des raisons techniques, on parle plus souvent d'OTU (Operational Taxonomic Unit) ou d'espèce moléculaire. Cette définition est issue de l'étude presque systématique de l'ADN microbien. L'OTU désigne un groupe de séquences d'acide nucléique, alignées par position nucléotidique homologue, dont le pourcentage de similarité deux à deux est supérieur à 97%. L'OTU peut être affiliée à une espèce cultivée ou non. Toutefois, lorsqu'un OTU est non affilié à une espèce connue, il est plus souvent appelé « phylotype ».

II. LE BIOTOPE

II.A. IMPORTANCE DES CONTRAINTES ECOLOGIQUES

Les micro-organismes présents dans les fermenteurs digestifs sont sélectionnés par leur environnement. Chaque espèce de micro-organismes possède ses caractéristiques physiologiques propres. Si les paramètres du milieu (notion de filtre écologique) dans lesquels ils vivent satisfont toutes ces caractéristiques (contraintes écologiques), alors les espèces microbiennes pourront se développer et inversement (Begon *et al.*, 1996). Aussi, les paramètres du milieu n'agissent pas uniquement sur l'occurrence des espèces microbiennes mais aussi sur leur activité, leur taux de multiplication, leur physiologie et leur mode de vie. Comme évoqué précédemment, les fermenteurs digestifs ne constituent pas un milieu uniforme et de ce fait les paramètres de l'environnement varient en fonction de l'endroit (localisation) et du temps (transit etc.). Ces micro-environnements fournissent autant de niches écologiques dans l'espace et le temps qui peuvent être favorables à certaines espèces microbiennes et défavorables à d'autres. Aussi, par rétroaction, l'activité microbienne peut participer à la sélection microbienne dans les fermenteurs digestifs. En effet, l'activité microbienne aboutit à l'utilisation des ressources et à la formation de nouvelles molécules qui peuvent à leur tour jouer un rôle dans la sélection microbienne (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008a).

Les facteurs physico-chimiques qui jouent un rôle majeur dans la sélection des micro-organismes dans un écosystème microbien sont la température, l'humidité, le pH, le potentiel d'oxydoréduction et l'osmolarité. C'est la raison pour laquelle, au cours de ce travail, nous avons systématiquement mesuré l'humidité, le pH et le potentiel redox. La température étant relativement constante dans les écosystèmes digestifs des animaux homéothermes.

Les fermenteurs digestifs sont des écosystèmes ouverts dans le sens où l'intrant des ressources est un phénomène régulier, lié à l'ingestion de l'individu hôte. Aussi, la nature des ressources et leur fréquence d'arrivée dans les fermenteurs digestifs sont des paramètres capitaux qui peuvent influencer le microbiote. Ces deux paramètres sont plus variables dans les fermenteurs pré-stomacaux (cas des ruminants) que dans les fermenteurs distaux. En effet, dans ce dernier cas, le tractus digestif amont régule la nature et la fréquence des intrants.

II.B. COMPOSITION DE L'INTRANT

Comme évoqué précédemment, la nature de l'intrant dans le fermenteur digestif varie en fonction de la nature de l'aliment et de la position du fermenteur au sein du tractus digestif. Le bol alimentaire arrivant dans le fermenteur des herbivores est constitué : *i)* de parois végétales, *ii)* de constituants intracellulaires des végétaux, *iii)* d'amidon, *iv)* et dans une moindre mesure ou dans des cas particuliers de chitine, de constituants de produits carnés, de substrats d'origine endogène (Jarrige *et al.*, 1995b ; Figure 11).

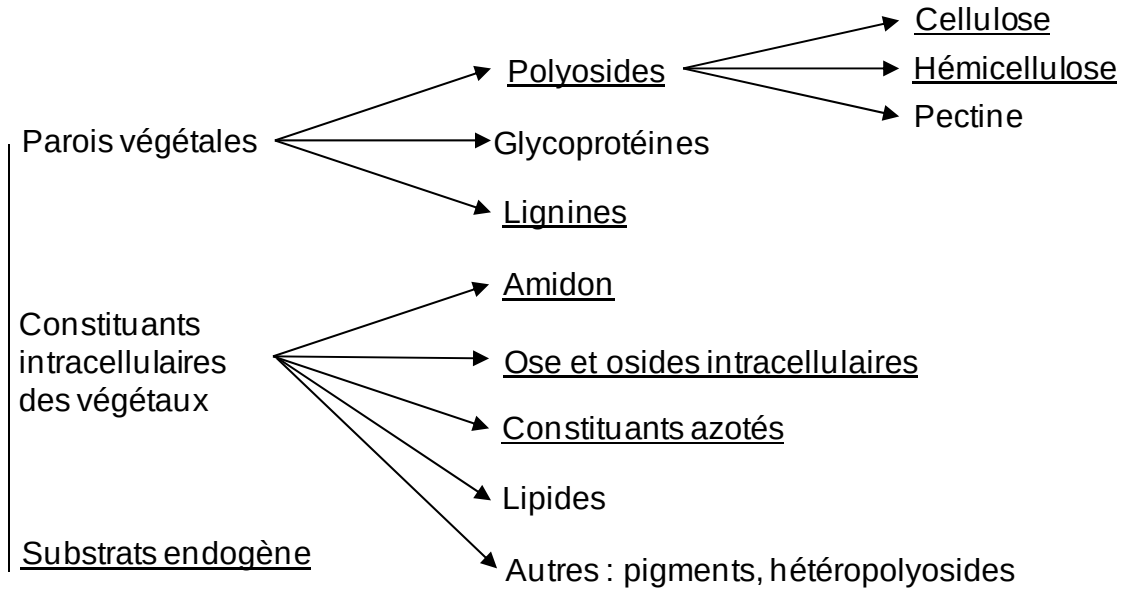


Figure 11. Les différents composants du bol alimentaire entrant dans le fermenteur digestif des mammifères herbivores.

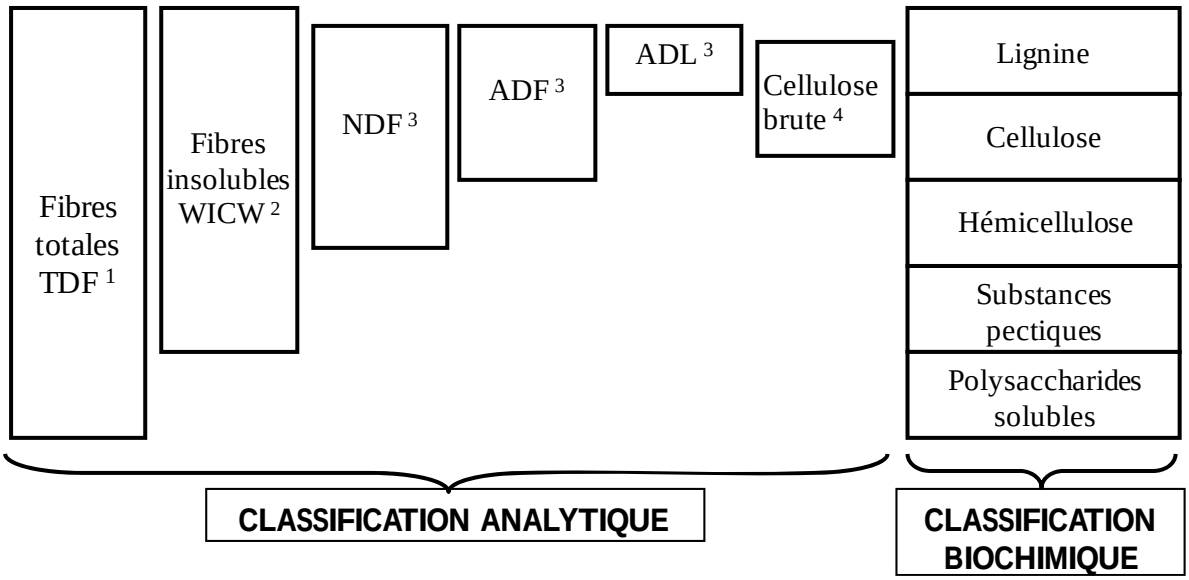


Figure 12. Méthode de dosage des fibres végétales et nature du résidu d'analyse.
D'après Gidenne (1996); 1 TDF=Total Dietary Fiber (Lee *et al.*, 1992) ; 2 Water Insoluble Cell-Wall (Carré & Brillouet, 1989) ; 3 NDF = Neutral Detergent Fiber, ADF = Acid Detergent Fiber, ADL = Acid Detergent Lignin (Van Soest *et al.*, 1991) ; 4 selon Weende

Les polyosides sont les principaux constituants des parois végétales (Figure 12). Leurs teneurs respectives varient fortement selon l'espèce botanique, l'âge de la plante, les organes de la plante et la qualité du sol. La cellulose structure les parois végétales et de ce fait, elle est très résistante aux dégradations chimiques et enzymatiques (Moore & Jung, 2001). L'hémicelluloses donne de la flexibilité et de la plasticité aux parois végétales. Elle est plus facile à hydrolyser que la cellulose. Les graminées contiennent plus d'hémicellulose que les légumineuses. Les lignines sont de très grosses molécules, complexes, extrêmement résistantes à de nombreux agents chimiques et biochimiques. Elles constituent le principal obstacle à la disponibilité des glucides pour les micro-organismes. La concentration en lignine est plus élevée dans les tiges que dans les feuilles et augmente avec l'âge de la plante (Jarrige *et al.*, 1995b). Elle constitue 10 à 15% de la matière sèche des parois végétales. Les oses et les osides intracellulaires sont principalement présents dans les cellules des parties aériennes des plantes et dans les organes de réserve (Jarrige *et al.*, 1995b).

Les substances azotées sont principalement localisées dans la partie aérienne des plantes, la RubisCO représentant 30 à 80% des protéines solubles chez les plantes C3[11] (Huffaker, 1982). La teneur en azote des plantes diminue au cours de leur croissance et elle devient inférieure à 1% dans les pailles de monocotylédones.

[11] Plantes produisant de l'acide posphoglycéridique à 3 atomes de carbonne lors du cycle de Calvin.

L'amidon représente la première ressource énergétique d'origine glucidique. L'amidon se retrouve dans les grains et graines (de 40 à 90%) mais aussi dans les tissus de stockage des plantes (2 à 4% ; Jarrige *et al.*, 1995b).

II.C. PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUE DU MILIEU

Les écosystèmes microbiens digestifs présentent des paramètres environnementaux particuliers qui constituent des contraintes écologiques majeures pour les micro-organismes :

- une absence d'énergie lumineuse
- une forte anaérobiose
- une température constante et relativement élevée 37-40°C
- un potentiel d'oxydoréduction très bas : -0.15 à -0.25 V
- un pH légèrement acide à neutre : pH=5 à 7

Tableau 7. Paramètres physico-chimiques du rumen de la vache et du cæcum du lapin

	Rumen de la vache	Cæcum du lapin
pH	5.7 à 7.3	5.5 à 6.5
Eh	-0.15V à -0.18V	-0.19 à -0.21 V
Température	38 à 41°C	37 à 39
Humidité	82 à 90%	77 à 79%

D'après Clarke et Bauchop (1977) et Marden *et al.* (2005) pour le rumen de la vache et d'après Kimsé *et al.* (2009) pour le cæcum du lapin.

Le contenu ruminal et cæcal diffèrent principalement de part (Tableau 7):

- le couple pH, Eh : De façon générale, l'écosystème cæcal du lapin est plus acide, plus réducteur et plus anaérobique que le rumen de la vache (Kimsé *et al.*, 2008; Marden *et al.*, 2005). En revanche, le pH et le potentiel redox du rumen de la vache est variable au cours de la journée et notamment en fonction des cycles prandiaux (Marden *et al.*, 2005).
- L'humidité. Le contenu ruminal est relativement liquide (80 à 92%d'humidité), tandis que le contenu cæcal est assez pâteux (80% d'humidité).
- la taille des particules. Les particules fibreuses du rumen sont environ 6 fois plus grossières que celle du cæcum (Uden & Van Soest, 1982).
- les concentrations en certains nutriments. L'amidon, les glucides rapidement fermentescibles, les protéines et les lipides sont présents dans le rumen de la vache car ils proviennent de l'aliment ingéré. En revanche, ces nutriments sont quasiment absents du cæcum du lapin car ils sont dégradés et absorbés dans la partie amont du tube digestif (Tableau 8).

Tableau 8. Composition des fermenteurs digestifs de la vache (rumen) et du lapin (cæcum) ainsi que de leur feces : bouse pour la vache, crotte, cæcotrophe pour le lapin.

		Rumen vache	Bouse	Cæcum lapin	Cæcotrophe	Crotte dure
% eau		82-90%	80-90%	80%	66%	53%
Taille moyenne des paticules (µm)		2290	830	389	426	443
Acides mM	acétique	66	ND	69-80	ND	ND
	propionique	23	ND	4-11	ND	ND
	butyrique	20	ND	7-19	ND	ND
	en C4-C6	2	ND	3-6	ND	ND
	lactique	<7	ND	ND	ND	ND
Ammoniaque mM		8-9	ND	5-8	ND	ND
Protéine brute % MO		variable	6-40	28	30	17
Lipides		Variable ordre de grandeur	Peu présent	Peu présent	Peu présent	Peu présent
Glucides	G. solubles	Absent 3h postprandial	Peu présent	Peu présent	Peu présent	Peu présent
	Cellulose brute % MO	Toujours présentes	14-56	17	18	30
Minéraux		Toujours présentes	7-30% MO	12-16% MS	ND	ND

D'après Carabaño *et al.*, 1988, Clarke & Bauchop, 1977, Fraga *et al.*, 1991, Jarrige, 1966, Uden & Van Soest, 1982. ND. Non déterminé.

On remarque également que les concentrations en AGV sont proches. Cependant, la quantité d'acide propionique est supérieure à celle d'acide butyrique chez les ruminants alors que ces proportions sont inversées chez le lapin adulte (Adjiri *et al.*, 1992; Adjiri *et al.*, 1995).

Chez le lapin, la composition du contenu cæcal est très proche de celle des cæcotrophes. En revanche, les crottes présentent des teneurs en cellulose plus élevées mais des teneurs en protéine moins élevées que le contenu cæcal. Ces observations sont en accord avec la physiologie digestive du lapin, puisque les cæcotrophes correspondent à du contenu

cæcal peu modifié et excrété alors que les crottes correspondent aux grosses particules du contenu cæcal triées et excrétées (De Blas & Wiseman, 1998).

III. STRUCTURATION DE L'ECOSYSTEME

Le fermenteur digestif est un écosystème composé d'un ensemble de micro-organismes (le microbiote) exploitant un milieu donné (le biotope). Cette exploitation du milieu ne se fait pas de façon aléatoire et anarchique mais est rigoureusement structurée. Cette auto-organisation est à la fois spatiale, temporelle et fonctionnelle.

III.A. EVOLUTION TEMPORELLE

III.A.1. Mise en place de l'écosystème

Les fermenteurs digestifs des mammifères herbivores sont stériles à la naissance, c'est-à-dire qu'ils n'abritent aucun micro-organisme. La colonisation de l'écosystème va se réaliser par l'arrivée progressive de différentes communautés de micro-organismes avec une succession bien définie (Fonty *et al.*, 1987 ; Krause *et al.*, 2000 ; Stewart & Bryant, 1988). En se développant, l'écosystème se complexifie pour acquérir des propriétés nouvelles jusqu'à un état ultime appelé climax.

III.A.2. Climax et équilibre dynamique

L'état climacique (ou climax) correspond à un état d'équilibre dynamique des communautés microbiennes. En effet, cet équilibre résulte d'ajustements incessants en réponse aux oscillations, elles-mêmes incessantes, des communautés microbiennes qui le constituent. Cet état climacique traduit donc un état pour lequel l'écosystème est capable de s'autoréguler grâce à sa diversité pour maintenir ses fonctions. Du fait, des ajustements incessants des communautés microbiennes, on ne peut donc qualifier un écosystème de stable (Lévèque, 2001; Peters, 1991).

III.A.3. Réponse aux perturbations

Un intérêt croissant est porté sur la « résistance » des écosystèmes aux perturbations induites par des facteurs anthropiques (Lévèque, 2001). Chez la vache, comme chez le lapin, les perturbations étudiées ont concernées le ratio amidon/fibres de la ration (Badiola *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 2000), l'ajouter de probiotiques (Brossard *et al.*, 2006; Kimse, 2009), ou d'antibiotiques (Abecia *et al.*, 2007; Edwards *et al.*, 2005) ou encore l'inoculation de

pathogènes (Dewrée *et al.*, 2007). En réponse ces perturbations, l'écosystème peut alors (Ives & Carpenter, 2007) :

- rester constant, c'est-à-dire ne pas répondre (ou de façon modéré) aux perturbations. On parle alors de résistance, de persistance, de rémanence ou d'inertie de l'écosystème.
- Etre affecté par la perturbation mais retrouver son état initial. On parle alors de résilience ou d'homéostasie de l'écosystème. On étudie alors l'ampleur de la réponse à la perturbation en caractérisant *i)* l'amplitude des modifications sur la structure de l'écosystème et *ii)* son élasticité, c'est-à-dire la vitesse à laquelle il revient à son état initial.
- Etre affecté par la perturbation et ne pas retrouver son état initial. On parle alors de seuil de réversibilité pour étudier les limites de la capacité de réaction de l'écosystème.

Les perturbations ont un rôle structurant dans le maintien de l'écosystème en affectant les dynamiques des communautés microbiennes. Le postulat veut qu'un écosystème soit d'autant plus stable qu'il est diversifié notamment en raison de la redondance fonctionnelle et de l'occupation maximale de toutes les niches. Cette théorie repose sur le fait que de nombreuses espèces de micro-organismes sont capables de réaliser les mêmes fonctions au sein de l'écosystème (Cardinale *et al.*, 2002). Ainsi, la disparition d'une espèce microbienne n'affectera pas le fonctionnement de l'écosystème étant donné que d'autres espèces microbiennes peuvent remplir les fonctions qu'elle occupait. Ainsi sur les écosystèmes digestifs, les travaux de Fonty *et al.* (Fonty & Gouet, 1989; Fonty *et al.*, 1983a; Fonty *et al.*, 1983b) ont démontré l'effet positif d'une plus grande diversité biologique sur le fonctionnement des fermenteurs digestifs.

III.B. STRUCTURATION SPATIALE

Dans les fermenteurs digestifs, les micro-organismes ne sont pas distribués de façon homogène et uniforme mais au contraire se répartissent dans l'espace de façon structurée en fonction des conditions écologiques. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur la structuration spatiale dans le cæcum du lapin. En revanche, de nombreuses études ont été réalisées sur la structuration spatiale des communautés microbiennes dans le rumen des herbivores.

Les communautés microbiennes de la phase solide et liquide du rumen sont différentes (Tableau 9). Les communautés bactériennes de la phase solide contiennent plus de *Firmicutes* et de *Proteobacteria* (Cho *et al.*, 2006; Larue *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 1999). En revanche, les communautés bactériennes de la phase solide contiennent plus de *Bacteroidetes*. Ces résultats sont observés chez la vache (Cho *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 1999) et chez le mouton (Larue *et al.*, 2005) quel que soit le régime alimentaire. Shin *et al.* (2004) démontrent également que la communauté de protozoaires diffère entre les phases liquide et solide du contenu ruminal notamment avec une absence du genre *Epidinium* dans la phase solide.

Les communautés microbiennes de la lumière du rumen (phase solide et liquide, dite luminale) diffèrent de celle de la paroi ruminale (dite épimurale ; Cho *et al.*, 2006; Sadet *et al.*, 2007). Les communautés bactériennes épimurales sont composées respectivement de 6 à 12 fois plus de *Firmicutes* et de 0.3 à 8 fois moins de *Bacteroidetes* que les communautés bactériennes luminales (Cho *et al.*, 2006 ; Sadet *et al.*, 2007). De plus, les protozoaires, abondant dans la lumière du rumen, sont absents de l'épithélium ruminal (Shin *et al.*, 2004).

Tableau 9. Les différentes divisions bactériennes présentes dans la phase liquide, solide et dans l'épithélium du rumen.

Hôte	Régime alimentaire	Localisation dans le rumen	n	en % du nombre total de sequence				Référence
				Firmicutes	*Bacteroidetes*	*Spirochaetes*	*Proteobacteria*	
vache tarie	65% foin / 35% concentré	phase liquide	53	11	79	0	8	(Whitford *et al.*, 1998)
bœuf	foin de luzerne	phase liquide	68	25	68	4	3	(Kocherginskaya *et al.*, 2001)
	20% foin / 80% concentré	phase liquide	67	15	58	0	27	
vache tarie	75% luzerne / 25% concentré	phase liquide	51	90	4	2	4	(Tajima *et al.*, 2000)
	Passage de 25 à 92% concentré	phase liquide	58	72	22	0	5	
	92% concentré	phase liquide	41	95	2	0	0	
vache tarie	80% luzerne-fléole / 20% de concentré	phase liquide	41	49	39	2	5	(Tajima *et al.*, 1999)
		phase solide	42	69	29	2	0	
mouton	foin d'herbe	phase solide	48	42	54	0	2	(Koike *et al.*, 2003b)
	80% luzerne / 20% concentré	phase solide	43	47	30	19	2	
mouton	foin d'herbe	phase liquide	98	57	40	0	3	(Larue *et al.*, 2005)
		phase solide	157	70	25	0	0	
	70% foin d'herbe / 30% maïs	phase liquide	120	54	41	0	1	
		phase solide	134	73	25	0	1	
vache tarie	75% enveloppe de riz / 25% concentré	phase liquide	40	30	68	0	3	(Cho *et al.*, 2006)
		phase solide	37	76	11	3	5	
		épithélium	36	6	94	0	0	
mouton	foin d'herbe	phase solide		57	36	0	3	(Yu *et al.*, 2006)

n : nombre total de séqence

IV. METABOLISMES PRINCIPAUX

IV.A. DEGRADATION DES POLYMERES VEGETAUX

Malgré la grande diversité des substrats d'origine glucidique entrant dans les fermenteurs digestifs, le catabolisme des glucides par les micro-organismes est relativement simple. La dégradation des polymères végétaux s'organise autour de 3 étapes successives : l'hydrolyse, la fermentation et l'hydrogénotrophie.

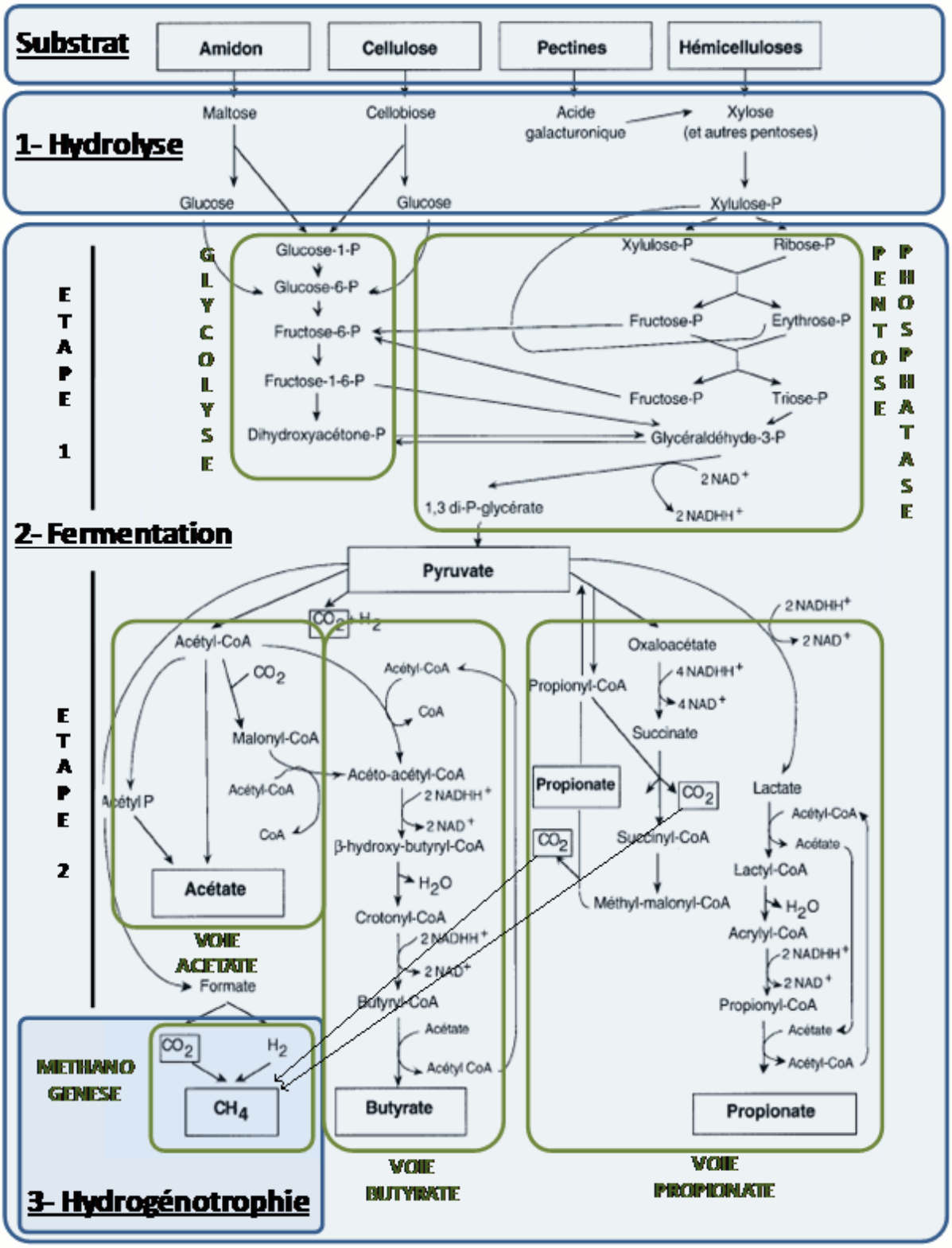


Figure 13. Principales voies métaboliques des glucides dans les fermenteurs digestifs.
D'après Fonty et Chaucheyras-Durand (2008b).

IV.A.1. Hydrolyse des polymères végétaux complexes

L'hydrolyse transforme les polymères végétaux complexes en oses simples[12]. Bien que les polymères végétaux arrivant dans le fermenteur digestif soient par nature extrêmement variés, leur hydrolyse aboutit majoritairement à la formation de glucose et de xylulose (Figure 13). L'hydrolyse est un mécanisme enzymatique qui permet de rompre les liaisons entre les oses simples qui composent les polymères complexes. A titre d'exemple, comme la cellulose est constituée d'un assemblage de centaines de molécules de glucose liées par des liaisons glycosidiques, l'hydrolyse de la cellulose aboutie à la production de glucose par rupture des liaisons glycosidiques.

IV.A.2. Fermentation des oses simples

La fermentation transforme les oses simples issus de l'hydrolyse en acides gras volatils (ou AGV ; Figure 13). La fermentation se réalise en deux étapes consécutives : la transformation des oses simples en acide pyruvique suivie d'une transformation de l'acide pyruvique en acides gras à chaine courte. L'acide pyruvique est un métabolite central des processus fermentaires.

La première étape permet de transformer les oses simples composés de 5 à 6 atomes de carbone en une molécule intermédiaire, l'acide pyruvique, composé de 3 atomes de carbone. Bien que 4 voies métaboliques existent dans la nature pour réaliser cette transformation, deux opèrent dans les fermenteurs digestifs :

- La glycolyse (ou voie de Embden-Meyerhof-Parnas). Dans les fermenteurs digestifs, cette voie est utilisée par la majorité des microorganismes, à l'exception des Bifidobactéries (Wolin & Miller, 1983). Cette réaction[13] nécessite du glucose et produit, 2 pyruvates pour une consommation de 2 ATP, par unité de glucose.
- La voie des pentoses phosphates (ou voie de Warburg-Dickens-Horecker). Cette voie minoritaire intervient principalement dans le métabolisme des pentoses[14] qui sont issus majoritairement de l'hydrolyse de l'hémicellulose et des pectines.

La deuxième étape de la fermentation transforme l'acide pyruvique en AGV. Dans les fermenteurs digestifs, l'acide pyruvique est converti selon 3 voies métaboliques majoritaires qui conduisent à la formation d'acide acétique, d'acide propionique et d'acide butyrique qui sont absorbés au niveau de l'épithélium de l'hôte puis utilisés par le métabolisme général. D'autres voies métaboliques présentes mais minoritaires existent et aboutissent à la production d'acide succinique, d'acide lactique et d'éthanol. En revanche, les acides lactiques, succiniques et l'éthanol ne sont pas absorbés par l'épithélium

[12] Un ose simple est une chaine de 3 à 8 carbones hydrogénée et oxygénée ne comportant pas de liaison osidique. C'est l'unité fondamentale des glucides

[13] Glucose + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD+ → 2 Pyruvate + 2 ATP + 2 (NADH,H+) + 2 H2O

[14] Molécule à 5 atomes de carbone dont la xylose est majoritaire dans les fermenteurs digestifs

de l'hôte. Pour autant, ils ne s'accumulent pas dans le fermenteur digestif car ils sont à leur tour métabolisés par les micro-organismes.

La contribution des AGV à la nutrition de l'hôte varie selon les espèces animales. Chez les ruminants, la proportion des différents AGV produits dans le rumen varie en fonction du régime alimentaire de l'hôte. D'une manière générale, un aliment riche en cellulose conduit à une production majoritaire d'acide acétique alors qu'une ration riche en amidon aboutie à une augmentation de la proportion en acide propionique (Andersen *et al.*, 1999). Chez les ruminants, ces AGV contribuent à:

- la nutrition directe de l'hôte par leur absorption au niveau de l'épithélium réticulo-ruminal. Chez une vache adulte de 600kg absorbant 18kg de matière organique par jour, environ 9kg de matière oganique sont fermentés. Pour des proportions en AGV standards (65% d'acide acétique, 25% d'acide propionique et 10% d'acide butyrique), cela représente une production journalière de 3.5kg d'acide acétique, 1.7kg d'acide propionique, 0.8kg d'acide butyrique, 535 l de méthane et 1187 l de dioxyde de carbone (Jouany *et al.*, 1995). Les 535 l de méthane éructés constituent donc une perte d'énergie énorme, de l'ordre de 8 à 12 % de l'énergie disponible dans la ration (Hooper *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2006; Moss *et al.*, 2000; Vermorel, 1995).
- la nutrition indirecte de l'hôte par digestion des micro-organismes du fermenteur. En effet, les fermentations productrices d'AGV sont réalisées par les micro-organismes. L'apport d'aliment dans le fermenteur conduit donc à une prolifération microbienne. Le rendement de cette synthèse de micro-organismes est estimé à 53 g de micro-organismes par kg de matière organique fermentée (Jouany *et al.*, 1995). Chez une vache adulte de 600kg absorbant 18kg de matière organique, cela représente 477g de biomasse microbienne par jour. Cette biomasse, digérée dans l'estomac, est absorbée dans l'intestin et contribue donc à l'alimentation de l'hôte (cf. Etude bibliographique- Chapitre 1).
- au développement des papilles de l'épithélium ruminal. L'acide butyrique joue un rôle prépondérant dans le développement épithélial (Hooper, 2004).

Chez le lapin, les AGV contribuent à la nutrition de l'hôte uniquement par leur absorption au niveau la paroi cæcale. Les proportions relatives des différents AGV sont influencées par l'âge (Bellier *et al.*, 1995; Padilha *et al.*, 1995), le régime alimentaire (Gidenne, 1997) et le statut sanitaire (Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004) du lapin. Le ratio acide propionique/acide butyrique est supérieur à 1 avant le sevrage comme chez les ruminants jeunes et adultes. Ce ratio devient inférieur à 1 après le sevrage (Adjiri *et al.*, 1992; Adjiri *et al.*, 1995). Chez le lapin, comme chez les ruminants, la composition du mélange d'AGV dépend de la composition de la ration. Une ration riche en matière fibreuse entraine une augmentation de la concentration cæcal en acide acétique et une diminution de la concentraton en acide

propionique (Gidenne, 1997). Chez le lapin, la production des AGV couvre 30% de l'énergie de maintenance de l'hôte (Hume, 1997).

IV.A.3. Hdrogénotrophie

Tableau 10. Les voies d'hydrogénotrophie

Micro-organismes	Réactions	ΔG°' (kJ/H_2 consommé)
Bactéries sulfato-réductrices	$4H_2 + \mathbf{SO_4^{2-}} + H^+ \rightarrow HS^- + 4H_2O$	-38
Archaea méthanogène	$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow \mathbf{CH_4} + 3H_20$	-33.9
Bactéries acétogènes	$4H_2 + 2HCO_3^- + H^+ \rightarrow \mathbf{CH_3COO^-} + 4H_2O$	-26.2

D'après Fonty *et al.* (2007)

Toutes les réactions fermentaires se déroulant dans les compartiments digestifs produisent de grandes quantités de dioxyde de carbone et de dihydrogène. Le dihydrogène ne s'accumule pas dans le fermenteur digestif car, dès sa production, il est utilisé par les micro-organismes hydrogénotrophes qui sont au contact des micro-organismes fermentaires. Dans les écosystèmes anaérobies, trois voies métaboliques utilisent le dihydrogène comme accepteur d'électrons : la sulfato-réduction, la méthanogenèse et l'acétogenèse (Tableau 10). La sulfato-réduction est la réaction thermodynamiquement la plus favorable. Cependant, dans les fermenteurs digestifs, elle reste minoritaire en raison de la faible concentration en sulfate. La méthanogenèse et, dans une moindre mesure l'acétogenèse, sont les deux voies d'hydrogénotrophie que l'on rencontre dans les fermenteurs digestifs. La méthanogenèse est la voie principalement utilisée dans les fermenteurs digestifs, si les micro-organismes capables d'utiliser cette voie sont présents, car le dioxyde de dioxyde de carbone est abondant, et cette réaction nécessite moins d'énergie que l'acétogenèse réductrice. La méthanogenèse est exclusivement réalisée par les *Archaea* (Jones *et al.*, 1987) tandis que l'acétogenèse est réalisée par de nombreux phyla bactériens. Or, la présence des *Archaea* dans le fermenteur digestif dépend de l'espèce animale et aussi chez certaines espèces de chaque individu. Chez les ruminants, les *Archaea* sont toujours présentes et de ce fait la méthanogenèse est la voie d'hydrogénotrophie majoritaire. Chez le lapin, des études *in vivo* et *in vitro* sur l'émission de méthane montrent que la production de méthane est très variable selon les individus (Belenguer *et al.*, 2008; Marounek *et al.*, 1999; Piattoni *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que chez les individus faiblement producteurs de méthane, une autre voie métabolique d'hydrogénotrophie est préférentiellement utilisée, comme l'acétogenèse réductrice déjà mise en évidence chez les rongeurs (Prins & Lankhorst, 1977). L'acétogenèse réductrice est systématiquement majoritaire dans le fermenteur stomacal du kangourou (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008b). Chez l'homme, le fermenteur (côlon) utilise soit l'acétogenèse soit la méthanogenèse comme voie d'hydrogénotrophie principale

respectivement chez les sujets non méthano-excréteurs et méthano-excréteurs (Bernalier *et al.*, 1996a; Bernalier *et al.*, 1996b). Dans la population humaine, la moitié des individus serait méthano-excréteur dont les deux tiers seraient des femmes (Doré *et al.*, 1995; El Oufir *et al.*, 1996; Pochart *et al.*, 1993). La présence des *Archaea* méthanogènes serait davantage liée à des effets environnementaux qu'à des phénomènes génétiques et héréditaires. En effet, la cohabitation en cage commune de rats non méthano-excréteurs et méthano-excréteurs engendre une conversion de l'hydrogénotrophie vers la méthanogenèse chez la majorité des individus non méthano-excréteurs (Florin *et al.*, 2000).

IV.B. DEGRADATION DE LA LIGNINE

Certaines espèces bactériennes et fongiques du rumen sont capables *in vitro* de solubiliser des monomères simples de la lignine (Besle *et al.*, 1995). Cependant, la lignine n'est pas ou peu dégradée dans les fermenteurs digestifs *in vivo* (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008b). En effet, son hydrolyse requiert un mécanisme d'oxydation thermodynamiquement non réalisable dans un milieu anaérobie. Par conséquent, la lignine est un obstacle majeur à l'accès des micro-organismes aux tissus dégradables sous-jacents des végétaux (cellulose, hémicellulose, amidon). Cependant, certains mammifères herbivores ont développé des stratégies adaptatives, comme la rumination, pour détourner cet obstacle.

IV.C. DEGRADATION DES PROTEINES

Les protéines contenues dans les aliments sont dégradées par les micro-organismes lorsque le fermenteur digestif est situé en amont du tractus gastro-intestinal. Inversement, chez les espèces dont le fermenteur se situe en aval du tractus gastro-intestinal, comme le lapin, les protéines sont digérées préalablement par l'équipement enzymatique de l'hôte, dans la partie proximale du tractus digestif, principalement l'estomac et l'intestin grêle. Chez l'homme, seulement 10% des protéines ingérées arrivent au fermenteur digestif : le côlon (Cuillerier & Marteau, 2002). Ces protéines sont issues de l'alimentation (non dégradées préalablement) ou sont d'origine endogène.

Dans les fermenteurs digestifs, la protéolyse est due aux bactéries et aux protozoaires. 30% à 50% des bactéries isolées du rumen sont capables de lyser les protéines solubles (Wallace *et al.*, 1997). La particularité des protozoaires est qu'ils lysent essentiellement les protéines insolubles (Ushida & Jouany, 1985). Les enzymes protéolytiques, présentes dans le périplasme[15] des micro-organismes, sont sécrétées à la surface des cellules où la protéolyse opère.

[15] Espace cellulaire situé entre la membrane cytoplasmique (interne) et la membrane externe

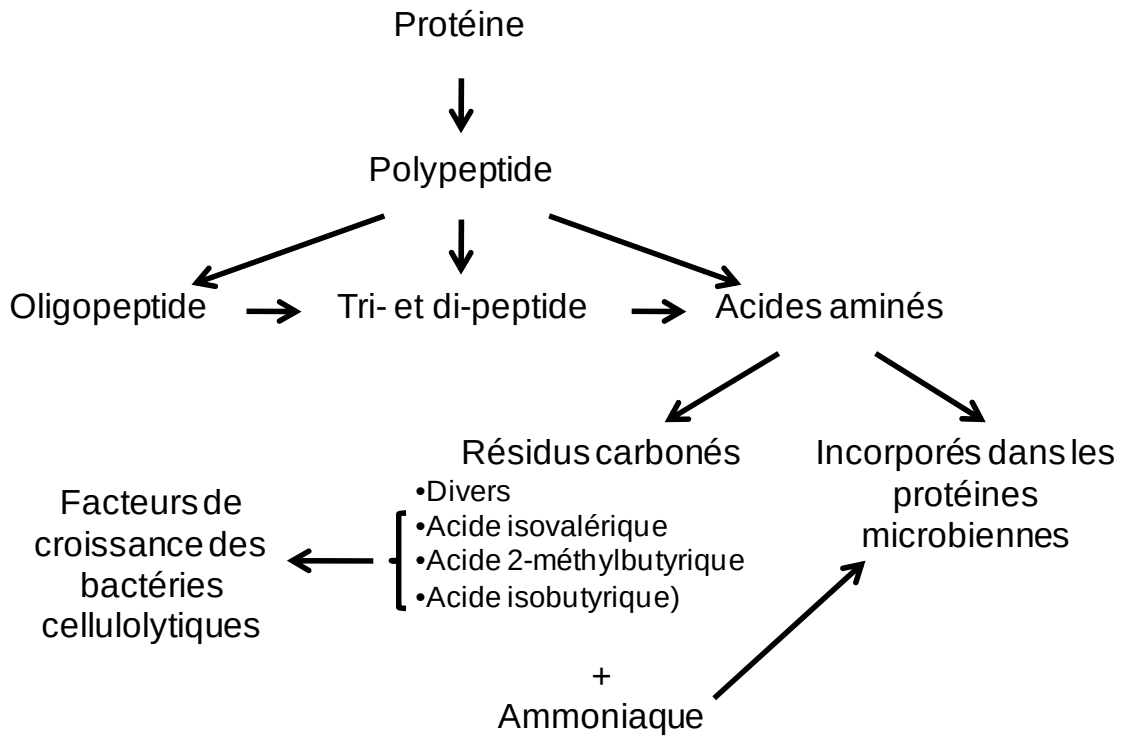


Figure 14. Dégradation des protéines dans les fermenteurs digestifs
D'après Cotta et Hespell (1986).

La dégradation des protéines se fait en étapes successives ; chaque réaction n permettant de réduire la taille du peptide utilisé dans la réaction n-1 (Figure 14). Ainsi, la taille des polypeptides diminue au cours des lyses jusqu'au stade tripeptide, dipeptide, voire jusqu'en acide aminé libre. Les acides aminés sont alors soit désaminés par des espèces bactériennes spécifiques (Wallace *et al.*, 1997), soit directement incorporés par les micro-organismes pour former leurs propres protéines. La désamination conduit à la formation de corps carbonés résiduels et d'ammoniaque. La désamination de certains acides aminés ramifiés comme la leucine, l'isoleucine et la valine conduit à la formation d'acides gras ramifiés: respectivement, l'acide isovalérique, l'acide 2-méthylbutyrique et l'acide isobutyrique. Ces acides aminés sont d'une importance capitale car ils servent de facteurs de croissances aux bactéries cellulolytiques (Bryant & Robinson, 1963).

Les micro-organismes utilisent préférentiellement l'ammoniaque aux acides aminés libres comme source d'azote (Jouany *et al.*, 1995). Si la production d'ammoniaque est supérieure aux besoins des micro-organismes, le surplus est absorbé au niveau de la paroi ruminale, circule dans le sang sous forme d'urée et est éliminé principalement dans l'urine (Leng & Nolan, 1984). Chez l'homme l'ammoniaque en surplus altère la physiologie des cellules épithéliales du côlon et jouerait ainsi un rôle dans les mécanismes d'initiation du cancer colique (Bernalier-Donadille, 2004).

IV.D. DEGRADATION DES LIPIDES

Les lipides qui arrivent dans le fermenteur digestif sont essentiellement sous forme de glycolipides, phospholipides et triglycérides. Les lipides sont essentiellement dégradés chez les animaux dont le fermenteur est localisé en amont du tube digestif puisque dans le cas des fermenteurs localisés en aval du tractus digestif, les lipides sont dégradés et absorbés dans l'estomac et l'intestin grêle.

IV.D.1. Fermenteur en position antérieure : le cas de la vache

Les molécules lipidiques sont dégradées par hydrolyse grâce aux bactéries lipolytiques. De ces hydrolyses résultent des acides gras qui vont alors subir des transformations très diverses par d'autres micro-organismes. Dans le rumen, les principales transformations des acides gras sont : l'isomérisation[16], l'hydrogénation[17] et l'hydratation (Vossenberg & Joblin, 2003). 80% à 92% des acides linoléiques et linoléniques sont hydrogénés dans le rumen (Doreau & Ferlay, 1994). Ces acides gras saturés sont ensuite digérés grâce aux enzymes pancréatiques dans l'intestin grêle puis absorbés.

Le degré de saturation des acides gras a des conséquences directes sur la nutrition et la santé de l'hôte. En effet, il a été montré, chez l'Homme, que les acides gras saturés (acide laurique, myristique et palmitique) ont un rôle pro-carcinogène et pro-athérogène[18] (Williams, 2000) alors que les insaturés (acide oléique, polyinsaturés oméga-3) ont un rôle anti-carcinogène et anti-athérogène (Williams, 2000). Par conséquent, les facteurs alimentaires susceptibles d'orienter le métabolisme des lipides dans les fermenteurs digestifs vers une production d'acides gras insaturés au détriment des acides gras saturés sont largement étudiés depuis quelques années chez l'Homme et les ruminants (Chilliard *et al.*, 2000).

IV.D.2. Fermenteur en position postérieure : cas du lapin

Bien que le rôle du microbiote cæcal dans la dégradation lipidique soit probablement limité, certaines espèces microbiennes seraient capables de convertir le cholestérol en coprostanol. Le coprostanol, peu absorbé, est excrété dans les selles. Chez l'Homme, il a été démontré que les micro-organismes capables de réaliser cette bioconversion ne sont pas forcément présents chez tous les individus (Veiga *et al.*, 2005). A notre connaissance, aucune étude sur ce sujet n'a été réalisée sur le lapin, ou d'autres animaux à fermenteur digestif postérieur. La teneur en lipides dans l'alimentation des lapins est généralement faible (entre 2% et 4%). Ceux-ci étant majoritairement absorbés au niveau de l'intestin grêle, la teneur en lipides qui arrive dans le cæcum est très faible.

[16] Conversion d'une molécule d'acide gras en un de ses isomères.
[17] Conversion des acides gras insaturés en acides gras saturés par l'ajout de dihydrogène.
[18] qui accélère le processus d'altération dégénérative de la paroi interne des vaisseaux sanguins

IV.E. CAPACITES METABOLIQUES DES PRINCIPALES ESPECES BACTERIENNES

Les fonctions globales du microbiote ne sont bien connues que dans quelques fermenteurs digestifs (côlon humain, rumen). Les capacités métaboliques *in vitro* de quelques espèces bactériennes (souvent cultivables) ont été étudiées mais ne permettent pas de réellement juger de leurs aptitudes *in vivo*. Nous décrirons ci-après seulement les espèces majoritairement présentes dans le rumen ou celles ayant un rôle essentiel dans son bon fonctionnement (Tableau 11 ; Figure 15).

Les *Ruminococccus* font partie des espèces cellulolytiques les plus actives. *R. albus* et *R. flavefaciens* ont été observées chez les ruminants et les équidés (Julliand *et al.*, 1999; Lin & Stahl, 1995).

Tableau 11. Fonctions in vitro des bactéries cultivables isolées du rumen.

Division	Classe	Espèce	Hydrolyse							Substrat de fermentation								Produit de fermentation									HGT		
			Cellulose	Hémicellu.	Pectine	Amidon	Protéine	Peptide	Lipide	Cellobiose	Maltose	Saccharose	Glucose	Galactose	Fructose	Pentose	Ac. aminés	Lactate	Acétate	Propionate	butyrate	Isobutyrate	Ethanol	Succinate	Lactate	H2	CO2	Méthanog.	Acétog.	Sulfatoréd.
Firmicutes	*Clostridia*	*Ruminococcus albus*	+	+	+					+									+				+			+	+			
		Ruminococcus flavefaciens	+	+	+					+									+					+		+	+			
		Ruminococcus bromii				+													+				+			+	+			
		Ruminococcus schinkii																											+	
		Fibrobacter succinogenes	+	+	+	+				+	+		+	+					+					+						
		Butyrivibrio fibrisolvens	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+		+						+			
		Clostridium aerotolerans	+							+																				
		Clostridium longisporum	+							+									+		+					+	+			
		Clostridium aerotolerans																												
		Clostridium aminophilum						+									+													
		Clostridium sticklandii						+									+													
		Clostridium polysaccharolyticum	+							+									+		+					+				
		Eubacterium cellulosolvens	+							+									+						+	+				
		Eubacterium ruminantium		+		+				+	+		+	+	+	+			+		+						+			
		Eubacterium limosum		+									+		+	+		+	+		+								+	
		Eubacterium oxydoreducens																		+									+	
		Selenomonas ruminantium	+			+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+			
		Lachnospira multipara								+		+	+		+				+						+	+	+			
		Lachnobacterium bovis								+	+	+	+		+															
		Mitsuokella jalaludinii				+																								
		Mitsuokella multiacidus				+																			+					
		Anaerovibrio lipolytica							+						+				+	+				+		+	+			
		Megasphaera elsdenii									+	+	+		+		+	+			+					+	+			
		Peptostreptococcus anaerobius															+													
		Peptostreptococcus productus																											+	
		Acidaminococcus fermentans															+		+		+									
		Allisonella histaminiformans															+													
		Veillonella alcalescens																+												
		Veillonella parvula																	+	+										
		Acetitomaculum ruminis																											+	
		Succiniclasticum ruminis																		+										
		Desulfotomaculum ruminis																												+
	Bacilli	*Streptococcus bovis*	+		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+			+	+						+		+			
		Syntrophococcus sucromutans																												+
Bacteroidetes	*bacteroides*	*Prevotella ruminicola*	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	+		+		+						
		Prevotella bryantii		+	+		+	+					+	+	+				+	+		+		+						
		Prevotella brevis					+	+					+	+	+				+	+		+		+						
		Prevotella albensis					+	+					+	+	+				+	+		+		+						
Proteobacteria	*Aeromonadales*	*Ruminobacter amylophilus*				+	+				+								+					+						
		Succinomonas amylolytica				+					+			+										+						
		Succinivibrio dextrinosolvens				+					+		+	+	+			+												
	Pasteurellales	*Succinivibrio dextrinosolvens*							+										+					+						
		Mannheimia succiniproducens											+		+	+														
	Campylobacterales	*Wolinella succinogenes*																						+						
	Desulfuvbriorales	*Desulfovibrio desulfuricans*																												+
Spirochaetes	*Spirochaetes*	*Treponema bryantii*			+														+					+						
		Treponema saccharophylum			+																									

D'après Fonty et Chaucheyras-Durand (2008d). HGT: hydrogénotrophie.

Pour adhérer aux fibres végétales, ces bactéries forment un épais glycocalyx[19] (Roger *et al.*, 1990). Elles sont très sensibles au pH acide provoqué par une alimentation riche en amidon. Certaines souches de *R. albus* produisent des métabolites secondaires qui inhibent *R. flavefaciens* (Odenyo *et al.*, 1994) et certains *Chytridiomycetes* (Bernalier *et al.*, 1993).

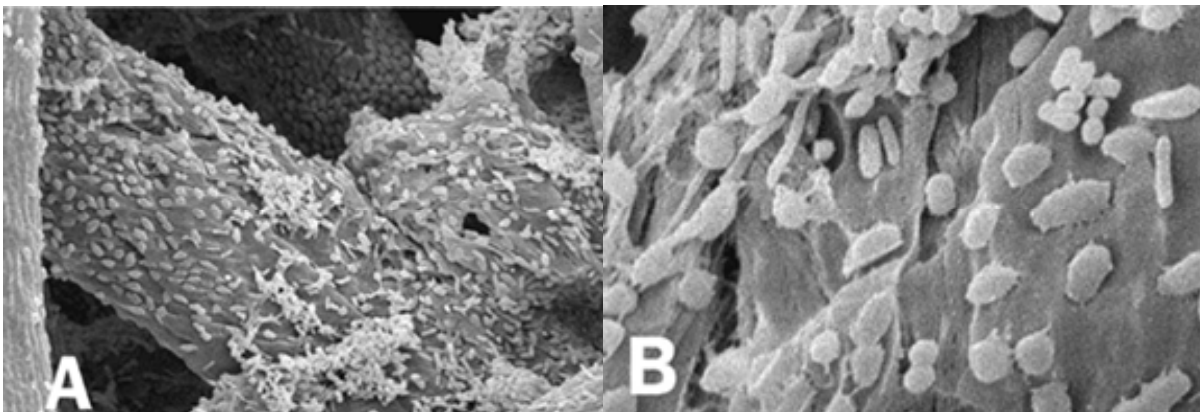


Figure 15. Consortium bactérien de différentes espèces sur des fibres végétales (Krause *et al.*, 2003)

Fibrobacter succinogenes est une espèce cellulolytique majeure du rumen, puisqu'elle représente 5 à 6% de la communauté procaryotique. Elle est capable de dégrader les celluloses les plus récalcitrantes mais elle est très sensible aux phénols des végétaux (Chesson *et al.*, 1982).

Butyrivibrio fibrisolvens est susceptible d'exercer une grande variété de fonctions (hydrolyses glucidique et protéique, fermentation) bien que son activité cellulolytique soit plus faible que les *Ruminococcus* et *Fibrobacter succinogenes* (Bryant & Burkey, 1953). Elle fait partie des espèces dominantes chez les ruminants et elle est une des principales espèces productrices d'acide butyrique.

Les *Clostridium* ne sont jamais dominantes dans le rumen. Elles sont cellulolytiques, et certaines espèces dégradent les peptides.

Les *Eubacterium* ont été isolées chez diverses espèces de mammifères herbivores. Leurs potentialités métaboliques varient beaucoup d'une espèce à l'autre. Elles sont principalement fermentatives. Certaines espèces hydrogénotrophes sont capables d'acétogenèse réductrice.

Selenomonas ruminantium est une espèce majoritaire chez les ruminants recevant un aliment riche en amidon. Ces bactéries fermentent et produisent de l'acide lactique, de l'acide

[19] couche de polyholosides liée aux lipides et aux protéines de la membrane. Il a un rôle dans la protection, un rôle dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire

acétique et de l'acide propionique et une faible quantité de dihydrogène dont la concentration augmente fortement en présence d'*Archaea* méthanogènes (Scheifinger *et al.*, 1975).

Megasphaera elsdenii fermente les oses simples et 97% du lactate présent dans le rumen (Counotte *et al.*, 1981). Elle se retrouve chez les jeunes ruminants et chez les ruminants recevant une ration riche en amidon (Stewart & Bryant, 1988). *M. elsdenii* produit également beaucoup d'acides gras ramifiés[20] indispensables à la croissance de nombreuses espèces bactériennes dont les cellulolytiques.

Streptococcus bovis est une espèce amylolytique majoritaire chez les ruminants recevant une alimentation riche en céréales. La croissance de cette espèce est très rapide (temps de doublement de la population de l'ordre de 25 minutes) et son activité génère de grandes quantités d'acide lactique. Par conséquent, *S. bovis* est l'agent souvent responsable des phénomènes d'acidose lactique.

Lachnospira multipara est la principale espèce pectinolytique du rumen. On retrouve cette espèce chez les animaux recevant une alimentation riche en pectine.

Les fonctions métaboliques d'*Anaerovibrio lipolytica* sont l'hydrolyse des lipides et l'utilisation de l'acide lactique. Son importance est donc capitale dans le fonctionnement du fermenteur digestif.

Parmi les *Peptostreptococcus*, *P. anaerobius* est une espèce capitale dans le fonctionnent du rumen puisqu'elle est la principale espèce productrice d'ammoniaque.

Les *Prevotella* sont des espèces dominantes quel que soit le régime alimentaire des ruminants. On les retrouve également chez de nombreux animaux non ruminants : Homme, lapin, porc. Elles remplissent de nombreuses fonctions métaboliques : de l'hydrolyse des glucides à la fermentation des oses simples, en passant par la protéolyse (Wallace & Brammall, 1985).

[20] Par désamination et décarboxylation

V. QUELQUES FACTEURS DE VARIABILITE DU MICROBIOTE

VI.A. VARIABILITE ENTRE ESPECES HOTES

Des études basées sur la microscopie électronique ou les colorations de Gram montrent que les différentes espèces de ruminants ont des similitudes dans leurs microbiotes (Hobson *et al.*, 1976; Pearson, 1967; Pearson, 1969). Les principales espèces bactériennes dans le fermenteur digestif des ruminants domestiques se retrouvent chez les ruminants sauvages que ce soit avec l'utilisation d'approche culturale ou moléculaire (Dehority, 1975; Dehority, 1986; Nelson *et al.*, 2003; Orpin *et al.*, 1985).

Chez les ruminants domestiques, des travaux par approche culturale démontrent que, entre ovins et bovins, les espèces bactériennes amylolytiques et hemicellulolytiques sont proches (Dehority & Grubb, 1976; Leedle & Hespell, 1980). Les études moléculaires démontrent que certaines divisions bactériennes sont dans les mêmes proportions dans le rumen de différentes espèces de ruminants domestiques, tandis que chez d'autres divisions les proportions diffèrent. Par exemple, chez les ovins, le rumen est composé de 42 à 73% de *Firmicutes*, 25 à 54% de *Bacteroidetes*, 0 à 19% de *Spirochaetes* et 0 à 3% de *Proteobacteria*. Chez les bovins, bien que les proportions de *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* soient similaires, les *Proteobacteria* (0 à 27%) sont plus présentes que les *Spirochaetes* (0 à 4%). Chez le yak (*Bos grunniens*), la division des *Proteobacteria* est absente (An *et al.*, 2005). Chez les caprins, la densité bactérienne au niveau du contenu ruminal serait plus importante que chez les ovins (Sultan *et al.*, 2006). Chez la chèvre, le genre *Butyrivibrio* est majoritaire puisque 70% des souches isolées appartiennent à cette espèce bactérienne. Cette proportion est plus élevée que ce qui a déjà pu être observé chez les bovins ou les ovins (Dehority & Grubb, 1976).

VI.B. VARIABILITE ENTRE INDIVIDUS DE LA MEME ESPECE

Etant donné que les communautés bactériennes des fermenteurs digestifs abritent plusieurs centaines d'espèces, il est probable que les espèces présentes et leurs abondances respectives diffèrent, au moins un peu, d'un individu à l'autre chez une même espèce de mammifère herbivore.

Cette variabilité inter-individu a été observée dans la communauté bactérienne du rumen du mouton (Edwards *et al.*, 2005), du côlon de l'Homme (Zoetendal *et al.*, 1998), du côlon du chien (Simpson *et al.*, 2002). L'utilisation de la microscopie électronique démontre que le nombre de bactéries attachées à la paroi du rumen de la vache variait d'un animal à

l'autre (McCowan *et al.*, 1980). Dans le rumen du mouton, la variabilité entre individus est généralement plus importante que les autres effets testés comme un traitement antibiotique (Edwards *et al.*, 2005) ou un changement alimentaire (Larue *et al.*, 2005). Ainsi Larue *et al.* (2005) démontrent que les profils DGGE varient de 40% entre individus. En revanche, cette variabilité entre individus n'a pas été observée chez certaines espèces comme la dinde (Scupham, 2007). D'après Zoetendal *et al.* (1998) des différences inter-individuelles existent mais sont finalement de faible ampleur chez l'Homme puisque la flore bactérienne dominante est stable d'un individu à l'autre.

VI.C. PERTURBATION ALIMENTAIRE

L'alimentation est un facteur essentiel qui influence le microbiote du tube digestif. La nature, la forme de présentation, la quantité ingérée, la fréquence de distribution sont autant d'éléments qui peuvent influencer les communautés de micro-organismes. Les effets alimentaires ont beaucoup été étudiés chez l'Homme et les ruminants, notamment chez ce dernier en modulant le ratio amidon/fibres.

La communauté bactérienne de la phase liquide, lorsque le régime est riche en fourrages (100% foin de graminée ou 100% foin de luzerne + graminée), est principalement composée des divisions des *Firmicutes* (25 à 57%) puis des *Bacteroidetes* (40 à 68%), et dans une faible proportion des *Proteobacteria* (2 à 3%) et des *Spirochaetes* (0 à 4% ; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2003b; Larue *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006).

Avec un régime riche en concentrés, les *Firmicutes* deviennent plus largement majoritaires (92%) tandis que les *Bacteroidetes* deviennent minoritaires (2% ; Tajima *et al.*, 2000) et les *Proteobacteria* et *Spirochaetes* sont absentes (Koike *et al.*, 2003b; Larue *et al.*, 2005). Parmi les *Firmicutes*, la moitié appartiennent aux genres *Mitsuokella* et *Selenomonas* (Tajima *et al.*, 2000). Toujours, parmi les *Firmicutes*, on observe une augmentation des bactéries productrices et utilisatrices d'acide lactique (*Lactobacillus ruminis, Streptococcus bovis, Selenomonas ruminantium, Butyrivibrio fibrisolvens* et *Megasphera elsdenii* etc. ; Tajima *et al.*, 2000) en accord avec les travaux réalisés par culture de Mackie et Gilchrist (1979). On observe également une augmentation des *Ruminococcus* amylolytiques (*R. bromii, R. callidus, R. hydrogenotrophicus, R. obeum* et *R. schinkii* ; Larue *et al.*, 2005) et une baisse des *Ruminococcus* cellulolytiques (*R.albus* ; Larue *et al.*, 2005; Van der Linden *et al.*, 1984). L'activité de ces populations cellulolytiques est fortement diminuée (Martin *et al.*, 2002), entre autres, en raison de leur sensibilité au pH acide induit par les fermentations rapides

(Russell & Wilson, 1996). On observe également une augmentation des ciliés holotriches qui consomment les amidons et les oses et une très nette diminution des entodiniomorphes (Nagaraja, 2002).

Cependant, la nature même du fourrage ou du concentré utilisé peut modifier les communautés microbiennes. Par exemple les champignons anaérobies se développent plus particulièrement avec le foin de luzerne ou de prairie naturelle (Grenet *et al.*, 1989a). De même, *Fibrobacter succinogenes* serait favorisé par rapport à *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens* avec des régimes riches en cellulose cristalline (Fonty *et al.*, 1995).

En résumé, le microbiote des fermenteurs digestifs est composé de bactéries, d'*Archaea*, d'eucaryotes (protozoaires ciliés, protozoaires flagellés et champignons anaérobies) et de virus. Ces communautés microbiennes sont capables de dégrader les polyosides complexes (hydrolyse, fermentation, hydrogénation), les protéines et les lipides. Les méthodes de culture et plus récemment les outils de biologie moélculaire ont permis de montrer que ces communautés se structurent dans le temps et dans l'espace. On observe également une variabilité des écosystèmes digestifs entre espèces hôtes en termes de composition du microbiote et de composition du biotope. Toutefois, de nombreux progrès restent à accomplir. C'est pourquoi, notre travail de thèse vise à mieux connaitre les facteurs de variation des communautés procaryotiques et le fonctionnmentdes écosystèmes digestifs, notamment leurs réponses à une perturbation, chez la vache et le lapin à l'aide des outils de biologie moléculaire.

CHAPITRE 3 - METHODE D'ETUDE DU MICROBIOTE DES ECOSYSTEMES DIGESTIFS

I. COLLECTE DES ECHANTILLONS

Les contenus digestifs sont difficilement accessibles. De ce fait, la collecte des échantillons est souvent problématique. Le prélèvement de feces est une alternative largement utilisée pour la collecte d'échantillons sur des animaux en milieu naturel (Frey *et al.*, 2006). Chez l'homme, de nombreux auteurs (Chassard *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2008) utilisent les fèces pour étudier la flore de la dernière partie du côlon (côlon gauche) sans toutefois avoir préalablement démontré que ces échantillons sont effectivement représentatifs du microbiote colique. Par ailleurs, Marteau *et al.* (2001) ont montré que les communautés présentes dans le cæcum de l'homme et ses fèces sont différentes.

L'accès direct au contenu du fermenteur peut également se faire par canulation. Cette méthode est préférentiellement utilisée chez les animaux domestiques de grande taille (vache, mouton, cheval ; Belge *et al.*, 2002 ; Decuypere *et al.*, 1977; Komarek & Leffel, 1961 ; Taniguchi *et al.*, 2003). L'inconvénient majeur de la canulation est que, à chaque ouverture de la canule, du dioxygène entre dans l'écosystème et modifie son degré d'anaérobiose. Chez les animaux de petite taille (rongeur, lagomorphe, volaille, porc), les prélèvements d'échantillon se font principalement après sacrifice des animaux (Abecia *et al.*, 2007; Amit-Romach *et al.*, 2004; Deplancke *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2008a). L'inconvénient de cette technique repose dans l'impossibilité de mesurer la variation du microbiote dans le temps chez un même individu. C'est pourquoi, Gidenne et Bellier (1992) ont mis au point une technique de canulation du cæcum chez le lapin. Les auteurs ont montré la représentativité des échantillons collectés par cette technique en comparaison de ceux obtenus après le sacrifice des animaux pour les paramètres fermentaires. Toutefois, le délai de récupération post opératoire est de plusieurs jours et le prélèvement entraine une entrée d'air dans le fermenteur qui est en situation normale anaérobie. Les conséquences de la canulation et de prélèvement répétés de contenu cæcal sur le microbiote cæcal n'ont pas été étudiées chez le lapin. De plus, la lourdeur de la méthode limite le nombre d'animaux étudiés. De nouvelles techniques, plus représentatives ou moins invasives, sont actuellement en cours de développement. Ainsi, le prélèvement assisté par endoscopie a été utilisé pour échantillonner du contenu gastrique chez le cheval (Varloud *et al.*, 2007), et du contenu colique chez l'Homme (Marteau *et al.*, 2001).

Dans la première partie de notre travail, nous avons comparé pour nos deux espèces modèles (vache et lapin) les communautés microbiennes (bactéries et *Archaea*) du fermenteur

(rumen ou cæcum), des fèces (bouses et crottes dures) et des cæcotrophes (lapin seulement). Chez la vache, l'accès direct au fermenteur était permis par la canulation du rumen. Chez le lapin, l'accès au contenu cæcal se faisait après sacrifice des animaux. Notre objectif était d'étudier la représentativité de matrices alternatives (crottes dures ou cæcotrophes) qui soient faciles d'accès et dont le prélèvement n'engendre pas de perturbations dans le fonctionnement du fermenteur. Il s'agit d'une part de pouvoir réaliser à moindre coût, des études sur une large population d'animaux et d'autre part de pouvoir faire un suivi dans le temps sur un même individu.

II. MISE EN EVIDENCE DU MICROBIOTE

Pendant de nombreuses années, les écosystèmes digestifs de la vache et du lapin ont été étudiés à l'aide des méthodes de culture microbienne. Ces techniques présentent l'inconvénient de restreindre les connaissances aux populations cultivables. Suau *et al.* (1999) ont montré que les populations cultivables ne représentent que 20% à 40% de la totalité des espèces présentes dans les écosystèmes digestifs. Cette situation justifie le développement considérable des outils d'analyses moléculaires au cours des dernières années. Dans cette bibliographie, nous aborderons uniquement les techniques de biologie moléculaire basées sur l'étude de l'ADN. Les techniques basées sur la microscopie (DAPI[21], immunofluorescence), la cytométrie en flux, le SIP[22] ou la culture ne seront pas abordées.

II.A. LE CHOIX DU GENE

L'écologie microbienne s'intéresse *i)* à la connaissance des espèces présentes dans un écosystème (approche neutre), et *ii)* à comprendre les capacités fonctionnelles de cet écosystème (approche fonctionnelle). Les approches à la fois neutre et fonctionnelle sont de plus en plus courantes notamment avec le développement de la métagénomique.

II.A.1. Approche neutre

La connaissance des espèces composant un microbiote consiste à mettre en évidence le polymorphisme d'un gène entre les espèces microbiennes. Ces gènes très particuliers sont appelés des marqueurs de diversité. Les gènes codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal (ou gène *ssu*) s'est largement imposé. Il est le marqueur neutre de diversité le plus utilisé car :

[21] Technique basée sur la coloration de l'ADN des cellules par le 4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole puis comptage des cellules colorées sous microscope
[22] Stable Isotope Probing

- il est universellement présent en plusieurs copies chez tous les procaryotes et son homologue le 18S est universellement présent chez les eucaryotes (Case *et al.*, 2007).
- Il présente des zones fortement conservées au sein de chaque règne
- il présente suffisamment de variabilité pour distinguer les espèces entre elles (Case *et al.*, 2007).
- Il est neutre c'est-à-dire qu'il a évolué de façon constante avec le temps en l'absence de pression de sélection (concept d'horloge moléculaire). De ce fait, il permet non seulement de classer les micro-organismes mais aussi de comprendre leurs évolutions (Zuckerkandl & Pauling, 1965).

Cependant, ce gène présente quelques inconvénients comme l'hétérogénéité de séquences de ces copies chez certaines espèces (Klappenbach *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2001) et le manque de variabilité pour distinguer les espèces proches (Normand *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 2001). Pour ces deux raisons, d'autres gènes ont parfois été utilisés comme marqueur de diversité. Par exemple, le gène *rpoB*, codant pour la sous unité β de l'ARN polymérase est présent en une seule copie par génome et discrimine mieux les espèces que les gènes codant pour l'ARNr 16S (Case *et al.*, 2007; Dahllof *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2001). Toutefois, utiliser un marqueur de diversité autre que les gènes codants pour l'ARNr 16S est problématique car les bases de données sont moins riches pour ces autres gènes, ce qui rend l'identification des espèces par blast de séquences moins efficace (Gutell *et al.*, 1994).

Pour distinguer des espèces bactériennes très proches ou différentes souches issues de la même espèce, la région intergénique entre les gènes codant pour les ARNr 16S et 23S (ITS 16/23S) est le marqueur de diversité le plus utilisé (Garca-Martnez *et al.*, 1999; Otten & De Ruffray, 1996; Otten *et al.*, 1996). Cette région est plus variable en taille et en séquence que les gènes codant pour l'ARNr 16S et ce qui lui permet ainsi d'être plus discriminante.

Pour limiter les contraintes de chaque gène, de plus en plus d'études se basent sur l'analyse simultanée de plusieurs marqueurs neutres, souvent les gènes dit « de ménage » (par exemple : *gapA*, *groEL*, *gyrA*, *ompA* et *pgi* ; Christensen *et al.*, 2004; Wertz *et al.*, 2003). Cette approche permet de mieux caractériser et identifier les espèces microbiennes en recoupant les informations propres à chaque marqueur.

II.A.2. Approche fonctionnelle

L'approche fonctionnelle consiste à déterminer si une fonction métabolique est présente dans une communauté microbienne donnée. Concrètement, il s'agit de détecter voire de quantifier dans l'échantillon un ou des gènes indispensables à la réalisation de la fonction étudiée.

Cette approche est peu utilisée dans les écosystèmes digestifs. En effet, dans ces écosystèmes, la plupart des grandes fonctions métaboliques (par exemple la fibrolyse ou l'amylolyse) nécessitent de nombreux complexes enzymatiques qui sont codés par un grand nombre de gènes et qui, de plus, diffèrent selon les espèces microbiennes. A titre d'exemple, la cellulolyse dans le rumen nécessite l'action synergique d'endoglucanases (endo-1,4-β-D-glucane hydrolase, EC 3.2.1.4), d'exoglucanases (exo-1,4-β-D-glucane cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) et de β-glucosidases (β-D-glucosidase, EC 3.2.1.21). Chacune de ces enzymes sont codées par un grand nombre de gènes (Forsberg *et al.*, 1997).

Toutefois, cette approche a été utilisée pour étudier la méthanogenèse. En effet, cette fonction métabolique nécessite en phase terminale une enzyme spécifique, le méthyle coenzyme-M réductase, qui permet de réduire les groupes méthyles. Or ce complexe enzymatique est codé par un nombre restreint de gènes, appelé *mcr* (Méthyle coenzyme-M réductase), ce qui rend son étude plus aisée. Ainsi, le gène *mcrA* a été largement utilisé pour détecter ou quantifier les capacités méthanogènes d'un microbiote (Denman *et al.*, 2007; Nettmann *et al.*, 2008; Nunoura *et al.*, 2008).

II.A.3. Approche métagénomique

La métagénomique consiste à séquencer en totalité tous les génomes microbiens (concept de microbiote) présents dans un échantillon (Handelsman *et al.*, 1998 ; Singh *et al.*, 2008). En théorie, la métagénomique fournit alors un aperçu complet de la composition de la communauté mais aussi de ses fonctions métaboliques potentielles (Hugenholtz & Tyson, 2008). Cependant, les études actuelles sont basées soit sur l'analyse de la communauté microbienne (Eckburg *et al.*, 2005; Warnecke *et al.*, 2007) soit sur l'analyse des potentialités métaboliques du microbiote (Beloqui *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 2007; Kurokawa *et al.*, 2007; Palackal *et al.*, 2007). Des approches métagénomiques ont été réalisées chez l'homme (Eckburg *et al.*, 2005 ; Kurokawa *et al.*, 2007 ; Turnbaugh *et al.*, 2007), chez la termite (Warnecke *et al.*, 2007), chez le lapin (Feng *et al.*, 2007) et chez le bovin (Beloqui *et al.*, 2006 ; Ferrer *et al.*, 2007; López-Cortés *et al.*, 2007 ; Palackal *et al.*, 2007). Ces études ont permis de mettre en évidence chez le lapin et chez la vache de nouveaux gènes de micro-organismes impliqués dans la cellulolyse.

II.B. LES TECHNIQUES DE DETECTION ET DE QUANTIFICATION DES ESPECES MICROBIENNES

II.B.1. L'hybridation moléculaire : les biopuces

L'hybridation moléculaire consiste à hybrider des sondes spécifiques aux cibles potentielles présentes dans un extrait d'ADN (ou d'ARN). Différentes techniques existent : le dot-blot (Amann *et al.*, 1990; Harmsen *et al.*, 2002; Odenyo *et al.*, 1994), le FISH (Fluorescent *in situ* hybridization ; Rigottier-Gois *et al.*, 2003; Zoetendal *et al.*, 2002a), le SSH (suppressive soustractive ; Galbraith *et al.*, 2004) et les biopuces (ou microarrays).

Les biopuces permettent d'analyser rapidement plusieurs milliers de gènes en un seul essai (Figure 16). Les puces se présentent sous la forme de support (silicium, plastique, verre, etc.) de la taille d'une lame de microscope. Sur ces supports sont délimitées plusieurs dizaines de milliers de spots, chaque spot comprenant plusieurs copies d'une sonde spécifique aux gènes d'intérêts. Ces sondes sont déposées par un robot (spotted microarrays) ou bien directement synthétisées sur la puce (oligonucleotide microarrays). La méthode utilise des ADNc marqués par un fluorochrome (cyanine Cy3 ou Cy5), et obtenus par rétro-transcription des ARNm. L'ADNc marqué est déposé sur la puce où des hybridations spécifiques peuvent se réaliser avec les sondes présentes sur le support. Après lavages, les sondes avec lesquelles s'est produite l'hybridation sont révélées par la fluorescence. L'analyse de cette fluorescence sur chaque spot permet de déterminer la présence ou l'absence (voire l'abondance relative) du

gène recherché. Ainsi pour les puces phylogénétiques, on peut rechercher, sur un seul échantillon, plusieurs milliers de taxons avec des sondes 16S spécifiques. L'utilisation de sondes dégénérées permet également de détecter des micro-organismes non séquencés ou non attendus. De la même façon, les puces métaboliques (fonctionnelles) permettent d'identifier les capacités métaboliques potentielles présentes dans un échantillon. Les biopuces n'ont pas encore beaucoup été utilisées en écologie microbienne du tube digestif (Leser *et al.*, 2002b) mais sont en plein essor dans d'autres écosystèmes microbiens comme les milieux aquatiques (Günther *et al.*, 2006; Yergeau *et al.*, 2007) ou le sol (Barlaan *et al.*, 2005; Brodie *et al.*, 2006).

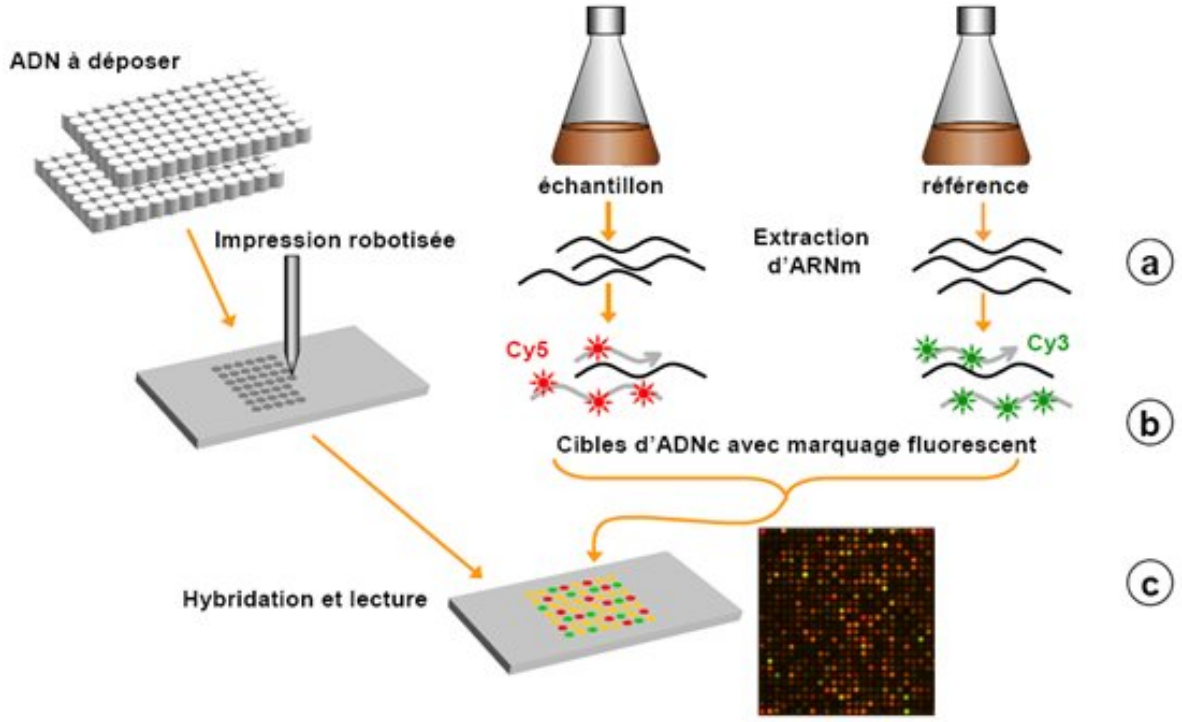


Figure 16. Principe de la biopuce.
Extraction de l'ARN (a), transcription reverse avec un marquage fluorescent (b), hybridation et lecture (c)

II.B.2. Le séquençage

II.B.2.1. Clonage et séquençage de Sanger

La majorité des travaux de séquençage en écologie microbienne a été réalisée par clonage et séquençage de Sanger. Le gène d'intérêt (souvent les gènes codant pour l'ARNr 16S) d'une communauté microbienne est d'abord amplifié par la technique de Polymerase Chain Reaction (PCR). Chaque amplicon est cloné dans le génome d'une cellule d'*Escherichia Coli*. Les cellules sont isolées et mises individuellement en culture. Chaque clone est alors séquencé par le protocole de Sanger qui consiste en une amplification PCR

classique avec l'ajout d'une faible concentration de ddNTP[23] (A, T, G et C) marqués par des fluorochromes différents. Lorsqu'ils sont intégrés à la chaine en cours de synthèse (phase d'élongation), les ddNTP stoppent la synthèse de l'amplicon. Les amplicons obtenus sont alors de tailles diverses et sont séparés par électrophorèse capillaire sur un gel de polyacrylamide avant d'être lus par un scanner couplé à un laser. La couleur de fluorescence des différentes bandes du gel permet d'attribuer le nucléotide (A, T, G ou C) à chaque paire de base.

L'approche clonage-séquençage est longue et coûteuse ce qui limite le nombre d'échantillons analysés et le nombre de clones séquencés par échantillon. Le caractère aléatoire de la sélection des clones à séquencer aboutie également à des différences de résultats pour un même échantillon (Edwards *et al.*, 2004; Leser *et al.*, 2002a).

II.B.2.2. SARST

Le SARST (Serial Analysis of Ribosomal Sequence Tags) utilise une série de réactions enzymatiques pour ligaturer[24] des marqueurs de séquences ribosomales (ribosomal sequence tags). Ces opérations sont préalables au clonage et au séquençage qui peuvent ensuite être réalisés par le protocole de Sanger (Neufeld *et al.*, 2004). Ces marqueurs correspondent à des régions hypervariables du gène codant pour l'ARNr 16S : V1 (Neufeld *et al.*, 2004) ou V6 (Kysela *et al.*, 2005). Cette approche permet alors pour chaque séquence d'avoir jusqu'à 19 marqueurs différents de diversité (Neufeld *et al.*, 2004). Le SARST permet de diminuer ainsi le cout du séquençage et de couvrir plus de diversité qu'un clonage-séquençage classique (environ 99% de la diversité bactérienne ruminale d'après Yu *et al.*, 2006).

II.B.2.3. Le pyroséquençage

Le pyroséquençage consiste à lire le nucléotide (A, T, C ou G) dès qu'il s'incorpore à la séquence en synthèse (Figure 17). Pour cela, contrairement à une amplification PCR classique, chaque nucléotide est incorporé successivement. Si le nucléotide présent dans le milieu réactionnel est celui attendu, il est incorporé dans le brin d'ADN en synthèse et libère un PPi (pyrophosphate). Ce PPi est transformé en ATP par l'ATPsulfurylase. Une luciférase couple cet ATP à une luciférine ce qui produit une oxyluciférine en émettant un signal lumineux capté par le scanner du séquenceur. Les nucléotides en surplus dans le milieu réactionnel sont alors dégradés par une apyrase. Le processus se poursuit avec l'ajout d'un

[23] 2'-3'didésoxynucléosides : ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP
[24] Les marqueurs de séquences ribosomales sont « assemblés bout à bout ».

autre nucléotide (Ronaghi *et al.*, 1996; Ronaghi *et al.*, 1998). Toutefois, la taille des séquences obtenues est faible (<400 pb) car à chaque ajout de nucléotide l'activité des enzymes utilisées diminue (Ahmadian *et al.*, 2006; Ronaghi, 2001).

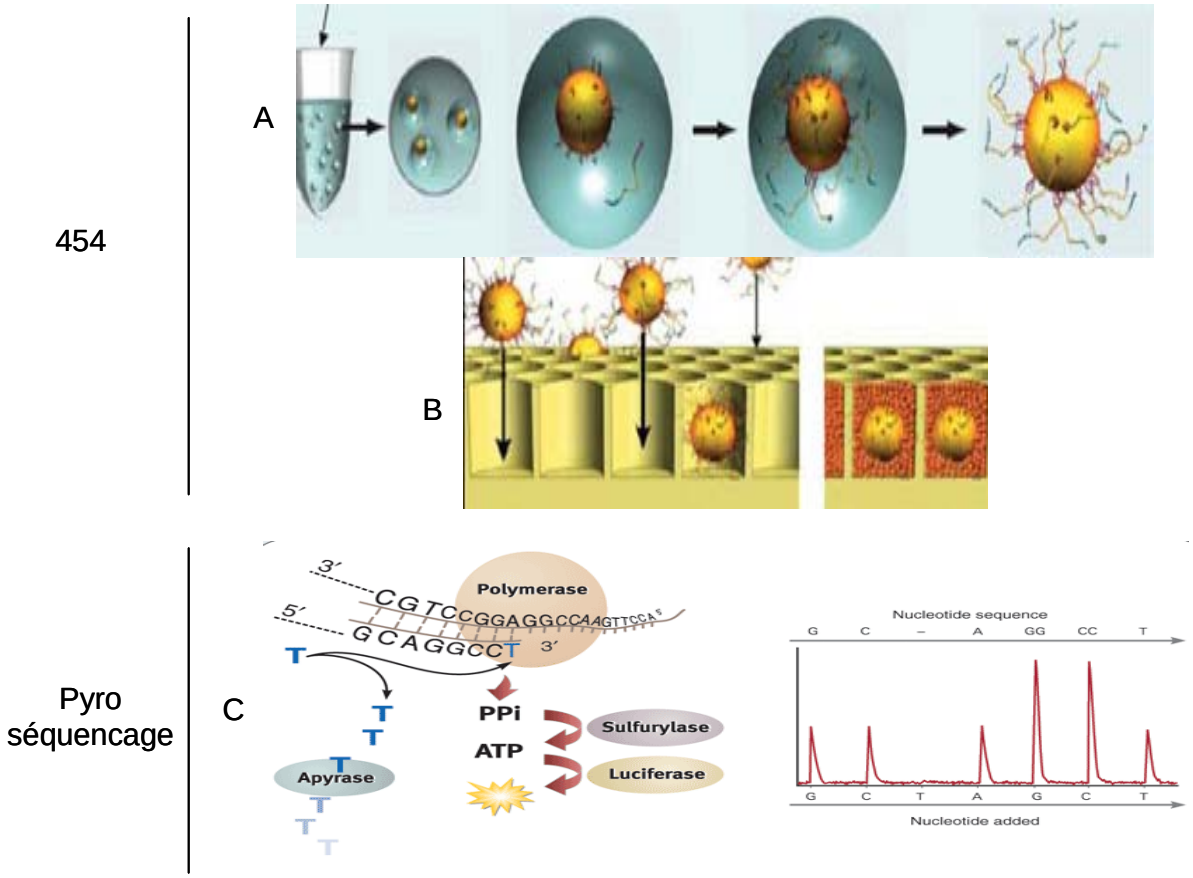


Figure 17. Principe du pyroséquençage 454.
Les réactions PCR se réalisent sur des billes de capture présentes en excès (A). Chaque bille est déposée dans un puit (B). Le séquenceur capte le signal lumineux issu de l'activité de la luciférase et de la sulfurylase et le reproduit sous forme d'un pic sur le chromatogramme (C). Les nucléotides en excès sont détruits par l'apyrase (C).

Le pyroséquençage est une technique de séquençage récente qui présente 3 avantages majeurs par rapport au séquençage de Sanger :

- sa rapidité. A titre d'exemple, la technologie 454 associée au séquenceur GSFLX (Life Sciences et Roche Diagnostics) séquence environ 5 millions de bases par heure contre 5 milles pour la technologie Sanger actuelle.
- l'absence d'une étape de culture de clone. En écologie microbienne, c'est une avancée majeure qui permet de séquencer directement l'ADN présent dans l'échantillon et représente un gain financier et de temps considérable.
- son faible coût à la séquence, environ 10 fois moins chère à la base nucléique que la technique Sanger.

Le pyroséquençage offre donc de nouvelles perspectives pour analyser les microbiotes digestifs, notamment avec des analyses métagénomiques ou en comparant plusieurs échantillons.

II.B.3. La PCR quantitative

La PCR quantitative est une technique automatisée permettant de quantifier précisément et rapidement un gène d'intérêt dans de nombreux échantillons. La PCR quantitative est une amplification PCR normale couplée à la quantification d'un signal fluorescent. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produite, elle-même directement proportionnelle à la quantité initiale d'ADN présente dans le milieu réactionnel (Elyse, 2002). La quantification est dite absolue lorsque la quantification est basée sur l'utilisation d'une gamme étalon du gène d'intérêt dont on connaît les concentrations initiales. La quantification relative est basée sur le calcul du niveau d'expression du gène cible contre un ou plusieurs gènes de référence dont on ne connaît pas forcément la concentration.

II.B.3.1. Technologie SYBR Green

Le SYBR Green est une molécule qui se fixe à l'ADN lors de la phase d'élongation de la PCR en émettant une fluorescence (Figure 18A). Le SYBR Green est beaucoup utilisé en PCR quantitative car il est applicable quelles que soient les amorces utilisées. Cependant, les amorces utilisées nécessitent une mise au point poussée pour éviter la formation de dimères de primer ou de produits non-spécifiques aboutissant à des surestimations de la quantité réelle du gène d'intérêt. La qualité de cette mise au point est généralement vérifiée en étudiant la courbe de fusion[25].

II.B.3.2. Technologie TaqMan

Cette méthode de détection est basée sur l'hybridation d'une sonde Taqman en plus des deux amorces lors de la PCR (Figure 18B). Cette sonde est marquée avec un fluorochrome *reporter* en 5' (fluorochrome FAM[26] ou VIC généralement) et un fluorochrome *quencher* en 3' (fluorochrome TAMRA[27]). Par un processus physique et énergétique (système FRET[28]), lorsque le *quencher* se trouve spatialement proche du *reporter*, celui-ci absorbe

[25] La courbe de fusion est obtenue en traçant la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température et la température de fusion d'un double brin correspond à un pic sur cette courbe.
[26] 6-carboxyfluorescein
[27] 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
[28] fluorescence resonance energy transfer

l'énergie du *reporter* et la transforme en chaleur. A l'inverse quand le *quencher* est éloigné, le quenching ne fonctionne plus et la fluorescence est visible. Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase dégrade la sonde située sur son chemin et libère le *reporter* du *quencher* qui émet alors la fluorescence. Les sondes TaqMan MGB[29] sont particulères puisqu'une molécule MGB est ajoutée à l'extrémité 3' de la sonde. Cette molécule MGB joue le rôle du quencher non fluorescent. Elle permet de stabiliser les 5 à 6 dernières bases de la sonde à son extrémité 3' et augmente sa température d'hybridation. Ce système permet ainsi de dessiner des sondes de plus petite taille (13 à 20 mer pour une sonde TaqMan MGB contre 18 à 30 mer pour une sonde TaqMan classique).

Le système TaqMan est plus spécifique que le SYBR Green, mais est plus difficile à mettre au point. En effet, la séquence d'ADN d'intérêt doit comporter entre les deux amorces une zone conservée pour pouvoir hybrider la sonde. La température d'hybridation de la sonde doit aussi être de 10°C supérieure à celle des amorces. Les sondes TaqMan MGB sont plus courtes et plus spécifiques que les sondes TaqMan classiques (Kutyavin *et al.*, 2000).

[29] Minor Groove Binder

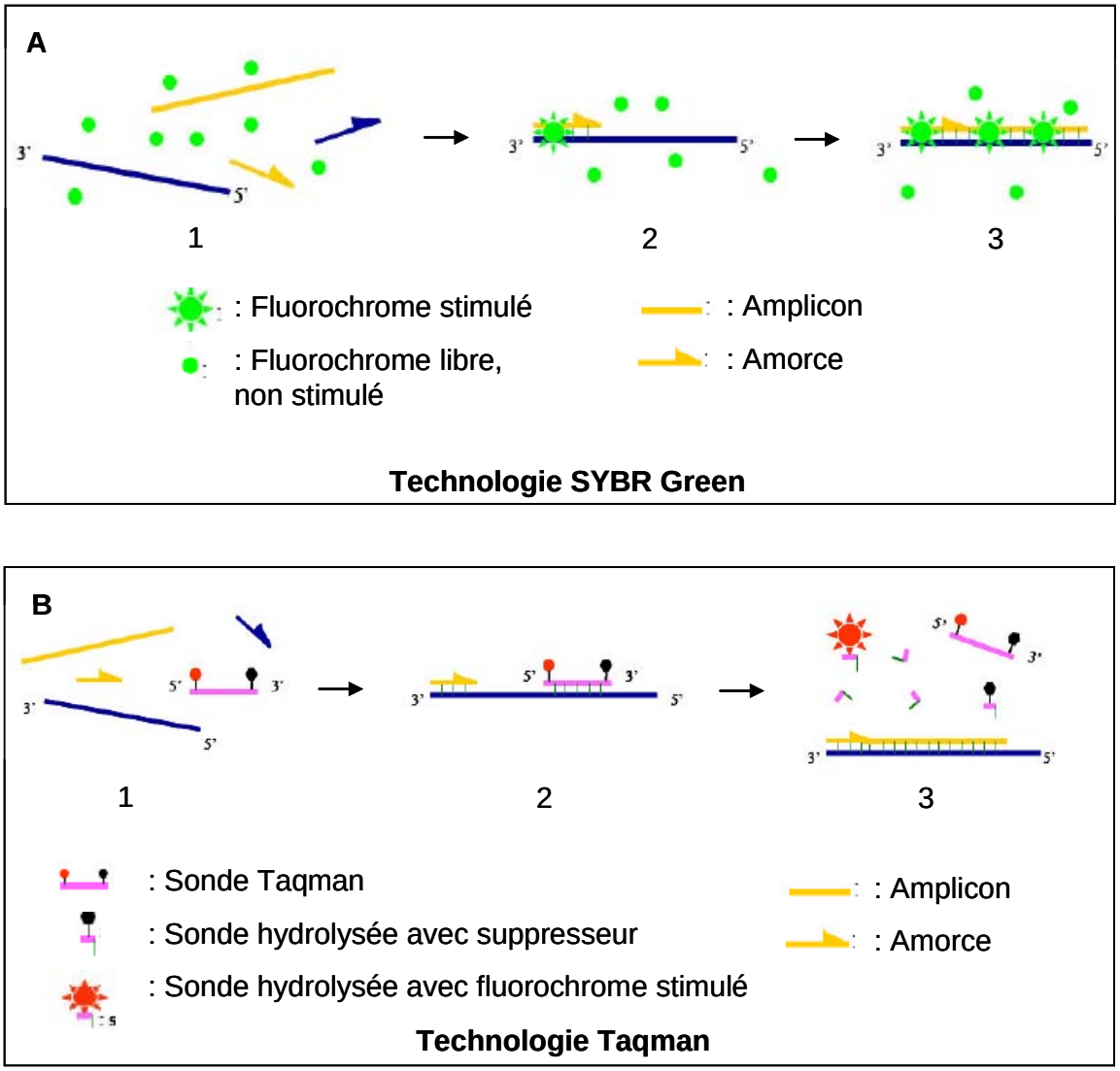


Figure 18. Principe de la qPCR en technologie SYBR Green (A) et Taqman (B).
Pour la technologie SYBR Green, le SYBR Green associé à des fluorochromes est ajouté dans le milieu (A1), puis durant la phase de polymérisation, les molécules de SYBR Green s'intercalent au double brin d'ADN en émettant une fluorescence (A2, A3). L'accroissement de cette fluorescence peut être suivi en temps réel. Pour la technologie Taqman, les sondes associées aux 2 fluorochromes sont ajoutées sous forme libre dans le milieu (B1). Lors de l'hybridation, la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence (B2). Lors de la polymérisation, la polymérase hydrolyse la sonde et sépare ainsi le fluorochrome émetteur du suppresseur, lui permettant d'émettre la fluorescence (B3).

II.B.4. Les empreintes moléculaires

Contrairement aux autres techniques (séquençage, biopuce), les empreintes moléculaires permettent d'avoir rapidement une image représentative de l'ensemble de la communauté. Elles sont également moins chères et sont donc très utilisées pour comparer la communauté microbienne lorsque le nombre d'échantillons à analyser est élevé.

Ces méthodes se basent sur la mise en évidence de la variabilité de longueur et/ou de composition des amplicons d'un marqueur de diversité (souvent le gène codant pour l'ARNr 16S). On peut distinguer différentes méthodes d'empreintes moléculaires (Tableau 12):

- T-RFLP, AFLP : traitement des amplicons par des enzymes de restriction engendrant des fragments de taille différente séparés par électrophorèse ;
- ARISA : utilisation d'un marqueur de diversité de longueur variable : l'ITS 16S/23S ;
- DGGE, TGGE, TTGE : dénaturations différentielles du double brin d'ADN des amplicons selon leur composition en GC face à un agent dénaturant (température, urée).
- CE-SSCP : conformation tridimensionnelle différentielle des simples brins des amplicons.

La migration électrophorétique des empreintes moléculaires est soit réalisée sur des gels classiques (DGGE, TGGE, TTGE, AFLP), soit réalisée dans des capillaires gérés par un séquenceur (T-RFLP, CE-SSCP, ARISA). Les techniques en gel traditionnelles comme la DGGE et la TGGE sont capables de détecter les espèces bactériennes qui constituent plus de 1% de la communauté totale (Casamayor *et al.*, 2000; Muyzer *et al.*, 1993; Zoetendal *et al.*, 1998). Les techniques en capillaire (appelées CE pour Capillary Electrophoresis) sont plus précises, plus reproductibles, moins coûteuses et plus rapides que les techniques en gel (Hong *et al.*, 2007; Hori *et al.*, 2005). Contrairement aux techniques CE, les techniques en gel traditionnelles permettent toutefois de récupérer les bandes du gel afin de les séquencer pour faire de l'affiliation phylogénétique (Costa *et al.*, 2006 ; Mohr & Tebbe, 2006; Schmalenberger & Tebbe, 2003).

Tableau 12. Comparaison des méthodes actuelles d'empreintes moléculaires pour étudier les écosystèmes microbiens

Méthodes	Migration	Détection du polymorphisme des amplicons	Identification des espèces	Enzyme de restriction	Etude sur le microbiote digestif
DGGE TGGE TTGE	gel	composition en acide nucléique	oui par séquençage	non	(Kocherginskaya *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 1999; Zoetendal *et al.*, 1998)
T-RFLP	capillaire	longueur de l'amplicon	oui probabilité de présence dans des bases de données	oui	(Kaplan *et al.*, 2001; Leser *et al.*, 2000; Nagashima *et al.*, 2003)
CE-SSCP	capillaire	longueur de l'amplicon + composition en acide nucléique	non	non	(Tatsuoka *et al.*, 2007)
AFLP	gel	longueur de l'amplicon	oui par séquençage	oui	
ARISA	capillaire	longueur de l'amplicon	non	non	(Scupham, 2007; Sundset *et al.*, 2008)

La DGGE est la technique la plus utilisée pour étudier les microbiotes digestifs. Elle a été utilisée chez de nombreuses espèces : l'Homme (Seksik *et al.*, 2003; Tannock *et al.*, 2000; Zoetendal *et al.*, 1998), le porc (Konstantinov *et al.*, 2002; Simpson *et al.*, 2000), la vache (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Sadet *et al.*, 2007), le chien (Simpson *et al.*, 2002), les rongeurs (Deplancke *et al.*, 2000; McCracken *et al.*, 2001) et le poulet (Van der Wielen *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002). La T-RFLP et la CE-SSCP sont des techniques plus récentes, encore peu utilisées pour étudier les écosystèmes digestifs.

II.B.5. La CE-SSCP

II.B.5.1. Principe

Une des deux amorces utilisées en PCR est marquée par un fluorochrome ce qui aboutit au marquage d'un seul des deux brins des amplicons (Figure 19). Les amplicons sont ensuite dénaturés[30] à 95°C puis rapidement refroidis à 0°C. Chaque brin d'ADN adopte alors une conformation tridimensionnelle unique et répétable. Cette conformation est maintenue par

[30] Séparation des doubles brins d'ADN des amplicons

la formamide désionisée, utilisée comme support de mix. Cette conformation dépend : *i)* de la taille (nombre d'acides nucléiques) du brin d'ADN, *ii)* de sa composition en bases azotées (A, G, C ou T) et *iii)* de l'ordre de succession de ces bases azotées.

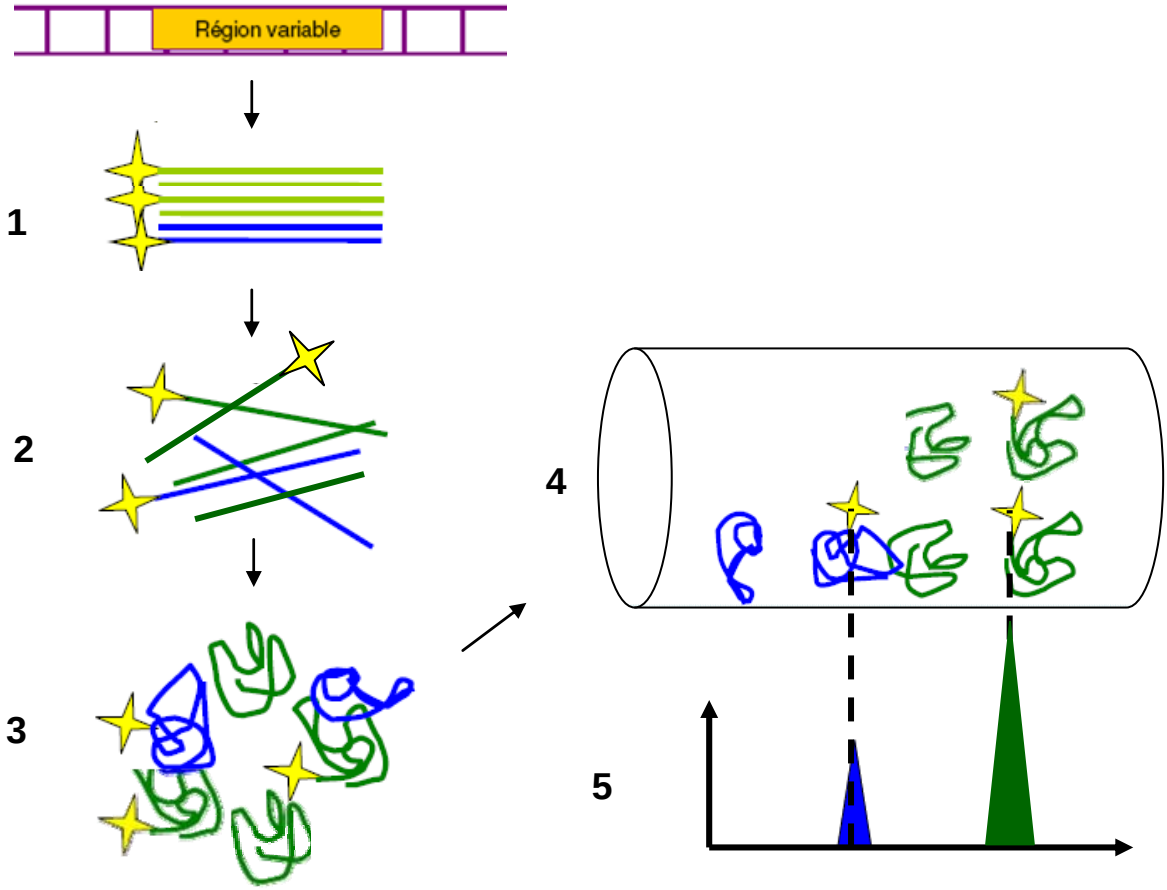


Figure 19. Principe de la CE-SSCP.
Exemple avec trois séquences d'ADN dont deux issues de la même espèce microbienne. Une région variable d'un gène d'intérêt est amplifiée avec des amorces marquées d'un fluorochrome (1). Les amplicons sont dénaturés à 95 °C (2). Les amplicons sont rapidement refroidis à 0°C et leur conformation maintenue grâce à la formamide désionisée (3). Les amplicons adoptent une forme différente car leurs longueurs et leurs compositions en acides nucléiques sont hétérogènes. Les amplicons migrent en électrophorèse capillaire (4). Un laser détecte la fluorescence et l'information est acquise sous forme de chromatogramme (5).

Les simples brins d'ADN en conformation tridimensionnelle sont alors déposés dans un capillaire par électrocinétique[31]. Un potentiel électrique est appliqué à chaque extrémité du capillaire, ce qui provoque la migration électrophorétique des simples brins. La forme et la taille de la conformation de chaque brin vont donc être à l'origine d'une migration différentielle à travers le maillage du gel : les grosses structures vont être freinées et vont

[31] Une aiguille chargée positivement plonge dans l'échantillon. L'ADN chargé négativement vient se coller sur cette aiguille. Puis l'aiguille se positionne dans l'entrée du capillaire. L'aiguille inverse sa polarité et ainsi les brins d'ADN sont repoussés et déposés à l'entrée du capillaire.

donc migrer moins loin que les petites structures. Un scanner associé à un laser va alors capter l'intensité de fluorescence sur toute la tête de lecture et produire un chromatogramme.

Généralement, on utilise le fluorochrome 6-FAM[32] (pic d'absorption à 530 nm) pour marquer les brins d'amplicons et le fluorochrome ROX[33] (pic d'absorption à 600 nm) pour marquer l'étalon interne. L'étalon est composé de 11 à 68 brins d'ADN différents selon les modèles (ROX, TAMRA, LYZ). Lors de la migration, ces étalons internes vont produire des pics à intervalle réguliers qui permettront l'alignement des profils CE-SSCP entre-eux.

II.B.5.2. L'information contenue dans les profils CE-SSCP

La CE-SSCP est une méthode d'empreinte moléculaire robuste et reproductible (King *et al.*, 2005; Zinger *et al.*, 2007) qui a été appliquée pour étudier l'écologie microbienne de nombreux écosystèmes appartenant à des environnements variés : tube digestif (Brinkmann *et al.*, 2008 ; Leclerc *et al.*, 2004), réacteur biologique (Hori *et al.*, 2005), sol (King *et al.*, 2005 ; Smalla *et al.*, 2007 ; Zinger *et al.*, 2008), mer (Livi *et al.*, 2006)

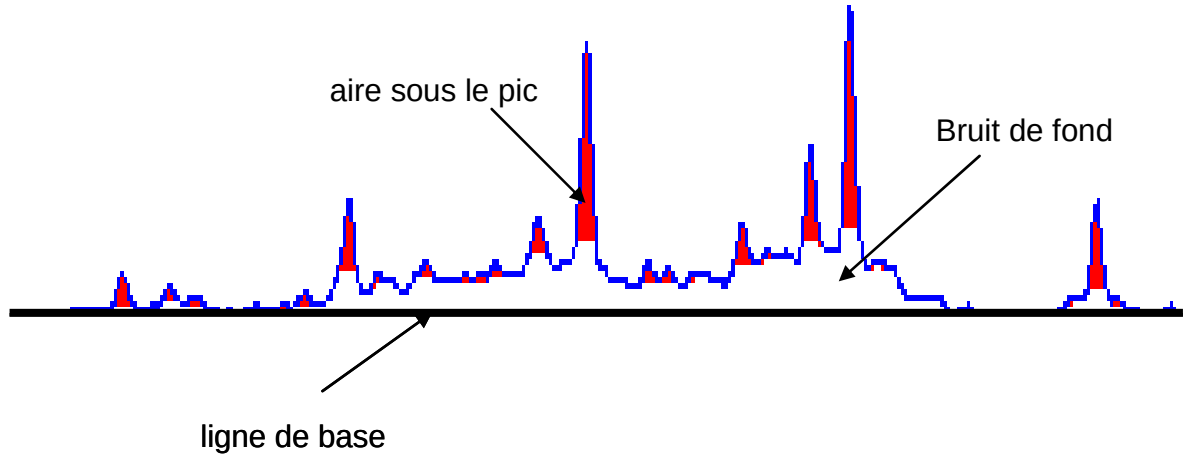


Figure 20. Exemple de profil CE-SSCP.

Dans un profil CE-SSCP (Figure 20), les pics représentent les espèces dominantes du microbiote tandis que le bruit de fond (aire sous la courbe sans l'aire sous les pics) représente les espèces minoritaires (Fromin *et al.*, 2002; Nakatsu *et al.*, 2000). Le bruit de fond est associé aux co-migrations des espèces minoritaires sur les pics des espèces dominantes. L'importance de ces phénomènes de co-migration peut être analysée sur un profil CE-SSCP. En effet, lorsque le rapport entre l'aire sous les pics et le bruit de fond augmente, les phénomènes de co-migration augmentent (Haegeman *et al.*, 2008; Loisel *et al.*, 2006). De ce fait un profil SSCP donne *i)* une image représentative des espèces dominantes du microbiote

[32] Un isomère de la carboxyfluoresceine
[33] carboxy-X-rhodamine

par l'analyse de ces pics, et *ii)* une idée de la quantité d'espèce minoritaire et de la richesse de la communauté par l'analyse du bruit de fond. Cependant, comme toutes les empreintes moléculaires, l'approche CE-SSCP est sujette aux biais inhérent à : *i)* l'extraction d'ADN, *ii)* la PCR et *iii)* un manque de résolution pour l'étude des communautés riches.

II.B.5.3. Biais d'extraction et d'amplification PCR

La diversité bactérienne d'une communauté microbienne d'un même échantillon varie en fonction de la méthode d'extraction utilisée (Luna *et al.*, 2006 ; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Stach *et al.*, 2001 ; Tang *et al.*, 2008). De plus, les produits issus de la lyse des cellules (fragment cellulaire, agent chimique) peuvent inhiber l'activité de la Taq Polymérase (Frostegard *et al.*, 1999 ; Gian Marco *et al.*, 2006). Des résultats différents sont obtenus en fonction de la méthode d'extraction d'ADN utilisée car chaque espèce microbienne a une sensibilité propre aux conditions d'extraction (Li *et al.*, 2003; Scupham *et al.*, 2007 ; Yu & Morrison, 2004). Dans ce travail, nous avons utilisés le QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, Angleterre) pour extraire et purifier l'ADN. Scupham *et al.* (2007) démontrent en utilisant du contenu cæcal de caille que ce kit d'extraction n'est pas le meilleur en termes de quantité d'ADN extraite (environ 10 fois moins que le Invitrogen Easy-DNA kit), en pureté de l'ADN (A260/280 varie de 2.1 à 2.2) et en nombre d'espèces lysées (le meilleur est le Invitrogen Easy-DNA kit). Cependant, en couplant l'utilisation du QIAamp® DNA Stool Mini kit avec une lyse mécanique (Beadbeater), Yu and Morrisson (2004) démontrent une augmentation de la quantité et de la qualité de l'ADN extrait et la diversité obtenue après PCR. De plus, Li *et al.* (2003) démontrent que ce kit lyse 93% des cellules de différents échantillons digestifs et qu'il est aussi particulièrement adapté pour l'extraction et la purification de l'ADN des échantillons digestifs.

La technique CE-SSCP présente aussi des biais inhérents à l'étape de PCR: choix des amorces, choix de l'enzyme utilisée et amplification différentielle. Le choix des amorces PCR est crucial car elles sont à l'origine de la sélection des espèces qui seront amplifiées (Zhu *et al.*, 2002). Il est nécessaire que les amorces soient spécifiques (sélection d'un maximum d'espèces au sein de la communauté ciblée et sélection d'un minimum d'espèces non-ciblées). Le choix de l'enzyme nécessite de trouver le meilleur compromis entre sa fidélité (taux erreur) et son rendement. En effet, une erreur d'un seul nucléotide engendre une conformation du simple brin différent et donc une migration différente avec la technique CE-SSCP (Hayashi, 1991). En revanche, une enzyme haute fidélité a un rendement moins élevé et par conséquent engendre un nombre supérieur de cycles PCR pour obtenir une même quantité

d'amplicons. Or, l'amplification de l'extrait d'ADN original se réalise au cours des 5 ou 6 premiers cycles PCR. Les cycles suivants ne font que ré-amplifier les amplicons déjà obtenus (Kurata *et al.*, 2001). De ce fait, les séquences présentes en grand nombre et/ou pour lesquelles les amorces ont une forte complémentarité sont amplifiées préférentiellement (Dahllöf, 2002) et ce d'autant plus que le nombre de cycle est important (Suzuki & Giovannoni, 1996). En revanche ce biais semble être d'autant moins important que la communauté étudiée est diverse (Suzuki & Giovannoni, 1996). Ainsi, l'étude des communautés bactériennes des feces humain en DGGE ne montre pas de différence de résultats entre 20 et 35 cycles d'amplification PCR (Zoetendal *et al.*, 1998).

II.B.5.4. Biais de co-migration

Chaque technique d'empreinte moléculaire possède une résolution maximale qui correspond au nombre de pics ou de bandes qui peuvent être identifiés. Or, les communautés microbiennes sélectionnées par les amorces possèdent souvent un nombre supérieur d'espèces au nombre maximum de pics ou de bandes identifiables. Dès lors, on observe des phénomènes de co-migration. De ce fait, un seul pic ne correspond pas forcément à un seul OTU mais à un assemblage d'OTUs (Kowalchuk & Stephen, 2001 ; Loisel *et al.*, 2006; Schmalenberger & Tebbe, 2003 ; Zinger *et al.*, 2007). Loisel *et al.* (2006) démontrent ainsi que, dès que le nombre d'espèces présentes dans la communauté excède 10, des co-migrations existent. De plus, lorsque le nombre d'espèces excède 100, tous les pics du chromatogramme correspondent à des co-migrations (Figure 21). Les OTUs susceptibles de co-migrer ne sont pas nécessairement proches d'un point de vue phylogénétique mais possèdent seulement une conformation tridimensionnelle proche. Toutefois, il a été démontré que les pics représentent généralement les espèces dominantes du microbiote (Fromin *et al.*, 2002; Nakatsu *et al.*, 2000).

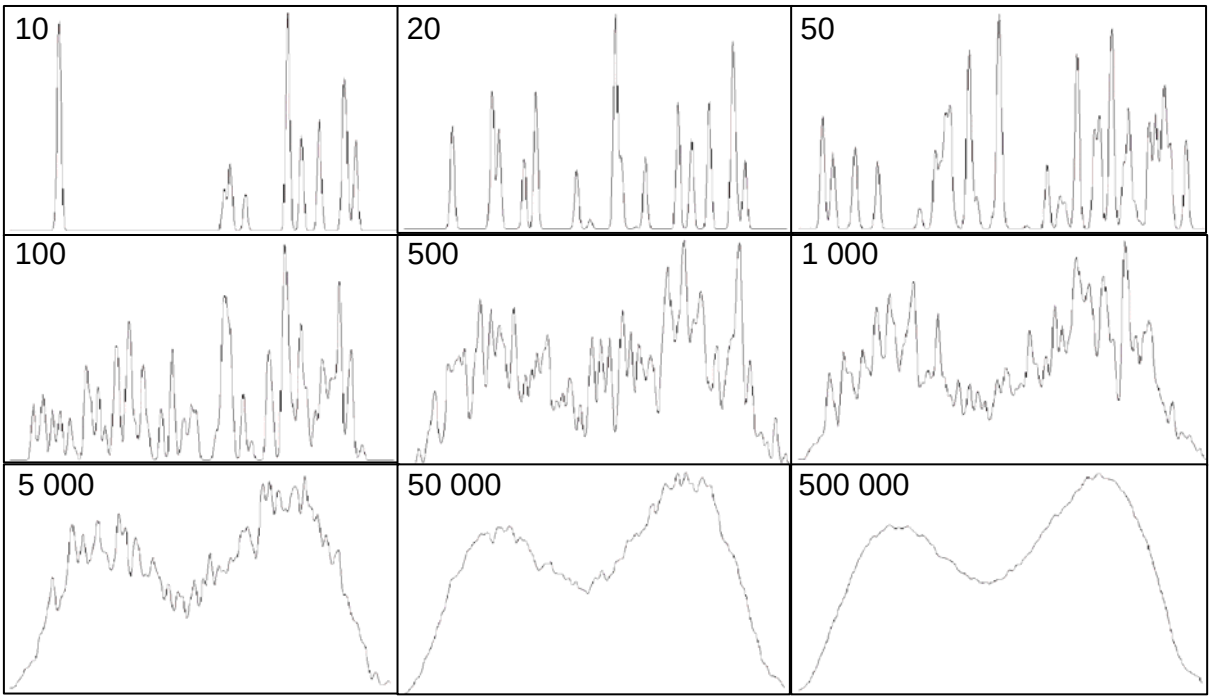


Figure 21. Simulation de profils CE-SSCP avec une distribution uniforme de l'abondance des espèces.
D'après Loisel *et al.* (2006). Le nombre d'espèce simulé est indiqué au dessus des profils CE-SSCP. Dès la présence de 10 espèces, on observe quelques pics représentant des co-migrations d'espèces. Dès la présence de 100 espèces, tous les pics représentent des co-migrations.

Pour l'ensemble des raisons évoquées ci-dessus, nous avons choisi d'utiliser au cours de ce travail, la technique de la CE-SSCP pour la caractérisation moléculaire du microbiote des fermenteurs digestifs de la vache et du lapin. Cette technique présente en effet les avantages d'obtenir rapidement et pour un coût modéré une image représentative de l'ensemble de la communauté microbienne. Cette technique a été montrée robuste et reproductible. Toutefois, le nombre d'espèces bactériennes dans les fermenteurs étudiés étant supérieur à 100 (estimé à 300 espèces dans les feces de bovin, Dowd *et al.*, 2008 et à 100 espèces dans le cæcum du lapin, Monteils *et al.*, 2008), nous aurons à tenir compte des phénomènes de co-migration dans l'interprétation des résultats. Nous avons développé un travail méthodologique important dans le but d'exploiter au maximum l'ensemble des informations contenues dans les profils CE-SSCP.

En résumé, la collecte des échantillons pour l'analyse des écosystèmes digestifs est difficile et nécessite de faire des compromis : utilisation de matrices alternatives (problème de représentativité), abattage (problème de variabilité entre individus) ou méthodes intrusives (induit des modifications des communautés). L'étude des communautés se réalise sur des marqueurs de diversité qui doivent être choisis pour discriminer au mieux les espèces microbiennes étudiées. Parmi toutes les techniques

disponibles, seule la qPCR permet de quantifier de façon précise les groupes microbiens. L'image qualitative du microbiote peut se réaliser par différentes approches de séquençage et d'empreintes moléculaires. Contrairement au séquençage, les empreintes moléculaires permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons et par conséquent de tester l'influence de facteurs sur le microbiote. Parmi les techniques d'empreintes moléculaire, la CE-SSCP est une des techniques les plus précises et reproductibles. Toutefois, l'analyse des profils CE-SSCP nécessite de prendre en compte les biais induits par les phénomènes de co-migration. C'est pour l'ensemble de ces raisons que nous avons choisi, au cours de notre travail, de combiner la CE-SSCP et la qPCR pour la caractérisation des communautés procaryotiques du rumen de la vache et du cæcum du lapin. Au cours de nos essais, nous avons comparé différentes méthodes d'échantillonnage (abattage, prélèvement chirurgical, matrice alternative) dans le but d'obtenir le meilleur compromis entre facilité, fiabilité, coût et éthique animale. Nous avons également cherché par des outils informatiques et statistiques (algoritmes) à extraire le maximum d'information écologique contenue dans les données fournies par la CE-SSCP mais également à bien cerner les limites, d'un point de vue écologique, de cette méthode.

OBJECTIFS

Le tractus digestif des animaux comporte des compartiments spécifiques appelés fermenteurs digestifs qui sont des écosystèmes très complexes. Chez les mammifères herbivores actuels, on rencontre trois types de fermenteurs représentant trois stratégies différentes pour le même service rendu (digestion des fibres alimentaires) : les fermenteurs stomacaux, les fermenteurs coliques et les fermenteurs cæcaux. Ces trois types de fermenteurs présentent des différences importantes en termes de volume, de type de mutualisme hôte/microbiote, de composition des intrants, de composition des communautés microbiennes, et de paramètres environnementaux. La caractérisation des communautés microbiennes et la compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes digestifs présentent un intérêt cognitif et agronomique. C'est pourquoi, l'objectif de ce travail était de comparer les caractéristiques éco-systémiques et les facteurs de variations des fermenteurs stomacaux et des fermenteurs cæcaux en utilisant deux modèles animaux d'intérêt zootechnique : la vache (rumen) et le lapin (cæcum). Pour ces deux modèles, notre étude bibliographique montre que les principaux paramètres du milieu (pH, matière sèche etc.) de ces fermenteurs digestifs sont bien décrits. Elle montre également, que la majeure partie des résultats concernant le microbiote provient d'études utilisant la culture microbienne. Pourtant, les nouveaux outils de biologie moléculaire offrent la perspective d'avoir une vision plus globale de ces microbiotes et de leurs facteurs de variation. Notre étude bibliographique montre, notamment, que la CE-SSCP semble très adaptée aux écosystèmes riches et complexes tels que les écosystèmes digestifs.

Nous nous sommes intéressés à caractériser *i)* la variabilité taxonomique (entre espèces animales, entre individus), spatiale (inter- et intra- fermenteurs digestifs) et temporelle des communautés procaryotiques en termes de composition, de structure et de diversité, *ii)* à établir le lien entre ces communautés et leurs environnements et *iii)* à étudier les conséquences d'une perturbation nutritionnelle sur ces écosystèmes (Tableau 13). De plus, pour réaliser ces études, nous avions également pour objectif de *i)* mettre au point la méthodologie CE-SSCP pour nos échantillons ainsi que des procédés de traitement et d'analyses statistiques des profils obtenus, *ii)* proposer un index de biodiversité adapté à l'étude des écosystèmes digestifs par CE-SSCP et *iii)* développer des systèmes de détection qPCR spécifiques des divisions bactériennes majeures présentes dans les fermenteurs digestifs.

Tableau 13. Récapitulatif des différents travaux et expérimentations réalisés.

Travaux	Publications / travaux	Animaux	Facteurs ou paramètres étudiés	Mesures	Techniques utilisées
Développement informatique	Publication 1 StatFingerprints	-	Profils CE-SSCP	Traitement des profils CE-SSCP Estimation de la diversité Analyse de la diversité et de la structure Affichage graphique	programmation bioinformatique et biostatistique
Méthodologie	Simulation sur la diversité	-	Indice de Simpson	Comportement Limites	Simulation informatique
Expérimentation 1	Publication 2	Vaches laitières taries, n=5	Temps (prandial, hebdomadaire) Individu Matrice de prélèvement	Bactéries (indice de Simpson, structure) pH, Eh AGV, NH_3-N	CE-SSCP Mesure *ex-vivo* CPG, colorimétrie
Expérimentation 2	Publication 3	Lapin pré-pubère, n=14	Temps (hebdomadaire) Individu Matrice de prélèvement Perturbation chirurgicale	Bactéries (indice de Simpson, structure) pH, Eh AGV, NH_3-N	CE-SSCP Mesure *in-vivo* pré-mortem CPG, colorimétrie
	Publication 4	Vaches laitières taries, n=5 (expé. 1) Lapin pré-pubère, n=14 (expé. 2)	Temps (hebdomadaire) Matrice de prélèvement	*Archaea* (richesse, structure)	CE-SSCP
Expérimentation 3	Publication 5	Vaches laitières taries, n=4	Temps (journalier) Fraction de prélèvement Perturbation nutritionnelle	Bactéries (richesse, structure, densité) *Firmicutes* (densité) *Bacteroides Prevotella* (densité) pH, Eh, AGV, NH_3-N	CE-SSCP, qPCR TaqMan MGB qPCR SYBR green qPCR TaqMan Mesure *ex-vivo* CPG, colorimétrie
Expérimentation 4	Publication 6	Lapin pré-pubère, n=120	Temps (journalier) Perturbation nutritionnelle	Bactérie (richesse, structure, densité) *Firmicutes* (densité) *Bacteroides Prevotella* (densité) pH, Eh AGV, NH_3-N, matière sèche, fibres	CE-SSCP, qPCR TaqMan MGB qPCR SYBR green qPCR TaqMan Mesure *in-vivo* pré-mortem CPG, colorimétrie, gravimétrie

CPG : chromatographie en phase gazeuse.

ETUDE EXPERIMENTALE

PARTIE 1 : TRAITEMENT DES DONNEES ET CHOIX METHODOLOGIQUES

Dans ce travail de thèse, nous avons réalisé une analyse qualitative des communautés procaryotiques en termes de diversité et de structure à partir de profils microbiens générés par CE-SSCP après amplification de la région V3 des gènes codant pour l'ARNr 16S. Les données brutes de ces profils CE-SSCP nécessitent un certain nombre d'étapes de traitement des données pour rendre comparables les profils entre eux. Après traitement, la structure de la communauté microbienne peut être analysée à l'aide de méthodes statistiques multivariées. En revanche, la diversité doit d'abord être estimée avant d'être analysée avec des méthodes statistiques univariées.

L'objectif de cette partie à connotation méthodologique a été *i)* de développer des algorithmes de traitement des profils plus efficaces que ceux existants, *ii)* de choisir des approches multivariées qui permettent de réveler l'information écologique contenue dans nos données, *iii)* de choisir la méthode la plus adaptée possible pour estimer la diversité des communautés étudiées à partir des profils CE-SSCP, *iv)* de comprendre et d'interpréter cette diversité, et enfin *v)* de rendre accessibles ces méthodes d'analyse à la communauté scientifique par la création d'un logiciel libre de droits et facile d'accès pour les utilisateurs.

ANALYSE DES PROFILS CE-SSCP

I. TRAITEMENT DU SIGNAL

Les profils CE-SSCP bruts nécessitent d'être traités avant de les analyser statistiquement. Quatre étapes de traitement des profils sont nécessaires et une étape est optionnelle (Figure 22):

- Etape 1 : alignement en abscisse des profils CE-SSCP entre eux grâce à l'alignement de leurs étalons internes. En CE-SSCP, la mobilité des fragments peut varier d'une migration (run) à l'autre en raison des changements possibles dans le micro-environnent du capillaire. Ces changements peuvent être dus à de très faibles modifications de la lumière ou de la température (Mitchelson & Cheng, 2001). Ainsi, ces décalages de profils CE-SSCP entre runs nécessitent d'être corrigés. Cette calibration se réalise grâce à l'utilisation systématique d'un étalon interne dans chaque échantillon. Cet étalon est couplé à un fluorochrome différent de celui utilisé pour détecter la communauté étudiée. L'alignement des profils CE-SSCP consiste à aligner les pics de l'étalon interne de chaque échantillon entre eux puis à appliquer les modifications nécessaires pour l'alignement de chaque étalon au profil CE-SSCP de l'échantillon.
- Etape 2 : réorientation de la ligne de base des profils CE-SSCP de telle sorte qu'elle soit parallèle à l'axe des abscisses. En effet, les profils CE-SSCP bruts ne sont parfois pas parallèles à l'axe des abscisses.
- Etape 3 : alignement des lignes de base des profils CE-SSCP. En effet, les lignes de base des profils ne sont pas toujours au même point d'intersection sur l'axe des ordonnées.
- Etape 4 : normalisation des profils à une aire totale sous la courbe égale à 1. En effet, les profils CE-SSCP bruts peuvent avoir une intensité de signal très variable.
- Etape 5 : il est parfois nécessaire de détecter les pics et leur abondance relative au sein des profils CE-SSCP pour l'estimation d'un indice de diversité, la transformation en profils binaires ou encore l'utilisation de certains indices de proximité (Bray-Curtis, Dyce-Sørensen etc.).

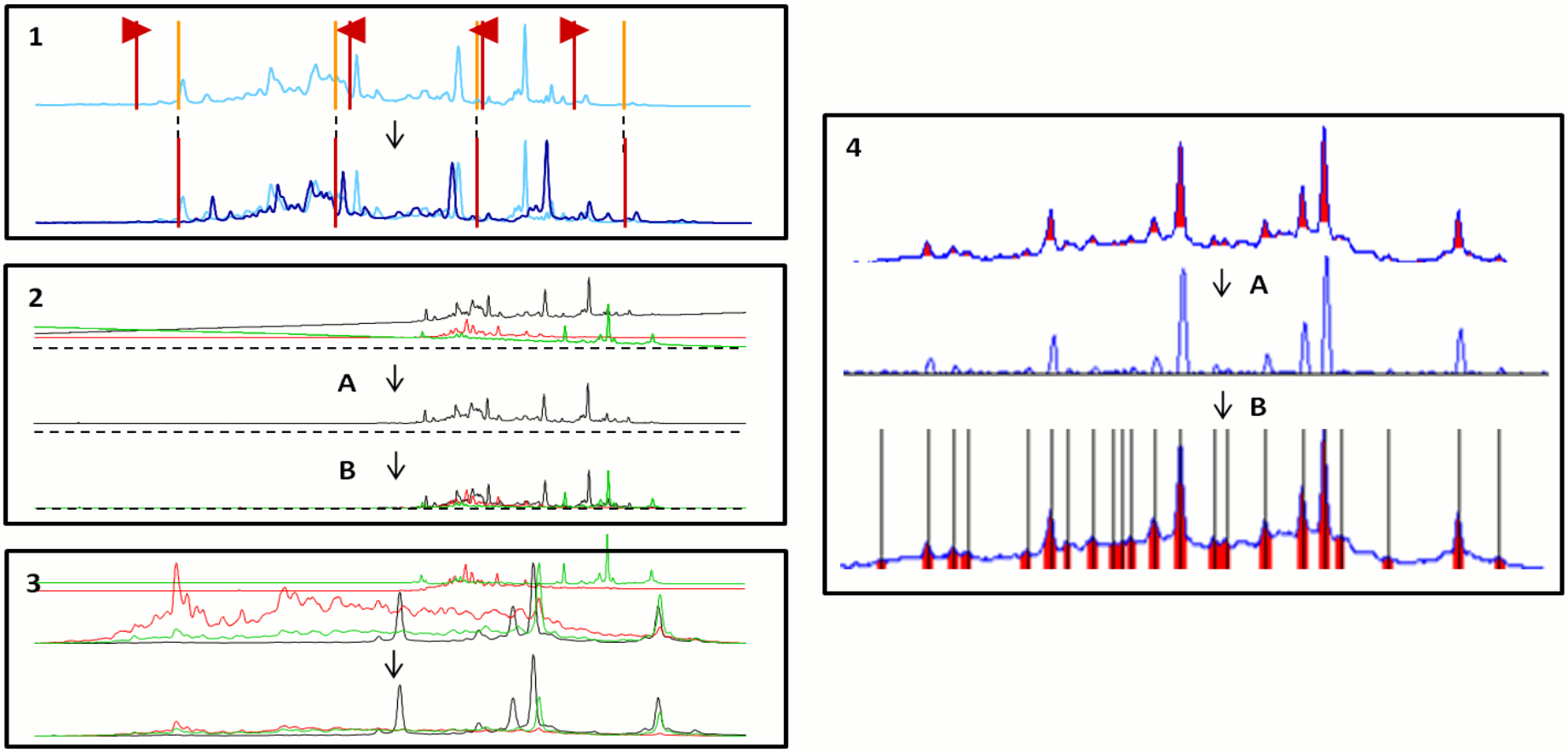


Figure 22. Traitement des profils CE-SSCP.
Etape 1, Les profils CE-SSCP sont alignés en abscisse les uns par rapport aux autres, en alignant leurs étalons internes sur un étalon standard et en appliquant ces mêmes homothéties aux profils (1). Etape 2, les profils CE-SSCP subissent une rotation pour que leurs lignes de base soient parallèle à l'axe des abscisses (2A), puis une translation en ordonnée pour que les lignes de base des profils soient confondues (2B). Etape 3, les profils sont normalisés entre eux de telle sorte que l'aire sous les profils soit égale à 1. Etape 4, pour estimer la diversité, pour transformer les profils en profils binaires ou pour utiliser certains indices de proximité (Bray-Curtis etc.), les pics et leur aire relative peuvent être calculés (4A et 4B).

II. ESTIMATION DE LA DIVERSITE A L'AIDE D'INDICES

Classiquement, les signaux issus des empreintes moléculaires sont traités selon deux approches complémentaires (Figure 23):

- Estimation d'un indice de diversité sur chaque profil CE SSCP puis analyse statistique univariée classique.
- Analyse de la structure des communautés avec l'utilisation d'approche statistique multivariée.

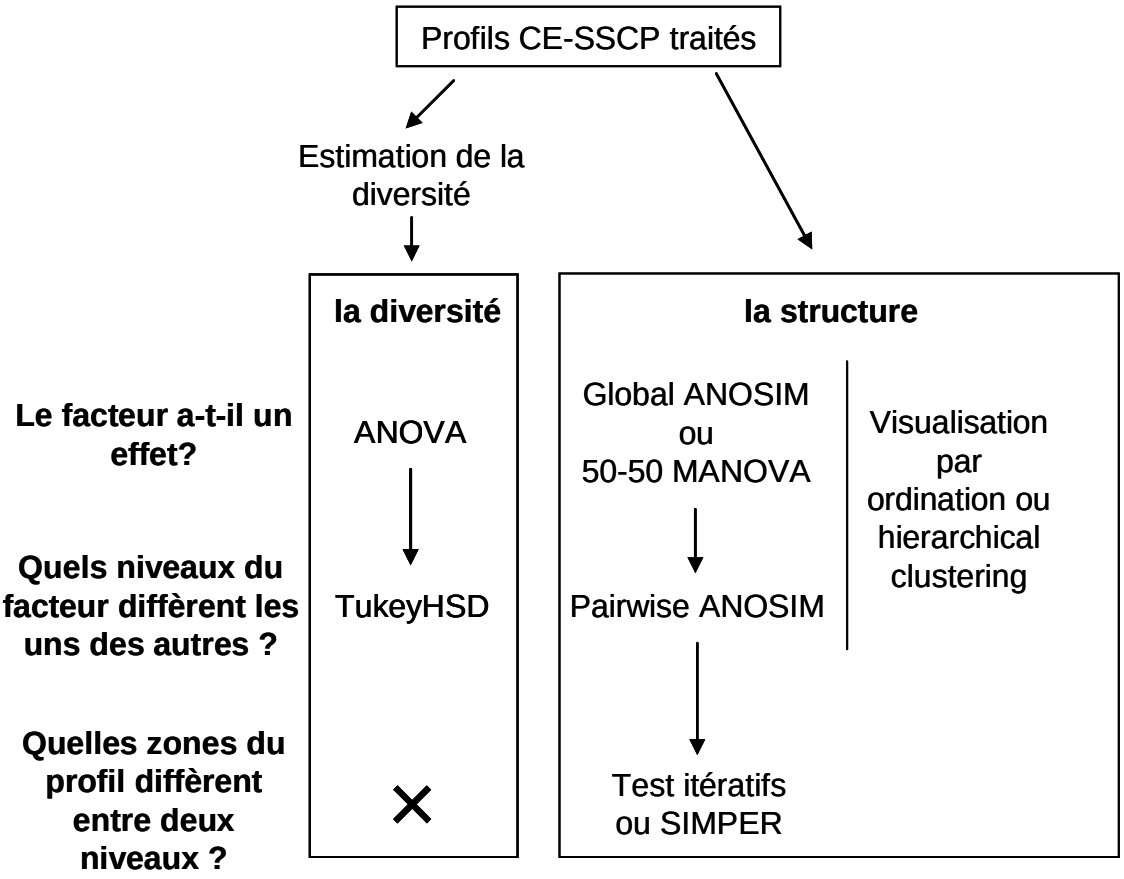


Figure 23. Analyse statistique de la structure et de la diversité d'une communauté à partir de profils d'empreintes moléculaires.
Abbréviations : ANOVA, analysis of variance ; TukeyHSD, Tukey Honestly Significant Differences ; ANOSIM, ANalysis Of SIMilarity ; MANOVA, multivariate analysis of variance.

II.A. Définition et limite des indices de diversité

La diversité calculée à partir d'une empreinte moléculaire correspond à une estimation d'une diversité spécifique[34] α[35] monocritère : souvent une région variable des gènes codant pour l'ARNr 16S.

Ces indices utilisent deux paramètres : la richesse et l'abondance relative de chaque espèce. Cependant, les empreintes moléculaires ne permettent pas de connaître la richesse réelle de l'échantillon car les espèces les plus rares sont masquées par les espèces dominantes en raison des phénomènes de co-migration (Forney *et al.*, 2004; Pedros-Alio, 2006). Cependant, ce manque d'information sur les espèces rares pourrait être compensé en estimant la distribution de l'abondance relative des espèces[36]. Or, on ne connaît pas réellement cette distribution et par conséquent les indices de diversité classiquemet utilisés sont non-paramétriques. C'est la raison pour laquelle, plusieurs auteurs considèrent que créer un indicateur de diversité précis et adapté aux empreintes moléculaires reste problématique (Curtis *et al.*, 2002; Dunbar *et al.*, 2002; Gans *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006; Loisel *et al.*, 2006; Schloss & Handelsman, 2006; Torsvik *et al.*, 1998; Venter *et al.*, 2004). Toutefois, deux indices sont actuellement majoritairement utilisés : l'indice de Shannon et l'indice de Simpson.

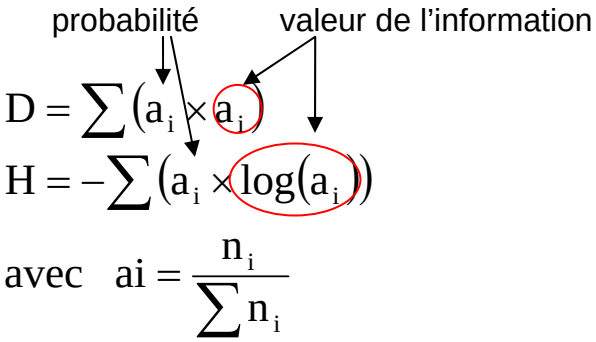
II.B. Comparaison des indices de Shannon et de Simpson

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour estimer la diversité d'une communauté (Hugues *et al.*, 2001). Dans ce travail, nous comparerons les deux indices non-paramétriques les plus utilisés pour estimer la diversité à partir d'empreintes moléculaires : l'indice de Shannon (H) et de Simpson (D).

Ces deux indices sont fondés sur des probabilités de MRR[37] couplées à une attribution de la valeur de l'information. Pour chaque individu *i*, (ou pic dans le cas d'un profil) on

[34] Relative à l'espèce, en opposition à la diversité fonctionnelle.
[35] La diversité α correspond au nombre d'espèces et à leur abondance dans un habitat uniforme en opposition à la diversité β et γ.
[36] Le nombre d'espèces recensées augmente avec l'effort d'échantillonnage mais plus l'échantillonnage augmente et plus le nombre d'espèces tend à se stabiliser. De ce fait, il est possible d'estimer le nombre maximum d'espèces dans l'échantillon soit en déterminant l'asymptote de la courbe soit en réalisant un ajustement de courbe aux données par des régressions non-linéaires.
[37] Mark-release-recapture. On compare les espèces observées plus d'une fois (recaptured) par rapport à celles observées une seule fois (singletons).

calcule une valeur qui est le produit de la probabilité de tirer au hasard ce pic *i* et de la valeur d'information attribuée à ce pic. Ensuite, on somme la valeur attribuée à chaque pic i du profil.



L'indice de Simpson et de Shannon diffèrent sur la valeur de l'information attribuée aux pics *i*. Pour l'indice de Simpson, la valeur de l'information des petits pics a le même poids que celle des grands pics. En revanche, l'utilisation de log dans la valeur de l'information pour l'indice de Shannon tend à minimiser l'importance des espèces abondantes par rapport aux espèces minoritaires : cet indice donne plus de poids aux espèces minoritaires. Or, comme évoqué en partie bibliographique, les techniques d'empreinte moléculaire montrent davantage les espèces majoritaires du microbiote que celles minoritaires. De ce fait, l'indice de Simpson semble plus adapté à l'étude des empreintes moléculaires que celui de Shannon.

De plus, des approches par simulation *in silico* démontrent que, contrairement à l'indice de Shannon, l'indice de Simpson est indépendant de la distribution de l'abondance relative des espèces et de la richesse réelle de l'échantillon (Haegeman *et al.*, 2008 ; Figure 24). Or comme évoqué précédemment, on ne connaît ni la richesse réelle ni la distribution des échantillons à partir des profils d'empreintes moléculaires. De ce fait, l'indice de Simpson est plus adapté à l'estimation de la diversité de communautés étudiées par empreinte moléculaire (Haegeman *et al.*, 2008).

C'est l'ensemble de ces éléments qui nous ont déterminés à retenir dans nos études, l'indice de Simpson pour l'estimation de la diversité des communautés à partir des profils CE-SSCP.

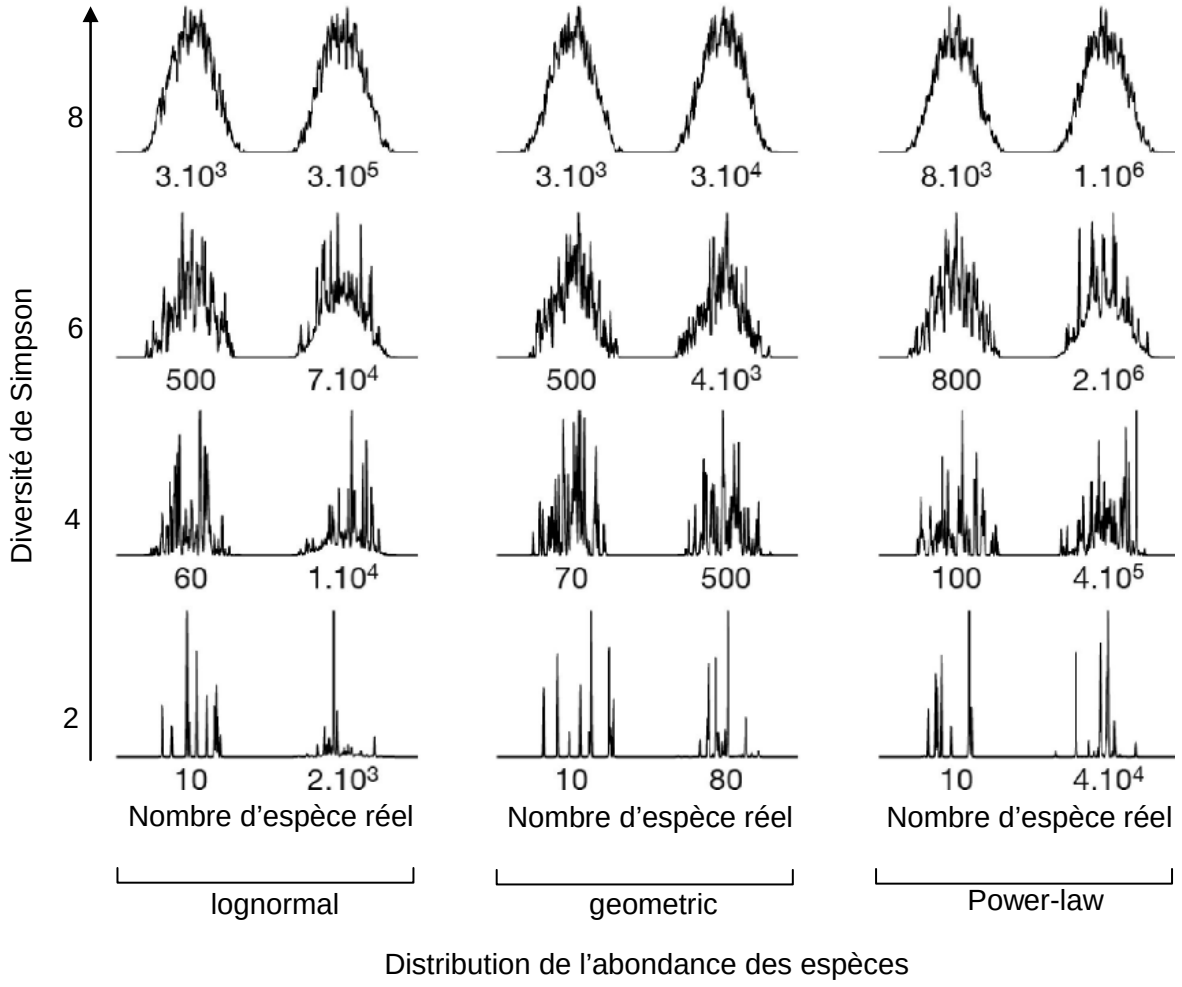


Figure 24. Calcul de l'indice de Simpson par simulation de profils CE-SSCP selon des richesses et des distributions de l'abondance des espèces variables.
D'après Haegeman *et al.* (2008).On s'aperçoit que l'indice de Simpson calculé est constant quelles que soient la richesse réelle et la distribution paramétrées dans la simulation.

II.C. Prise en compte du bruit de fond des profils CE-SSCP

Comme évoqué ci-dessus, le bruit de fond des profils correspond aux co-migrations des espèces minoritaires (Fromin *et al.*, 2002; Nakatsu *et al.*, 2000). Haegeman *et al.* (2008) démontrent en utilisant des méthodes de simulation que le bruit de fond doit être pris en compte dans le calcul de l'indice de diversité pour que l'estimation soit correcte et la plus proche possible de la valeur de diversité réelle (Figure 25). Pour cela, les diversités réelles ($\hat{D}$) d'échantillons sont calculées et comparées à celles calculées à partir des profils simulés pour les mêmes échantillons ($\hat{D}_0, \hat{D}_1, \hat{D}_2$). La diversité $\hat{D}_0$, calculée sans prendre en compte le bruit de fond, diffère de la diversité réelle $\hat{D}$ dès que celle-ci est supérieure à 3. En

revanche, la prise en compte du bruit de fond ($\hat{D}_1$, $\hat{D}_2$) permet une estimation précise de la diversité réelle $\hat{D}$ quelle que soit la diversité de l'échantillon. En effet, $\hat{D}_1$ considére que le bruit de fond correspond à un nombre infini d'espèces avec une abondance presque nulle tandis que $\hat{D}_2$ considère que le bruit de fond correspond à un nombre minimal d'espèces dont l'abondance est juste inférieure à celle du plus petit pic.

En conséquence, dans nos études nous avons estimé la diversité des communautés en tenant compte du bruit de fond des empreintes obtenues.

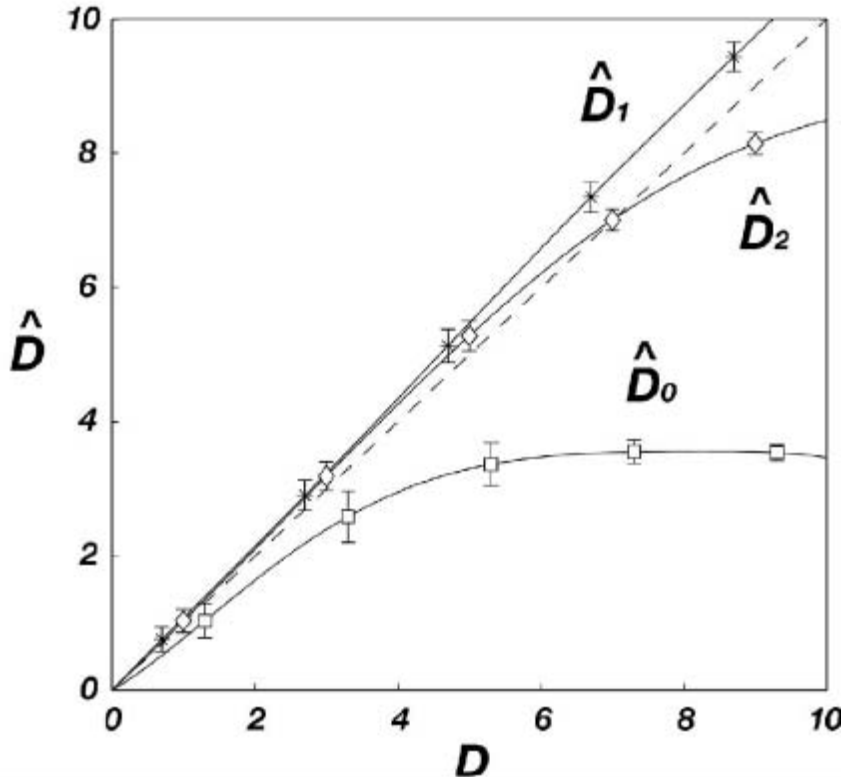


Figure 25. Comparaison de la diversité de Simpson réelle et de celle estimée à partir de profils CE-SSCP simulés en fonction de la prise en compte ou non du bruit de fond.
D'après Haegeman *et al.* (2008). Diversité de Simpson réelle ($\hat{D}$), diversité de Simpson calculée (D) en prenant en compte ($\hat{D}_1$, $\hat{D}_2$) ou non ($\hat{D}_0$) le bruit de fond.

II.D. Signification de l'indice de Simpson

Afin de mieux comprendre, la signification de l'indice de Simpson, connaître ses limites inférieures et supérieures et comprendre l'influence de la richesse et de l'abondance

relative des pics sur les valeurs de cet indice, nous avons simulé les réponses obtenues en faisant varier différents paramètres du profil CE-SSCP. Nos simulations ont été réalisées sous R (R development Core Team, 2009) en utilisant la fonction de calcul de diversité du programme StatFingerprints (Michelland *et al.*, 2009b). Pour cela, l'indice de diversité a été calculé à l'aide de la formule suivante :

$D = -\log \sum_{i=1}^{n} (a_i \times a_i)$ avec a_i : l'aire relative du $i^{ème}$ pic au sein des n pics détectés

tel que $\sum_{i=1}^{n} (a_i + b_i) = 1$ avec b_i, le bruit de fond sous le $i^{ème}$ pic.

Nos données montrent qu'un pic est en moyenne composé de 40 scans et qu'un profil CE-SSCP s'étend en moyenne sur 2000 scans. En théorie, dans nos conditions, la CE-SSCP peut détecter au maximum 50 pics. Au-delà de ce seuil on observe forcément des co-migrations et en conséquence un bruit de fond (b) qui augmente. Les simulations ci-dessous correspondront donc au seuil théorique de 50 pics au-delà duquel le bruit de fond apparaît.

II.D.1. Limite de l'indice de Simpson

Diversité minimale

La diversité minimale de l'indice est égale à zéro (Figure 26). Cette diversité correspond à un profil CE-SSCP contenant un unique pic (n=1) donc sans bruit de fond ($\sum_{i=1}^{n} (b_i) = 0$) et une aire sous le pic égale à 1 (a_1=1).

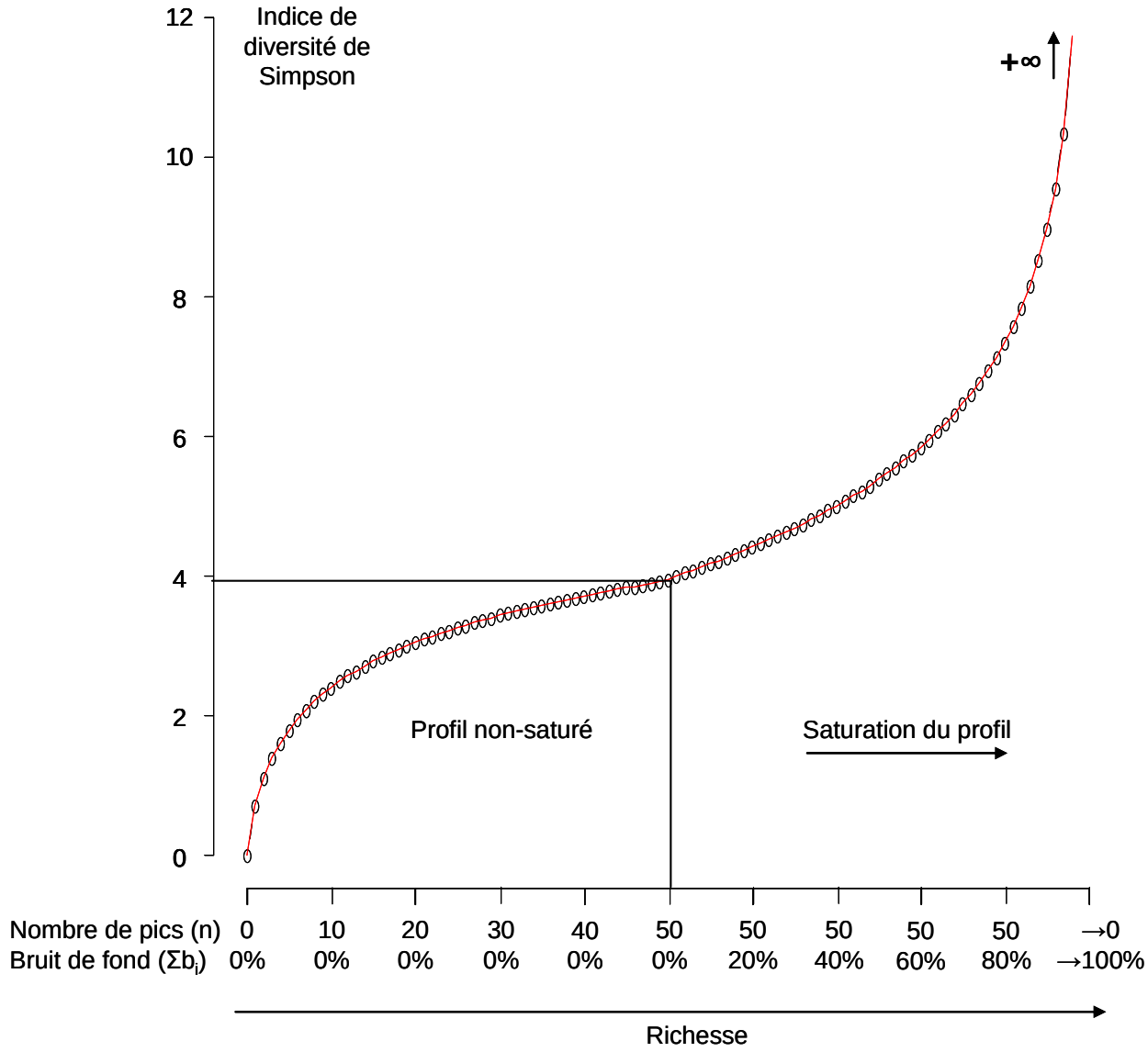


Figure 26. Simulation de l'indice de diversité de Simpson en fonction de la richesse pour une abondance relative constante.

Diversité maximale

La diversité maximale tend vers l'infini (Figure 26). Cette diversité serait obtenue avec un profil complètement saturé. Le profil comporterait *i)* 50 pics (n=50) avec une aire relative tendant vers 0 (lim $a_i \rightarrow 0$), *ii)* une proportion de bruit de fond qui tend vers 1 (lim $\sum_{i=1}^{n}(b_i) \rightarrow 1$).

Diversité théorique maximale pour un profil non saturé

Cette valeur correspond à la résolution maximale de la CE-SSCP dans nos conditions. La diversité théorique maximale est de 3.9 (Figure 26). Cette diversité théorique maximale correspondrait *i)* à un profil comportant 50 pics (n=50), *ii)* avec un bruit de fond nul ($\sum_{i=1}^{n}(b_i) = 0$) et *iii)* une aire relative sous les pics constante et égale à 1/n ($T_i = 1/50$). Ce calcul indique que dans ces conditions (n=50 pics), une valeur de diversité supérieure à 3.9 est synonyme de co-migrations (saturation du profil). Toutefois, en deçà de ce seuil (3.9), le profil peut déjà commencer à saturer notamment si certains fragments d'ADN différents migrent au même endroit sans pour autant que le profil n'atteigne 50 pics.

II.D.2. Influence de la richesse et de l'abondance sur l'indice de Simpson

Sur un profil sans bruit de fond ($\sum_{i=1}^{n}(b_i) = 0$), le nombre d'espèces correspond en théorie au nombre de pics (n). Mais dès que le nombre de pic atteint la limite de résolution de la technique (n=50 pics dans nos conditions), les espèces co-migrent et on observe l'apparition d'un bruit de fond (b). Comme le nombre d'espèces dans les écosystèmes complexes se chiffre à plusieurs centaines, pour étudier la richesse de nos communautés d'étude, il est nécéssaire de tenir compte à la fois du nombre de pics (n) et du bruit de fond total ($\sum_{i=1}^{n}(b_i)$).

Richesse : influence du nombre de pics

Pour étudier l'influence du nombre de pics du profil CE-SSCP sur la valeur de la diversité obtenue, notre simulation a consisté à faire varier le nombre de pics n (qui correspond aux espèces dominantes, Loisel *et al.*, 2006) tout en gardant l'aire relative sous les pics constante (a_i=constante) et leur somme égale à 1 ($\sum_{i=1}^{n}(a_i) = 1$) avec un bruit de fond nul ($\sum_{i=1}^{n}(b_i) = 0$). Les résultats sont reportés dans la Figure 26 et indiquent que plus le nombre de pics augmente plus la diversité augmente.

Richesse : influence du bruit de fond

Dans cette nouvelle simulation, nous avons fixé le nombre de pics à 50 et laissé constante l'aire relative sous les pics (a_i=constante) aisni que le bruit de fond relatif aux n pics (b_i=constante) pour supprimer l'influence de l'abondance relative sur la valeur de la diversité. Nous avons fait varier la somme des bruits de fond des pics ($\sum_{i=1}^{n}(b_i)$ = variable). Nos résultats montrent que si $\sum_{i=1}^{n}(b_i)$ augmente alors $\sum_{i=1}^{n}(a_i)$ diminue et inversement. Ces analyses démontrent que plus la proportion de bruit de fond augmente, plus l'indice de diversité augmente et inversement (Figure 26).

Influence de l'abondance relative : aire des pics

Dans ce cas, nous avons fait deux types de simulation de profil : avec ($\sum_{i=1}^{n}(b_i) \neq 0$) et sans ($\sum_{i=1}^{n}(b_i) = 0$) bruit de fond. Le nombre de pics est resté constant (n=constante). Nous avons fait varier la régularité de l'aire sous les pics a_i d'un modèle avec des aires sous les pics très irrégulières vers un modèle avec des aires sous les pics constantes. Nous montrons que pour un même nombre d'espèces, avec ou sans bruit de fond, plus les aires relatives sous les pics respectifs sont proches (a_i tend vers une constante), plus la diversité est élevée. Inversement, plus les aires relatives sous les pics sont variables, plus la diversité est faible (données non montrées).

En conclusion, l'indice de Simpson est l'indice le plus adapté à l'étude de la diversité à partir de l'information contenue dans les profils CE-SSCP. Cependant, la compréhension de la variabilité de cet indice reste difficile. En effet, la varabilité de cet indice est fonction de la richesse (nombre de pics et bruit de fond) et de l'abondance relative des espèces.

III. ANALYSE DE LA STRUCTURE DU PROFIL CE-SSCP

III.A. Définition

La composition d'une communauté se définit comme la connaissance du nombre d'espèces, du nombre d'individus par espèce et de l'identification de ces espèces (Begon *et al.*, 1996). Un profil CE-SSCP ne permet pas de connaître *i)* le nombre d'espèce de la communauté puisque dans des écosystèmes complexes seules les espèces majoritaires apparaissent sous forme de pics, *ii)* le nombre précis d'individus par espèce car cette technique fournit une représentation relative et par conséquent semi-quantitative, et *iii)* les espèces identifiées puisque l'assignation des pics n'est pas automatique avec cette technique. Cependant, la CE-SSCP permet d'avoir une connaissance de la structure globale de la communauté. Ainsi, des changements concernant *i)* la hauteur relative des pics ou *iii)* l'apparition et la disparition de pics dans une zone du profil donnée peuvent être identifiés en comparant les profils CE-SSCP. Contrairement à la diversité, l'analyse de la structure des communautés à l'aide des données générées par la CE-SSCP n'utilise plus le profil comme référentiel mais le pic voire le scan. Dans notre travail, l'analyse de la structure des communautés fait donc référence à une analyse fine des modifications des pics au sein des profils. L'analyse de cette structure a été faite par des approches statistiques multivariées.

III.B. Indice de proximité

Tous les outils statistiques pour analyser la structure se basent sur des matrices de proximité calculées à partir d'indices de proximité. La matrice de proximité se construit en comparant tous les profils CE-SSCP deux à deux. Une valeur est attribuée à chaque comparaison deux à deux qui est dépendante de la méthode de calcul utilisée et donc de l'indice de proximité choisi.

On distingue deux types d'indices de proximité, ceux de distance (plus les profils sont différents, plus leur valeur de proximité est grande) et ceux de similarité (plus les profils sont différents, plus leur valeur de proximité est petite). L'indice de distance le plus utilisé est la distance euclidienne (Ghiglione *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2008), qui consiste à prendre la racine carrée de la somme des différences d'aire au carré entre les deux profils CE-SSCP. Les indices de similarité se déclinent en deux catégories, ceux basés sur des corrélations et ceux basés sur une matrice sous jacente de contraintes. L'indice basé sur les corrélations le plus

utilisé est l'indice de Pearson (Korthals *et al.*, 2008; Smalla *et al.*, 2007), qui consiste à calculer le coefficient de détermination de Pearson entre les 2 profils CE-SSCP. Les indices basés sur les corrélations présentent l'avantage d'être moins sensibles aux légers décalages d'alignement des profils (artefact) que les autres indices.

De nombreux indices basés sur des matrices de contraintes existent, le plus utilisé étant probablement celui de Bray Curtis (Bray & Curtis, 1957). Certains indices donnent davantage d'importance aux différences fortes (Bray Curtis), tandis que d'autres mettent en avant les différences faibles (Canberra, Bloom, 2003). Des indices dits binaires codent le profil en présence / absence de pics (indice de Dice Sørensen, Dice, 1945, Sørensen, 1948) ; Jaccard (indice de Jaccard, 1901 ; etc.) et détectent à chaque scan dans les deux profils CE-SSCP si la valeur du scan correspond à la ligne de base (=0) ou à un pic (=1). Ces indices calculent ensuite la somme des valeurs issues de chaque scan en attribuant plus ou moins d'importance à la double absence (0 et 0), à la double présence (1 et 1) ou à la présence/absence (1 et 0 ou 0 et 1).

Dans nos analyses, nous avons utilisé des matrices de distance basées sur les distances euclidiennes à l'exception de l'analyse des communautés *Archaea* qui a été réalisée avec l'indice de Dyce Sorensen. En effet, pour ces communautés, les profils CE-SSCP ont été réalisés après une nested PCR qui peut entrainer une distorsion dans les abondances relatives. En conséquence, nous avons étudié les profils après transformation en mode binaire (absence/présence de pics pour chaque scan).

III.C. Représentations graphiques

Les représentations graphiques consistent à représenter la matrice de proximité dans un plan. Deux types de représentations existent : les ordinations et les méthodes de regroupement hiérarchique (RH). Nous présentons le principe de représentation de ces différentes méthodes sur la Figure 27, en utilisant un jeu de données volontairement simplifié à l'extrême de 3 profils contenant 5 scans chacun.

III.C.1. Les ordinations

Les ordinations consistent à représenter les profils CE-SSCP sous forme de points dans un plan. Plus les points sont proches, plus les profils représentés par ces points sont similaires. De nombreux algorithmes permettent d'aboutir à ce type de graphique comme l'ACP, l'AFC ou le nMDS (Cox & Cox, 2003). Le nMDS consiste à représenter dans un plan le rang des valeurs de la matrice de proximité en respectant le plus possible ces valeurs de rang. Toutefois, toutes ces techniques aboutissent à une simplification de la matrice de proximité. Aussi, certains éléments (le stress pour le nMDS, la proportion de variance expliquée par les composantes principales pour l'ACP) permettent d'apprécier la qualité de la représentation.

III.C.2. le regroupement hiérarchique

Le regroupement hiérarchique consiste à grouper les profils CE-SSCP les plus proches dans la matrice de proximité sous forme de classe. Les classes de profils les plus proches entre elles sont alors à nouveau regroupées au sein d'une classe inférieure et ainsi de suite jusqu'à l'obtention d'une unique classe. Tous ces groupes hiérarchiques de profils sont alors représentés sous forme d'un arbre. Différents algorithmes existent quant à la façon de réaliser les dendogrammes (ward, single, complete, average, mcquitty, median, centroid etc. ; Hartigan, 1975).

III.D. Test statistiques basés sur une hypothèse

Les outils qui permettent de tester statistiquement des jeux de données tels que les profils CE-SSCP (analyses multivariées) sont basés *i)* soit sur des permutations de Monte Carlo (ANOSIM, MANOVA), *ii)* soit sur des rotations aléatoires (FF-MANOVA), *iii)* soit sur des permutations aléatoires réalisées à partir d'une ordination contrainte par une ou plusieurs variables (CCA, RDA etc.). Lorsque deux groupes diffèrent, les scans expliquant la différence entre ces deux groupes peuvent être déterminés. Ces tests sont soit basés sur la partition de l'indice de proximité totale entre les deux groupes au sein des scans (SIMPER), soit basés sur des tests univariés (T-test, Mann Withney, Chi carré) appliqué à chaque scan.

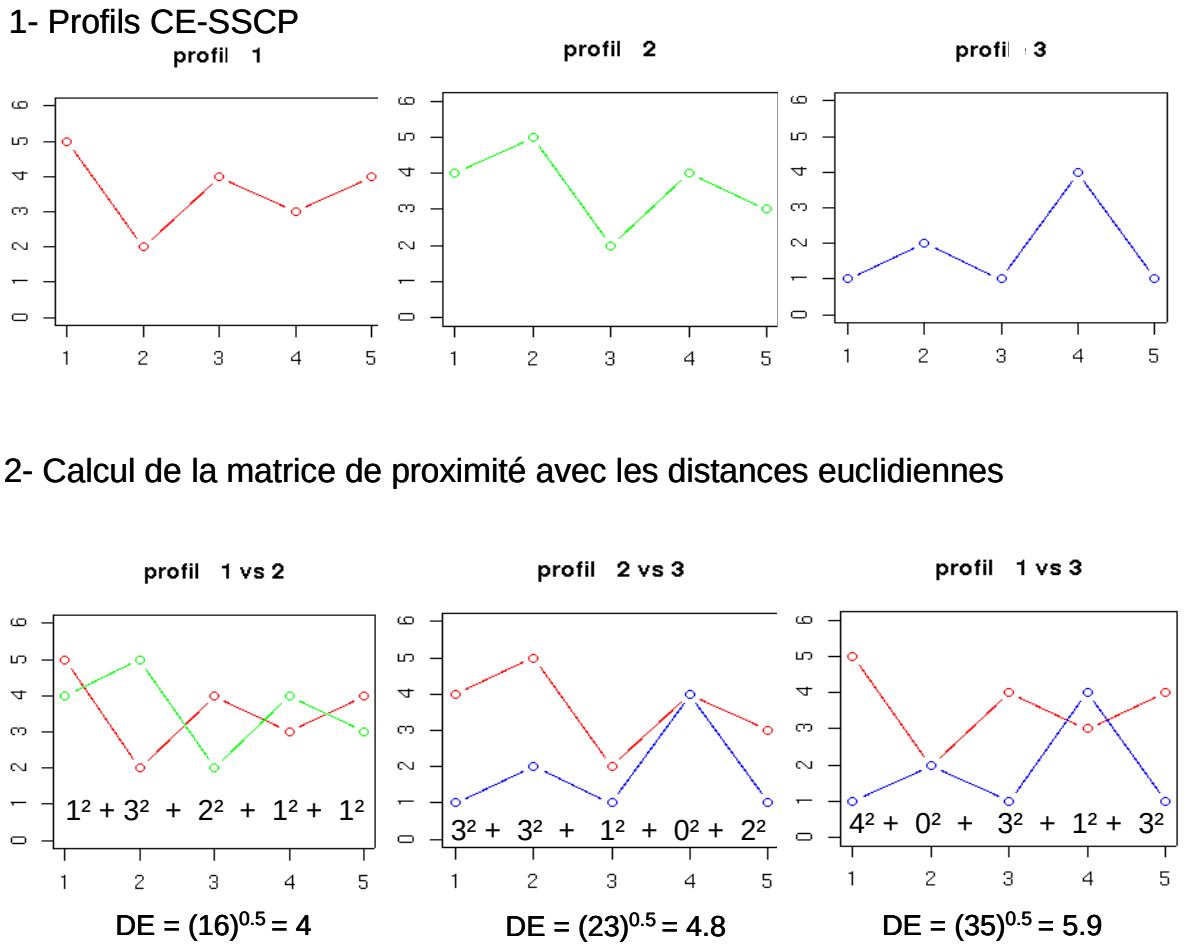


Figure 27. Exemple de méthode classique pour analyser la structure des profils CE-SSCP. A partir des profils CE-SSCP (1), la matrice de proximité est calculée (2). Cette matrice est explorée en utilisant une méthode d'ordination ou de regroupement hiérarchique (3).

En résumé, les données brutes des profils CE-SSCP nécessitent d'être traitées en étapes successives avant d'être analysées : alignement des abscisses et des ordonnées, orientation des lignes de base et normalisation. L'indice de Simpson se révèle être l'indice le plus adapté pour estimer la diversité dans les profils issus des empreintes moléculaires. Toutefois, le calcul de cet indice sur les profils CE-SSCP nécessite d'être adapté pour estimer au mieux la réelle diversité de Simpson, notamment en prenant en compte l'importance du bruit de fond. Avec ces adaptations, la diversité de Simpson varie de zéro à l'infini, elle augmente quand la richesse augmente (nombre de pic et/ou aire du bruit de fond) et/ou l'abondance relative des pics devient constante. L'analyse de la structure des communautés se réfère à l'analyse fine de la présence/absence des pics et de leur abondance relative le long des profils CE-SSCP. Les indices de proximité basés sur des distances, qui sont indépendants des critères subjectifs de détection des pics, semblent les mieux adaptés pour l'analyse de cette structure des communautés.

STATFINGERPRINTS: UN PROGRAMME DE TRAITEMENT ET D'ANALYSE DES PROFILS MICROBIENS ISSUS D'EMPREINTES MOLECULAIRES

Molecular Ecology Resurces 2009. 9(5): 1359-1363

R. J. Michelland, S. Dejean, S. Combes, L. Fortun-Lamothe, L. Cauquil

Mots clés : empreinte moléculaire, écologie, statistiques, diversité, traitement de profil

Titre abrégé: traiter et analyser les profils d'empreintes moléculaires

Résumé

Les empreintes moléculaires sont des méthodes largement utilisées pour étudier les communautés microbiennes présentes dans de nombreux environnements. StatFingerprints est un programme informatique libre de droits qui permet non seulement d'importer, de traiter et de tracer les profils issus des empreintes moléculaires mais aussi de réaliser de nombreuses analyses statistiques et d'estimer des indices de diversité. StatFingerprints utilise le programme R pour réaliser les calculs statistiques et afficher les graphiques. Il est doté d'une interface graphique intuitive et facile d'accès qui ne nécessite aucune connaissance en programmation. Il est particulièrement adapté pour tester l'effet d'un facteur de variation sur les communautés microbiennes et pour établir les relations entre les communautés microbiennes et les paramètres environnementaux. Les analyses multivariées incluses dans ce programme sont les ordinations, les classifications hiérarchiques et les tests statistiques basés sur hypothèse comme la 50-50 MANOVA (50-50 multivariate ANOVA), l'ANOSIM (analysis of similarity) ou le SIMPER (similarity percentage procedure). StatFingerprints offre également des possibilités de représentations graphiques en 3 dimensions.

STATFINGERPRINTS: A FRIENDLY GRAPHICAL INTERFACE PROGRAM FOR PROCESSING AND ANALYSIS OF MICROBIAL FINGERPRINT PROFILES

Molecular Ecology Resurces 2009. 9(5): 1359-1363

R. J. Michelland [*,†,‡], S. Dejean [§], S. Combes [*], L. Fortun-Lamothe [*], L. Cauquil [*]

[*] INRA, UMR 1289 TANDEM, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [†] Université de Toulouse, INPT-ENSAT, UMR 1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [‡] ENVT, UMR 1289 TANDEM, F-31076 Toulouse, France ; [§] Université Paul Sabatier, Institut de Mathématiques, 31062 Toulouse cedex 9, France.

Keywords: fingerprint, ecology, statistic, diversity, processing

Correspondence : Laurent Cauquil. Address : INRA, Université de Toulouse, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, Chemin de Borde-Rouge, Auzeville, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France. Fax: 33 (5) 61 28 53 18. E-mail: laurent.cauquil@toulouse.inra.fr

Running title: processing and analysis of fingerprint profiles

1. ABSTRACT

Molecular fingerprint methods are widely used to compare microbial communities in various habitats. The free program StatFingerprints can import, process, and display fingerprint profiles and perform numerous statistical analyses on them, and also estimate diversity indexes. StatFingerprints works with the free program R providing an environment for statistical computing and graphics. No programming knowledge is required to use StatFingerprints thanks to its friendly graphical user interface. StatFingerprints is useful to analyze the effect of a controlled factor on the microbial community and to establish the relationships between the microbial community and the parameters of its environment. Multivariate analyses include ordination, clustering methods and hypothesis-driven tests like 50-50 multivariate ANOVA, analysis of similarity (ANOSIM) or similarity percentage procedure (SIMPER) and offer the possibility of plotting ordinations as a three-dimensional display.

2. INTRODUCTION

Molecular fingerprint methods and especially those based on capillary electrophoresis (CE) such as terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), single-strand conformation polymorphism (SSCP) or automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) offer, at little cost, a rapid high resolution snapshot of the overall community in a sample (Hong *et al.*, 2007; Hori *et al.*, 2005; King *et al.*, 2005; Zinger *et al.*, 2007). Consequently, they have been widely used in various environments to compare the communities of numerous samples (Babendreier *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2007; Kent *et al.*, 2007; King *et al.*, 2005; Leclerc *et al.*, 2004; Osborn *et al.*, 2000; Tatsuoka *et al.*, 2007). However, the fingerprint profiles generated are difficult to analyze. Firstly they need to be processed before they can be compared, and secondly, the large data sets generated require multivariate statistical methods. Dedicated programs like GeneMarker (SoftGenetics Inc), Safum (Zemb *et al.*, 2007), DAx (Van Mierlo program) or GeneScan (Applied Biosystems) provide no or only rudimentary statistical tools, with limited, if any, export possibilities to perform further analyses. They are also expensive. Furthermore, pre-programmed algorithms cannot be parameterized sufficiently to be satisfactorily used for ecological purposes (Zemb *et al.*, 2007). For example, it was recently demonstrated that the area under the peaks is informative and must be taken into account for statistical analysis; hence programs need to be able to retain this background (Loisel *et al.*, 2006).

Therefore, due to the wide use of fingerprint methods and the inadequacy of current programs for processing and analyzing fingerprint profiles, we developed a free program called StatFingerprints. No programming knowledge is required to use it, thanks to its friendly graphical user interface (GUI). It can *i)* import raw files containing fingerprint profiles (FSA, ASCII), *ii*) process fingerprint profiles (alignments, normalization etc.), *iii*) estimate diversity indexes, *iv*) perform univariate and a wide range of multivariate statistical tests, and *v*) plot in three dimensions with dynamic control. The program StatFingerprints works with R: a free program providing an environment for statistical computing and graphics (R development Core Team, 2008). StatFingerprints and its user guide can be downloaded from the comprehensive R archive network at http://cran.r-project.org/web/packages/StatFingerprints/index.html. In this note, we describe some possibilities of the program StatFingerprints.

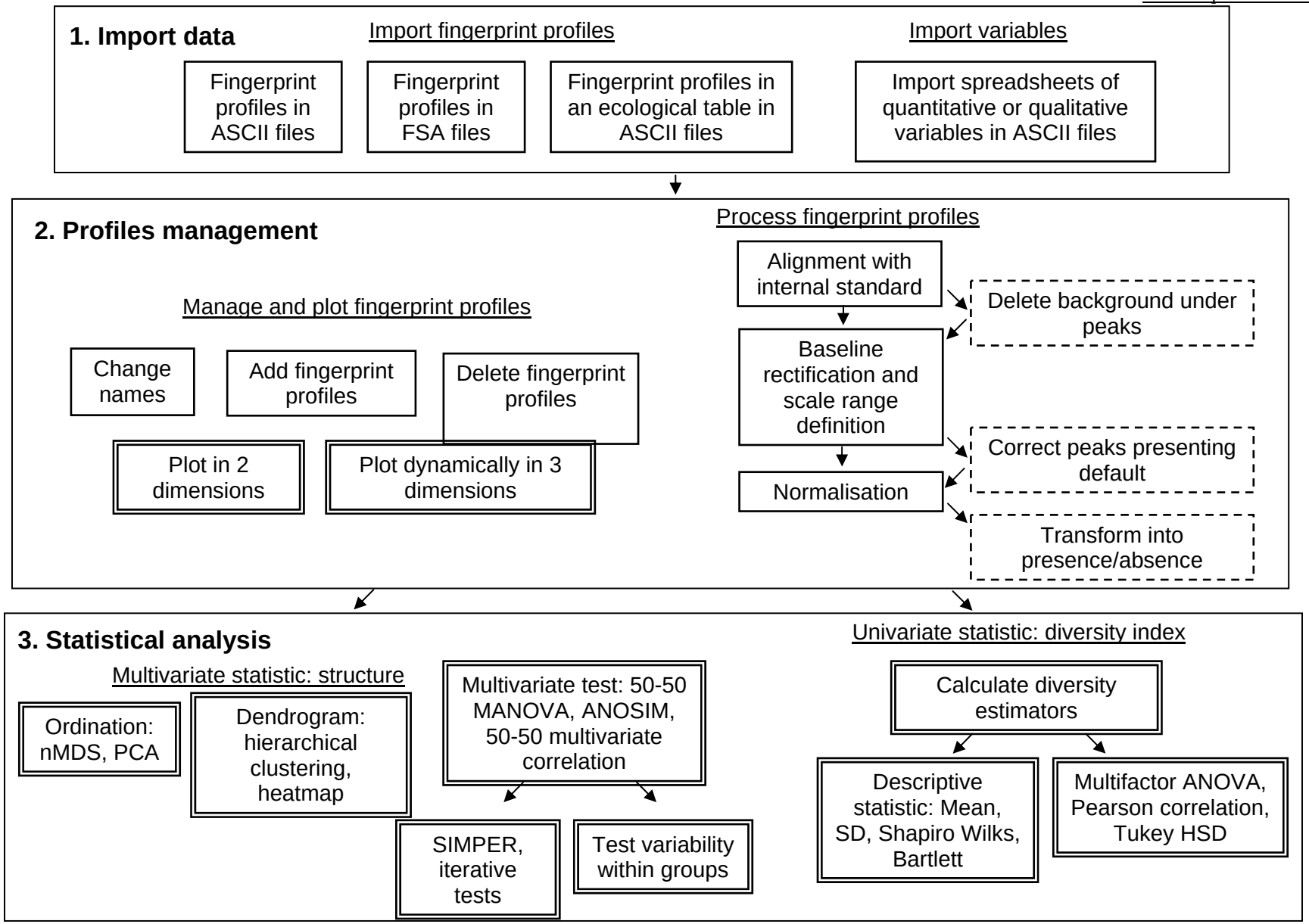


Figure 28. Structure of the StatFingerprints program.

Three main parts guide the user: (1) importation, (2) management and (3) statistical analysis of the fingerprint profiles. Arrow indicates successive steps. A step with double borders offers the possibility of exporting its numerical or graphical results. Steps with a dashed border are optional.

3. IMPORT AND EXPORT FINGERPRINT PROFILES

Fingerprint profiles from CE can be imported into StatFingerprints using all ASCII formats (Figure 28) and also directly from the output of ABI Prism sequencers (Applied Biosystems) using the FSA files. Data generated by traditional gel-based methods like DGGE (Denaturing Gradient Gel Elecrophoresis) or TGGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis) can also be imported as chromatograms. All results can be exported in all ASCII formats and plots can be exported in Metafile, Postscript, PDF, png, bmp, TIFF or jpeg formats.

4. PROCESS FINGERPRINT PROFILES

CE raw fingerprint profiles can be aligned with a safe manual control of the detection of the internal standard peaks. The baseline of the fingerprint profiles can also be aligned and horizontally reoriented. The background under peaks of fingerprint profiles, which is often considered as noise, can be deleted. The area under each fingerprint profile can be normalized. Processing the fingerprint profiles in such a way is required to compare them for further statistical analysis. Some authors prefer to transform fingerprint profiles into binary fingerprint profiles due to the semi-quantitative information given by fingerprint methods (Blackwood *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2004; Ramírez-Moreno *et al.*, 2005). The program StatFingerprints can detect peaks in profiles and then transform areas with and without peaks to one and zero respectively to obtain such binary profiles.

5. ESTIMATION AND ANALYSIS OF DIVERSITY INDEXES

Diversity indexes are frequently estimated from fingerprint profiles. They summarize all the scans of a fingerprint profile into a single value by taking into account the number of peaks and their relative abundance. StatFingerprints can estimate several diversity indexes: the richness, Simpson's negative logarithm, one minus Simpson, Shannon, Buzas and Gibson's evenness and equitability (Begon *et al.*, 1996; Magurran, 2004; Rosenzweig, 1995). The algorithm for the detection of the peaks in the fingerprint profiles can be easily and fully parameterized. For example, artefact peaks can be deleted using a threshold and the peaks' abundance can be calculated using their heights or their areas. StatFingerprints can perform some commonly used univariate tests: multifactor ANOVA, Tukey's Honest Significant Difference, Pearson's correlation, Bartlett's test or Shapiro Wilks' test. These tests can be used to calculate basic statistics either on the diversity index or on other imported variables.

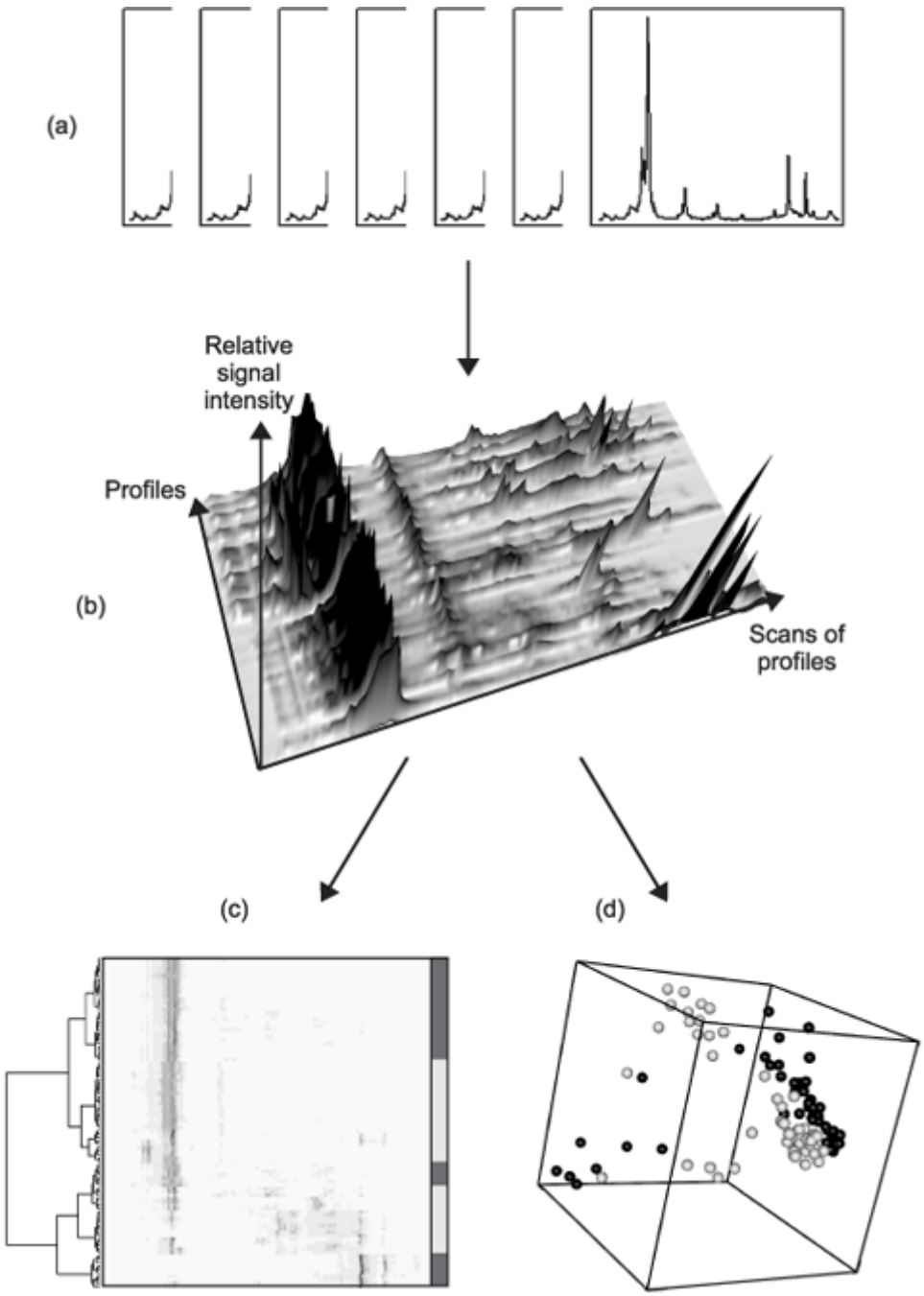


Figure 29. Analysis of CE-SSCP profiles of the *Archaeal* community of the digestive tract of the rabbit and the cow using StatFingerprints.
Raw CE-SSCP profiles (a) require processing before they can be compared (b). Then they can be compared using heatmap (c) or three-dimensional nMDS (d). The black and grey colors correspond to rabbit and cow, respectively. Heatmap was calculated using Euclidean distances and the Ward algorithm. The nMDS was computed with 10000 random starts using Euclidean distances. The stress of the nMDS was equal to 0.050.

6. ANALYSIS OF THE STRUCTURE OF COMMUNITY WITH MULTIVARIATE STATISTICS

The proximities between pairs of fingerprint profiles can be calculated using 13 proximity measures: Euclidean distance, maximum distance, Manhattan distance, Canberra

distance, Minkowski distance, Bray Curtis similarity index, chi-squared correlation index, Ruzicka similarity index, Roberts similarity index, Jaccard binary index, Dice-Sørensen binary index, Ochiai binary index, Stainhaus binary index (Legendre & Legendre, 1998; Magurran, 2004; Wolda, 1981). The proximity measures between fingerprint profiles can be explored using either ordination or dendrogram methods (Figure 29). Ordination methods available in the program StatFingerprints are principal components analysis (PCA) and random starts non metric multidimensional scaling (nMDS ; Borg & Groenen, 2005; Cox & Cox, 2003). These analyses produce a display in 2 or 3 dimensions in which each point represents one fingerprint profile. From the proximity matrix, nMDS plots points so as to respect as well as possible the proximity measures between each pair of profiles. On the other hand, PCA does not use the proximity matrix. PCA calculates the linear combination with the largest variance within scan values of all profiles to produce synthetic variables. These synthetic variables determine the axis of the space where fingerprint profiles are plotted as points (Hotelling, 1933). Dendrogram methods available in StatFingerprints are hierarchical clustering and heatmap. Seven dendrogram construction algorithms are available: Ward, nearest neighbor, unweighted pair-group average, average, Mc Quitty, median and centroid (Gordon, 1999; Murtagh, 1985). Heatmap is a hierarchical clustering coupled with a simplified representation of the profiles using a color data set (the signal intensity is translated into a gradient of colors). This facilitates the visual interpretation of the plot.

The influence of a factor on the structure of the microbial community has often been studied by a subjective observation of the clusterings on the ordination plot but has rarely been statistically determined using a hypothesis-driven test. StatFingerprints offers two hypothesis-driven tests : 50-50 multivariate ANOVA with rotations (Langsrud, 2002; Langsrud, 2005) and analysis of similarity (ANOSIM) with Monte Carlo permutations (Chapman & Underwood, 1999; Clarke, 1993). ANOSIM analysis can be based on any of the 13 proximity measures available but can test the effect of only one factor. In the other hand, the 50-50 multivariate ANOVA is not based on proximity measures but can test the effect of two or more factors and their interactions. The multivariate post-hoc test can be performed using pairwise ANOSIM (Clarke, 1993) to understand which levels differ from the others within a factor. To go further into the analysis and to understand which scans along a fingerprint profile explain the difference between two groups of fingerprint profiles (two levels within a factor), StatFingerprints offers either the similarity percentage procedure (SIMPER; Clarke, 1993) or iterative tests. The SIMPER calculates the relative contribution of

each scan of a fingerprint profile to the dissimilarities between the two groups, whilst the iterative test performs a univariate test between the two groups for each scan of the profile. The univariate test can be a T-test, Mann Withney or Fisher's exact tests for normal, non-normal, nominal (binary fingerprint profiles) variables respectively. StatFingerprints can also calculate the variability within each group of fingerprint profiles and test whether this variability differs significantly between groups. Establishing the relationship between the structure of the microbial community and environmental parameters, for example a gradient pollution, is often required. For this, StatFingerprints provides a 50-50 multivariate correlation (Langsrud, 2002; Langsrud, 2005).

7. CONCLUSION

In conclusion, StatFingerprints provides a useful tool for scientists in the field of microbial ecology who use molecular fingerprint methods and especially those based on CE. It offers, in a single free program, a way to easily manipulate fingerprint profile output data from the sequencer, and perform numerous statistical analyses on them. A wide range of importing and processing methods, multivariate statistical tests, and the ability to estimate diversity indexes is available, using a user-friendly graphical interface. All the results and figures are exportable and can be easily included in a publication. To our knowledge, StatFingerprints is the only free program to include statistical tests like pairwise ANOSIM, SIMPER, iterative tests or heatmap to analyze the fingerprint data.

8. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Olivier Zemb, Jerôme Hamelin and Laurence Lamothe for helpful ideas and discussion. We are grateful for Mélanie Martignon and Moussa Kimsé for their suggestions.

9. REFERENCES

Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F (2007) Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology* **59**(3)**:** 600-610

Begon M, Harper JL, Townsend CR (eds) (1996) *Ecology. Individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science, 1068pp

Blackwood CB, Marsh T, Kim S-H, Paul EA (2003) Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2)**:** 926-932

Borg I, Groenen PJF (2005) *Modern multidimensional scaling: theory and applications*, New York: Springer-Verlag.

Chapman MG, Underwood AJ (1999) Ecological patterns in multivariate assemblages: information and interpretation of negative values in ANOSIM tests. *Marine Ecology Progress Series* **180:** 257-265

Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* **18**(1)**:** 117-143

Cox TF, Cox MAA (2003) Multidimensional scaling. *Technometrics* **45**(2)**:** 328-328

Gordon AD (1999) *Classification*, second edn. London.

Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ (2004) Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* **432**(7018)**:** 747-750

Guo Y, Zhu N, Zhu S, Deng C (2007) Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *Journal of Applied Microbiology* **103**(4)**:** 1344-1354

Hong H, Pruden A, Reardon KF (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbiological Methods* **69**(1)**:** 52-64

Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y (2005) 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. *Journal of Microbiological Methods* **66**(1)**:** 165-169

Hotelling H (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *British Journal of Educational Psychology* **24:** 417–441

Kent AD, Yannarell AC, Rusak JA, Triplett EW, McMahon KD (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *ISME Journal* **1**(1)**:** 38-47

King S, Mc Cord BR, Riefler RG (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **60**(1)**:** 83-92

Langsrud Ø (2002) 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *The Statistician* **51:** 305-317

Langsrud Ø (2005) Rotation tests. *Statistics and Computing* **15:** 53-60

Leclerc M, Delgenes J-P, Godon J-J (2004) Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology* **6**(8)**:** 809-819

Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology.*, 2 edn. Amsterdam: Elsevier.

Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, Godon JJ (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and singlestrand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8:** 720-731

Magurran AE (2004) *Measuring biological diversity.*, Oxford: Blackwell publishing.

Murtagh F (1985) Multidimensional clustering algorithms. In *Compstat*. Wuerzburg

Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 39-50

R development Core Team (2008) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Ramírez-Moreno S, Martínez-Alonso M, Méndez-Alvarez S, Gaju N (2005) Seasonal microbial ribotype shifts in the sulfurous karstic lakes Cisó and Vilar, in northeastern Spain. *International Microbiology* **8**(4)**:** 235-242

Rosenzweig ML (1995) *Species diversity in space and time*, Vol. 10, Cambridge: Cambridge University Press.

Tatsuoka N, Mohammed N, Mitsumori M, Tajima K, Hara K, Kurihara M, Itabashi H (2007) Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Animal Science Journal* **78**(5)**:** 512-518

Wolda H (1981) Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia* **50:** 296-302

Zemb O, Haegeman B, Delgenes JP, Lebaron P, Godon JJ (2007) Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular Ecology Notes* **7**(5)**:** 767-770

Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia R (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial ecology* **54**(2)**:** 203-216

PARTIE 2 VARIABILITE SPATIALE, TEMPORELLE, INTER-INDIVIDUELLE ET INTER-SPECIFIQUE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES

Dans cette seconde partie, nous avons cherché à identifier les facteurs de variation des fermenteurs digestifs dans les deux modèles animaux étudiés : la vache et le lapin. L'objectif de cette partie a donc été *i)* d'étudier la variabilité entre espèces (vache *vs* lapin), entre individus, dans l'espace (le long du tractus digestif et au sein du fermenteur principal) et dans le temps (au cours de la journée et entre plusieurs semaines successives) des communautés procaryotiques (bactérie, *Archaea*) et de leur biotope et *ii)* d'établir les relations microbiote/biotope.

Notre objectif étant de réaliser une approche comparée entre la vache et le lapin, nous nous sommes attachés à décliner nos essais dans ces deux espèces de la façon la plus proche possible et nous avons ensuite traité les échantillons, exploité et analysé les données de façon contemporaine et similaire. Néanmoins, cette volonté a été confrontée aux différences physiologiques entre les deux espèces. Ainsi, certains choix méthodologiques valides pour une espèce pouvaient se réveler des non-sens physiologiques pour une autre. Par exemple, chez la vache, nous avons distribué deux repas par jour, de manière contrôlée. Nous avons ensuite pu étudier l'évolution des communautés bactériennes et des paramètres fermentaires au cours de la période post-prandiale. Cette situation n'a pas de sens chez le lapin. En effet, cet animal réalise de très nombreux repas au cours de la journée (20 à 30 repas). De plus, le cæcum étant situé en aval du tube digestif, le flux des nutriments entrant dans ce fermenteur est plus régulier et plus indépendant de l'ingestion de l'hôte. Le contenu ruminal est hétérogène et il est probable que les communautés bactériennes présentes dans la partie ventrale du rumen soient différentes de celles vivant dans la partie dorsale du rumen ou dans le réticulum. Nous avons donc introduit ce facteur de variation (zone de prélèvement dans le rumen) dans nos études pour la vache. En revanche, le contenu cæcal est pâteux et homogène et cette notion de zone de prélèvement n'a pas de sens chez le lapin. Enfin, en raison de la taille de l'animal, le nombre d'animaux utilisé peut être plus important chez le lapin que chez la vache, surtout pour des vaches porteuses de canules. Afin de gagner en puissance expérimentale, nous avons choisi de profiter de cette possibilité pour travailler sur des effectifs plus importants chez le lapin.

C'est pour l'ensemble de ces raisons, que les schémas expérimentaux ne sont pas toujours identiques entre les deux espèces étudiées et qu'ils ont abouti à des publications parfois séparées (à l'exception de la publication sur les *Archaea*). En revanche, au sein de la

discussion générale, les résultats sont discutés sous l'angle d'une approche comparée entre les deux espèces modèles.

VARIATIONS SPATIALES ET TEMPORELLES DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DANS LE TRACTUS DIGESTIF DE LA VACHE LAITIERE

Journal of Applied Microbiology 2009. 107(45): 1642-1650

R.J. Michelland, V. Monteils, A. Zened, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, J. Hamelin, L. Fortun-Lamothe

Mots clés: bactéries, rumen, fèces, CE-SSCP, paramètres environnementaux

Titre abrégé: les communautés bactériennes dans le tractus digestif des vaches

Résumé

Une amélioration de la connaissance des communautés bactériennes résidant dans le tube digestif des herbivores est nécessaire pour améliorer leur efficacité digestive. Le but de ce travail était d'étudier les variations spatiales et temporelles des communautés bactériennes du tube digestif de la vache et les corrélations avec les paramètres environnementaux. Le contenu ruminal et les fèces de 5 vaches ont été prélevés pendant 3 semaines, tandis que du contenu du réticulum a été prélevé au cours de la 3ème semaine. Les communautés bactériennes ont été caractérisées par l'analyse des profils CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism) basées sur une amplification de la région V3 des gènes codant pour l'ARNr 16S. Nous montrons que la structure des communautés bactériennes diffère entre le réticulo-rumen et le contenu fécal en raison de l'abondance de quelques OTUs (operational taxonomic units) qui change d'une semaine à l'autre. La structure de la communauté bactérienne du rumen a été corrélée aux concentrations d'acide propionique et de NH_3-N. En conclusion, les communautés bactériennes du tube digestif des bovins varient dans l'espace et le temps. Les résultats de ce travail impliquent que l'étude des communautés bactériennes du tube digestif des herbivores devrait être étendue au côlon. Une meilleure connaissance de l'amplitude et de l'origine de la variation temporelle des communautés bactériennes du rumen permettraient de mieux comprendre et en conséquence d'améliorer le contrôle de l'activité fermentaire chez les herbivores.

SPATIAL AND TEMPORAL VARIATIONS OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN THE BOVINE DIGESTIVE TRACT

R.J., Michelland[1,2,3], V. Monteils[1,2,3], A. Zened[1,2,3], S. Combes[1,2,3], L. Cauquil[1,2,3], T. Gidenne[1,2,3], J. Hamelin[4], L. Fortun-Lamothe[1,2,3]

Journal of Applied Microbiology 2009. 107(45): 1642-1650

[1] INRA, UMR 1289 TANDEM, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [2] Université de Toulouse, INPT-ENSAT, UMR 1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [3] ENVT, UMR 1289 TANDEM, F-31076 Toulouse, France; [4] INRA, UR 050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, F-11100 Narbonne, France.

Running title: Bacterial community in bovine digestive tract

Corresponding author. Name : L. Fortun-Lamothe. Mailing address : INRA, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan Cedex, France. E-mail: lamothe@toulouse.inra.fr. Phone: 33 (5) 61 28 53 18. Fax: 33 (5) 61 28 53 19.

1. ABSTRACT

Aims: Improved knowledge of the bacterial community of the digestive tract is required to enhance the efficiency of digestion in herbivores. This work aimed to study spatial and temporal variations of the bacterial communities in the bovine digestive tract, and their correlation with gut environmental parameters.

Methods and Results: Rumen content and fæces of five cows were sampled for three weeks. In addition, reticulum content was sampled during the 3rd week. Bacterial communities were assessed by studying Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism (CE-SSCP) profiles of 16S rRNA genes. The bacterial community structure differed between the forestomach and fæcal contents. The abundance of several operational taxonomic units (OTUs) changed from week to week. Bacterial community structure of the rumen was correlated to propionic acid and NH_3-N concentrations.

Conclusions: The bacterial community of the bovine digestive tract varied in space and time.

Significance and Impact of the Study: The study of the bacterial communities of the digestive tract in herbivores should be widened from the rumen to the large intestine. The amplitude and origin of the temporal variation of the ruminal bacterial community needs to be better understood to improve the control of the fermentative activity in herbivores.

Keywords: Bacteria, rumen, fæces, CE-SSCP, environmental parameters

2. INTRODUCTION

Bacteria are present throughout the digestive tract of ruminants. They are predominant compared to other microbes in the forestomach, i.e. the rumen and the reticulum, and the large intestine. They are also present in other compartments, such the small intestine and the cæcum, but in smaller numbers (Edwards *et al.*, 2005). These ecosystems harbor a complex range of microbes living in an anaerobic and reductive environment. The rumen contains 10^{10-11} bacteria, 10^{9-10} phage particles, 10^{8-9} protozoa, 10^{7-9} *Archaea* and 10^{3-5} fungal zoospores per milliliter (Klieve & Swain, 1993; Mackie *et al.*, 1997). The microbial ecosystems in other parts of the ruminant digestive tract are less well known, but Lin *et al.* (1997) showed that the relative abundance of bacteria, eucarya and *Archaea* varied according to the digestive compartment. Indeed, in the goat digestive tract, bacterial rRNA accounts for 59% of the total rRNA present in the rumen, compared to 66% and 73% in the colon and cæcum respectively.

The bacterial and protozoal communities play a key role in digestion, hydrolyzing plant cell walls and producing volatile fatty acids, ammonia and vitamins directly utilized by the ruminant (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008d). This microbial activity releases hydrogen which is used by the *Archaea* to produce methane (Janssen & Kirs, 2008). The three main currently known cellulolytic bacterial species are the Gram-negative *Fibrobacter succinogenes* and two species of Gram-positive bacteria, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens* (Krause *et al.*, 2003). For several decades, numerous studies have been devoted to understanding the factors which influence the fermentative activity in the cow's rumen (Allen, 1997; Nagaraja & Titgemeyer, 2007; Owens *et al.*, 1998). New knowledge of the bacterial community itself is essential to advance the control of microbial digestion. This knowledge has recently increased with the development of molecular tools based on 16S rRNA gene heterogeneity (Deng *et al.*, 2008). These techniques have revealed the extraordinary richness of bacterial species in the rumen, revealing many new species. In contrast, little is known about the factors that influence the bacterial richness. One generally distinguishes biotic factors, like interactions between microbial communities and their hosts, from abiotic factors like environmental parameters such pH or redox potential.

This study aimed to assess the spatial, temporal and inter-animal variations of bacterial communities residing in the bovine forestomach and large intestine. We studied both structure and diversity index of the bacterial communities and their correlation with gut environmental parameters. We used Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism

(CE-SSCP) generated by amplification of the V3 region of the 16S rRNA gene. It is a reproducible and high-resolution methodology which permits a rapid analysis of the whole bacterial community (King *et al.*, 2005; Zinger *et al.*, 2007).

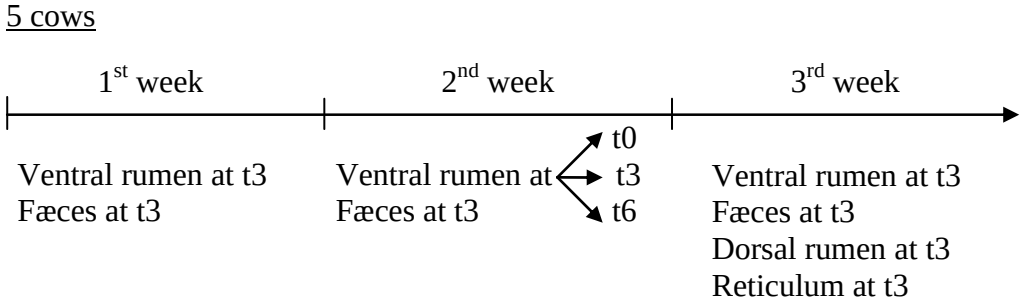


Figure 30. Scheme of the experimental design.
t0, t3, t6 stand for before meal, 3 h and 6 h after the meal respectively.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. EXPERIMENTAL DESIGN

Five non-lactating Prim Holstein cows fistulated in the rumen were kept indoors in individual pens. They were fed twice daily at 0800 h and 1700 h with a maintenance diet of 2 kg of hay, 2 kg of barley straw, 1 kg of ground corn and 0.08 kg of mineral supplement. They were adapted to the diet for 21 days before sampling to stabilize the digestive tract ecosystems at the beginning of experiment. The animals were cared for in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 27 avril 1988).

Samples were collected once a week, on the same day, for three consecutive weeks (Figure 30). To study the bacterial community of the large intestine, fæces were collected immediately after their excretion. During the 1st week, ventral rumen and fæces samples were collected 3 h after the morning meal. During the 2nd week, ventral rumen samples were collected before the meal and 3 h and 6 h after the morning meal whereas fæces samples were collected once, 3 h after morning meal. During the 3rd week, ventral and dorsal rumen samples, reticulum and fæces samples were collected 3 h after the morning meal. A total of 50 samples were collected and filtered (1.6 mm) before storage at -20°C until analysis. The samples taken to determine concentrations of NH_3-N and VFA were collected each week in the liquid phase of the ventral rumen content, 3 h after the morning meal, and stored at -20°C in a 2 % (w/v) mercuric chloride solution.

3.2. DETERMINATION OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS

Concentrations of VFA were determined by Playne's (1985) method by automated gas separation (5890A, Hewlett Packard, Avondale, PA). NH_3-N concentrations were determined by a colorimetric method as previously described by Hach *et al.* (1987). Ventral ruminal pH and redox potential were measured *ex-vivo* as described by Marden *et al.* (2005), the day following sampling. The measurements of pH and redox potential were carried out with a glass electrode (combined electrode DG SC, Metrohm) and a platinum electrode (Pt SC with Ag/AgCl as reference, Metrohm). The redox potential measurements were corrected by adding the potential of the reference hydrogen electrode: +199 mV.

3.3. DNA EXTRACTION AND PCR AMPLIFICATION

Total DNA was extracted and purified with QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, England) directly from approx. 0.2 g of sample corresponding to 227 ± 173 ng μl^{-1}. The V3 region of the 16S rRNA genes of bacterial species, corresponding to a 205 bp fragment in *Escherichia coli* (position 329 to 534), were used as a diversity marker by performing PCR using the primers W49 5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' and 6FAM-labeled W34 5'-TTACCGCGGCGTGCTGGCAC-3' (Delbès *et al.*, 1998; Zumstein *et al.*, 2000). PCR was carried out in 50 μl reaction mixtures containing 5 μl 10× buffer, 0.2 μM of each primer, 200 μM of each dNTP, 0.25 U *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene), 25 μg bovine serum albumin (Biolabs) and 1 μl of 200 times diluted DNA extract. The temperature program consisted of 2 min at 95 °C, 30 cycles with 30 s at 94 °C, 30 s at 61 °C, 30 s at 72 °C followed by a final extension at 72 °C for 3 min. PCR products were checked for appropriate size by 1 % agarose gel electrophoresis.

3.4. CAPILLARY ELECTROPHORESIS SINGLE-STRANDED CONFORMATION POLYMORPHISM

Briefly, Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism (CE-SSCP) is a capillary electrophoretic method based on heterogeneity of single-stranded ribotype secondary structure providing different mobility through a gel. An internal standard using a different fluorochrome 6-carboxy-X-rhodamine (ROX, Applied Biosystems-HD400) was analyzed simultaneously. The SSCP mix contained 1 μl of PCR product, 7.8 μl of deionized formamid (Genescan, Applied Biosystem) and 0.2 μl of the internal standard ROX. Mix was denatured at 95 °C for 5 min and placed on ice before loading. CE-SSCP was performed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer using a 36 cm length capillary and a 7.2 % non-denaturing polymer consisted of 80 % CAP polymer (Applied Biosystems), 10 %

glycerol and 10 % 10x TBE Buffer (Applied Biosystems). Electrophoresis was performed at 25 °C for 3500 s at 15 KV and produced chromatograms containing both sample and internal standard signals. Bacterial communities were spread out in about 1200 scans. Co-migration events of PCR products belonging to different bacterial species could occur during capillary electrophoresis, resulting in a single peak in the CE-SSCP profile (Loisel *et al.*, 2006; Zinger *et al.*, 2007). Therefore, one should remember that a single peak could correspond to an operational taxonomic unit (OTU) assemblage rather than a single OTU.

CE-SSCP data processing was computed with SAFUM software, version 4.4, running on Matlab version 6.0 (Zemb *et al.*, 2007). CE-SSCP profiles were aligned together using pairwise alignment of their internal standard with the same reference internal standard. Total areas under CE-SSCP profiles were normalized to one producing relative abundance data. Alignment and normalization guaranteed reliable comparison between samples.

3.5. DIVERSITY INDEX AND STRUCTURE OF COMMUNITIES

Estimating a diversity index consists of summarizing a complex community represented by a molecular fingerprint pattern in a single value by taking into account the number of species (number of peaks) and their relative abundance (area under each peak). Simpson's diversity index gives the probability of two individuals randomly taken from an infinitely large community belonging to the same species (Simpson, 1949). It is heavily weighted towards the most abundant species and thus is better suited to patterns of molecular fingerprints where only principal OTUs are plotted as peaks. It is estimated as the negative logarithm of the Simpson index named D' (Rosenzweig, 1995) ; Haegeman *et al.*, personal communication). The lowest value of D' is obtained when the profile contains only one peak and the highest value of D' when the profile contains many overlapping peaks of equal abundance. Thus, in a CE-SSCP profile, D' will decrease when the abundance of a few peaks increases and will increase when the areas of the highest peaks are replaced by a lot of minor peaks.

The community structure of an ecosystem was defined as the list of species and their relative abundance in the community (Begon *et al.*, 1996). It has been shown that the migration of ribotypes within the CE-SSCP capillary is highly reproducible (Zinger *et al.*, 2007). Therefore, the comparison of the peak sizes for each scan of the profile shows which OTUs appear, disappear or change in abundance. Consequently, in the present paper, the

study of the structure of bacterial communities refers to the fine analysis of the size of the various peaks throughout the profiles.

3.6. STATISTICAL ANALYSES OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS AND DIVERSITY INDEX

All statistical analyses were carried out using R version 2.6.1 (R development Core Team, 2007). ANOVA was performed for diversity index (D') using the following variables as fixed effects: individual cow (five levels), sample type (four levels: ventral rumen, dorsal rumen or reticulum contents and fæces), sampling week (three levels) and sampling hour after meal (three levels). For environmental variables (pH and redox potential at 3 h after the meal, VFA and NH_3-N concentrations), the statistical model included individual cow and sampling week as fixed effects. All possible interactions between previously cited factors were also tested. Tukey's Honestly Significant Differences post-hoc tests (Tukey's HSD) were performed. Correlations between diversity index as dependent variable and environmental variables as independent variables were explored using General Linear Model (GLM) to calculate Pearson's R^2.

3.7. STATISTICAL ANALYSES OF THE STRUCTURE OF THE BACTERIAL COMMUNITIES

We calculated the pairwise Euclidean distances of the 50 CE-SSCP profiles. To explore this distance matrix, non-metric MultiDimensional Scaling (nMDS) was performed using 10000 random starts. Basically, nMDS is a two-dimensional display where each CE-SSCP profile is represented by a single point. They are plotted so as to respect as well as possible with the Euclidian distance between each pair of points. The degree to which the display matched the underlying distances was assessed by using Kruskal stress, a maximum threshold value of 0.1 gives little risk of misinterpretation (Clarke & Warwick, 2001). Analysis of similarity (ANOSIM) was performed on the distance matrix using 10000 Monte Carlo permutations. Global ANOSIM was performed to test the fixed effects of individual cow, sampling site, sampling week and sampling hour after the meal. Pairwise ANOSIM was used to determine which level differed within a significant fixed effect. The factor tested was considered to be not significant if $P>0.05$, whatever the value of ANOSIM R. The factor tested was considered to be significant when $P<0.05$ and ANOSIM $R>0.25$. The value of ANOSIM R indicates the degree of similarity between the groups ($R>0.75$: well separated groups; $0.50<R<0.75$: separated but overlapping groups; $0.25<R<0.50$: separated but strongly overlapping groups; Ramette, 2007). An iterative Mann-Whitney test on the 1200 scans of the profile revealed which OTUs differed between two distinct communities.

3.8. RELATIONSHIPS BETWEEN BACTERIAL COMMUNITIES AND ENVIRONMENTAL PARAMETERS

Relationships between bacterial communities and environmental variables were tested with a multivariate 50-50 *F*-test followed by a rotation test with 10000 permutations to assess significance (Langsrud, 2002; Langsrud, 2005). The 1200 scans of CE-SSCP profiles were treated as dependent variables and the environmental variables (pH and redox potential at 3 h after the meal, VFA and NH_3-N) as independent variables. This multivariate GLM test is particularly suited to molecular fingerprint data as it is nonparametric, is effective for collinear variables, is unaffected by the order of the independent variables (type II) and allows the possibility of having more variables than observations.

4. RESULTS

Tableau 14. Effects of individual animal, week, and hour after meal in the ventral rumen and effect of sampling site on the structure of bacterial communities using ANOSIM

CE-SSCP profile groups*	Degree of proximity: R	P
Site of sampling	0.49	<0.001
Ventral rumen *vs* fæces	0.96	<0.05
Dorsal rumen *vs* fæces	0.96	<0.01
Reticulum *vs* fæces	1.00	<0.01
Ventral rumen *vs* dorsal rumen	0.02	NS†
Ventral rumen *vs* reticulum	0.10	NS
Reticulum *vs* dorsal rumen	-0.02	NS
Sampling week in the ventral rumen	0.51	<0.001
Wk 1 *vs* wk 2	0.88	<0.05
Wk 1 *vs* wk 3	0.11	NS
Wk 2 *vs* wk 3	0.50	<0.05
Sampling hour after meal	-0.06	NS
Individual cow in the ventral rumen	-0.10	NS

*The number of observation for all groups was 5.†NS non significant at P<0.05.

4.1. ENVIRONMENTAL PARAMETERS OF THE VENTRAL RUMEN

Ventral rumen content was relatively acid (pH = 6.5 ± 0.1) and reductive (redox potential = -173 ± 32 mV). Acetic acid, propionic acid, butyric acid and NH_3-N

concentrations were 53.6 ± 8.4 mM, 11.2 ± 1.9 mM, 5.0 ± 0.7 mM and 93.7 ± 20.7 mg l^{-1} respectively. All parameters measured in the ventral rumen, apart from redox potential, varied between animals (P<0.05; data not shown). However, environmental parameters did not change between sampling weeks. No interaction was found between the effects of individuals and sampling weeks (data not shown).

4.2. EFFECT OF INDIVIDUAL COW ON BACTERIAL COMMUNITIES

In the ventral rumen, the structure of the bacterial communities did not differ between individual cows (Tableau 14). Likewise, the diversity index of the bacterial communities did not differ between individual cows (Tableau 15). These findings meant that variability in the diversity index and in the structure of bacterial communities in the ventral rumen did not depend on the cow concerned.

Tableau 15. Effects of individual animal, week, hour after meal and sampling site on diversity index of the bacterial communities

Simpson diversity index					P
Individual cow					
Cow 1	Cow 2	Cow 3	Cow 4	Cow5	
6.0 (0.6)	5.8 (0.7)	5.5 (0.5)	5.8 (0.3)	6.1 (0.6)	NS†
Sampling site					
Ventral rumen	Dorsal rumen	Reticulum	Fæces		
6.0 (0.7)	5.5 (0.4)	5.9 (0.3)	5.7 (0.3)		NS
Weeks					
1st week		2nd week		3rd week	
5.4 (0.3) [a]		6.1 (0.5) [b]		5.7 (0.5) [a]	<0.01
Hour after meal*					
t_0		t_3		t_6	
6.3 (0.6)		5.7 (0.5)		6.1 (0.4)	NS

*t_0, t_3, t_6 stand respectively for 0 h (before), 3 h and 6 h after meal. †NS means non significant at P<0.05. Different letters ([a], [b], [c]) indicated that means differed at P<0.05. SD is given in brackets.

4.3. COMPARISON OF THE BACTERIAL COMMUNITIES RESIDING AT DIFFERENT SITES OF THE DIGESTIVE TRACT

The bacterial communities differed between sampling sites (ANOSIM R=0.49, P<0.001; Tableau 14). The structure of the bacterial communities differed greatly between samples from fæces and from the forestomach regions, i.e. the ventral rumen, dorsal rumen and reticulum (ANOSIM R>0.96, P<0.05; Tableau 14; Figure 31). Differences between forestomach and fæces concerned numerous OTUs located throughout the profiles (Figure 32A). Indeed, 61 % of the scans of the CE-SSCP profiles differed significantly between the bacterial communities of forestomach and fæces. Bacterial community structures did not differ either between ventral and dorsal rumen or in the reticulum (Tableau 14). The diversity index did not differ among the four sample types of the digestive tract (Tableau 15).

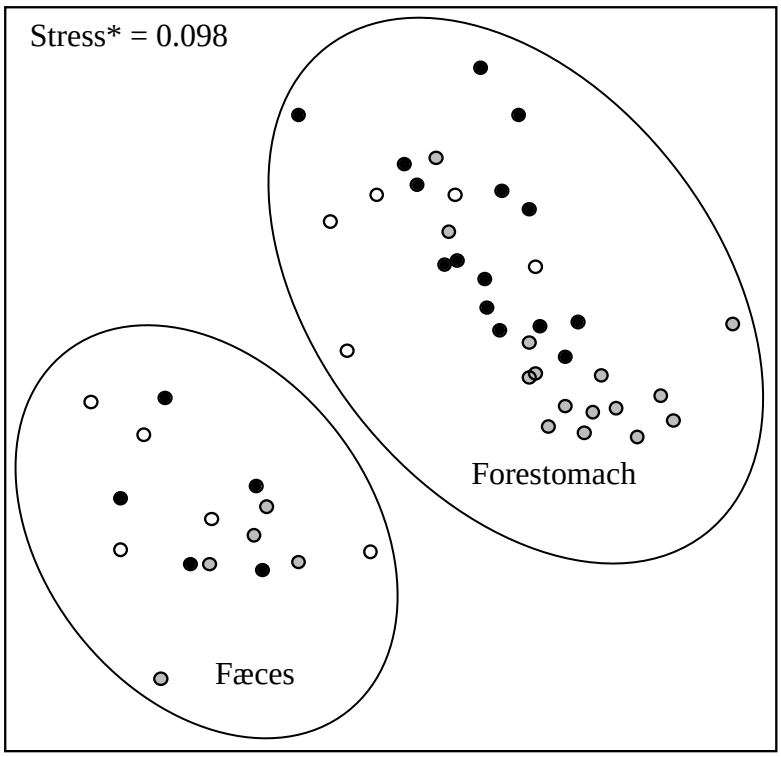


Figure 31. Two-dimensional nMDS plot of the 50 CE-SSCP profiles from the 1st (○), 2nd (●) and 3rd (●) weeks.
Black ellipses clustered the CE-SSCP profiles sampled from forestomach and fæces.

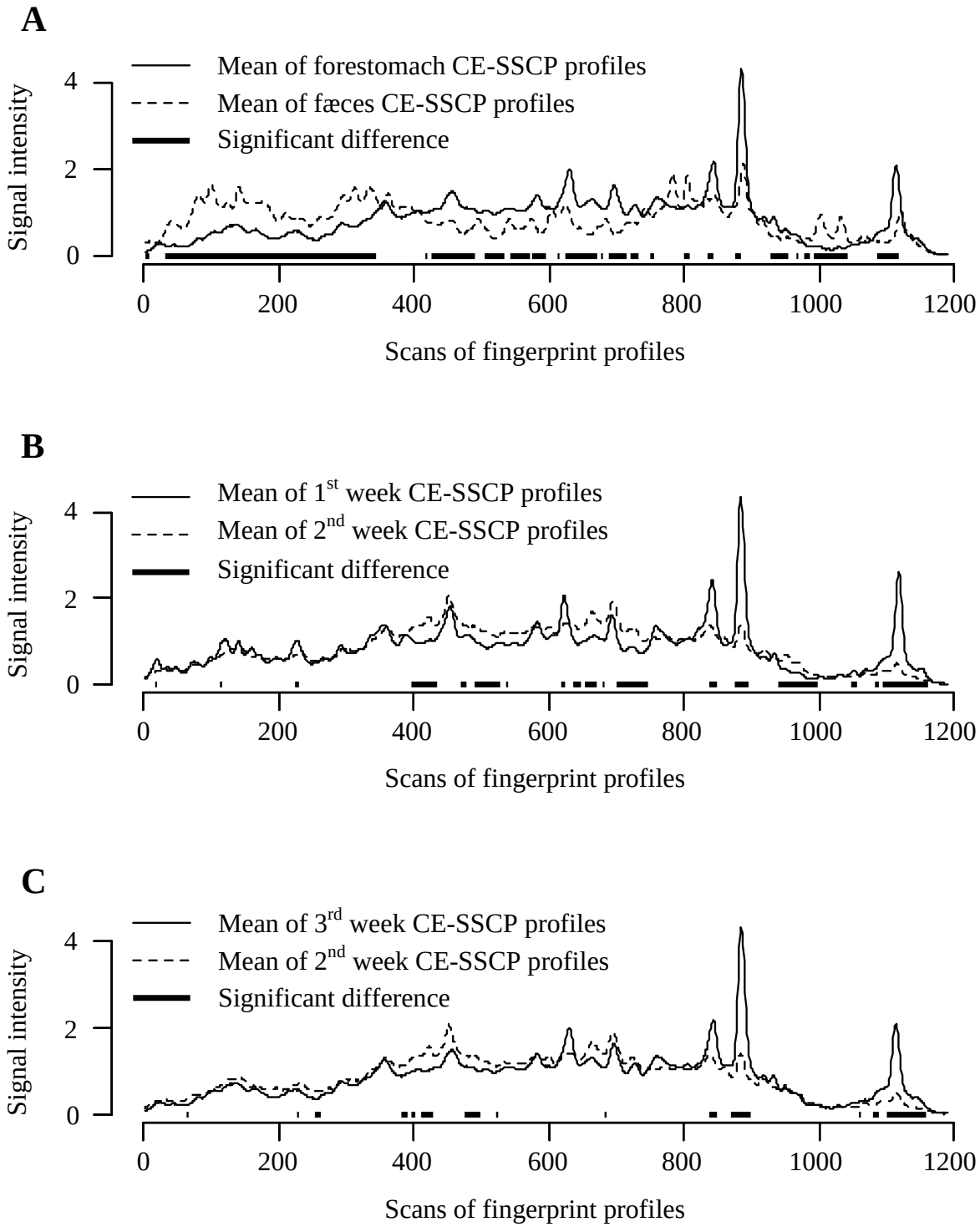


Figure 32. Structure differences on average CE-SSCP profiles between two distinct bacterial communities: forestomach *vs* fæces (A), 1st *vs* 2nd week (B) and 2nd *vs* 3rd week (C).
Structure differences at P<0.05 are indicated by black horizontal lines.

4.4. DYNAMICS OF BACTERIAL COMMUNITIES BETWEEN WEEKS AND AFTER MEALS

In the ventral rumen, the bacterial community structure differed between sampling weeks (ANOSIM R=0.51, P<0.001; Tableau 14). In this study, the bacterial community structure of the 2nd week differed from those of the 1st and 3rd weeks (ANOSIM R=0.88, 0.50 for 2nd week *vs* 1st and 3rd week respectively; P<0.05). This difference occurred sporadically along the profile. Indeed 32% and 18% of OTUs differed significantly between the 2nd week and respectively the 1st (Figure 32B) and 3rd week (Figure 32C).

The diversity index was also different between weeks, with a higher value for the 2nd week than for the 1st and 3rd weeks (P<0.01; Tableau 15). The structure and the diversity index of the bacterial community of the ventral rumen did not change significantly during the 6 hours following the meal (Tableau 14, Tableau 15).

Tableau 16. Effects of environmental parameters on the structure of the bacterial community of the ventral rumen 3 h after a meal using 50-50 F-test

	d.f.	Explained variance (%)	P
pH	1	9.6	NS†
Redox potential (mV)	1	5.1	NS
Acetic acid (mM)	1	6.6	NS
Propionic acid (mM)	1	7.0	<0.01
Butyric acid (mM)	1	8.2	NS
NH_3-N (mg l^{-1})	1	12.2	<0.05
Residuals	8	51.3	

†NS non significant at P<0.05.

4.5. RELATIONSHIP BETWEEN ENVIRONMENTAL PARAMETERS AND BACTERIAL COMMUNITIES

The 15 CE-SSCP profiles sampled in the ventral rumen 3 h after a meal were selected for analysis as they correspond to the entire set of environmental parameters data available. The structure of the bacterial community of the ventral rumen was correlated with propionic acid (7 %, P<0.01) and NH3-N concentrations (12 %, P<0.05; Tableau 16). The Simpson diversity index of the bacterial community of the ventral rumen was correlated (R^2=0.23, P<0.05) with the NH3-N concentration (Tableau 17).

Tableau 17. Correlations between environmental parameters and diversity index of the bacterial community of the ventral rumen 3 h after a meal

	Pearson R^2	P
pH	0.15	NS†
Redox potential (mV)	0.03	NS
Acetic acid (mM)	0.03	NS
Propionic acid (mM)	0.04	NS
Butyric acid (mM)	0.00	NS
NH_3-N (mg l^{-1})	0.23	<0.05

†NS non significant at P<0.05.

5. DISCUSSION

In this work, CE-SSCP profiles of the V3 region of 16S rRNA genes were used to study the spatial changes, dynamic and inter-animal variation of the bacterial community of the bovine digestive tract. The results showed that the bacterial community was primarily influenced by the sampling site. Indeed, we showed that forestomach and fæces harbored very different bacterial communities. In the rumen, the bacterial community was correlated with some environmental parameters like propionic acid and NH_3-N concentrations. Bacterial communities also varied with time as shown by the sampling week effect. On the other hand we found no influence either of the host individual or of the time after the meal on the structure and diversity of the bacterial community.

The diversity index of bacterial communities was similar whatever the sampling site (mean 5.8 ± 0.5) but higher than that observed in the rabbit cæcum (3.8 ± 0.5) using the same estimator (Michelland *et al.*, 2008). However, the structure of the bacterial communities differed greatly between forestomach and fæces. Differences between these two communities occurred throughout the profile of the bacterial community and for almost all OTUs. Similar results were observed throughout the gastrointestinal tract of domestic animals (Lin *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1999), and man (Marteau *et al.*, 2001; Zoetendal *et al.*, 2002b). Our result could be explained by the origin of the samples: the rumen is in the anterior part of the digestive tract while fæces are excreted at the end of the digestive tract. Therefore, environmental conditions like pH and degree of anaerobiosis, but also source and amount of substrate, are well known to vary greatly. Due to differences in the structure of the bacterial community between rumen and fæces, the study of both rumen and large intestine in future

experiments would permit a more global approach to the bovine digestive ecosystem and open up additional possibilities for controlling and managing digestion in herbivorous mammals.

Within the forestomach we observed no differences in the structures and diversity indexes of bacterial communities between ventral rumen, dorsal rumen and reticulum. However, the ventral rumen contains both solid fiber particles and fluid falling by gravity whereas the dorsal rumen contains mainly solid fiber particles. Furthermore, studies based on fingerprint methods (Larue *et al.*, 2005; Sadet *et al.*, 2007) or 16S rRNA gene library sequences (Cho *et al.,* 2006) showed that the solid particles and the ruminal juice harbor two very different bacterial communities. The solid particles contained mainly fibrolytic bacteria attached to particles. In our study, the whole bacterial community was analyzed, which could explain the similar bacterial communities at different sample sites. Indeed, ruminal contractions tend to continuously mix the rumen content. In future investigations it would be interesting to dissociate the solid and liquid phases in the ventral and dorsal compartments of the rumen.

Our results showed that neither diversity index nor structure of the bacterial communities differed between individual cows. Sadet *et al*. (2007) obtained a similar result. Studying two groups of four lambs receiving different food, they observed that DGGE patterns of bacterial communities were clustered primarily according to diet and sample type (location in the forestomach, liquid or solid phase) and then according to the individual animal. However the current opinion is that the bacterial community of the digestive tract is specific to each individual, suggesting a strong interaction between the host and its bacterial communities (dog: Simpson *et al.*, 2002 ; man: Zoetendal *et al.,* 1998; sheep: Edwards *et al.*, 2005). Consequently, in studies like ours where several sources of variation are studied simultaneously, the absence of an effect of individual can mean that variability between CE-SSCP profiles for different samples of a given individual cow is greater than variability between individual cows.

In our study, the diversity index and the structure of the bacterial communities were similar in the 1st and 3rd week but different from those of the 2nd week. This result could reflect either stochastic events or the occurrence of non-measured disturbances affecting specific OTUs, since all the environmental parameters measured 3 hours after the meal remained constant during the three weeks of the trial. In contrast, Edwards *et al*. (2005) did not observe evolution of the ruminal bacterial community in four sheep studied over fifteen days. Fernandez *et al.* (1999) previously demonstrated that a stable ecosystem function can

hide a chaotic evolution of the different OTUs constituting a community. A better comprehension of both the possible amplitude of, and the phenomena underlying such a temporal variation could improve control of the digestive process in ruminants. The present results showed no modification either of the structure or of the diversity index of the bacterial community of the ventral rumen after the meal.

In our study we observed significant correlations between environmental parameters and structure or diversity of bacterial communities, but the amount of variance that environmental parameters explained is limited. Propionic acid and NH_3-N concentrations of the ventral rumen were correlated to the structure of the bacterial community, whereas only NH_3-N concentration was correlated to the diversity index. The reductive conditions (measured by redox potential) and acidity (pH) of the ventral rumen are usually regarded as important parameters selecting bacterial species (Kamra, 2005). Strikingly, in our study neither pH nor redox potential were correlated with the structure or the diversity index of the bacterial community of the ventral rumen. These two environmental parameters did not change between sampling weeks, probably due to the high fiber and low starch content of the meal, known to maintain ruminal pH and redox potential (Allen, 1997).

Ecologically, a greater diversity is often considered to be a positive attribute for a more stable and resilient microbial community. Indeed, diversity allows functional redundancy, meaning that even if disturbances affect some bacterial species, several others can provide the same services to maintain the ecosystem's functioning (Cardinale *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2004). In our work, the diversity index seemed an interesting global indicator as it allowed us to demonstrate the dynamic of bacterial communities. It failed to differentiate the bacterial communities of forestomach and large intestine, confirming that the two communities could have the same diversity index while harboring very different structures. Therefore, for finer characterization of a microbial community using molecular fingerprints, the diversity index should be coupled with the analysis of the structure of the bacterial community.

In conclusion, the present experiment demonstrated both spatial and temporal variations in the bacterial communities residing in the bovine digestive tract. Consequently, future studies on digestive ecosystems in ruminants should be widened from the rumen to other parts of the digestive tract, such as the reticulum and large intestine. Secondly, our results showed that the bacterial communities can evolve spontaneously from week to week in the absence of controlled disturbances. The reasons for this need to be elucidated.

6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Sébastien Dejean, Institut de Mathématiques of Paul Sabatier University of Toulouse, France, for assistance with statistical analyses. The authors are grateful to technical assistance in the laboratory from Carole Bannelier, Béatrice Gabinaud, Muriel Segura, Véronique Tartie and the staff at the breeding center. The work of the staff at the Centre de Ressources, Génotypage et Séquencage of Toulouse is gratefully acknowledged.

7. REFERENCES

Allen MS (1997) Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* **80**(7)**:** 1447-1462

Anonymous (27 avril 1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française***:** 5608-5610

Begon M, Harper JL, Townsend CR (eds) (1996) *Ecology. Individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science, 1068pp

Cardinale BJ, Palmer MA, Collins SL (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* **415**(6870)**:** 426-429

Cho SJ, Cho KM, Shin EC, Lim WJ, Hong SY, Choi BR, Kang JM, Lee SM, Kim YH, Kim H (2006) 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**(1)**:** 92-101

Clarke KR, Warwick RM (2001) *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, 2 edn. Plymouth, UK.

Delbès C, Godon J-J, Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digestor bacterial community. *Anaerobe* **4:** 267-275

Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M (2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports* **35**(2)**:** 265-274

Edwards JE, McEwan NR, McKain N, Walker N, Wallace RJ (2005) Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiology* **151**(3)**:** 717-725

Fernandez A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C, Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8)**:** 3697-3704

Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2008) Niches écologiques potentielles des principales espèces microbiennes. In *Les écosystèmes digestifs*, Lavoisier (ed), pp 157-193. Paris, France

Hach CC, Bowden BK, Kopelove AB, Brayton SV (1987) More powerful peroxide Kjeldahl digestion method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70**(5)**:** 783–787

Janssen PH, Kirs M (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **74:** 3619-3625

Kamra DN (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current Science* **89**(1)**:** 124-135

King S, Mc Cord BR, Riefler RG (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **60**(1)**:** 83-92

Klieve AV, Swain RA (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(7)**:** 2299-2303

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **27**(5)**:** 663-693

Langsrud Ø (2002) 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *The Statistician* **51:** 305-317

Langsrud Ø (2005) Rotation tests. *Statistics and Computing* **15:** 53-60

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology* **7**(4)**:** 530-543

Lin C, Raskin L, Stahl DA (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **22**(4)**:** 281-294

Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, Godon JJ (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and singlestrand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8:** 720-731

Mackie RI, White BA, Isaacson RE. (1997) Gastrointestinal microbiology. In Hall Ca (ed.), New York, Vol. 1.

Marden JP, Bayourthe C, Enjalbert F, Moncoulon R (2005) A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **88**(1)**:** 277-281

Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10)**:** 4939-4942

Michelland R, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Monteils V, Fortun-Lamothe L (2008) Characterization of bacterial communities in caecum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). In *proceedings of the nineth World Rabbit Congress*, p 294. Verona, Italy

Nagaraja TG, Titgemeyer EC (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science* **90**(13_suppl)**:** E17-38

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR (1998) Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science* **76**(1)**:** 275-286

Playne MJ (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **36**(8)**:** 638-644

R development Core Team (2007) *R: a language and environment statistical computing.*, Vienna, Austria: R foundation for statistical computing.

Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**(2)**:** 142-160

Rosenzweig ML (1995) *Species diversity in space and time*, Vol. 10, Cambridge: Cambridge University Press.

Sadet S, Martina C, Meunier B, Morgavi D (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**(7)**:** 939-944

Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**

Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI (2002) Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial ecology* **44**(2)**:** 186-197

Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI (1999) Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods* **36:** 167-179

Zemb O, Haegeman B, Delgenes JP, Lebaron P, Godon JJ (2007) Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular Ecology Notes* **7**(5)**:** 767-770

Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia R (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial ecology* **54**(2)**:** 203-216

Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10)**:** 3854-3859

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *Journal of Nutrition* **134**(2)**:** 465-472

Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM (2002) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(7)**:** 3401-3407

Zumstein E, Moletta R, Godon J-J (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 69-78

ANALYSE MOLECULAIRE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE DU TUBE DIGESTIF DU LAPIN

Rory J. Michelland, Sylvie Combes, Valérie Monteils, Laurent Cauquil, Thierry Gidenne, Laurence Fortun-Lamothe

In press dans Anaerobe

Mots clés : bactéries, cæcum, fèces, indice de diversité, structure

Résumé

Le but de ce travail était d'étudier la stabilité temporelle des communautés bactériennes du cæcum et des fèces du lapin (indice de diversité et structure) en l'absence de perturbation expérimentale et d'évaluer ses relations avec les paramètres environnementaux. Des cæcotrophes et des crottes dures de 14 lapins ont été prélevés pendant 5 semaines tandis que du contenu cæcal a été prélevé la 3ème semaine (par chirurgie) et la 5ème semaine (après sacrifice). Les communautés bactériennes ont été étudiées en analysant les profils CE-SSCP des gènes codant pour l'ARNr 16S. Le potentiel redox, le pH, les concentrations en NH3-N et en acides gras volatiles ont été mesurées dans le cæcum. Les données montrent que les communautés bactériennes des cæcotrophes et des crottes dures diffèrent légèrement de celle du cæcum (ANOSIM-R<0.25 ; p<0.05). En l'absence de perturbation, les communautés bactériennes des fèces sont stables dans le temps (ANOSIM-R<0.25 ; p<0.001). En revanche, les communautés bactériennes du cæcum et des fèces ont été affectées par l'opération chirurgicale réalisée en 3ème semaine (ANOSIM-R=0.22 à 0.33 ; p < 0.001). Le contenu cæcal est un environnement acide (pH = 6.03 ± 0.33) et anaérobique (potentiel redox = -160 ± 43 mV). Seul le potentiel redox est corrélé à l'indice de diversité des communautés bactériennes du cæcum (R^2=0.35 ; p<0.05) et aucun des paramètres du milieu étudiés n'a été corrélé à sa structure.

MOLECULAR ANALYSIS OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN DIGESTIVE TRACT OF RABBIT

In press in Anaerobe

Rory J. Michelland [1,2,3], Sylvie Combes [1,2,3], Valérie Monteils [2,1,3], Laurent Cauquil [1,2,3], Thierry Gidenne [1,2,3], Laurence Fortun-Lamothe [1,2,3]

[1] INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France
[2] Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France
[3] ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

Corresponding author: Laurence Fortun-Lamothe. Address: INRA, Université de Toulouse, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, Chemin de Borde-Rouge, Auzeville, BP 52627, F-31326 Castanet-Tolosan Cedex, France. Phone: 33 (5) 61 28 53 18. Fax: 33 (5) 61 28 53 18. E-mail: Laurence.Lamothe@toulouse.inra.fr

1. ABSTRACT

This work aimed to study the stability over time of the bacterial community in cæcum and fæces of the rabbit (diversity index and structure) without experimental disturbance and to evaluate its relationships with environmental parameters. Soft and hard fæces of 14 rabbits were sampled for 5 weeks while cæcal content was sampled on the 3rd week (by surgery) and the 5th week (at slaughter). Bacterial communities were assessed by studying CE-SSCP profiles of 16S rRNA genes fragments. Redox potential, pH, NH3-N concentration and volatile fatty acid concentrations were measured in the cæcum. Data showed that bacterial communities of soft and hard fæces barely differed from that of the cæcum (ANOSIM-R<0.25; p<0.05). Without disturbance, the bacterial communities of fæces were stable over time (ANOSIM-R<0.25; p<0.001). However, the bacterial communities of cæcum and fæces were affected by the surgery (ANOSIM-R=0.22 to 0.33; p < 0.001). The cæcal content was an acidic (pH = 6.03 ± 0.33) and an anaerobic environment (redox potential = -160 ± 43 mV). Only the redox potential was correlated with the diversity index of the bacterial community of the cæcum (R^2=0.35; p<0.05) and no environmental parameters were correlated to its structure.

Keywords : bacteria, cæcum, fæces, diversity index, structure

2. INTRODUCTION

In intensive rabbit breeding, digestive disorders are responsible for a high mortality rate, mainly during the period following weaning. In rabbits, the bacterial community of the digestive tract, and more especially of the cæcum, plays a major role in the health of the gut and in digestive efficiency (Gouet & Fonty, 1979). Therefore a better knowledge of the bacterial community of the cæcum is required to reduce the losses occurring in rabbit farming.

The cæcal microbial community has been mainly studied using culture techniques (Gouet & Fonty, 1979). But such techniques reveal only 20 to 40% of the real bacterial richness (Suau *et al.*, 1999). Few studies used culture-independent analysis of 16S rRNA genes. They demonstrated that the rabbit's cæcum harbors 80% to 96% of unknown bacterial species (Abecia *et al.*, 2005; Monteils *et al.*, 2008) and contains no anaerobic fungi and a higher proportion of *Archaea* than in the cow's rumen (Bennegadi *et al.*, 2003). The bacterial community contained a majority of *Firmicutes* (93%) and *Bacteroidetes* (4%; Monteils *et al.*, 2008). However, to our knowledge, variability of the cæcal bacterial community has never been studied for individual animals over time.

Rabbits belong to the rare cæcotrophic herbivorous species. The finest particles in the cæcum are selected continuously by antiperistaltic movements towards the cæcum and proximal colon to form soft fæces. Unlike hard fæces which are excreted, soft fæces are excreted and eaten by the rabbit, providing a protein and vitamin supply of bacterial origin. This particular digestive strategy contrasts with those of previously studied herbivores: the forestomach of ruminants (Tajima *et al.*, 1999), the large intestine of horses (Daly *et al.*, 2001) or the hindgut of termites (Schmitt-Wagner *et al.*, 2003). This suggests that the microbial community in the rabbit cæcum could differ from those of soft and hard fæces but also from those of digestive tract in other herbivores.

This study aimed *i)* to explore the stability over time of bacterial communities of cæcal content, soft and hard fæces using Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP), and *ii)* to establish relationships between the cæcal bacterial community and the cæcal environmental parameters (pH, redox potential, and volatile fatty acid concentrations).

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. EXPERIMENTAL DESIGN AND SAMPLING

In the experimental unit of UMR 1289 INRA TANDEM, fourteen 12-week-old white New Zealand x Californian rabbits were maintained in individual cages in a controlled environment during the five experimental weeks. The rabbits were fed *ad-libitum* a standard diet (18 % crude protein; 2.0 % crude fat; 14.2 % crude fiber; 19.4 % starch; 16.5% ADF) containing neither antibiotics nor coccidiostatics and had free access to fresh water. The rabbits were adapted to the diet 2 weeks before sampling. Animals were cared for in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 27 avril 1988).

Soft and hard fæces were collected once a week between 09:00 and 12:00 during 5 consecutive weeks on fixed days. Soft fæces were collected by placing a light plastic collar round the neck on the day of sampling (Gidenne & Lapanouse, 2000). To avoid stress, rabbits were familiarized with the collar several times during the 14 days before the experiment. Cæcal contents were collected surgically on the 3rd week as described by Bellier *et al.* (1995) and on the 5th week, after slaughtering by means of an overdose of thiopental (Nesdonal, Rhone Merieux) preceded by anesthesia (0.5 ml/kg Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany and 0.4 ml/kg Imalgène, Rhône Merieux). Surgery and slaughtering were performed just after collection of soft and hard fæces. On certain days some rabbits did not excrete soft (n=9) or hard fæces (n=1). A total of 158 samples were collected and immediately stored at -20°C until analysis.

3.2. DETERMINATION OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS

Environmental parameters were determined on the 5th week only. The cæcal pH and redox potential were recorded after anesthesia according to Kimsé *et al.* (2008). Measurements were recorded after 15 min for stabilization. A combined electrode was used to measure pH (Unitrode with Pt 1000; Metrohm, Heriseau, Switzerland). Redox potential was measured with a platinum electrode using Ag/AgCl as reference (combined Pt-ring electrode; Metrohm, Heriseau, Switzerland). The data obtained were corrected by adding the potential of the reference hydrogen electrode: +199 mV (Nordstrom, 1977). Concentrations of volatile fatty acids (VFA) were determined by automated gas separation (5890A, Hewlett Packard, Avondale, PA; Playne, 1985). NH3-N concentrations were determined by a colorimetric method as previously described by Hach *et al.* (1987).

3.3. DNA EXTRACTION, AMPLIFICATION AND CE-SSCP

Total DNA was extracted and purified with QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) from about 0.2 g of sample. The V3 region of the 16S rRNA genes, corresponding to a 205 bp fragment in Escherichia coli, was used as a diversity marker by performing PCR using the primers w49 5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' and 5'-6FAM-labeled w34 5'- TTACCGCGGCGTGCTGGCAC-3' (Delbès *et al.*, 1998; Zumstein *et al.*, 2000). PCR was carried out in a 50 µL reaction mixture containing 5 µL 10× buffer, 0.2 µM of each primer, 200 µM of each dNTP, 0.25 U Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, California, USA), 25 µg bovine serum albumin (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) and 1 µL of 200 times diluted DNA extract. The PCR program consisted of 2 min at 95°C, 30 cycles with 30 s at 94°C, 30s at 61°C, 30s at 72°C followed by a final extension at 72°C for 3 min. PCR product was checked for appropriate size by 1% agarose gel electrophoresis. The CE-SSCP mix contained 1 µL of PCR product, 7.8 µL of deionized formamid (Genescan, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) and 0.2 µL of the internal standard labelled with 6-carboxy-X-rhodamine (ROX HD400, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). The mixture was denatured at 95°C for 5 min and placed on ice before loading. CE-SSCP was performed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer using a 36 cm long capillary and a 7.2% non-denaturing polymer consisting of 80% CAP polymer (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), 10% glycerol and 10% 10xTBE buffer (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Electrophoresis was performed at 25°C for 3500 s at 15 KV. CE-SSCP produced 22000 scans chromatogram containing both sample and internal standard signal. The bacterial community was spread out in about 1200 scans. Events of co-migration of ribotypes belonging to different bacterial species may occur during capillary electrophoresis resulting in a single peak on the CE-SSCP profile (Zinger *et al.*, 2007). Thus we preferred to assume that a single peak corresponds to an operational taxonomic unit (OTU) assembly rather than to a single ribotype or a bacterial species. CE-SSCP profiles were aligned and normalized with SAFUM version 4.4 software running on Matlab version 6.0 (Zemb *et al.*, 2007).

3.4. DIVERSITY INDEX AND STRUCTURE OF COMMUNITIES

The diversity index is estimated by summarizing a complex community represented in a molecular fingerprint pattern by a single value by taking into account the number of species (number of peaks) and their relative abundance (area under each peak). The Simpson diversity

index was estimated as the negative logarithm of the Simpson index, designated D' (Rosenzweig, 1995).

The community structure of an ecosystem has been defined as a list of the species and their relative abundance in the community (Begon *et al.*, 1996). It was demonstrated that the migration of ribotypes within the CE-SSCP capillary is highly reproducible (Zinger *et al.*, 2007). Therefore comparison of the peak size for each scan of the profile shows which OTUs appear or disappear, or whose abundance has changed. Consequently, in the present paper, the study of the structure of the bacterial communities refers to the fine analysis of the size of the various peaks throughout the profiles.

3.5. STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were carried out using R version 2.6.1 (R development Core Team, 2007). The diversity index was subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD post-hoc test using individual animal, sample type, sampling week and interactions as fixed effects. This ANOVA model was applied to two data sets because cæcal content was not sampled in the 1^{st}, 2^{nd} and 4^{th} weeks. To begin with, the data from cæcal content were excluded from analysis to determine the stability over time of the bacterial diversity index in fæces. Next, the data from the 1^{st}, 2^{nd} and 4^{th} weeks were excluded from the analysis to compare the bacterial diversity index in the cæcum and fæces and to determine the influence of the individual animal. Pearson correlation coefficients between diversity index and pH, redox potential and VFA were calculated.

To study the structure of the bacterial communities, we calculated the pairwise Euclidean distances between the 158 CE-SSCP profiles. To explore this distance matrix, non-metric MultiDimensional Scaling (nMDS) was performed using 10000 random starts (Clarke, 1993). nMDS produced a two-dimensional display where each CE-SSCP profile was represented by a single plot. Analysis of similarity (ANOSIM) was performed on the distance matrix using 10000 Monte Carlo permutations. Global ANOSIM was performed to test the effects of sample type (cæcal content, soft and hard fæces) and then to test within the three sample types, the individual and week effects. Pairwise ANOSIM was used to determine which levels differed within a significant fixed effect (P-value<0.05). The ANOSIM-R value indicated the extent to which the groups differed (R>0.75: well separated groups; 0.50<R<0.75: separated but overlapping groups; 0.25<R<0.50: separated but strongly overlapping groups; 0.25<R: barely separated groups; Ramette, 2007). An iterative Mann-

Whitney test on the 1200 scans of the CE-SSCP profiles identified the OTU assemblies which differed between the two distinct communities.

Relationships between bacterial communities and environmental variables were studied using multivariate 50-50 *F*-test followed by a rotation test to assess significance (Langsrud, 2002; Langsrud, 2005). The 1200 scans of CE-SSCP profiles were treated as dependent variables and the environmental variables (pH, redox potential and VFA) as independent variables.

4. RESULTS

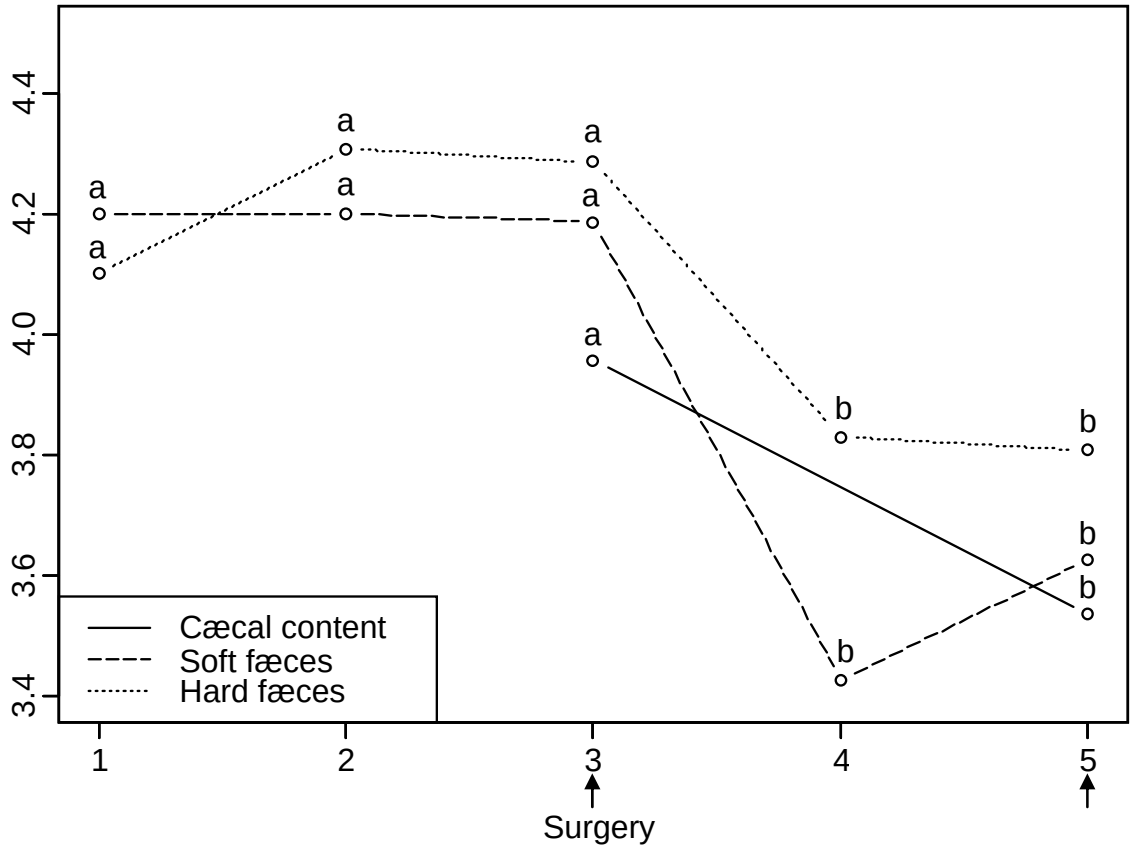


Figure 33. Dynamics of the Simpson diversity index for cæcal content and soft and hard fæces. Within a sample type, means with different letters were significantly different at $p<0.05$.

4.1. THE CÆCAL BIOTOPE

At slaughtering, the full cæcum represented 4.2 ± 0.7% of the rabbit body weight. The cæcal content was an acidic (pH = 6.03 ± 0.33), reductive (redox potential = -160 ± 43 mV) and humid (water content = 76 ± 9%) environment. Acetic, propionic and butyric acid concentrations were 64.9 ± 18.5 mM, 4.1 ± 1.3 mM and 11.3 ± 4.9 mM respectively.

Tableau 18. Effect of individual and sampling week on the bacterial community of cæcum, soft and hard fæces using global and pairwise ANOSIM statistical test.

Effect	Degree of similarity: R	Significance of R
Sample type	0.16	<0.001
Cæcal content (n=28) *vs* soft fæces (n=61)	0.13	<0.05
Cæcal content (n=28) *vs* hard fæces (n=69)	0.24	<0.001
Soft (n=61) *vs* hard fæces (n=69)	0.15	<0.001
Cæcal content		
Individual	0.15	NS[1]
3rd (n=14) *vs* 5th weeks (n=14)	0.22	<0.001
Soft fæces		
Individual	0.13	<0.001
Between 1st (n=12), 2nd (n=11), 3rd (n=14) weeks	<0.08	NS
4th (n=12) *vs* 5th (n=12) weeks	-0.05	NS
1st, 2nd, 3rd (n=37) *vs* 4th, 5th (n=24) weeks	0.33	<0.001
Hard fæces		
Individual	0.17	<0.001
Between 1st (n=14), 2nd (n=14), 3rd (n=14) weeks	<0.07	NS
4th (n=14) *vs* 5th (n=14) weeks	-0.02	NS
1st, 2nd, 3rd (n=42) *vs* 4th, 5th (n=28) weeks	0.30	<0.001

[1] NS, non-significant R value at p<0.05.

4.2. BACTERIAL COMMUNITIES IN CÆCAL CONTENT, SOFT AND HARD FÆCES

The diversity index of bacterial communities of cæcal content (4.0 ± 0.5), soft (3.9 ± 0.5) and hard fæces (4.1 ± 0.4) were not significantly different (Figure 33). CE-SSCP profiles were barely separated according to sample type (ANOSIM-R=0.16; p<0.001; Tableau 18, Figure 34). The bacterial community structure of cæcal content was closer to that of soft fæces than of hard fæces (ANOSIM-R=0.13 and 0.24 respectively; p<0.05; Tableau 18).

Differences in bacterial community structure between cæcal content and soft fæces occurred sporadically along the profile and applied to few OTU assemblies (17% of the profile; Figure 35). Conversely, the differences between cæcal content and hard fæces occurred more extensively along the profile (41% of the profile).

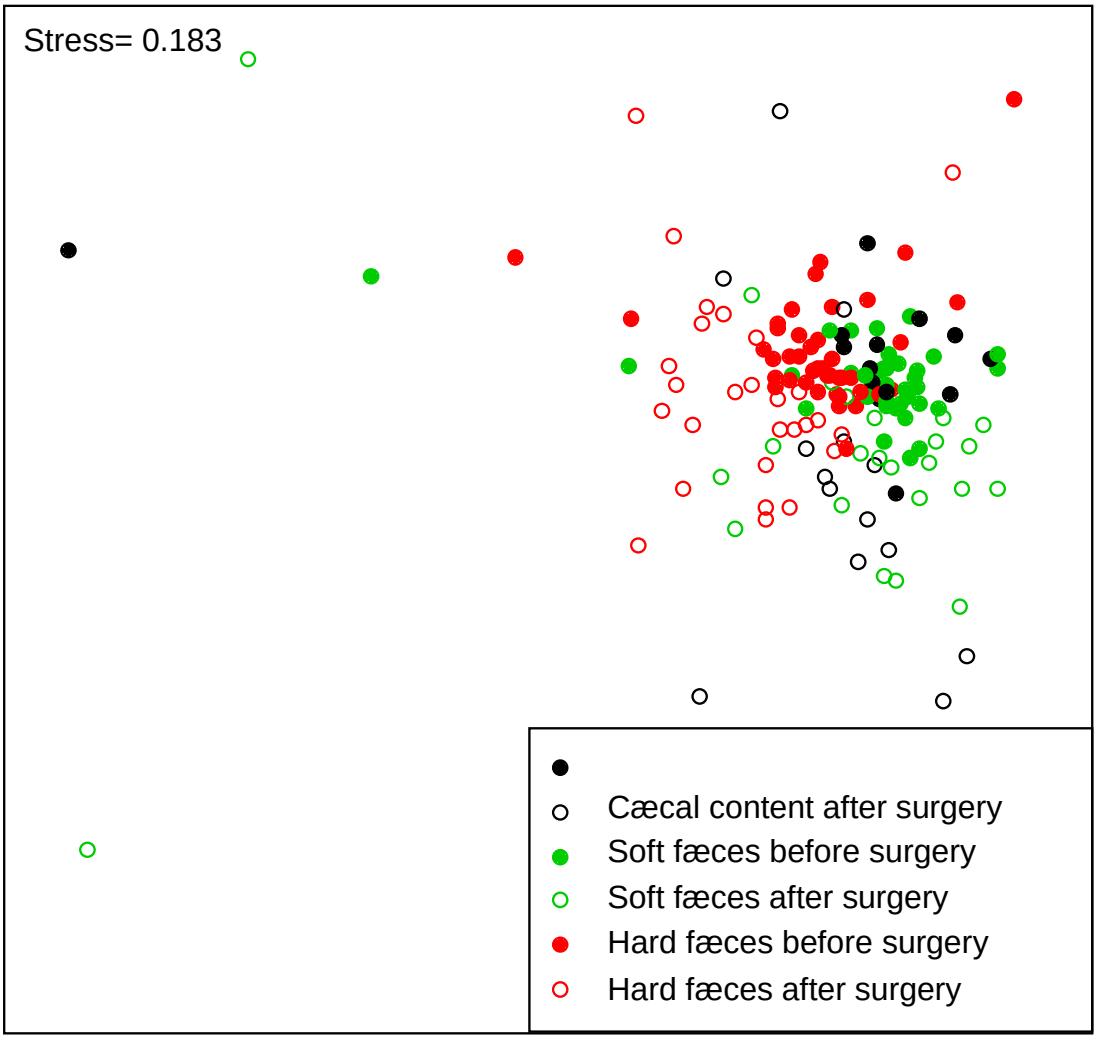


Figure 34. Two-dimensional nMDS plot of the 158 CE-SSCP profiles set according to sample type and surgery.

4.3. INDIVIDUAL EFFECT ON BACTERIAL COMMUNITY

CE-SSCP profiles of cæcal content did not cluster according to the rabbit from which they came (Tableau 18). Those from soft and hard fæces barely clustered for individuals (ANOSIM-R=0.13, 0.17 respectively; $p<0.001$). Bacterial diversity index varied between individuals ($p<0.001$) but this effect was due to a single rabbit (data not shown).

3.4. STABILITY OVER TIME AND EFFECT OF SURGERY ON BACTERIAL COMMUNITIES

CE-SSCP profiles of soft and hard fæces sampled from the 1st to the 3rd weeks did not cluster according to sampling week (Tableau 18). Similarly, bacterial diversity indexes of soft

and hard fæces were similar between the 1st and 3rd weeks (Figure 33). Conversely, the comparison of the profiles before (1st, 2nd and 3rd weeks) and after surgery (4th and 5th weeks) demonstrated that surgery to sample cæcal content greatly affected the bacterial community structure in both cæcum and fæces (ANOSIM-R=0.22, 0.33, 0.30 respectively for cæcal content, soft and hard fæces; p<0.001; Tableau 18). The differences in the bacterial community of cæcal content before and after surgery applied to numerous OTU assemblies located throughout the profiles (Figure 35). Indeed, 67 % of these scan values differed between the 3rd and the 5th week (Figure 35). Bacterial community diversity indexes of the cæcum and fæces decreased after surgery (3.7 ± 0.4 and 4.2 ± 0.4 respectively; p<0.001; Figure 35).

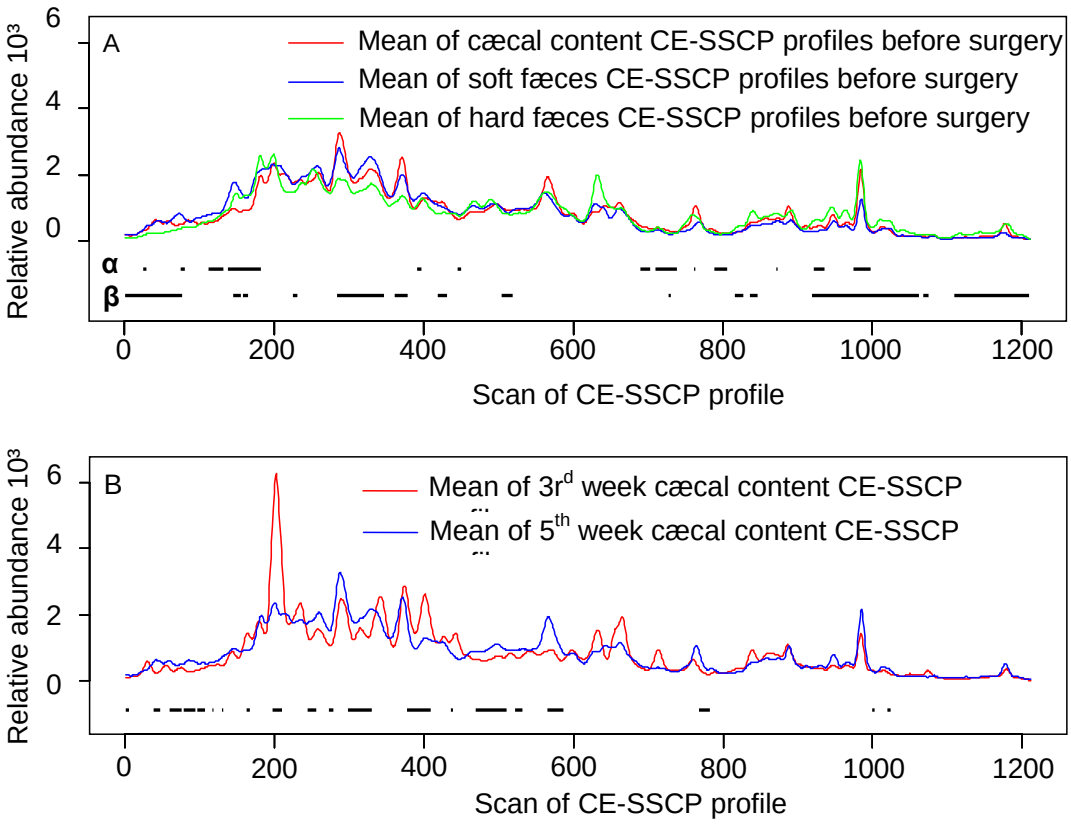


Figure 35. Structure differences of bacterial community between cæcal content, and soft and hard fæces before surgery (A) and effect of surgery in bacterial community structure in cæcal content (B).
Structure differences at p<0.05 were indicated by black horizontal lines. α, β: structure differences with cæcal content and soft and hard fæces respectively.

4.5. RELATIONSHIPS BETWEEN BACTERIAL COMMUNITY AND ENVIRONMENTAL PARAMETERS IN THE CÆCUM

In the cæcum, among the environmental parameters measured in the 5th week, only the redox potential was negatively correlated to the bacterial diversity index (R^2=0.35; $p<0.05$). Redox potential, pH and VFA were not correlated to the bacterial structure (NS).

5. DISCUSSION

In the present work we compared bacterial communities in the cæcum and in the soft and hard fæces of adult rabbits using CE-SSCP profiles of 16S rRNA gene fragments. The results showed that the diversity index was similar in the three communities and that the structure of the bacterial community of cæcal content was close to that of soft fæces. Without disturbance, the bacterial community structure and diversity index of fæces were stable. However, the surgical operation used to sample cæcal content affected the bacterial communities of both the cæcum and the fæces.

These results show that the diversity index of the bacterial community of the cæcum in adult rabbits was 3.8 ± 0.5. This is lower than has been observed in the bovine rumen using the same method (5.8 ± 0.5; Michelland *et al.*, 2007). The diversity index was similar between the cæcum and the two types of fæces. We also showed that the structure of the bacterial community in the cæcum is close to that in soft fæces and to a lesser extent to that in hard fæces. This may be linked with the digestive physiology and anatomy of the rabbit (Carabaño & Piquer, 1998). Indeed, soft fæces correspond to a slightly modified cæcal content which is excreted after a simple transit through the large intestine. Moreover, the cæcum is located at the end of the digestive tract, just before the large intestine where hard fæces are produced.

The results obtained before surgery demonstrated that both the diversity index and the structure of bacterial communities in soft and hard fæces did not change over time. This stability of the bacterial community in the gastrointestinal ecosystem was also observed over fifteen days in the sheep's rumen (Edwards *et al.*, 2005). Our results could be explained by i) the age of the animals, since cæcal fermentative activity has been shown to be fully developed from 6 weeks of age (Gidenne *et al.*, 2002), and ii) the highly controlled environment of breeding which limits exposure to microorganisms and provides a constant diet to the animals. The stability of the bacterial community meant that its resilience to a challenge could be studied (e.g. nutrition, feed additives or drugs). The surgical procedure used to sample cæcal content greatly affected the diversity index and the structure of the bacterial communities in the cæcum and in the soft and hard fæces. Consequently, the study of the

bacterial community in the cæcum over time is difficult since access to this ecosystem disturbs the animals. Gidenne *et al.* (1993) tested fistulation of the cæcum in rabbits to study cæcal fermentation. This technique avoids operating on the animals for each sampling but each opening of the fistula may disturb the bacterial community as oxygen enters. Our results show a link between the bacterial community of the cæcum and the highly reductive condition in the cæcum, as measured by the Eh. Indeed, the more reductive was the cæcal redox potential, the higher was the diversity index of the bacterial community in the cæcum. Besides, oxygen entry into the cæcum during surgery may explain the fall in the diversity index observed between the 3rd and the 4th week. The present results suggest that soft, and to a lesser extent hard fæces, could be a useful alternative to surgery to monitor changes in the cæcal bacterial community. Hence future studies will be easier and ethically more acceptable, since slaughter or surgery will no longer be necessary.

None of the environmental parameters studied were correlated with the structure of the bacterial community in the cæcum. This lack of a clear relationship between the bacterial community and the measured environmental parameters could be due to the high buffering capacity of the cæcal content (Ding *et al.*, 1997) and the relatively constant composition of the material entering the cæcum. Indeed, the rabbit is a monogastric animal whose food is hydrolyzed in the stomach and small intestine before entering the cæcum.

In the cæcum, the structure of the bacterial community did not differ between rabbits. These results suggest either that *i)* the host has little impact on the bacterial community or *ii)* the strong control of the extrinsic parameters (diet, housing) and the genetic similarity between individuals belonging to the same selected rabbit strain shaped the bacterial community in the same way. Similar results were recently observed in prepubescent turkeys (Scupham, 2007), but in the sheep's rumen, the bacterial community has been reported to be highly specific to each animal, the influence of the individual being larger than any other tested effects such as antibiotic treatment (Edwards *et al.*, 2005) or diet (Larue *et al.*, 2005).

6. CONCLUSIONS

In conclusion, in the absence of disturbance, the fæcal bacterial communities in adult rabbits were stable over time. This stability means that their resilience to a challenge (e.g. nutrition, feed additives or drugs) can be studied in the future. Environmental parameters were poorly related to microbial community of cæcum. Soft and to a lesser extent hard fæces, have

bacterial communities close to that of the cæcum and can be used instead of cæcal content to monitor changes in the cæcal bacterial community of the rabbit.

7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to technical assistance in the laboratory Carole Bannelier, Béatrice Gabinaud, Muriel Segura, Véronique Tartie and in the breeding center Patrick Aymard, Jacques De Dapper, Jean De Dapper, André Lapanouse. The work of the staff at the Centre de Ressources, Génotypage et Séquencage of Toulouse is gratefully acknowledged.

8. REFERENCES

Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ, McEwan NR (2005) Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* **244**(1)**:** 111-115

Anonymous (27 avril 1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française***:** 5608-5610

Begon M, Harper JL, Townsend CR (eds) (1996) *Ecology. Individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science, 1068pp

Bellier R, Gidenne T, Vernay M, Colin M (1995) In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* **73**(1)**:** 128-135

Bennegadi N, Fonty G, Millet L, Gidenne T, Licois D (2003) Effects of age and diatery fibre level on cæcal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease* **5:** 23-32

Carabaño R, Piquer J (1998) *The digestive system of the rabbit*, Vol. Chapter 1, CABI Publishing edn.: Wallingford, United Kingdom.

Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* **18**(1)**:** 117-143

Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* **38**(2-3)**:** 141-151

Delbès C, Godon J-J, Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digestor bacterial community. *Anaerobe* **4:** 267-275

Ding Z, Rowe JB, Godwin IR, Xu Y (1997) The buffering capacity of caecal digesta exceeds that of rumen digesta from sheep fed pasture or roughage diets. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**(5)**:** 723-728

Edwards JE, McEwan NR, McKain N, Walker N, Wallace RJ (2005) Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiology* **151:** 717-725

Gidenne T, Bellier R, Bouyssou T (1993) An improved technique for cecal cannulation in the rabbit - effect of sampling time after feeding on cecal VFA pattern. *Annales de Zootechnie* **42**(2)**:** 163

Gidenne T, Jehl N, Segura M, Michalet-Doreau B (2002) Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology* **92:** 107-118

Gidenne T, Lapanouse A (2000) Technical note : the measurement of soft faeces production is affected by the type of colar. *World Rabbit Science* **8:** 41-42

Gouet P, Fonty G (1979) Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* **19:** 553-566

Hach CC, Bowden BK, Kopelove AB, Brayton SV (1987) More powerful peroxide Kjeldahl digestion method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70:** 783–787

Kimsé M, Gidenne T, Bayourthe C, Monteils V (2008) A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit cæcum: relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Science***. 17**(2): 1257-5011

Langsrud Ø (2002) 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *The Statistician* **51:** 305-317

Langsrud Ø (2005) Rotation tests. *Statistics and Computing* **15:** 53-60

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology* **7**(4)**:** 530-543

Michelland R, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2007) Caractérisation des communautés bactériennes dans le rumen et les feces de bovins adultes par PCR-SSCP. In *Colloque d'Ecologie Microbienne*, p 71. La Grande Motte, France

Monteils V, Cauquil L, Combes S, Godon JJ, Gidenne T (2008) Potential core-species and satellite-species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 620-629

Nordstrom DK (1977) Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**(12)**:** 1835-1841

Playne MJ (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **36**(8)**:** 638-644

R development Core Team (2007) *R: a language and environment statistical computing.*, Vienna, Austria: R foundation for statistical computing.

Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**(2)**:** 142-160

Rosenzweig ML (1995) *Species diversity in space and time*, Vol. 10, Cambridge: Cambridge University Press.

Schmitt-Wagner D, Friedrich MW, Wagner B, Brune A (2003) Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (Cubitermes spp.). *Applied and Environmental Microbiology* **69**(10)**:** 6007-6017

Scupham AJ (2007) Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiology Ecology* **60:** 136-147

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(11)**:** 4799-4807

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y (1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology* **29**(2)**:** 159-169

Zemb O, Haegeman B, Delgenes JP, Lebaron P, Godon JJ (2007) Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular Ecology Notes* **7**(5)**:** 767-770

Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia R (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial ecology* **54**(2)**:** 203-216

Zumstein E, Moletta R, Godon J-J (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 69-78

COMPARAISON DES COMMUNAUTES D'*ARCHAEA* DANS LES FERMENTEURS DIGESTIFS ET LES FECES DE LA VACHE ET DU LAPIN

Rory Julien Michelland, Valérie Monteils, Sylvie Combes, Laurent Cauquil, Thierry Gidenne, Laurence Fortun-Lamothe

Mots clés: *Archaea*, structure, rumen, fèces, cæcum, indice de richesse

Titre abrégé: les communautés d'*Archaea* dans les systèmes digestifs

Résumé

L'objectif de ce travail était de comparer les communautés d'*Archaea* dans le tube digestif de deux modèles animaux qui possèdent des spécificités digestives. Pour cela, les communautés d'*Archaea* dans les fermenteurs digestifs et les fèces de la vache et du lapin ont été comparées par analyse des profils CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism) obtenus après amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S. Des échantillons de contenus ruminal et fécal ont été prélevés chez 5 vaches durant 3 semaines. Des crottes dures et des cæcotrophes ont été prélevés chez 14 lapins durant 3 semaines et des échantillons des contenus cæcaux ont été prélevés la 3ème semaine par voie chirurgicale. Nos résultats montrent que les communautés d'*Archaea* diffèrent entre les deux espèces modèles et entre les compartiments au sein du tube digestif. Chez les deux espèces, les communautés d'*Archaea* sont stables au cours du temps et varient très peu entre les individus. La similarité des communautés d'*Archaea* entre le contenu cæcal et les cæcotrophes nous permet d'utiliser les cæcotrophes comme une matrice alternative représentative du contenu cæcal. En conclusion, la communauté d'*Archaea* diffère entre les mammifères herbivores et à l'intérieur de leur tube digestif mais ont en commun une stabilité dans le temps et une faible variabilité individuelle.

COMPARISON OF THE *ARCHAEAL* COMMUNITY IN THE FERMENTATIVE COMPARTMENT AND FAECES OF THE COW AND THE RABBIT

Rory Julien Michelland 1,2,3, Valérie Monteils 2,1,3, Sylvie Combes 1,2,3, Laurent Cauquil 1,2,3, Thierry Gidenne 1,2,3, Laurence Fortun-Lamothe 1,2,3

1 INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France
2 Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France
3 ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

Running title: digestive archaeal community

Corresponding author. Name : Valérie Monteils. Mailing address: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, BP 32607, F-31326 Castanet Tolosan Cedex, France. E-mail: valerie.monteils@ensat.fr. Phone: 33 (5) 62 19 39 09. Fax: 33 (5) 62 19 39 01.

1. ABSTRACT

Aims: Studying of the archaeal community in the digestive tract of two animal models with different digestive specificities.

Methods and Results: The archaeal community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit were compared by analysis Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism (CE-SSCP) profiles of 16S rRNA genes. Ruminal and fæcal contents were sampled in five cows for three weeks. Hard and soft faeces were collected in 14 rabbits for three weeks and cæcal contents were sampled in the third week. The archaeal community differed according to the host species and to the location within the digestive tract. In both species, the archaeal community was stable over weeks and varied very little between individual animals. The similarity of the archaeal community between cæcal content and the soft faeces permitted to use the latter as a representative indicator.

Conclusions: The archaeal community varied between herbivorous mammals and within their digestive tract but was stable over three weeks and presented few inter-individuals variations.

Significance and Impact of the Study: Even if archaeal communities occurring between herbivores and within their digestive tracts were different, they seemed to present some common characteristics: a relative stability over time and between individuals.

Keywords: *Archaea*, community structure, cow rumen, faeces, rabbit cæcum, richness index

2. INTRODUCTION

In the digestive tract, methanogens belong exclusively to the domain of *Archaea* (Jones *et al.*, 1987). They have a key function in the final stage of organic matter decay by microorganisms in the digestive ecosystem. The degradation by microorganisms releases hydrogen and carbon dioxide. The methanogens use this hydrogen to reduce the carbon dioxide to methane. By removing hydrogen, methanogens help to improve the efficiency of fermentation and the reductive capacity of the ecosystem (Lange *et al.*, 2004). Animal producers of methane are found among both invertebrates and vertebrates, herbivores and carnivores, living in various environments, indicating that the presence of *Archaea* is independent of the climate, diet, and complexity of the digestive system (Lange *et al.*, 2004). The methane emitted by animals contributes to global warming (Moss, 1993) and to the loss of 6% to 8% of the ingested energy in intensively-bred animals (Boadi *et al.*, 2004; Johnson & Johnson, 1995). Consequently, the archaeal community has been studied in various species and especially in ruminants by quantification of methane emission (Hackstein & van Alen, 1996), cultural methods (Miller & Wolin, 1986; Miller *et al.*, 1986) and molecular tools (Skillman *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 2001b; Tatsuoka *et al.*, 2007; Tokura *et al.*, 1999). These studies have demonstrated the predominance in the animal digestive tract of *Methanobrevibacter sp.* associated with few *Methanomicrobium sp.*, *Methanobacterium sp.* and *Methanosarcina sp.* (Garcia *et al.*, 2000; Jarvis *et al.*, 2000). In herbivores, *Archaea* are principally present in the fermentative compartments because of *i)* the anaerobic conditions since oxygen is highly toxic to *Archaea* (Petersen *et al.*, 1998), *ii)* the intense fermentation activity that provides hydrogen and carbon dioxide and *iii)* the slow transit which allows intense fermentation (Mackie, 2002; Stevens & Hume, 1998). Fermentative compartments can be positioned either at the beginning or at the end of the digestive tract. Proximal fermentors are observed for example in ruminants whereas distal fermentors are observed in the majority of other herbivores. The rabbit possesses an extensively developed cæcum as a distal fermentative compartment, and is a cæcotrophic animal. During production of hard faeces, the largest particles of the cæcal content are sorted and excreted as hard faeces, corresponding to the true faeces. However during the production of soft faeces, the sorting activity decreases and a small part of the cæcal content is excreted as soft faeces (Ruckebusch & Hörnicke, 1977). Physicochemical characteristics (Carabaño *et al.*, 1988) and the bacterial community (Michelland *et al.*, 2008) of the cæcal content have been reported to be similar to those of soft faeces .

We hypothesize that the archeal community will differ according to the digestive strategies of two herbivorous mammals: the cow and the rabbit. Thus the aim of this study was to compare the archaeal community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit, which differ in their digestive physiology. To learn more about the archeal community dynamics (temporal and spatial variation) and about variation between individual animals, we studied this community using CE-SSCP of the V3 region of the archaeal 16S rRNA gene fragment.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. EXPERIMENTAL DESIGN

Five rumen-fistulated dry adult Prim Holstein cows were fed twice daily at 0800 h and 1700 h with a maintenance diet of 2 kg of hay, 2 kg of barley straw, 1 kg of ground maize and 0.08 kg of mineral supplement. They were adapted to the diet for 21 days before sampling. Samples from the ventral rumen and faeces were collected three hours after the morning meal once a week for three consecutive weeks. Ventral ruminal samples were filtered through a 1.6 mm sieve. Fourteen New Zealand x Californian adult rabbits (84 days old) were maintained in individual cages in a controlled environment. They were fed ad-libitum a standard diet (18 % crude protein; 2.0 % crude fat; 14.2 % crude fiber; 19.4 % starch; 16.5% ADF) containing no antibiotics or coccidiostats. They were adapted to the diet for two weeks before sampling. Soft and hard faeces were collected once a week for three consecutive weeks. Soft faeces were collected by fitting a collar on the day of sampling, as done by Gidenne and Lapanouse (2000). To avoid stress, the rabbits were adapted to the collar for 14 days before the experiment. Cæcal contents were collected surgically on the third week as described by Bellier *et al.* (1995). Cows and rabbits were cared for in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 27 avril 1988).

3.2. DNA EXTRACTION, PCR AND CE-SSCP

Total DNA was extracted and purified using QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, England) directly from about 0.2 g of sample. The V3 region of the 16S rRNA genes was amplified by semi-nested PCR. The primer sets Archf364/Archr1386 and Archf364/5'-6FAM-labeled w34 were used for the first PCR at an annealing temperature of 58°C and for the second PCR at and annealing temperature of 50°C respectively (Duthoit *et al.*, 2003; Skillman *et al.*, 2004). First PCR with Archf364 and Archr1386 primers ensured

highly specific amplification of a 1022 bp fragment of archaeal 16S rRNA genes. The second PCR with Archf354 and universal 5'-6FAM-labeled w34 primers maintained the specificity but provided a small 179 bp fragment in the V3 region of archaeal 16S rRNA genes necessary to be efficiently separated by CE-SSCP. PCR was carried out in a 50 µL reaction mixture containing 5 µL 10× buffer, 0.2 µM of each primer, 200 µM of each dNTP, 0.25 U Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene), 25 µg bovine serum albumin (Biolabs) and 1 µL of 200 times diluted DNA extract for the first PCR or 1 µL of DNA amplicons for the second PCR. The temperature program consisted of 2 min at 94°C, 35 cycles with 30 s at 94°C, 30s at annealing temperature, 30s at 72°C followed by a final extension at 72°C for 10 min. PCR products were checked for appropriate size by 1% agarose gel electrophoresis. The CE-SSCP mix contained 1 µL of PCR product, 7.8 µL of deionised formamid (Genescan, Applied Biosystem) and 0.2 µL of the internal standard labelled with 6-carboxy-X-rhodamine (ROX, Applied Biosystems-HD400). Mixes were denatured at 95°C for 5 min and placed on ice before loading. CE-SSCP was performed on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer using a 36 cm length capillary and a 7.2% non-denaturing polymer consisting of 80% CAP polymer (Applied Biosystems), 10% glycerol and 10% 10xTBE Buffer (Applied Biosystems). Electrophoresis was performed at 25°C for 3500 s at 15 KV.

3.3. CE-SSCP PROFILE PROCESSING

CE-SSCP profile processing and statistical analysis were computed with the program StatFingerprints version 1.2 (Michelland *et al.*, 2009b) working under R version 2.8.0 (R development Core Team, 2008). CE-SSCP profiles of the archaeal community were spread out in about 2000 scans. CE-SSCP profile processing required five successive steps *i)* alignment of the CE-SSCP profiles together using their internal standards, *ii)* definition of a common baseline between CE-SSCP profiles, *iii)* normalization to one of the total area under each CE-SSCP profile, *iv)* detection of peaks with an area above 2% of the total area, and v) transformation into presence/absence profiles. Alignment, baseline definition and normalization guarantee reliable comparison between CE-SSCP profiles. The 2% threshold allows peaks considered as noise to be deleted. Transforming CE-SSCP profiles into presence/absence profiles avoids the disturbances of the quantitative information due to biases of the semi-nested PCR. In all, 128 CE-SSCP profiles were generated by CE-SSCP. Due to the poor quality of the signal in some samples, we decided to omit 15 of the CE-SSCP profiles from the statistical analysis of, i.e. seven, six, one and one samples coming from rabbit hard faeces, rabbit soft faeces, cow rumen and cow faeces respectively.

3.4. DATA ANALYSIS

As soft faeces represent excreted cæcal content (Ruckebusch & Hörnicke, 1977), the similarity between archaeal communities (richness index and structure) in soft faeces and cæcal content was statistically tested. Indeed, the sampling of cæcal content using surgery is difficult and disturbs the microbial community (Michelland *et al.*, 2008).

Richness index was estimated by counting the number of detected peaks in each CE-SSCP profile. Firstly, the richness index was compared between soft faeces and cæcal content to test whether the soft faeces were representative of cæcal content. For this purpose, analysis of variance (ANOVA) was performed on the richness index of cæcal content and soft faeces collected during the third week. Next, after having verified the similarity of the richness index between cæcal content and soft faeces, the richness index was analyzed using analysis of variance for all data except that for cæcal content. The model included the host species (cow *vs* rabbit), the sample type (two levels: fermentative compartment i.e. cow rumen and rabbit soft faeces, and faeces i.e. cow faeces and rabbit hard faeces), the week of sampling (three levels), and their interactions as main effects. As the interaction between host species and sample type was significant, data were finally analyzed to study first the host species' effect and then, within each host species, the sample type, sampling week and host individual animal effects.

In the present paper, the study of the structure of the archaeal community refers to the fine analysis of the presence / absence of peaks throughout the profiles. The proximity between each pair of CE-SSCP profiles was achieved by calculating the Dice-Sørensen similarity coefficient: $Q = \frac{2(n_i \cap n_j)}{n_i + n_j}$, where ni and nj are the number of scans present respectively in the ith and jth CE-SSCP profiles (Dice, 1945; Sørensen, 1948). To explore these proximities, non-metric MultiDimensional Scaling (nMDS) was performed using 10000 random starts (Clarke, 1993). A two-dimensional display was produced by nMDS where each CE-SSCP profile was represented by a single point. The degree to which the plot matched the underlying proximities between CE-SSCP profiles was assessed by using the Kruskal stress. A Kruskal stress value below 0.2 represents a reliable ordination (Clarke, 1993). Analysis of similarity (ANOSIM) was performed on the proximities between CE-SSCP profiles using 10000 Monte Carlo permutations. For the ANOSIM analysis, a first step compared the similarity of the soft faeces and cæcal content. As the archaeal communities of these two sample types were not different, a second step was applied with the soft faeces used to study

the fermentative compartment of the rabbit. Global ANOSIM was performed to test the effects of host species, sample type, sampling week and individual on the structure of the archaeal community. Pairwise ANOSIM was used as a post hoc test to determine which levels within fixed effects significantly differed from each other. The factor tested was considered to be significant when $P<0.05$. The ANOSIM-R value indicated the extent to which the groups differed (ANOSIM-R > 0.75: well separated groups; 0.50< ANOSIM-R < 0.75: separated but overlapping groups; 0.25 < ANOSIM-R < 0.50: separated but strongly overlapping groups; 0.25 < ANOSIM-R: barely separated groups; Ramette, 2007). An iterative Fisher's exact test on the 2000 scans of the CE-SSCP profiles identified the scans which differed between the two distinct communities studied.

4. RESULTS

4.1. REPRESENTATIVENESS OF THE ARCHAEAL COMMUNITY OF SOFT FAECES TO ANALYSE THE CÆCAL CONTENT

Neither the richness index (9.7 ± 2.5, 10.1 ± 3.1 for the cæcum and the soft faeces respectively; NS) nor the structure of the archaeal community (ANOSIM-R= 0.03, P=NS) differed between the cæcal content and the soft faeces. Consequently, soft faeces were used in this study as a reliable indicator of the archaeal community of the rabbit cæcum.

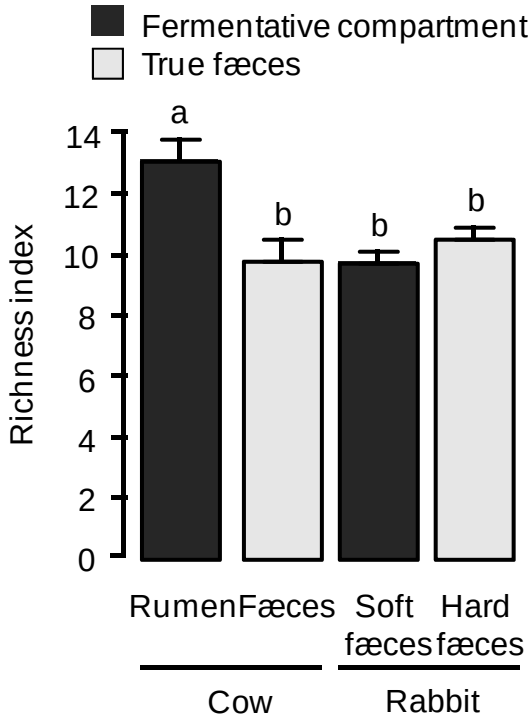


Figure 36. Richness index of the archaeal community according to fermentative compartment and faeces of cow and rabbit.
Mean values with the same letter were not significantly different at p=0.05.

4.2. HOST SPECIES' EFFECT

The richness index of the archaeal community of the digestive fermentative compartment was higher in cows than in rabbits (13.1 ± 2.6, 9.7 ± 2.5 for cows and rabbits respectively; $P<0.05$; Figure 36). Also, the structure of the archaeal communities in the fermentative compartment differed between the cow and the rabbit (ANOSIM-R=0.53; $P<0.001$; Tableau 19 and Figure 37). Several peaks, representing 18% of the scans, distributed throughout the profiles, differed significantly between the fermentative compartments of both host species (Figure 38).

Concerning faeces, the richness index of the archaeal community did not differ between the two species (9.8 ± 2.7, 10.2 ± 2.4, respectively for the cow and the rabbit; Figure 36). However the structure of the archaeal communities differed between the faeces of the two species (ANOSIM-R=0.72; $P<0.001$; Tableau 19 and Figure 37). The structures of the communities were different for 20% of the scans (Figure 38).

Tableau 19. Effect of host species, sample type and sampling week on the structure of the archaeal community

CE-SSCP profile groups	ANOSIM-R	P
Host species comparison		
Fermentative compartment: cow rumen (n=14) *vs* rabbit soft faeces (n=36)	0.53	<0.001
True faeces: cow faeces (n=14) *vs* rabbit hard faeces (n=35)	0.72	<0.001
Cow		
Sample type: rumen (n=14) *vs* faeces (n=14)	0.37	<0.001
Sampling week (n=28)	0.05	NS
Individual cow (n=28)	0.02	NS
Rabbit		
Sample type: Soft faeces (n=36) *vs* hard faeces (n=35)	0.52	<0.001
Sampling week (n =71)	-0.01	NS
Individual rabbit (n=71)	0.18	<0.05

NS: not significantly different (p> 0.05). n: number of CE-SSCP profiles included in the analysis.

4.3. ARCHAEAL COMMUNITY OF THE COW

The richness index of the archaeal community in the rumen was higher than that of the faeces (P<0.01; Figure 36). The structure of the archaeal communities differed slightly between the rumen and the faeces (ANOSIM-R=0.37, P<0.001; Tableau 19 and Figure 37). This difference corresponded to 7 % of the scans clustered within the CE-SSCP profile (Figure 38). Both structure and richness index of the archaeal communities in the rumen and in the faeces of the cow were similar over three consecutive weeks and are similar between individual animals (Tableau 19).

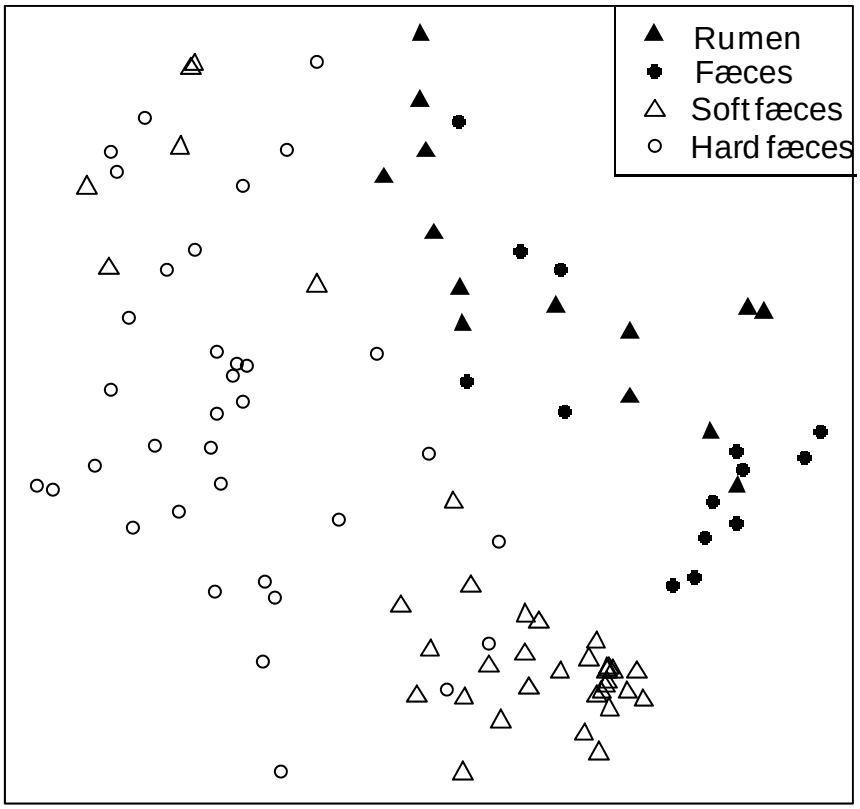


Figure 37. Two-dimensional nMDS plot of cow and rabbit CE-SSCP profiles of the archaeal community.
The stress of the nMDS is 0.18.

4.4. ARCHAEAL COMMUNITY OF THE RABBIT

Richness index was not significantly different between soft faeces, representative of the rabbit fermentative compartment, and hard faeces (Figure 36). However the structure of the archaeal community of the soft faeces differed from that of the hard faeces (ANOSIM R=0.52, P<0.001; Tableau 19 and Figure 37). The differences occurred for 20% of the scans, scattered along the CE-SSCP profile (Figure 38). The structure and the richness index of the archaeal communities in soft and hard faeces did not differ between the three weeks of the experiment (Tableau 19) but differed between individuals (P<0.05 for richness index; ANOSIM-R=0.18, P<0.05 for structure; Tableau 19). However, this inter-individual variation was only due to one rabbit. Hence, if CE-SSCP profiles of this rabbit were to be omitted from the statistical analysis, both the structure and the richness index of the archaeal community would not differ between individuals (data not shown).

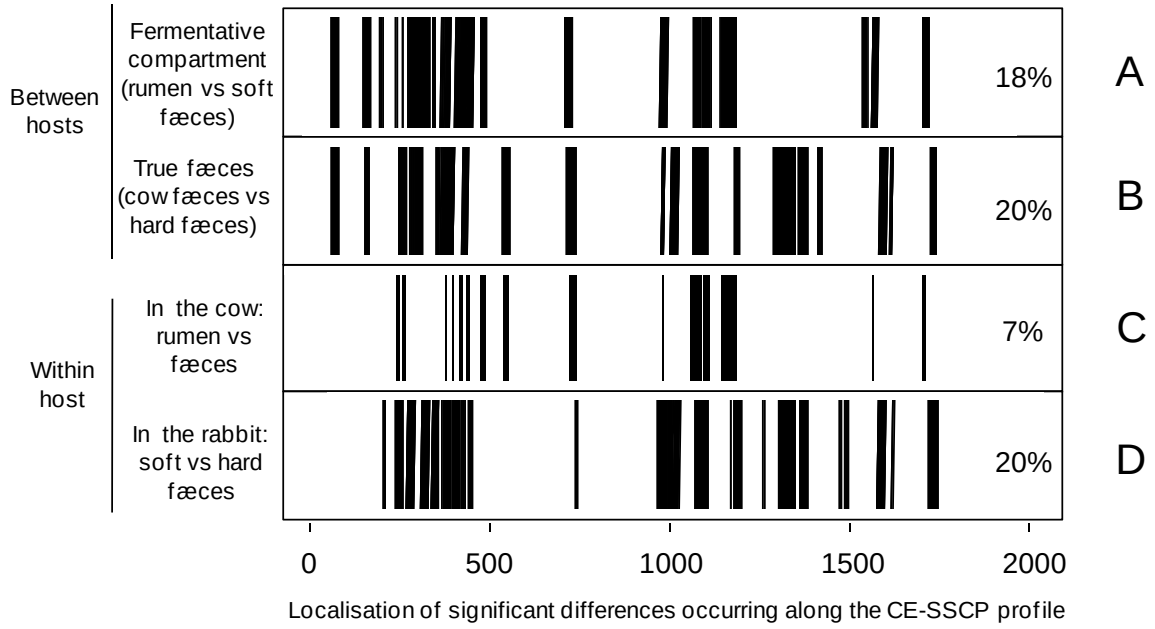


Figure 38. Localization archaeal in digestive tract of significant differences occurring along the CE-SSCP profile between the fermentative compartment (A) and faeces (B) of the two host species, between the rumen and the faeces of the cow (C), and between the soft and the hard faeces of the rabbit (D).
Differences at $p<0.05$ are indicated by black vertical bars. The percentage of scan significantly different is indicated at the right.

5. DISCUSSION

The CE-SSCP used in this study is a high throughput fingerprint method which has been successfully applied to investigate the ecology of microorganisms in many different environments (Brinkmann *et al.*, 2008; Hori *et al.*, 2005; Zinger *et al.*, 2008). In this study, the archaeal communities in the digestive tract (fermentative compartment and faeces) of two herbivorous species, the cow and the rabbit, were compared by analysis of 16S rRNA gene fragments using CE-SSCP. The archaeal communities were considered different if at least one of the criteria used was different: either richness index or community structure.

Our study demonstrated that the structure and the richness index of the archaeal community were similar in the cæcum and in the soft faeces. With the same method (CE-SSCP) and data analysis used in this study, Michelland *et al.* (2008) found similar bacterial communities for cæcal content and soft faeces. This result was in accordance with the digestive physiology of the rabbit since soft faeces are in fact cæcal content covered by a mucus envelope secreted in the colon (De Blas & Wiseman, 1998) resulting in a similar physico-chemical composition (Carabaño *et al.*, 1988; Fraga *et al.*, 1991). Consequently, in the present study to study the archaeal community, the soft faeces were used as an alternative

to the cæcal content which is difficult to access without disturbing the digestive physiology of the host. To our knowledge, this study is the first accurate investigation of the archaeal community in the rabbit cæcum and faeces with molecular technologies.

Within the rabbit digestive tract, our results showed that the structure of archaeal communities differed between the soft faeces and the true faeces. To our knowledge, the comparison of the archaeal community or of the methane emission between cæcum and faeces has never been investigated in the rabbit. However, this result could be explained by the digestive physiology of the rabbit. Indeed, hard faeces correspond to the bigger particles of the cæcal content which are sorted and then excreted whereas soft faeces correspond to the whole cæcal content covered by a mucus layer (Björnhag, 1972; Pickard & Stevens, 1972). As a consequence, the chemical composition of the soft faeces is quite different from that of hard faeces, with more proteins in soft faeces (300 and 170 g kg-1 dry matter respectively for soft and hard faeces) and more fibrous particles in hard faeces (180 and 300 g kg-1 dry matter respectively for soft and hard faeces; (Carabaño *et al.*, 1988; Fraga *et al.*, 1991). Such differences in chemical composition of soft and hard faeces could explain why they contain different archaeal communities. Moreover some authors demonstrated that the greater the concentration of fibrous particles, the more methanogens were present in the community (Miller, 1995; Minato *et al.*, 1992; Morvan *et al.*, 1996).

Within the cow's digestive tract, our results showed different archaeal community structures between the fermentative compartment (the rumen) and the faeces, coupled with a larger number of species in the rumen than in the faeces. As far as we know, no comparison of the archaeal community between faeces and rumen of the cow has ever been published. A positive relation between the number of methanogens, of cellulolytic organisms and the fiber proportion in the rumen content was observed in several animals (Miller, 1995; Minato *et al.*, 1992; Morvan *et al.*, 1996). From 50 to 80 % of fiber lysis occurred in the rumen and thus the fiber content of faeces is lower than in rumen (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008c). These two findings may explain the smaller archaeal community development in the faeces than in the rumen observed in our study.

The structure of the archaeal community differed in the fermentative compartment of the two herbivores, and the number of molecular species (richness index) was higher in the cow rumen than in the rabbit cæcum. Conversely, Bennegadi *et al.* (2003) demonstrated that the archaeal community represents 12.1% of the total RNA in 70-day-old rabbits, while it does not exceed 2% in the cow (Lin *et al.*, 1997). This could be explained by the primers

used. Indeed, the archaeal diversity revealed from 16S rRNA gene clone libraries sequencing has been shown to depend on the choice of the archaeal-specific primers (Skillman *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 2001b). In this study, the primers Arch f364/Arch r1386 were used because i) they are more specific and reliable than other developed primers, ii) they accurately represent the archaeal species inhabiting the mammal digestive tracts (Skillman *et al.*, 2006). However, the 1022 bp amplicons were too long to be efficiently discriminated by CE-SSCP. Thus, the PCR-products obtained were re-amplified with primers Archf364/universal 5'-6FAM-labeled w34 (Duthoit *et al.*, 2003) to lead to both specific and short fragments of 179 bp. The present method was highly specific to the *Archaea* domain and provided a huge polymorphism of the fragment conformations needed for CE-SSCP. All these results suggested that in the rabbit cæcum the richness of the archaeal community was less than in the cow rumen. When comparing the archaeal community in the true faeces of both species, we observed different structures but a similar number of species. A previous study using cultural methods demonstrated the presence of hundreds of times more methanogens in the faeces of cattle compared to that of the rabbit (Sorlini *et al.*, 1988). These results were strikingly different and need to be elucidated using molecular quantitative methods.

Our results demonstrated no inter-individual variability of the archaeal community between five cows and 13 rabbits. However, in vivo and in vitro studies of methane emission of cæcal content in adult rabbits have shown that only some individuals exhibit a high methane production (Belenguer *et al.*, 2008; Marounek *et al.*, 1999; Piattoni *et al.*, 1996). In the human colon, a great variability of the methanogen quantity and methane production has been reported between individuals (Doré *et al.*, 1995; El Oufir *et al.*, 1996; Pochart *et al.*, 1993), but this was more related to environmental than to genetic effects (Florin *et al.*, 2000). In the same way, in our study, the animals shared the same environment, the same breeding, the same cage for rabbits and the same cattle shed for cows. Such a situation may induce contamination with digestive flora and hence a similar archaeal community

In accordance with current opinion (Florin *et al.*, 2000), no variation in the archaeal community during the three weeks of the experiment was recorded in either host species. This suggests a relative stability of communities from week to week. In different species, great variability in the quantity of *Archaea* was observed during the early days after birth but not after the ecosystem reached maturity. Indeed, the density of the archaeal population remained stable after about one month in the lamb rumen (Morvan *et al.*, 1994; Skillman *et al.*, 2004). In the rabbit, the amount of *Archaea* varies until 70 days (Bennegadi *et al.*, 2003). However,

no investigation was conducted after this age to study the stability of the archaeal community in the mature cæcal ecosystem.

6. CONCLUSION

In conclusion, the present study demonstrates that the digestive tract of the cow and the rabbit harbor two different archaeal communities. These communities were stable from week to week and presented very little or no inter-animal variation. In both animals, comparison between fermentative compartments and faeces showed that the archaeal community varied along the digestive tract.

7. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to technical assistance in the lab and in the breeding center. The work of the staff at the Centre de Ressources, Génotypage et Séquencage of Toulouse is gratefully acknowledged.

8. REFERENCES

Anonymous (27 avril 1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française***:** 5608-5610

Belenguer A, Fondevila M, Balcells J, Abecia L, Lachica M, Carro M (2008) In vivo and in vitro study of caecal fermentation pattern and methanogenesis in rabbits. In *9th World Rabbit Congress*. Verona, Italy

Bellier R, Gidenne T, Vernay M, Colin M (1995) In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* **73**(1)**:** 128-135

Bennegadi N, Fonty G, Millet L, Gidenne T, Licois D (2003) Effects of age and diatery fibre level on cæcal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease* **5:** 23-32

Björnhag G (1972) Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swedish Journal of Agricultural Research* **2:** 125-136

Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Masse D (2004) Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* **84**(3)**:** 319-335

Brinkmann N, Martens R, Tebbe CC (2008) Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of Manduca sexta (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Applied and Environmental Microbiology* **74**(23)**:** 7189-7196

Carabaño R, Fraga MJ, Santomá G, de Blas JC (1988) Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. *Journal of Animal Science* **66:** 901-910

Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* **18**(1)**:** 117-143

De Blas C, Wiseman J (1998) *The nutrition of the rabbit*, Wallingford, UK: CABI Publishing.

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26:** 297-302

Doré J, Pochart P, Bernalier A, Goderel I, Morvan B, Rambaud JC (1995) Enumeration of H2 utilizing methanogenic archaea, acetogenic and sulfate-reducing bacteria from human feces. *FEMS Microbiology Ecology* **17:** 279–284

Duthoit F, Godon J-J, Montel M-C (2003) Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(7)**:** 3840-3848

El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, Barry JL, Cloarec D, Bornet F, Galmiche JP (1996) Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* **38**(6)**:** 870-877

Florin THJ, Gu Z, Kirk KM, Martin NG (2000) Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *American Journal of Gastroenterology* **95**(10)**:** 2872-2879

Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2008) Les communautés microbiennes du tube digestif des mammifères: diversité et structure. In *Les écosystèmes digestifs*, Lavoisier (ed), pp 71-118. Paris, France

Fraga MJ, De Ayala PP, Carabaño R, De Blas JC (1991) Effect of type of fiber on the rate of passage and on the contribution of soft feces to nutrient intake of finishing rabbits. *Journal of Animal Science* **69:** 1566-1574.

Garcia J-L, Patel BKC, Ollivier B (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**(4)**:** 205-226

Gidenne T, Lapanouse A (2000) Technical note : the measurement of soft faeces production is affected by the type of colar. *World Rabbit Science* **8:** 41-42

Hackstein JHP, van Alen TA (1996) Fecal methanogens and vertebrate evolution. *Evolution* **50:** 559-572

Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y (2005) 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. *Journal of Microbiological Methods* **66**(1)**:** 165-169

Jarvis GN, Strömpl C, Burgess DM, Skillman LC, Moore ERB, Joblin KN (2000) Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current microbiology* **40**(5)**:** 327-332

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**(8)**:** 2483-2492

Jones WJ, Nagle DP, Whitman WB (1987) Methanogens and the diversity of archaebacteria. *Microbiological Reviews* **51**(1)**:** 135-177

Lange M, Westermann P, Kiær Ahring B (2004) Archaea in protozoa and metazoa. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66:** 465-474

Lin C, Raskin L, Stahl DA (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **22**(4)**:** 281-294

Mackie RI (2002) Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integrative and Comparative Biology* **42**(2)**:** 319-326

Marounek M, Fievez V, Mbanzamihigo L, Demeyer D, Maertens L (1999) Age and incubation time effects on in vitro caecal fermentation pattern in rabbits before and after weaning. *Archives of Animal Nutrition* **52**(2)**:** 195-201

Michelland R, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Monteils V, Fortun-Lamothe L (2008) Characterization of bacterial communities in caecum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). In *proceedings of the nineth World Rabbit Congress*, p 294. Verona, Italy

Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Lamothe L, Cauquil L (2009) Statfingerprints: a friendly graphical interface program for microbial fingerprint profiles processing and analysis. *Molecular Ecology Resources* **in press**

Miller T (1995) Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reprodution*, Verlag FE (ed), pp 317-331. Stuttgart, Germany

Miller TL, Wolin MJ (1986) Methanogens in human and animal intestinal tracts. *Systematic and Applied Microbiology* **7:** 223-229

Miller TL, Wolin MJ, Kusel EA (1986) Isolation and characterization of methanogens from animal feces. *Systematic and Applied Microbiology* **8:** 234-238

Minato H, Otsuka M, Shirasaka S, Itabashi H, Mitsumori. M (1992) Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *Journal of General and Applied Microbiology* **38:** 447-456

Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G, Gouet P (1996) Quantitative determination of H2-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current Microbiology* **32**(3)**:** 129-133

Morvan B, Dore J, Rieu-Lesme F, Foucat L, Fonty G, Gouet P (1994) Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiology Letters* **117**(3)**:** 249-256

Moss AR (1993) *Methane-Global Warming and Production by Animals.*, Canterbury, UK: Chalcombe Publications.

Petersen JN, Bereded-Samuel Y, Skeen RS (1998) The effect of oxygen exposure on the methanogenic activity of an anaerobic bacterial consortium. *Environmental Progress* **17**(2)**:** 104-110

Piattoni F, Demeyer D, Maertens L (1996) In vitro study of the age-dependent caecal fermentation pattern and methanogenesis in young rabbits. *Reproduction Nutrition Development* **36**(3)**:** 253-261

Pickard WD, Stevens CE (1972) Digesta flow through the rabbit large intestine. *American Journal of Physiology* **222:** 1161-1166

Pochart P, Lemann F, Flourie B, Pellier P, Goderel I, Rambaud JC (1993) Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* **105:** 1281–1285

R development Core Team (2008) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**(2)**:** 142-160

Ruckebusch Y, Hörnicke H (1977) Motility of the rabbit's colon and caecotrophy. *Physiology & Behavior* **18:** 871-878

Skillman, Evans, Naylor, Morvan, Jarvis, Jorblin (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**(5)**:** 277-285

Skillman LC, Evans PN, Strompl C, Joblin KN (2006) 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* **42**(3)**:** 222-228

Sørensen T (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *K Dan Vidensk Selsk Biol Skr* **5:** 1-34

Sorlini C, Brusa T, Ranalli G, Ferrari A (1988) Quantitative determination of methanogenic bacteria in the feces of different mammals. *Current Microbiology* **17:** 33-36

Stevens CE, Hume ID (1998) Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews* **78**(2)**:** 393-427

Tajima K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI (2001) Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters* **200**(1)**:** 67-72

Tatsuoka N, Mohammed N, Mitsumori M, Tajima K, Hara K, Kurihara M, Itabashi H (2007) Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Animal Science Journal* **78**(5)**:** 512-518

Tokura M, Chagan I, Ushida K, Kojima Y (1999) Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology* **39**(3)**:** 123-128

Zinger L, Gury J, Alibeu O, Rioux D, Gielly L, Sage L, Pompanon F, Geremia RA (2008) CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *Journal of Microbiological Methods* **72**(1)**:** 42-53

PARTIE 3 : CARACTERISATION DE LA REPONSE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES A UNE PERTURBATION NUTRITIONNELLE PERMANENTE : EFFET D'UNE AUGMENTATION DU RATIO AMIDON/FIBRES

Dans cette dernière partie, nous avons étudié la réponse des fermenteurs digestifs à une perturbation d'origine nutritionnelle maintenue pendant plusieurs semaines. Pour cela nous avons choisi d'augmenter le ratio amidon/fibres de le ration distribuée à l'hôte car il a été montré précédemment qu'une réduction de la teneur en fibres dans l'alimentation engendre des troubles sanitaires chez le lapin (augmentation de la mortalité suite à des troubles digestifs) et chez la vache (acidose). L'objectif de cette partie est de caractériser la réponse de la communauté bactérienne, son ampleur et sa mise en place, à ce type de perturbation. Outre un intérêt fondamental sur les capacités de réponse des écosystèmes microbiens, cette partie a pour but d'enrichir les connaissances sur les possibilités de contrôle du microbiote par l'alimentation afin d'améliorer les performances (efficacité digestive) et de diminuer les problèmes sanitaires dans les filières bovins lait et cunicole (santé digestive).

Notre objectif étant de réaliser une approche comparée entre la vache et le lapin, nous nous sommes attachés à décliner ces essais dans ces deux espèces de la façon la plus proche possible et avons ensuite traité les échantillons, exploité et analysé les données de façon contemporaine et similaire. Néanmoins, cette volonté a été confrontée aux différences physiologiques entre les deux espèces. En effet, les modèles de perturbation nutritionnelle appliqués dans les deux espèces sont de même nature (augmentation du ratio amidon/fibres) mais ont été réfléchis pour avoir un sens vis-à-vis des besoins nutritionnels et de la physiologie des deux espèces étudiées.

SUIVI DYNAMIQUE SUR 2 MOIS DE L'EVOLUTION DES POPULATIONS BACTERIENNES DOMINANTES DANS LE RUMEN EN REPONSE A UNE PERTURBATION NUTRITIONNELLE

R.J., Michelland, V. Monteils, S. Combes, L. Cauquil, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe

Mots clés : perturbation nutritionnelle, dynamique, microbiote, vache, fraction ruminale, qPCR, CE-SSCP

Titre abrégé : Perturbation nutritionnelle et populations bactériennes du rumen

Résumé

Le but de ce travail était d'étudier la réponse de la communauté bactérienne du rumen de la vache en réponse à une perturbation nutritionnelle induite par une augmentation du ratio amidon/fibres. Quatre vaches ont été nourries avec un régime riche en fibres durant 21 jours puis brusquement nourries avec un régime alimentaire riche en amidon durant 33 jours. Les fractions liquide et solide du contenu ruminal ont été collectées régulièrement avant (n=13) et après la perturbation (n=23). Les communautés bactériennes ont été caractérisées par CE-SSCP tandis que les populations de Bactéries totales, de *Bacteroides Prevotella* et de *Firmicutes* ont été quantifiées par qPCR. Les principaux paramètres physico-chimiques ont été mesurés dans la fraction liquide du rumen. Dans les deux fractions, la perturbation nutritionnelle a réduit de 6% l'indice de diversité des communautés bactériennes ($P<0.001$) mais n'a pas affecté leur structure. De plus, le nombre de copies de gène des Bactéries, des *Firmicutes* et des *Bacteroides Prevotella* diminue légèrement (de 1 à 2% ; $P<0.01$). Après la perturbation, l'environnement ruminal est devenu plus acide (-0.5 unité ; $P<0.001$), moins réducteur (+54 mV, $P<0.001$) et présente une augmentation de la concentration en AGV totaux (+26%, $P<0.001$) et une réduction de la concentration en NH_3-N (- 48%, $P<0.001$). Avant la perturbation, les communautés bactériennes fluctuent de façon sporadique atour d'un état constant. Après la perturbation, les communautés bactériennes continuent à fluctuer mais autour d'un état différent. La fraction solide du rumen a un indice de diversité plus élevé (+17%, $P<0.001$) et une quantité des divisions bactériennes étudiées plus importante (de 4 à 7%, $P<0.001$) que la fraction liquide. Les réponses à la perturbation nutritionnelle sont similaires entre les deux fractions.

2-MONTHS DYNAMIC OF THE RUMEN PREDOMINANT BACTERIAL DIVISIONS IN RESPONSE TO A NUTRITIONAL DISTURBANCE

R.J., Michelland[1,2,3], V. Monteils[2,1,3], S. Combes[1,2,3], L. Cauquil[1,2,3], T. Gidenne[1,2,3], L. Fortun-Lamothe[1,2,3]

[1] INRA, UMR 1289 TANDEM, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [2] Université de Toulouse, INPT-ENSAT, UMR 1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [3] ENVT, UMR 1289 TANDEM, F-31076 Toulouse, France.

Running title : Nutritional disturbance of the rumen bacteria

Corresponding author. Name : Valérie Monteils. Mailing address: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, BP 32607, F-31326 Castanet Tolosan Cedex, France. E-mail: valerie.monteils@ensat.fr. Phone: 33 (5) 62 19 39 09. Fax: 33 (5) 62 19 39 01.

1. ABSTRACT

This work aimed to study the response of the bacterial community in the bovine rumen to a nutritional disturbance induced by an increase of the dietary starch/fiber ratio. Four cows were fed a high-fiber diet during 21 days and suddenly switched into a high-starch diet during 33 days. Liquid and solid fractions of the rumen contents were collected regularly before (n=13) and during the challenge (n=23). The bacterial communities were characterized by CE-SSCP and the total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* were quantified by qPCR. In addition, main physico-chemical parameters were measured in the liquid fraction of the rumen. In both fractions, the nutritional disturbance reduced by 6% the diversity index of the bacterial community ($P<0.001$) but did not affect its structure. Furthermore, the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* decreased slightly (from 1 to 2%; $P<0.01$). After the disturbance, the ruminal environment became more acid (-0.5 unit, $P<0.001$), less reductive (+54 mV, $P<0.001$) with an increase of total VFAs concentration (+26%, $P<0.001$) and a decrease of NH_3-N concentration (- 48%, $P<0.001$). The bacterial community reached different states before and after the disturbance but presented sporadic fluctuations without any clear trends around these states. The solid fraction of the rumen had a higher diversity index (+17%, $P<0.001$) and higher quantities of bacterial divisions (from 4 to 7%, $P<0.001$) than the liquid fraction. The responses to the nutritional disturbance were similar for the both fractions.

Keywords: nutritional disturbance, dynamic, microbiota, cow, ruminal fraction, qPCR, CE-SSCP

2. INTRODUCTION

Rumen is composed of a complex symbiotic microbiota which is in charge of biomass degradation at relatively rapid rate under anaerobic conditions (Flint, 1997). The rumen contains a majority of *Bacteria* (10^{10-12} cell ml^{-1}), and also *Protozoa* (10^{8-9} cell ml^{-1}), and *Archaea* (10^{7-9} cell ml^{-1} ; Klieve & Swain, 1993; Mackie *et al.*, 1997). Among bacteria, the predominant divisions are the *Firmicutes* and the *Bacteroide*s associated with few *Spirochaetes* and *Proteobacteria* (Tajima *et al.*, 1999) In the rumen, the *Bacteria* were spread out in three main micro-niches: *i)* free-living in the rumen fluid, *ii)* associated with feed particles and *iii)* associated with rumen epithelium (Czerkawski & Cheng, 1988; McAllister *et al.*, 1994; Miron *et al.*, 2001). Specific bacterial communities have been reported to inhabit each micro-niche (Cho *et al.*, 2006; Larue *et al.*, 2005; Sadet *et al.*, 2007; Tajima *et al.*, 1999). Indeed, Cho et al (2006) using clone library sequencing reported 30%, 75.7%, 5.6% of *Firmicutes* and 67.5%, 10.8% and 94.4% of *Cytophaga Bacteroides Prevotella* respectively among bacteria associated to fluid fraction, feed particles fraction and rumen epithelium. The composition of diet offered to the cow (high-fiber *vs* high-starch diets) have been reported to change the bacterial communities of both the rumen fluid and feed particles fraction (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2003a; Larue *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 2001a; Tajima *et al.*, 1999; Whitford *et al.*, 1998). In contrary, the bacterial community associated with epithelium did not differ according to the diet (Sadet *et al.*, 2007). The adaptation of the bacterial community to a modification of the nutrient supply has been studied in several works using cultural methods (Goad *et al.*, 1998; Hungate, 1968; Nocek, 1997; Owens *et al.*, 1998; Slyter, 1976) and one clone library sequencing (Tajima *et al.*, 2000). Tajima *et al.* demonstrated that 3 days after a permanent dietary switch, the rumen contained six-times more *Bacteroides Prevotella* and a quarter less of *Firmicutes* than just before the disturbance. The concentrations of *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* reached approximately the initial level 28 days after disturbance. This study demonstrated the adaptability of the bacterial community to nutrient supply but also highlighted lack of knowledge concerning dynamic of community after disturbance using closer interval of sampling and both qualitative and quantitative information of the whole community.

Consequently, this study aims to evaluate the response of the ruminal ecosystem to a nutritional disturbance consisting in a sudden and permanent switch from a high-fiber diet to a high-starch diet. The bacterial community was characterized, in both liquid and solid fraction, by two complementary molecular approaches: the CE-SSCP to analyse the bacterial structure

and estimate the bacterial diversity, and the quantitative PCR to quantify total *Bacteria* and the main *Bacteria* divisions i.e. *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella*. Simultaneously, several environmental parameters were measured to evaluate the impact of the disturbance on the bacteria environment. The data obtained before and after disturbance permitted to study the correlations between the bacterial community and its environment.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. EXPERIMENTAL DESIGN

Four non-lactating Prim Holstein cows fistulated in the rumen were kept indoors in individual pens of the experimental unit of UMR 1289 TANDEM (Poucharramet, France) during the 56 days of the experiment. They were fed with 10.5 kg gross day^{-1} of a high-fiber diet from the 1^{st} to the 21^{st} day of the experiment. The high-fiber diet consisted of 57% of hay alfalfa, 24% of ground corn and 19% of wheat straw which resulted of 13.1% cellulose, 13.3% hemicellulose, 12.3% starch and 11.5% crude protein. Animals were adapted to the high-fiber diet during 3 weeks before the experiment. The 22^{nd} day of experiment, animals were suddenly switched to a high-starch diet until the end of the trial. They were fed with 23 kg gross day^{-1} of the high-starch diet consisting on 87% corn silage, 9% ground corn and 4% soybean meal. The high-starch diet was composed of 16.2% cellulose, 17.0% hemicellulose, 26.7% starch and 6.2% crude protein. During the whole experiment, the cows were fed twice daily at 0900 h and 1700 h with free access to fresh water and a mineral salt mix. The cows were cared for in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 27 avril 1988).

3.2. SAMPLING, MEASUREMENT AND DETERMINATION OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS

All samplings and measurements were achieved in the ventral site of the rumen. Samplings and measurements were performed 3 hours after morning meal (at 1200 h). Before the nutritional disturbance, samplings and measurements were done the 1^{st}, 3^{rd}, 5^{th}, 8^{th}, 10^{th}, 13^{th} days and each day from the 15^{th} to the 21^{st} day. After the dietary switch, samplings and measurements were done each day from the 22^{nd} to the 36^{th} day, and the 38^{th}, 40^{th}, 43^{rd}, 45^{th}, 47^{th}, 50^{th}, 52^{nd} and 54^{th} days of the experiment. For microbial analyses, approximately 250 mL of ruminal content was collected. To separate the liquid and solid fractions, a filtration through a 250 µm sieve was done with pressure of 54N during 60 seconds. Samples of about 200 mg of the rumen fluid fraction (in the filtrate) and of the feed particle fraction (in the

retentate) were collected. At all 288 samples were collected and stored at -20°C until microbial analyses.

The pH and the redox potential were measured with the *ex-vivo* anaerobic method developed by Marden *et al.* (2005). The redox potential data were corrected by adding the potential of the reference hydrogen electrode, *i.e.* +199 mV (Marden *et al.*, 2005; Nordstrom, 1977). Others environmental parameters were determined in the fluid fraction obtained after the 250 µm-filtration of the ventral rumen content. For volatile fatty acids (VFA) determination, 10 mL of liquid fraction were added to 1 mL of 2% $HgCl_2$. Quantification of VFA was performed by automated gas chromatography (5890 Series II with a flame-ionization detector, Hewlett-Packard, Avondale, PA) according to Playne (1985). For NH_3-N determination, 10 mL of liquid fraction were added to 100 µL of H_2SO_4. NH_3-N concentration was determined with a colorimetric method by a Continuous Flow Analyzer (SAN++, Skalar, Norcross, Georgia,USA) as previously described by Krom (1980).

3.3. DNA EXTRACTION

Total genomic DNA from about 200 mg of sample was extracted and purified with QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, England) according to the manufacturer's instructions.

3.4. 16S rRNA GENE PCR-CE-SSCP

The V3 region of the 16S rRNA genes was used as a bacterial diversity marker using the primers w49 and 5'-6FAM-labeled w34 (Delbès *et al.*, 1998; Zumstein *et al.*, 2000). PCR assays were performed as previously described (Michelland *et al.*, 2009c) using Isis DNA Polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France). The capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) was performed on an ABI Prism 3100 Genetic (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) as previously described (Michelland *et al.*, 2009c).

3.5. ANALYSIS OF BACTERIAL COMMUNITY

CE-SSCP profiles were aligned, normalized and diversity index was estimated using StatFingerprints program version 1.3 (Michelland *et al.*, 2009b) running on R version 2.8.3 (R development Core Team, 2008). Diversity index was estimated for each CE-SSCP profile using $-\log_{10} \sum(a_i)^2$ with a_i the relative area under the i^{th} peak (Haegeman *et al.*, 2008; Rosenzweig, 1995).

The community structure of an ecosystem has been defined as a list of the species and their relative abundance in the community (Begon *et al.*, 1996). In the present paper, the study of the structure of the bacterial communities refers to the fine analysis of the size of the various peaks throughout the CE-SSCP profiles.

3.6. REAL TIME QPCR

The primers were designed or modified from literature using the software ARB (Ludwig *et al.*, 2004) and the 16SrDNA database SSURef_96_SILVA_04_10_08_opt.arb generated by the SILVA project (Pruesse *et al.*, 2007). The specificity of the primers was evaluated by the calculation of the matching efficiency defined as the ratio of the number of matching sequences to the total number of sequences in the target database (Yu *et al.*, 2005). As suggested by Smith and Osbone (2009), for the design of primers and probe, amplicons size, melting temperature (T_m), percentage of G+C bases possibility of self complementarity of the sequence were investigated using Primer express software (version 2.0, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Assays were performed using the ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) using optical grade 384-well plates in a final volume of 10 µL. TaqMan qPCR technology was used for absolute quantification of *Bacteria* and *Bacteroides Prevotella*. SYBR Green qPCR technology was used for absolute quantification of *Firmicutes*. TaqMan reaction mixture contained 2.5 µl of 200-times diluted template DNA, a mix of primer (200 nM) and of TaqMan probe (250 nM for total bacteria and archaea or 150 nM for bacteroides prevotella respectively; Tableau 20) and 5 µl of TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). SYBR Green assays reaction mixture contained 2.5 µl of 200-times diluted template DNA, a specific primer set at 100 nM (Tableau 20) and 5 µl of Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). The PCR program consisted of 10 min at 94°C, followed by 40 cycles with 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C. A dissociation curve was added to SYBR Green assays to check the

specificity of the amplification. At least four nonzero standard concentrations were used in each assay.

Standard curves were generated by amplification of the serial ten-fold dilutions of plasmid (from 10^4 to 10^9 copy number) containing the 16S rRNA gene sequence of *Ruminococcus albus* (acc: EF445158; 1489 pb), *Butyvibrio fibrisolvens* (acc: EF445262; 1504 pb) and *Prevotella bryantii* (acc: EF445235; 1490 pb) for quantification of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* respectively. Plasmid concentrations were measured using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). The copy number for each reaction was calculated from the standard curves.

16S rRNA-gene-targeted group primers set to *Firmicutes* and *Bacteroides* developed or adapted in our study (Layton *et al*. 2006 and Guo *et al*. 2008b) were highly specific. Indeed, primers and probe for *Bacteroides Prevotella* quantification with zero mismatch allowance matched with almost 92% of the targeted sequences in the database, 0% of not-*Bacteroides* and *not-Prevotella Bacteria* (Tableau 20). Primers for *Firmicutes* quantification with zero mismatch allowance matched with almost 78% of the targeted sequences in the database and only 4% of not-*Firmicutes Bacteria*.

Tableau 20. PCR primers and probes used for qPCR assays

Target group qPCR assay	Primer / Probe	sequence (5' → 3')	E. Coli numbering	Size (bp)	Tm (°C)	Matching efficiency (%)				References
						Target group[α]		Upper group minus target group[β]		
						0 M	2 M	0 M	2 M	
Total *Bacteria*										
Bact1369F	Forward	CGGTGAATACGTTCYCGG	1369-1386	142	59.2	80	92	0	1	(Suzuki *et al.*, 2000)
Bact1492R	Reverse	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	1492-1513		54.7	ND	ND	ND	ND	(Suzuki *et al.*, 2000)
TM1389F	Probe	6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-MGB	1389-1407		58.6	58	77	0	34	(Suzuki *et al.*, 2000)
Bacteroides Prevotella										
296F21	Forward	GAGAGGAAGGTCCCCCACATT	296-316	110	60.1	92	99	0	0	(Layton *et al.*, 2006) modified in this study
385R21	Reverse	CACGCTACTTGGCTGGTTCAG	385-405		59.5	98	100	0	3	(Layton *et al.*, 2006) modified in this study
375R29	Probe	6FAM-CCATTGACCAATATT CCTCACTGCTGCCT-TAMRA	375-404		69	98	100	5	27	(Layton *et al.*, 2006)
Firmicutes										
Firm1048F20	Forward	ACAGGTGGTGCATGGTTGTC	1048-1066	170	57.9	90	100	4	70	(Guo *et al.*, 2008a) modified in this study
Firm1196R23	Reverse	CATAAGGGGCATGATGATTTGAC	1196-1217		59.2	78	99	4	18	This study

We used the SILVA database SSURef_96_SILVA_04_10_08_opt.arb (Pruesse *et al.*, 2007) with an align quality up to 75% and a pintail up to 50%. The matching efficiency of primers and probe was calculated as the ratio of the number of matching sequences to the total number of sequences in the target database. α: the target group matching efficiency were calculated with specific databases for total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* qPCR assays and contained respectively 249635, 14359 and 89610 sequences. β: the upper group minus target group matching efficiency corresponded to total *Eucarya* plus *Archaea*, total *Bacteria* minus *Bacteroides Prevotella* and total *Bacteria* minus *Firmicutes*, respectively for the total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* qPCR assays. The upper group minus target group databases contained 36996, 235276 and 160025 sequences, respectively for the total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* qPCR assays. Abbreviations: Tm, melting temperature according to Primer express software (version 2.0, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA); M, mismatch; ND, not determined.

3.7. STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were carried out using StatFingerprints version 1.3 (Michelland *et al.*, 2009b) running on R version 2.8.3 (R development Core Team, 2008).

To test the effect of the nutritional disturbance on the environmental parameters (pH, redox potential, total VFA, acetic acid, butyric acid, propionic acid and NH3-N), analyses of variance (ANOVA) were used with the period as fixed effect (2 levels : before and after the nutritional disturbance). The evolution of the environmental parameters were tested in two subsequent analyses using ANOVA and Tukey's honest significant differences (HSD) post-hoc tests with sampling days as fixed effect. The first analysis concerned the data obtained before the disturbance (13 levels) and the second one, the data obtained after the disturbance (23 levels).

To test the effect of the nutritional disturbance on the qPCR data and the diversity index, ANOVA were used with the period (two levels: before and after disturbance), the ruminal fraction (2 levels: liquid or solid) and their interaction as fixed effects. The dynamic of the community were tested in two subsequent analyses (before and after disturbance data sets) using ANOVA and Tukey's HSD with sampling days, ruminal fraction and their interaction as fixed effects.

To test the effect of the nutritional disturbance in both ruminal fractions on the structure of the bacterial community (whole CE-SSCP profiles data), a centered and scaled principal components analysis (PCA) and a fifty-fifty multivariate ANOVA (FF-MANOVA) with 10000 rotations (Langsrud, 2002; Langsrud, 2005) were used. The FF-MANOVA was performed using period (before or after nutritional disturbance), the ruminal fraction (liquid or solid) and their interaction as fixed effects. When effect was significant, an iterative Mann-Whitney test was applied on each scan of the CE-SSCP profiles to identify the scan position which differed along the CE-SSCP profile. The dynamic of the bacterial community structure before and after the nutritional disturbance were tested in two subsequent analyses using FF-MANOVA with sampling days, ruminal fraction and their interaction as fixed effects.

The correlations between the environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* in the fluid fraction were calculated using a centered and scaled PCA. The correlation between the structure of the bacterial community in the fluid fraction (whole CE-SSCP profiles data) and the environmental parameters were investigated separately before and after nutritional

disturbance using redundancy analysis (RDA) with 10000 Monte Carlo permutations (Legendre & Legendre, 1998). Prior to the RDA, the environmental parameters included in the model were selected using a stepwise selection. As environmental parameters were expressed in different units, they were standardized to zero mean and unit variance prior to RDA.

4. RESULTS

4.1. ENVIRONMENTAL PARAMETERS

Tableau 21. Effects of the nutritional disturbance on the environmental parameters of the rumen.

	disturbance		significance
	before	after	
pH	6.67 ± 0.11	6.21 ± 0.18	P<0.001
Redox potential (mV)	-222 ± 17	-168 ± 38	P<0.001
NH_3-N (mmol L^{-1})	142.0 ± 42.3	74.3 ± 35.8	P<0.001
Total VFAs (mmol L^{-1})	77.0 ± 15.6	96.9 ± 13.6	P<0.001
C2 (mmol L^{-1})	54.3 ± 10.9	63.6 ± 9.1	P<0.001
C3 (mmol L^{-1})	12.5 ± 2.6	17.1 ± 3.4	P<0.001
C4 (mmol L^{-1})	7.0 ± 1.7	12.5 ± 2.1	P<0.001

Abbreviations: C2, acetic acid; C3 propionic acid; C4 butyric acid. Mean ± standard deviation.

As expected, the diet composition modified the ruminal environment. The nutritional disturbance induced a more acidic (-0.5 unit) and a less reductive environment (+54 mV; P<0.001; Tableau 21). The fermentative pattern was also affected with a decrease of 48% of the NH_3-N concentration and an increase of 26% of the total VFAs concentration (P<0.001). VFAs concentrations increased by 17%, 37% and 79% for acetic, propionic and butyric acids concentrations, respectively (P<0.001).

Before the nutritional disturbance, the pH, the redox potential, the total VFAs, the acetic acid and propionic acid proportions were stable over time (Figure 39). The NH_3-N and butyric acid concentrations varied over time but these overall changes were observed on non-consecutive sampling days (P<0.05).

After the nutritional disturbance, the pH varied in time (P<0.01) with punctual and sporadic fluctuations. The redox potential increased progressively during the entire post-disturbance period (from -239 mV to -114 mV from the 22nd day to the 52nd day; P<0.001). The NH_3-N evolved sporadically from the disturbance until the 32nd day (95 ± 27 mmol l^{-1}; P<0.001) and then remained stable at a lower level (57 ± 27 mmol l^{-1}) until the end of the

experiment. All VFAs (total VFAs, acetic, propionic and butyric acids) concentrations were stable over time after the disturbance.

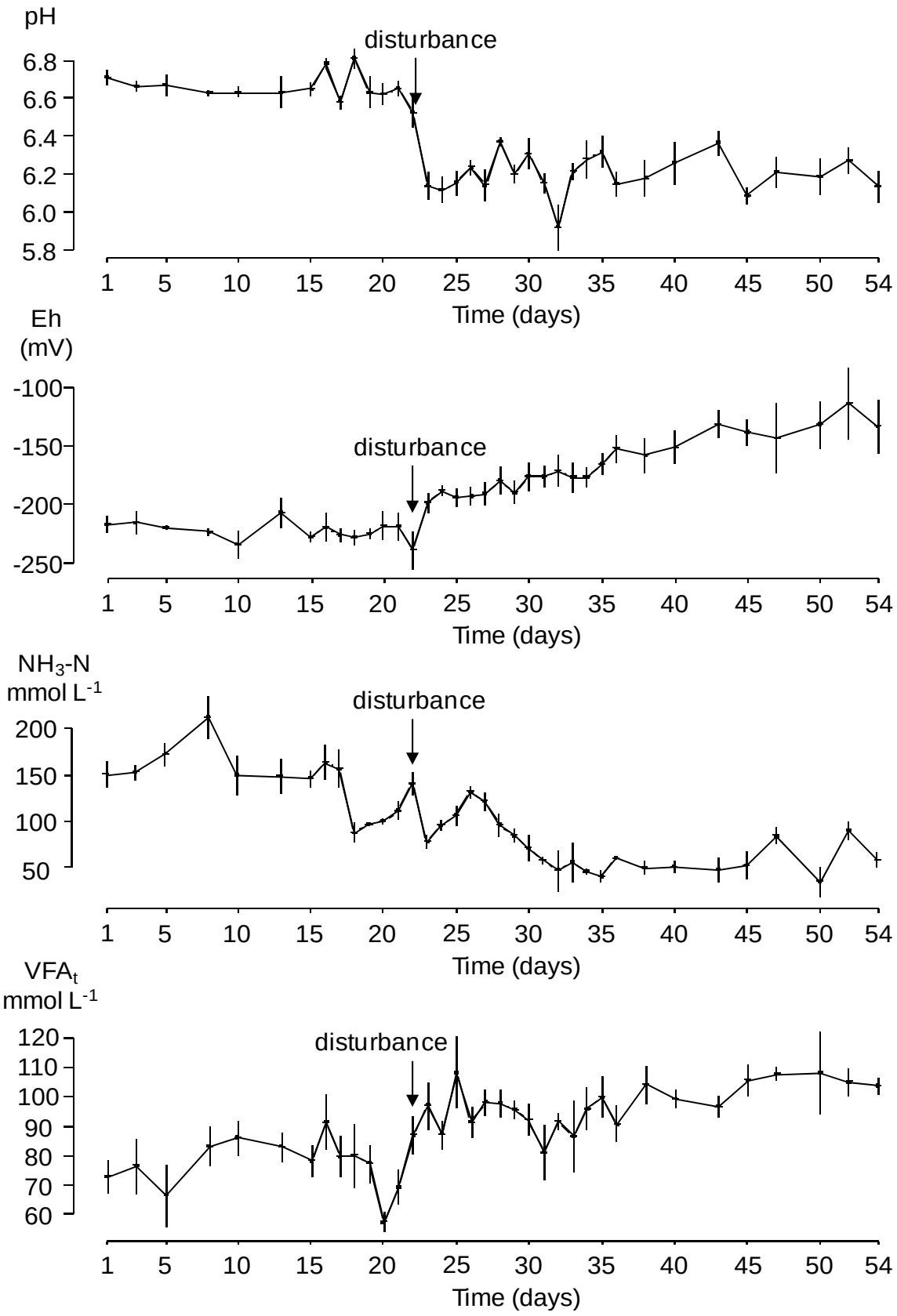


Figure 39. Dynamics of the pH (A), the redox potential (B), the NH3-N (C) and the total VFAs (D).

NS stands not significant at $p<0.05$. Abbreviations: SBD, stability before nutritional disturbance; SAD, stability after nutritional disturbance.

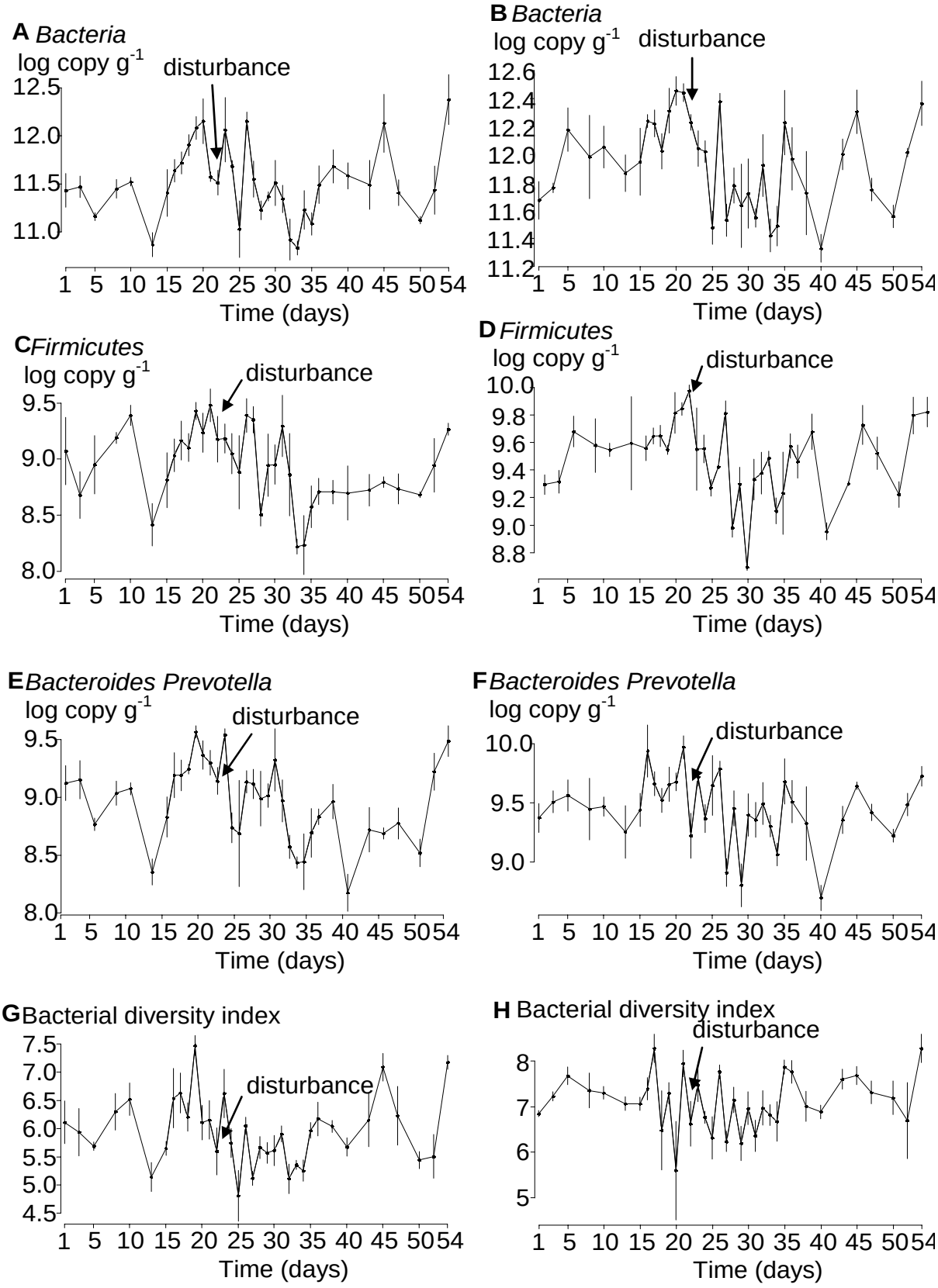


Figure 40. Dynamics of the number of gene copies of *Bacteria, Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and of the bacterial diversity index in rumen liquid fraction (A, C, E and G respectively) and solid fraction (B, D, F, and H respectively).
L'effectif est de 4 observations par point

4.2. QUANTIFICATION OF 16S RDNA COPIES NUMBER

The number of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* logarithm gene copies were 1%, 2% and 2% lower after the nutritional disturbance than before (P<0.001; Tableau 22). Moreover, the liquid fraction of the rumen contained respectively 4%, 7% and 4% less *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* logarithm gene copies than the solid fraction (P<0.001).

Before the nutritional disturbance, the number of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* gene copies spontaneously evolved in time in both fractions (P<0.01, Figure 40), except the number *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* gene copies in the solid fraction. However, these evolutions corresponded to frequent, punctual and sporadic fluctuations.

After the nutritional disturbance, the number of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* gene copies evolved in time in both fractions (P<0.01). These variations are less sporadic than before disturbance but clear trends are difficult to evidence.

4.3. BACTERIAL DIVERSITY INDEX

The bacterial diversity index decreased of 6% after the nutritional disturbance (P<0.001; Tableau 22). The bacterial diversity index in the rumen fluid fraction was 17% lower than in the solid fraction (P<0.001). In both ruminal fractions, the bacterial diversity index evolved in time before and after the nutritional disturbance without clear trends (P<0.05; Figure 40).

4.4. STRUCTURE OF THE BACTERIAL COMMUNITY

The structure of the bacterial community evolved over time in both fractions (FF-MANOVA P<0.001; data not shown). However, these dynamics were not caused by the nutritional disturbance but by sporadic and punctual fluctuations before as well as after the disturbance (data not shown). These fluctuations explained 35% of the variance of the CE-SSCP profiles.

The structure of the bacterial community differed between the rumen liquid and solid fractions (FF-MANOVA P<0.001, data not shown) but PCA showed a strong overlapping of the bacterial community structures between both fractions (Figure 41A). Indeed, only 7% of the variance of the CE-SSCP profiles set was explained by the ruminal fraction and corresponded to 77% of the scans which are located throughout the CE-SSCP profile

($P<0.05$). These differences were more related to change in peaks relative size than in appearance/disappearance of peaks (Figure 41B).

Tableau 22. Effects of the nutritional disturbance and the ruminal fraction on the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and the bacterial diversity index.

	Disturbance		Fraction		Significance		
	Before	After	liquid	solid	Disturbance	Fraction	Disturbance × Fraction
Bacteria (log copy g gross $^{-1}$)	11.8 ± 0.5	11.7 ± 0.5	11.5 ± 0.5	11.9 ± 0.4	<0.01	<0.001	NS
Firmicutes (log copy g gross $^{-1}$)	9.3 ± 0.5	9.1 ± 0.5	8.9 ± 0.5	9.5 ± 0.4	<0.001	<0.001	NS
Bacteroides Prevotella (log copy g gross $^{-1}$)	9.3 ± 0.4	9.1 ± 0.5	9.0 ± 0.4	9.4 ± 0.4	<0.001	<0.001	NS
Diversity index	6.8 ± 0.9	6.4 ± 1.0	6.0 ± 0.8	7.2 ± 0.8	<0.001	<0.001	NS

NS stands not significant at $p<0.05$.

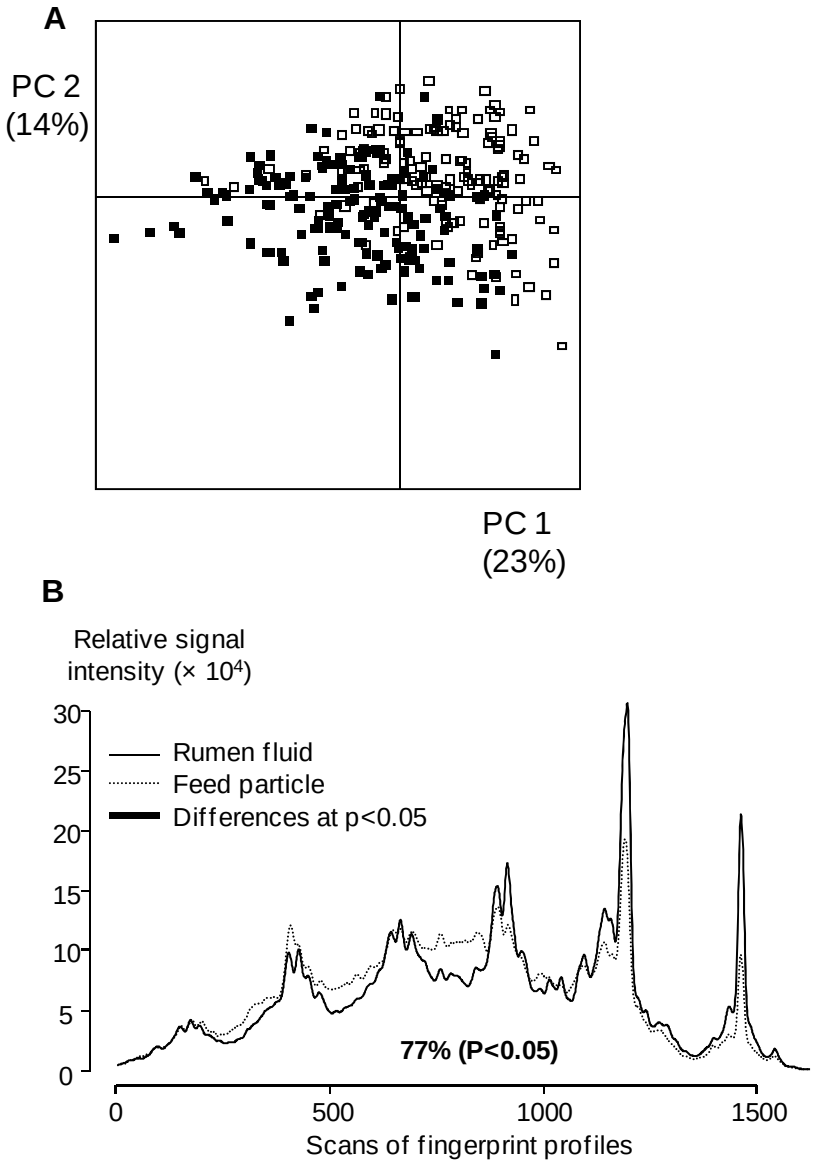


Figure 41. Effect of the ruminal fraction on the structure of the bacterial community.
A: PCA plot of the CE-SSCP profiles assessed in the rumen fluid (■) and feed particle fraction (□). B. Mean CE SSCP profile in the rumen fluid (solid line) and in the feed particle fraction (dotted line) and iterative test significance at P<0.05 (bold horizontal dashed line). Abbreviations: PC, principal component.

4.5. CORRELATION BETWEEN THE MICROBIOTA AND THE ENVIRONMENTAL PARAMETERS

Relationships between the environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* were reported in Figure 42. The first two principal components explained 66% of the total variance. The first principal component was related to the environmental parameters while the second principal component was attributed to the variations of the bacterial community (number of gene copies

of different groups of *Bacteria* and diversity index). Neither the bacterial group concentrations nor the diversity index were correlated to environmental parameters.

We found any significant correlations between the structure of the bacterial community and environmental parameters before disturbance (data not shown). After the dietary disturbance, only the NH_3-N concentration had a significant ($P<0.05$) correlation with the structure of the bacterial community but it explained only 3% of the total inertia (data not shown).

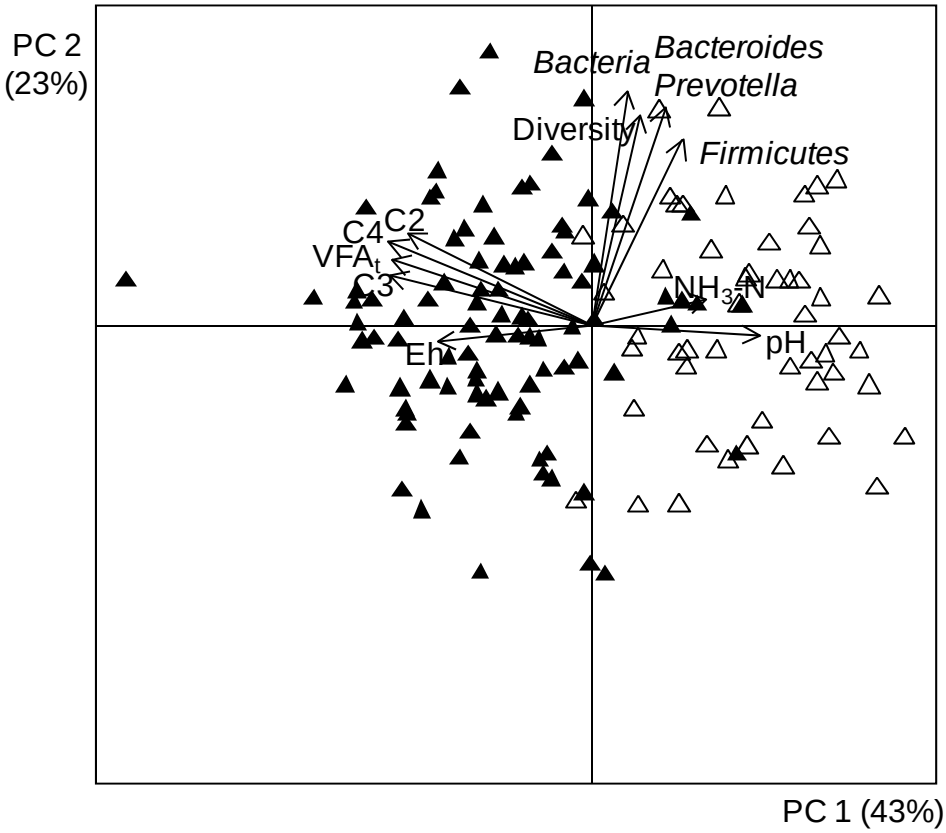


Figure 42. PCA plot of the seven environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* before (∆) and after (▲) the nutritional disturbance.
Abbreviations: PC, principal component; C2, acetic acid; C3, propionic acid; C4, butyric acid.

5. DISCUSSION

5.1. ENVIRONMENTAL PARAMETERS

The environmental parameters studied are reliable indicators of the global rumen functioning (Kamra, 2005). They allowed characterizing the intensity of ruminal fermentations and the main metabolic pathways involved. The nutritional disturbance induced significant modifications of all the ruminal parameters measured as expected and as previously reported in the literature for high-fiber *vs* high-grain diets. An increase of grain

rate in a diet induced *i)* a ruminal pH decrease (Garrett *et al.*, 1999; Goad *et al.*, 1998), *ii)* a lesser reductive ruminal environment (Hungate, 1966), *ii)* a modified fermentative pattern with an increase of the total VFA concentration associated to increases of each level of main VFAs (Davey, 1965 ; Shaw *et al.*, 1960; Williams & Christian, 1956). VFA productions were probably higher than the measured concentrations due to an increased of VFA absorption under our acidic conditions (Nozière & Hoch, 2007). The low ruminal pH we measured during high-starch challenge (after nutritional disturbance) did not generate an acidosis ruminal state (Owens *et al.*, 1998). Consequently, the ruminal parameters were significantly disturbed by the nutritional challenge but the animals were not in a pathological state.

5.2. EFFECT OF THE NUTRITIONAL DISTURBANCE ON THE BACTERIAL COMMUNITY

The total quantity of *Bacteria* and its majors divisions *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* decreased slightly after the disturbance in relation with the modifications of the environment (Ley *et al.*, 2006). The majority of fiber-degrading bacteria in the bovine rumen belong to the *Firmicutes* division (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens* ; Krause *et al.*, 2003). The greater quantity of *Firmicutes* before disturbance may be also attributed to higher proportion of fiber-degrading bacteria associated with the high-fiber diet (Michalet-Doreau *et al.*, 2001; Mosoni *et al.*, 2007). The *Bacteroides Prevotella* are involved in starch fermentation (Cotta, 1992). In consequence, the lower quantity of this bacterial division observed during the high-starch diet supplementation (after disturbance) contrasted with the data available in the literature. However synergistic interactions among cellulolytic bacteria were observed during hemicellulose and pectin degradation in vitro conditions (Dehority, 1991) and development of *Bacteroides Prevotella* depended to solubilised polysaccharides released by the activities of other bacteria (Dehority, 1991; Flint, 1997). Consequently, the lower number of *Bacteroides Prevotella* during the high-starch diet supplementation may be explained by the reduction of the fiber-degrading bacteria.

Even significant, the effects of nutritional disturbance observed on the bacterial community were of a low extent. Sadet *et al.* (2008) displayed any bacterial community differences of the ovine rumen consequently to changes in dietary composition using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). On the opposite, most studies focusing on the relationship between diet composition and bovine ruminal microbiota reported consistent changes (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2000). Such controversial results could be explained by difference in the composition of the diets, mainly the starch concentration,

twice lower in Sadet *et al.* (2008) and us than in studies of Kocherginskaya *et al.* (2001) and Tajima *et al*. (2000).

No difference on the bacterial community structure was observed before and after the nutritional disturbance. This result corroborated the low extent of the diet switch. With the fingerprint technique we used (CE-SSCP) a low change of the bacterial community structure could be not detected. Indeed, the analysis of structure highlighted in majority the changes of peaks size which are considered to be the dominant OTUs (Fromin *et al.*, 2002; Nakatsu *et al.*, 2000).

5.3. DYNAMIC OF THE BACTERIAL COMMUNITY

The dynamic of the ruminal ecosystem in absence of disturbance could be studied thanks to the samples collected before the dietary switch. Our results demonstrated that the majority of the ruminal environmental parameters and of the microbiota data were subjected to variations in absence of induced disturbance. These punctual fluctuations did not evolved to a clear trend. Similarly, a spontaneous change of the bacterial community (structure and diversity index) was previously reported in the bovine rumen (Michelland *et al.*, 2009c; Monteils *et al.*, 2009a). Interestingly, in hindgut fermentors of mammals, the bacterial community were particularly stable: in Human (Abell *et al.*, 2008; Abell & McOrist, 2007; Zoetendal *et al.*, 1998), in pig (Leser *et al.*, 2000), in dog (Simpson *et al.*, 2002) and in rabbit (Michelland *et al.*, 2009a). Such spontaneous evolution of the bacterial community in foregut compared to hindgut mammal fermentors may be explained by the more heterogeneous composition of the digesta incoming and more intense fermentations which both involved great daily changes in environmental parameters. Further studies are needed to verify this observation and may provide better understand of the global functioning of the digestive fermentors. However, in our study, the NH_3-N concentration was the only ruminal parameter showing a significant sporadic variation. Despite this variation, we could not evidence a correlation between the N-NH3 concentration and the bacterial community. Similarly, a long term study, carried out on animals fed a high fibre diet without any disturbance, showed weak time-variation of ruminal environmental parameters (Monteils *et al.*, 2009b). The lack of time-stability of the ruminal ecosystem in absence of disturbance required to induce a strong nutritional disturbance to observe a significant response.

As observed before the nutritional disturbance, all the data concerning microbial community obtained after the disturbance showed sporadic fluctuations but any clear trend

could be evidenced. Similarly, in a long term study in cows fed a high-starch diet, Monteils *et al.* (2009a) did not displayed a time effect on the bacterial community structure.

All these results suggested that the ruminal bacterial community never remains in a stable state but oscillated around a steady point. That suggests that the bacterial community of the rumen obeyed the ecological laws of the dynamic equilibrium (Tuljapurkar & Semura, 1977), previously observed in other ecosystems (Chave *et al.*, ; Gardner *et al.*, 2007; Wingreen & Levin, 2006). Furthermore, these fluctuations were smaller than changes induced by the disturbance, suggesting that the bacterial communities before and after the disturbance were different and presented a dynamical stability around different states.

5.4. BACTERIAL COMMUNITY IN THE SOLID AND LIQUID FRACTION OF THE RUMEN CONTENT

Both before and after nutritional disturbance, we observed higher values of number of gene copies of the total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and diversity index in the solid fraction compared to the liquid fraction of the rumen content. Such different communities between fractions of digestive ecosystem content were previously observed in the cow (Cho *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 1999), in the sheep (Larue *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 1999)} and in Human (Walker *et al.*, 2008). But, in our study, the differences are of weak amplitude and concerned more a weak modification of majority of OTUs abundance (77% of CE-SSCP peaks) than occurrence of fraction-specific dominant OTUs. However, we observed a higher diversity index in the solid fraction than in the liquid fraction of rumen content. The bacteria species inhabiting the solid fraction were in contact with numerous micro-scale conditions providing by the variety of substrates. This environmental heterogeneity promotes more variety of micro-niches and thus more bacterial species were able to colonize it in the solid than in the liquid fraction. This species–area relationship ecological law was previously observed in the microbiota in salt marsh sediments ecosystems (Horner-Devine *et al.*, 2004).

5.5. CORRELATION BETWEEN THE BACTERIAL COMMUNITY AND THE RUMEN ENVIRONMENT

In this study, we evidenced no correlation between the bacterial communities, the quantity of bacterial divisions and the environmental parameters before the disturbance and significant but slight correlation with the NH_3-N concentrations after the disturbance. Undoubtedly, the environmental parameters, and more especially the reductive conditions (measured by redox potential) and acidity (pH), are important parameters selecting bacterial species in digestive tract (Kamra, 2005; Ley *et al.*, 2006). The lack of correlation between the pH and the redox potential and the microbial community could be attributed to low changes of

these parameters in response to the nutritional disturbance. The NH_3-N concentration was the parameter which showed the highest variations between periods (-48% after the nutritional disturbance) and it was the only one which was slightly correlated with the structure of the bacterial community. In further studies, it would be interesting to apply a stronger nutritional disturbance to study relationships between ruminal parameters and microbiota.

6. CONCLUSION

The present experiment demonstrated that a nutritional disturbance, i.e an increase of the dietary starch/fiber ratio, induced a modification of all the environmental parameters in the rumen environment which became less reductive, more acid and contained higher VFAs concentrations and lower NH_3-N concentrations. The bacterial community was affected by the nutritional disturbance since the bacterial diversity index and the quantities of all bacterial divisions decreased even if the structure of the community did not change. However, both before and after disturbance, the community showed sporadic fluctuations suggesting a dynamical variation around different steady points. Finally, the bacterial community was specific to the fraction (liquid, solid) of the rumen. Relationships between environmental parameters and microbial community remained to be elucidated.

7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to technical assistance in the laboratory Carole Bannelier, Béatrice Gabinaud, Muriel Segura, Véronique Tartie and in the breeding center Rémi Dufresne, Brigitte Santa Cruz and Caroline Dufresne. The author thanks Christine Julien for her help in sample collection. The work of the staff at the Centre de Ressources, Génotypage et Séquencage of Toulouse is gratefully acknowledged.

8. REFERENCES

Abell GCJ, Cooke CM, Bennett N, Conlon MA, McOrist AL (2008) Phylotypes related to Ruminococcus bromii are abundant in the large bowel of humans and increase in response to a diet high in resistant starch. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 505-515

Abell GCJ, McOrist AL (2007) Assessment of the diversity and stability of faecal bacteria from healthy adults using molecular methods *Microbial Ecology in Health and Disease* **19:** 229–240

Anonymous (27 avril 1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française***:** 5608-5610

Begon M, Harper JL, Townsend CR (eds) (1996) *Ecology. Individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science, 1068pp

Chave M, Dabert P, Brun R, Godon JJ, Poncet C (2008) Dynamics of rhizoplane bacterial communities subjected to physicochemical treatments in hydroponic crops. *Crop Protection* **27**(3-5)**:** 418-426

Cho SJ, Cho KM, Shin EC, Lim WJ, Hong SY, Choi BR, Kang JM, Lee SM, Kim YH, Kim H (2006) 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**(1)**:** 92-101

Cotta MA (1992) Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(1)**:** 48-54

Czerkawski JW, Cheng KJ (1988) Compartimentation in the rumen. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, Hobsn PN (ed), p 361. New York, USA: Elsevier Science Publishing

Davey AWF (1965) Variations in ruminal pH, volatile fatty acid concentration and proportions of the individual acids. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production***:** 25-106

Dehority BA (1991) Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society* **50:** 149-150

Delbès C, Godon J-J, Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digestor bacterial community. *Anaerobe* **4:** 267-275

Flint HJ (1997) The rumen microbial ecosystem : some recent developments. *Trends in Microbiology* **5:** 483 - 488

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**(11)**:** 634-643

Gardner A, West SA, Griffin AS (2007) Is bacterial persistence a social trait? *PLoS ONE* **2**(8)**:** e752

Garrett EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR (1999) Diagnostic methods for detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **82:** 1170-1178

Goad DW, Goaf CL, Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimental induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science* **76:** 234-241

Guo X, Xia X, Tang R, Wang K (2008a) Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe* **14**(4)**:** 224-228

Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K (2008b) Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology* **47**(5)**:** 367-373

Haegeman B, Godon J-j, Sen B, Hamelin J (2008) Measurement of microbial diversity using fingerprints. *Environmental Microbiology.* Submitted

Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannan BJ (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432:** 750-753

Hungate RE (1966) The Rumen and its Microbes. . New York and London: Academic Press

Hungate RE (1968) Ruminal fermentation. In *Handbook of physiology*, C.F. C (ed), pp 2725-2745. Washington, USA: Amer. Physiol. Society

Kamra DN (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current Science* **89**(1)**:** 124-135

Klieve AV, Swain RA (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(7)**:** 2299-2303

Kocherginskaya SA, Aminov RI, White BA (2001) Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe* **7**(3)**:** 119-134

Koike S, Pan J, Kobayashi Y, Tanaka K (2003) Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science* **86**(4)**:** 1429-1435

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **27**(5)**:** 663-693

Krom MD (1980) Spectrophotometric determination of ammonia. *The analyst* **105**(1249)**:** 305-316

Langsrud Ø (2002) 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *The Statistician* **51:** 305-317

Langsrud Ø (2005) Rotation tests. *Statistics and Computing* **15:** 53-60

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology* **7**(4)**:** 530-543

Layton A, McKay L, Williams D, Garrett V, Gentry R, Sayler G (2006) Development of bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6)**:** 4214-4224

Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology.*, 2 edn. Amsterdam: Elsevier.

Leser TD, Lindecrona RH, Jensen TK, Jensen BB, Moller K (2000) Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with Brachyspira hyodysenteriae. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8)**:** 3290-3296

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **124**(4)**:** 837-848

Ludwig W, Strunk O, Westranm R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S,

Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lübmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer K-H (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4)**:** 1363-1371

Mackie RI, White BA, Isaacson RE. (1997) Gastrointestinal microbiology. In Hall Ca (ed.), New York, Vol. 1.

Marden JP, Bayourthe C, Enjalbert F, Moncoulon R (2005) A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **88**(1)**:** 277-281

McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ (1994) Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science* **72**(11)**:** 3004-3018

Michalet-Doreau B, Fernandez I, Peyron C, Millet L, Fonty G (2001) Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development* **41:** 187-194

Michelland RJ, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2009a) Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* **in press**

Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Lamothe L, Cauquil L (2009b) Statfingerprints: a friendly graphical interface program for microbial fingerprint profiles processing and analysis. *Molecular Ecology Resources* **9**(5): 1359-1363

Michelland RJ, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Hamelin J, Fortun-Lamothe L (2009c) Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology* **107**(5): 1642-1650

Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M (2001) Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science* **84**(6)**:** 1294-1309

Monteils V, Cauquil L, Combes S (2009a) Evolution spontanée de la communauté bactérienne ruminale selon la nature de la ration. In *3ème journée d'animation scientifique du département PHASE*, p in press. Tours, France

Monteils V, Rey M, Gidenne T (2009b) Mid to long term stability of ruminal physicochemistry in dairy cows fed a fibre- or a starch-based diet. In *XIth International Symposium on Ruminant Physiology*, p in press. Clermont-Ferrand, France

Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Bera-Maillet C, Forano E (2007) Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology* **103:** 2676-2685

Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreas L (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* **64:** 1382-1388

Nocek JE (1997) Bovine acidosis: implication on laminitis. *Journal of Dairy Science* **80:** 1005-1028

Nordstrom DK (1977) Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**(12)**:** 1835-1841

Nozière P, Hoch T (2007) Modelling fluxes of volatile fatty acids from rumen to portal blood. In *Nutrient digestion and utilisation in farm animals: modeling approaches*, Kebreab JDE, Bannink A, Gerints WJJ, France J (eds). Wallingford, U.K.: CAB International

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR (1998) Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science* **76**(1)**:** 275-286

Playne MJ (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **36**(8)**:** 638-644

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glockner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35**(21)**:** 7188-7196

R development Core Team (2008) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Rosenzweig ML (1995) *Species diversity in space and time*, Vol. 10, Cambridge: Cambridge University Press.

Sadet S. (2008) Etude de la diversité des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire. INRA, Clermont Ferrand, France, pp. 73-80.

Sadet S, Martina C, Meunier B, Morgavi D (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**(7)**:** 939-944

Shaw JC, Ensor WL, Tellechea HF, Lee SD (1960) Relation of diet to rumen volatile fatty acids digestibility, efficiency of gain and degree of unsaturation of body fat in steers. *The Journal of Nutrition* **71:** 203-208

Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI (2002) Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial ecology* **44**(2)**:** 186-197

Slyter LL (1976) Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science* **43:** 910-929

Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**(1)**:** 6-20

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(11)**:** 4605-4614

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y (2001) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(6)**:** 2766-2774

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y (1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology* **29**(2)**:** 159-169

Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Mastui H, Nakamura M, Aminov R, Benno Y (2000) Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* **6:** 273-284

Tuljapurkar SD, Semura JS (1977) Dynamic equilibrium under periodic perturbations in simple ecosystem models. *Journal of Theoretical Biology* **21**(66)

Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJM, Welling GHGW, Flint HJ (2008) The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environmental Microbiology* **10**(12)**:** 3275-3283

Whitford MF, Forster RJ, Beard CH, Gong J, Teather RM (1998) Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* **4:** 153-163

Williams VJ, Christian KP (1956) Rumen studies in sheep. IlI The effect of feed intake on the concentrations of microbial end-products. *New Zealand Journal of Science and Technology* **38:** 403

Wingreen NS, Levin SA (2006) Cooperation among microorganisms. *PLoS Biology* **4**(9)**:** e299

Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe stes to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* **89:** 670-679

Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10)**:** 3854-3859

Zumstein E, Moletta R, Godon J-J (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 69-78

ADAPTATION RAPIDE DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE DU CÆCUM DE LAPIN EN REPONSE A UNE REDUCTION DES APPORTS EN FIBRES ALIMENTAIRES

R.J., Michelland1,2,3, S. Combes1,2,3, V. Monteils2,1,3, L. Cauquil1,2,3, T. Gidenne1,2,3, L. Fortun-Lamothe1,2,3

Mots clés: aliment, perturbation, fibres, bacteries totales, *Firmicutes*, *Bacteroides Prevotella*, CE-SSCP, qPCR

Titre abrégé: Perturbation nutritionnelle dans l'écosystème cæcal du lapin

Résumé

Ce travail avait pour objectif d'étudier la réponse de la communauté bactérienne du cæcum du lapin à une réduction des apports de fibres alimentaires. Deux groupes de 60 animaux agés de 49 à 88 jours ont été alimentés à volonté avec un aliment témoin (13.6% cellulose) ou déficitaire en fibres (7.1% cellulose, LFD). Du contenu cæcal de 5 lapins dans chaque groupe a été collecté régulièrement à 12 dates différentes. Les communautés bactériennes ont été caractérisées par analyse des profils CE-SSCP tandis que les bactéries totales, les *Firmicutes* et les *Bacteroides Prevotella* ont été quantifiés par qPCR. Enfin, les principaux paramètres environnementaux du cæcum ont été mesurés. Une réduction de la teneur en fibres de l'aliment modifie la structure de la communauté bactérienne du cæcum mais pas sa diversité (5.6 ± 0.8). Les quantités des principales divisions bactériennes étudiées diminuent. L'environnement cæcal devient moins acide (+0.2 ; $P<0.01$), plus réducteur (-11 mV ; $P<05$) et contient plus de matière sèche (+3.4% ; $P<0.001$) et de NH_3-N (+77% ; $P<0.001$) mais moins d'AGV (-17% ; $P<0.001$). Toutes ces modifications microbiennes et environnementales sont observables dès le deuxième jour après la perturbation et persistent pendant toute sa durée. En conclusion, ces résultats suggèrent que la communauté bactérienne du cæcum du lapin est capable de changement et d'adaptation rapides pour atteindre un nouvel équilibre en réponse à une perturbation nutritionnelle.

RAPID ADAPTATION OF THE BACTERIAL COMMUNITY IN THE RABBIT CÆCUM TO A REDUCTION OF DIETARY FIBER SUPPLY

R.J., Michelland[1,2,3], S. Combes[1,2,3], V. Monteils[2,1,3], L. Cauquil[1,2,3], T. Gidenne[1,2,3], L. Fortun-Lamothe[1,2,3]

[1] INRA, UMR 1289 TANDEM, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [2] Université de Toulouse, INPT-ENSAT, UMR 1289 TANDEM, F-31326 Castanet-Tolosan, France; [3] ENVT, UMR 1289 TANDEM, F-31076 Toulouse, France.

Running title: Dietary disturbance of the rabbit cæcum ecosystem

Corresponding author. Name : L. Fortun-Lamothe. Mailing address : INRA, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme, BP 32607, 31326 Castanet Tolosan Cedex, France. E-mail: lamothe@toulouse.inra.fr. Phone: 33 (5) 61 28 53 18. Fax: 33 (5) 61 28 53 19.

1. ABSTRACT

This work aimed to study the response of the bacterial community in the rabbit cæcum to a reduction of dietary fiber supply. Two groups of 60 animals were fed ad libitum a control (13.6% cellulose) or a low fiber diet (7.1% cellulose, LFD) from 49 to 88 days of age. Cæcal contents of 5 rabbits of each group were collected regularly at twelve dates. The bacterial communities were characterized by CE-SSCP and the total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* were quantified by qPCR. In addition, main cæcal parameters were measured. The reduction of fiber in the diet modified the structure of the bacterial community of the cæcum but not the diversity (5.6 ± 0.8). The quantities of all bacterial divisions decreased. The cæcal environment became less acid (+0.2; $P<0.01$), more reductive (-11mV ; $P<0.05$) and dryer (+3.4% ; $P<0.001$) with an increase of NH_3-N (+77% ; $P<0.001$) and a decrease of VFA (-17% ; $P<0.001$). All these microbial and environmental modifications occurred as soon as the 2nd day after the disturbance and remained stable for all its length of time. In conclusion, these results suggested that the bacterial community in the rabbit cæcum was able of rapid change and short settling time to a new steady state in response to a nutrient disturbance.

Keywords: diet, disturbance, fiber, *Bacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroides Prevotella*, CE-SSCP, qPCR

2. INTRODUCTION

Anti microbial growth promoters have been used for many decades to prevent digestive disorder by regulating the microbial ecosystem presents in intensive-bred animal digestive tract. Recently, the European Union (EU directive 2001/82) has banned the administration of antibiotics as growth promoters (Casewell *et al.*, 2003). Consequently, new alternatives are required urgently to fight against digestive disorders in intensive-bred animals. This has led to an increased interest on the effect of dietary components on the gastrointestinal tract microbiota.

Digestive disorder causes high mortality rate in rabbit breeding (Peeters, 1988). For example, in France, it reached 14% between weaning and slaughter age (Guerder, 2003). Several studies demonstrated that the increasing of dietary fiber concentration in the diet decreased the mortality rate (Bennegadi *et al.*, 2001; Gidenne, 2003; Montagne *et al.*, 2003). This beneficial effect is related to enhanced fermentative activity in the cæcum (Carabaño *et al.*, 2008), through increasing the amount of cellulolytic bacteria (Boulahrouf *et al.*, 1991). The bacterial community of the cæcum contains mainly *Firmicutes* (93%) such as *Ruminococcus albus* (Bennegadi *et al.*, 2003), but also *Bacteroidetes* (4%; Monteils *et al.*, 2008) which the concentrations increase when the dietary fiber level increases (Bennegadi *et al.*, 2003). The cæcum contains few or no protozoa and fungi (Bennegadi *et al.*, 2003; Forsythe & Parker, 1985b; Lelkes, 1987; Peeters, 1988). Consequently, rabbit is a relevant model to study relations between diet composition, gut microbiota and digestive health. However, the effects of dietary fiber on the global structure and diversity of the bacterial community is poorly known.

This study aimed to evaluate the response of a gastro-intestinal ecosystem to a nutrient disturbance. We used the cæcal ecosystem of the rabbit as a model and we applied a permanent dietary disturbance based on a low-fiber diet. The bacterial community was characterized using two complementary molecular approaches: the capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) to analyse the bacterial structure and diversity, and the quantitative PCR (qPCR) to quantify the amount of *Bacteria* and its principal divisions, the *Firmicutes* and the *Bacteroides Prevotella*. Simultaneously, ten parameters were measured to characterize the cæcal environment, and to study relationships between the bacterial community and its environment.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1. EXPERIMENTAL DESIGN

A total of 120 white New Zealand x Californian rabbits were maintained in individual cages in a controlled husbandry at the experimental unit of UMR 1289 INRA TANDEM (Castanet-Tolosan, France). From weaning (36 days old) until the beginning of the experiment (49 days of age), the rabbits were fed with a standard commercial diet (Rablo Formax GVR, GCO, Castelnaudary, France) containing 13.6% cellulose, 17.4% hemicellulose, 13.6% starch, 16.1% crude protein and 2.7% crude fat. At 49 days-old (day 0), 60 rabbits were switched to a low fiber diet for 39 days (LFD group). This feed was made at UMR 1289 INRA TANDEM and contained 7.1% cellulose, 8.8% hemicellulose, 32.9% starch, 17.1% crude protein and 2.1 % crude fat. The other 60 animals remained to be fed with the commercial diet (control group). The rabbits were cared for in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 27 avril 1988). Both groups of rabbits were fed *ad-libitum* and had free access to fresh water.

3.2. SAMPLING, MEASUREMENT AND DETERMINATION OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS

Five control rabbits and five LFD rabbits were randomly selected for sampling and measurement purposes on days 2, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36 and 39. The rabbits were anesthetized using 0.5 ml kg^{-1} of Rompun® 2% (Bayer, Leverkusen, Germany) and 0.4 ml kg^{-1} of Imalgène® 1000 (Merial, Lyon, France). The cæcal contents (about 200 mg) were collected surgically after incision of cæcal wall, and stored at -20°C until microbial analyses. Then, the pH and redox potential were recorded *in vivo* according to the method of Kimsé *et al*. (2008) using electrodes with Pt 1000 for pH and combined Pt-ring electrode for redox potential (Unitrode Metrohm, Heriseau, Switzerland). After these measurements, the rabbits were slaughtered using 0.3 ml kg^{-1} of T61® (Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany). For the determination of volatile fatty acids (VFA) concentration, 1g of cæcal content was collected in tube containing 2ml of 2% $HgCl_2$. Quantifications of VFA were determined by automated gas chromatography (Chrompack CP 9000 gas chromatograph, Chrompack B.V., Middleburg, the Netherlands) according to Playne (1985). For NH_3-N assays, 1g of cæcal content was sampled in tube containing 3ml of 2% H_2SO_4. NH_3-N concentrations were determined with a colorimetric method by a Continuous Flow Analyzer (SAN++, Skalar, Norcross, Georgia,USA) as previously described by Krom (1980). Dry matter was determined using 3g of cæcal content dried at 100°C for 24 h. Concentrations of

cellulose and hemicellulose in cæcal content were determined according to the sequential method developed by Van Soest *et al*. (1991).

3.3. DNA EXTRACTION

Total genomic DNA from about 0.2 g of cæcal sample was extracted and purified with QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, England) according to the manufacturer's instructions.

3.4. 16S RRNA GENE PCR-CE-SSCP

The V3 region of the 16S rRNA genes was used as a bacterial diversity marker using the primers w49 and 5'-6FAM-labeled w34 (Delbès *et al.*, 1998; Zumstein *et al.*, 2000). PCR assays with 25 cycles of amplification was performed as described previously (Michelland *et al.*, 2009c) using Isis DNA Polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France). The capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) was performed on an ABI Prism 3100 Genetic (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) as previously described (Michelland *et al.*, 2009c). CE-SSCP profiles were aligned, normalized and diversity index was estimated using StatFingerprints program version 1.3 (Michelland *et al.*, 2009b) running on R version 2.8.3 (R development Core Team, 2008). Diversity index was estimated on each CE-SSCP profile with $-\log_{10} \sum(a_i)^2$ where a_i is the relative area under the i^{th} peak (Haegeman *et al.*, 2008; Rosenzweig, 1995).

3.5. REAL TIME QPCR

The primers were designed or modified from literature using the software ARB (Ludwig *et al.*, 2004) and the 16SrDNA database SSURef_96_SILVA_04_10_08_opt.arb generated by the SILVA project (Pruesse *et al.*, 2007). The specificity of the primers was evaluated by the calculation of the matching efficiency defined as the ratio of the number of matching sequences to the total number of sequences in the target database (Yu *et al.*, 2005). As suggested by Smith and Osbone (2009), the design of primers and probe, amplicons size, melting temperature (T_m), percentage of G+C bases possibility of self complementarity of the sequence were investigated using Primer express software (version 2.0, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA).

Assays were performed using the ABI Prism 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) using optical grade 384-well plates in a final volume of 10 µl. TaqMan qPCR technology was used for absolute quantification of

Bacteria and *Bacteroides Prevotella*. SYBR Green qPCR technology was used for absolute quantification of *Firmicutes*. TaqMan reaction mixture contained 2.5 µl of 200-times diluted template DNA, a mix of primer (200 nM) and of TaqMan probe (250 nM for total bacteria and archaea or 150 nM for bacteroides prevotella respectively; Tableau 23) and 5 µl of TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). SYBR Green assays reaction mixture contained 2.5 µl of 200-times diluted template DNA, a specific primer set at 100 nM (Tableau 23) and 5 µl of Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). The PCR program consisted of 10 min at 95°C, followed by 40 cycles with 15 s at 94 °C, 1 min at 60 °C. A dissociation curve was added to SYBR Green assays to check the specificity of the amplification. At least four nonzero standard concentrations were used in each assay.

Standard curves were generated by amplification of the serial ten-fold dilutions of plasmid (from10^4 to 10^9 copy number) containing the 16S rRNA gene sequence of *Ruminococcus albus* (acc: EF445158; 1489 pb), *Butyvibrio fibrisolvens* (acc: EF445262; 1504 pb) and *Prevotella bryantii* (acc: EF445235; 1490 pb) for quantification of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* respectively. Plasmid concentrations were measured using NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA). The copy number for each reaction was calculated from the standard curves.

16S rRNA-gene-targeted group primers set to *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* developed or adapted in our study (Layton *et al*. 2006 and Guo *et al*. 2008b) were highly specific. Indeed, primers and probe for *Bacteroides Prevotella* quantification with zero mismatch allowance matched with almost 92% of the targeted sequences in the database, 0% of not-*Bacteroides* and *not-Prevotella Bacteria* (Tableau 23). Primers for *Firmicutes* quantification with zero mismatch allowance matched with almost 78% of the targeted sequences in the database and only 4% of not-*Firmicutes Bacteria*.

Tableau 23. PCR primers and probes used for qPCR assays

Target group qPCR assay	Primer / Probe	sequence (5' → 3')	E. Coli numbering	Size (bp)	Tm (°C)	Matching efficiency (%)				References
						Target group[α]		Upper group minus target group[β]		
						0 M	2 M	0 M	2 M	
Total *Bacteria*										
Bact1369F	Forward	CGGTGAATACGTTCYCGG	1369-1386	142	59.2	80	92	0	1	(Suzuki *et al.*, 2000)
Bact1492R	Reverse	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	1492-1513		54.7	ND	ND	ND	ND	(Suzuki *et al.*, 2000)
TM1389F	Probe	6FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-MGB	1389-1407		58.6	58	77	0	34	(Suzuki *et al.*, 2000)
Bacteroides Prevotella										
296F21	Forward	GAGAGGAAGGTCCCCCACATT	296-316	110	60.1	92	99	0	0	(Layton *et al.*, 2006) modified in this study
385R21	Reverse	CACGCTACTTGGCTGGTTCAG	385-405		59.5	98	100	0	3	(Layton *et al.*, 2006) modified in this study
375R29	Probe	6FAM-CCATTGACCAATATT CCTCACTGCTGCCT-TAMRA	375-404		69	98	100	5	27	(Layton *et al.*, 2006)
Firmicutes										
Firm1048F20	Forward	ACAGGTGGTGCATGGTTGTC	1048-1066	170	57.9	90	100	4	70	(Guo *et al.*, 2008a) modified in this study
Firm1196R23	Reverse	CATAAGGGGCATGATGATTTGAC	1196-1217		59.2	78	99	4	18	This study

We used the SILVA database SSURef_96_SILVA_04_10_08_opt.arb (Pruesse *et al.*, 2007) with an align quality up to 75% and a pintail up to 50%. The matching efficiency of primers and probe was calculated as the ratio of the number of matching sequences to the total number of sequences in the target database. α: the target group matching efficiency were calculated with specific databases for total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* qPCR assays and contained respectively 249635, 14359 and 89610 sequences. β: the upper group minus target group matching efficiency corresponded to total *Eucarya* plus *Archaea*, total *Bacteria* minus *Bacteroides Prevotella* and total *Bacteria* minus *Firmicutes*, respectively for the total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* qPCR assays. The upper group minus target group databases contained 36996, 235276 and 160025 sequences, respectively for the total *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes* qPCR assays. Abbreviations: Tm, melting temperature according to Primer express software (version 2.0, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA); M, mismatch; ND, not determined.

3.6. STATISTICAL ANALYSIS

Environmental parameters, qPCR data and the diversity index were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD post-hoc test using dietary treatment (2 levels), day of sampling (12 levels) and their interaction as fixed effects (R development Core Team, 2008).

The CE-SSCP profiles data were explored using a centered and scaled PCA and tested with a fifty-fifty multivariate ANOVA (FF-MANOVA) with 10000 rotations (Langsrud, 2002; Langsrud, 2005). FF-MANOVA was performed using dietary treatment, day of sampling and their interaction as fixed effects. When an effect was significant, an iterative Mann-Whitney test was applied on each scan of the CE-SSCP profile to identify the scan position which differed along the CE-SSCP profile. Such analyses on CE-SSCP profiles are refered in the text as analysis of the structure of the bacterial community.

The correlations between the environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella*, were analysed using a centered and scaled PCA. The correlation between the structure of the bacterial community (whole CE-SSCP profiles data) and the environmental parameters set was tested using redundancy analysis (RDA) with 10000 Monte Carlo permutations (Legendre & Legendre, 1998). Prior to the RDA, the environmental parameters included in the model were selected using a stepwise selection. As environmental parameters were expressed in different units, they were transformed to have similar mean (0) and variance (1) prior to RDA.

4. RESULTS

There were no significant differences in mortality (12%, 17% respectively for the control and LFD rabbits; NS), daily weight gain (49 g day^{-1}, 47 g day^{-1} respectively for the control and LFD rabbits; NS) and body weight at the end of the study (2748 g, 2667 g respectively for the control and LFD rabbits; NS) between the control and the LFD group. As expected, the daily feed intake of the LFD rabbits was 25% lower than the control rabbit. Consequently, the mean daily fiber intake was 189 g day^{-1}.and 142 g day^{-1}, respectively for the control and LFD rabbits.

Tableau 24. Effect of the diet on the cæcal environmental parameters, the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and the bacterial diversity index.

		Diet		Significance		
		Control	LFD	Dietary treatment	Time	Treatment × Time
Environmental parameters	Cellulose (%)	14.3 ± 3.6	11.6 ± 3.0	<0.001	NS	NS
	Hemicellulose (%)	16.9 ± 3.7	13.9 ± 3.0	<0.001	NS	NS
	pH	6.1 ± 0.3	6.3 ± 0.3	<0.01	NS	NS
	Redox potential (mV)	-192 ± 26	-203 ± 22	<0.05	NS	NS
	Dry matter (%)	20.3 ± 2.3	23.7 ± 2.5	<0.001	<0.001	NS
	NH_3-N (mmol L^{-1})	6.0 ± 3.3	10.6 ± 6.2	<0.001	NS	NS
	VFA_{total} (mmol L^{-1})	94.7± 16.6	78.4 ± 18.0	<0.001	NS	NS
	C2 (mmol L^{-1})	73.1± 13.8	56.3 ± 14.0	<0.001	NS	NS
	C3 (mmol L^{-1})	4.9 ± 1.5	4.7 ± 1.6	NS	<0.01	NS
	C4 (mmol L^{-1})	14.8 ± 4.4	14.9 ± 7.2	NS	NS	NS
Microbial data	Total *Bacteria* (log copy g^{-1})	12.4 ± 0.4	12.2 ± 0.5	<0.01	NS	NS
	Firmicutes (log copy g^{-1})	8.6 ± 0.4	8.3 ± 0.3	<0.001	NS	NS
	Bacteroides Prevotella (log copy g^{-1})	8.0 ± 0.4	7.7 ± 0.5	<0.01	NS	<0.05
	Diversity index	5.7 ± 0.8	5.5 ± 0.8	NS	<0.05	<0.05

NS, non significant at P<0.05. Abbreviations: C2, acetic acid; C3 propionic acid; C4 butyric acid. Mean ± standard deviation.

4.1. Effect of nutrient disturbance on environmental parameters

As expected, the diet composition greatly affected the chemical composition of the cæcal environment (Tableau 24). The cæcal cellulose and hemicellulose contents were lower in the LFD than in the control rabbits (-2.7 % and -3 % respectively; $P<0.001$). The cæcal content of the LFD rabbits was a less acid (+0.2 unit), more reductive (-11 mV) and dryer (+3.4 %) environment than those of the control rabbits ($P<0.05$). Concentration of total VFAs in the cæcal content was lower (-17 %; $P<0.001$) in LFD group than in control rabbits. This result was explained by a lower acetic acid level (-23 %; $P<0.001$) in cæcum of the LFD rabbits than of control rabbits. Moreover NH_3-N concentration was 77% higher in the LFD than in the control rabbit ($P<0.001$). In both groups, the chemical composition of cæcal content did not varied along the experiment, except the percentage of dry matter and the concentration of propionic acid which exhibited punctual and sporadic fluctuations ($P<0.01$; data not shown).

4.2 Effect of the nutrient disturbance on Quantification of 16S rDNA copies number

The number of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* gene copies were significantly lower in the cæcal contents of the LFD than of the control rabbits ($P<0.01$; Tableau 24, Figure 43). The number of total *Bacteria* and *Firmicutes* gene copies did not differ between days of sampling in both groups. The number of gene copy of *Bacteroides Prevotella* did not varied over time in control rabbits but showed sporadic fluctuation in LFD rabbits ($P<0.05$ on days 22, 25, 32 and 39).

4.3. Effect of the nutrient disturbance on the bacterial diversity

The bacterial diversity index was similar in the cæcum of the control and the LFD groups (Tableau 24, Figure 43) and was stable during the experiment in control rabbits. On the opposite, in LFD rabbits it was lower on day 11 and higher on day 39 than on other days of sampling ($P<0.05$).

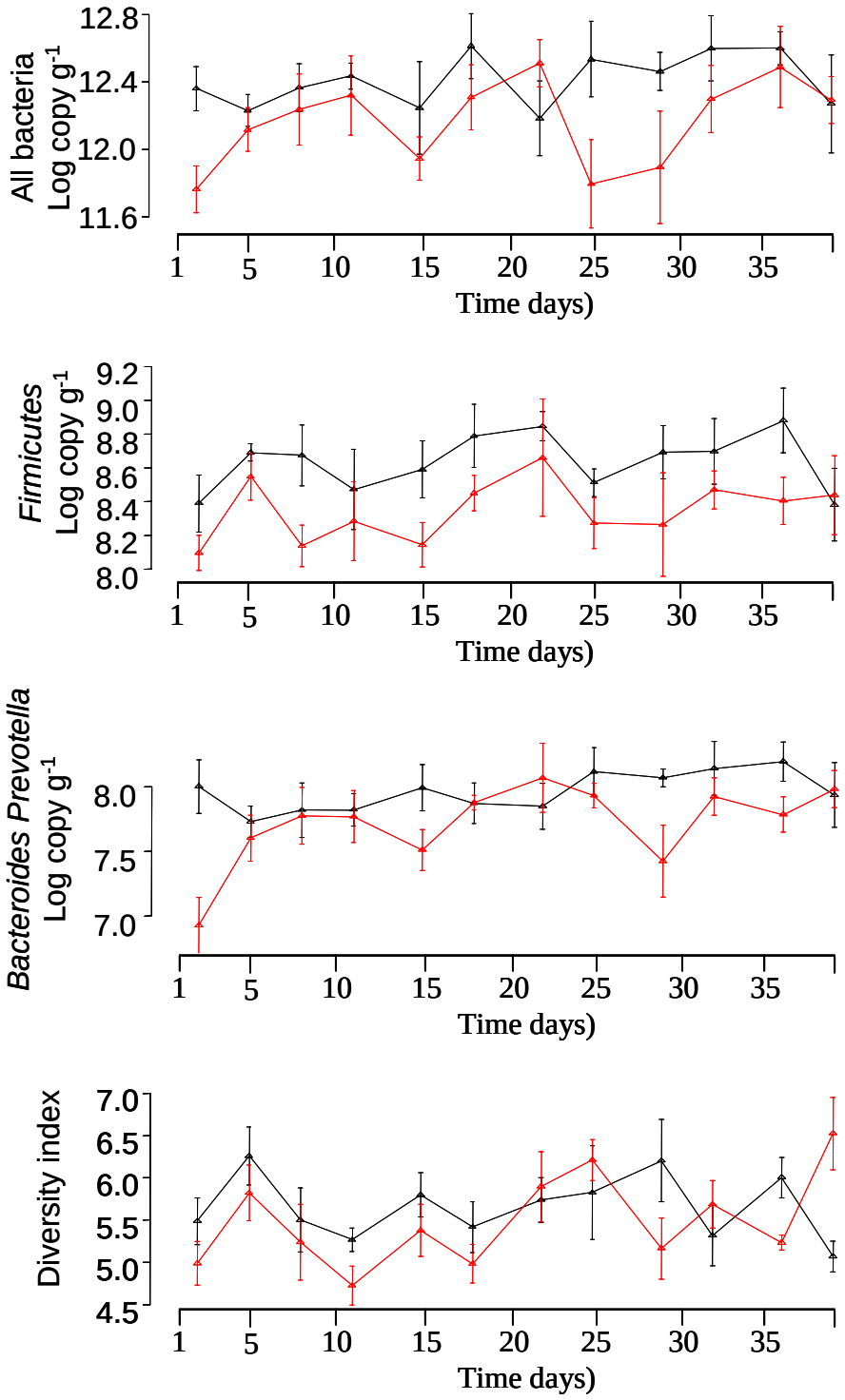


Figure 43. Dynamics of the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* and the bacterial diversity index in control (dashed line) and low-fiber diet rabbits (solid line).

L'effectif est de 5 observations par point

4.4. EFFECT OF THE NUTRIENT DISTURBANCE ON THE STRUCTURE OF THE BACTERIAL COMMUNITY

The structure of the bacterial community of the cæcum differed significantly between the control and LFD rabbits (P<0.001). However, only 2% of the variance of the CE-SSCP profiles set was explained by the dietary treatment according to the FF-MANOVA (data not shown). That was evidenced in PCA analysis which showed a strong overlapping between both groups (Figure 44A). However, the differences in the bacterial community between the LFD rabbits and the control rabbits concerned 60% of the scans, which are located throughout the CE-SSCP profile (Figure 44B). These structure modifications were more related to change in peak relative size than in appearance/disappearance of peak. In both groups, the structure of the cæcal bacterial community did not differ over time (data not shown).

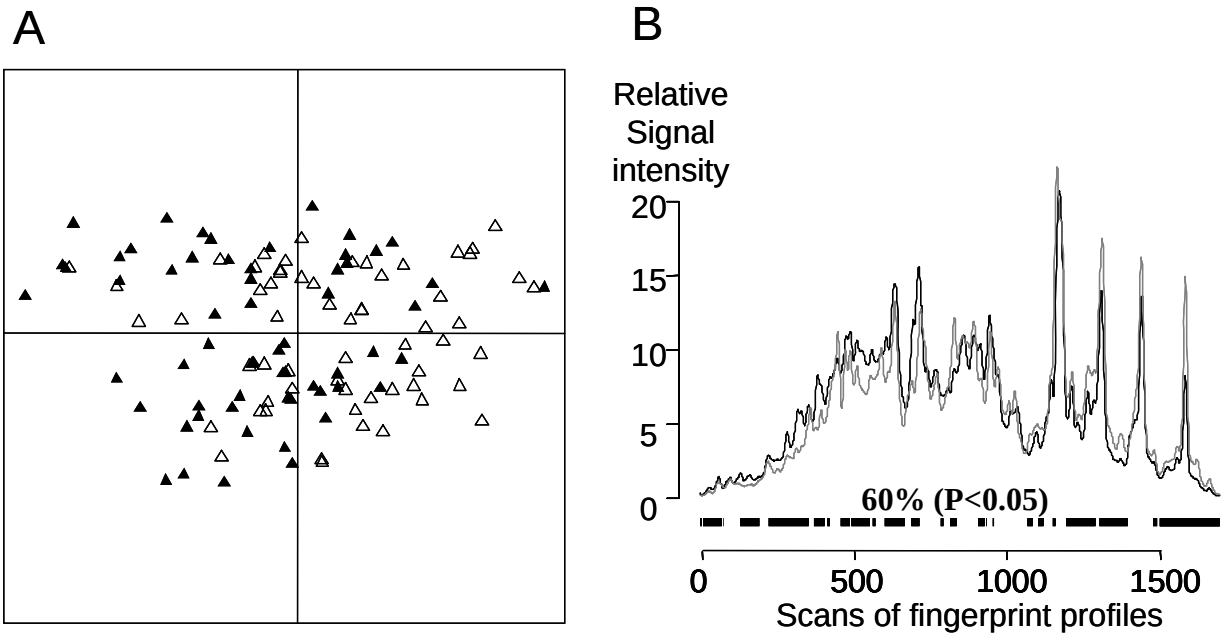


Figure 44. Effect of the diet on the structure of the bacterial community.
A: PCA plot of the CE-SSCP profiles assessed in the LFD (▲) and control (Δ) rabbits. B. Mean CE SSCP profile in the LFD (solid line), and control (dotted line) rabbits and iterative test significance at P<0.05 (bold horizontal dashed line).

4.5. CORRELATION BETWEEN BACTERIAL GROUP CONCENTRATIONS AND ENVIRONMENTAL PARAMETERS

PCA analysis was performed to study the relationship between the environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria*, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* (Figure 45). The first three principal components explained 57% of total variance. On the first principal component, gene copies number for total *Bacteria*, *Firmicutes* and to a lesser extend *Bacteroides Prevotella* variables were positively related to total VFAs and acetic acid and negatively to pH value. Hemicellulose and cellulose were

strongly correlated to the second axis and thus were not correlated to 16SrDNA copy number. As shown on the PCA plot, the bacterial diversity index was not correlated to environmental parameters.

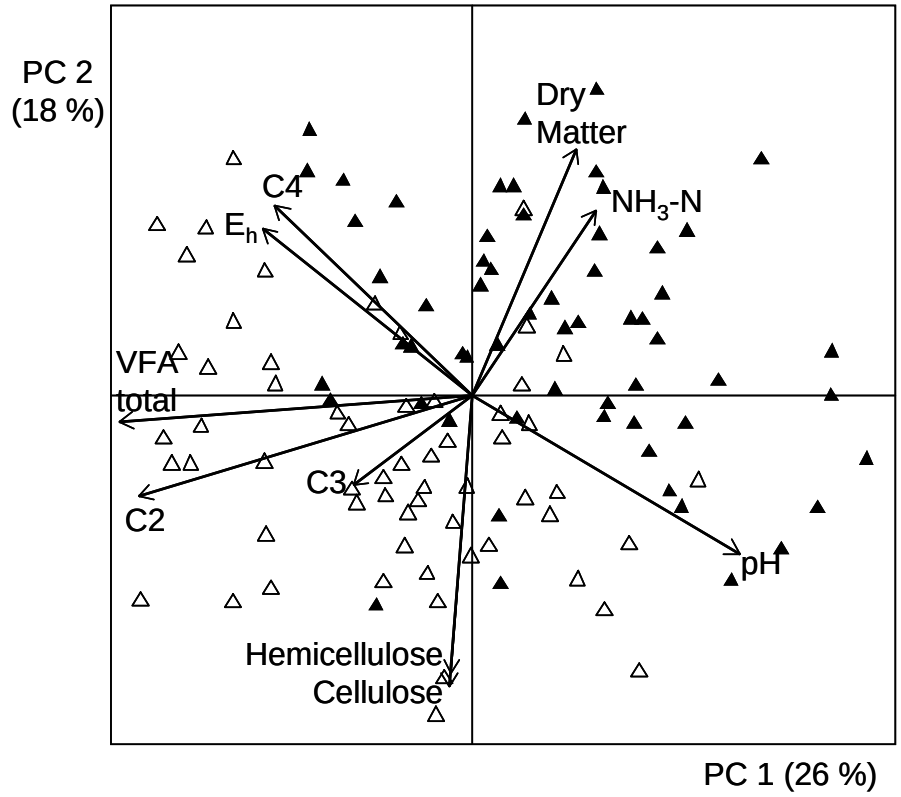


Figure 45. PCA plot of the ten environmental parameters, the diversity index and the number of gene copies of total *Bacteria, Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella* assessed in the low-fiber diet (▲) and control (∆) rabbits.
Abbreviations: C2, acetic acid; C3, propionic acid; C4, butyric acid.

4.6. CORRELATION BETWEEN THE STRUCTURE OF THE BACTERIAL COMMUNITY AND THE ENVIRONMENTAL PARAMETERS

In both groups, the environmental parameters constrained few the total inertia of the bacterial community structure (14% and 7% for the control and the LFD rabbits, respectively). In the control rabbits, the structure of the bacterial community was correlated to the total VFA concentrations ($P<0.01$) and subsequent relative concentrations: acetic ($P<0.01$), propionic ($P<0.001$) and butyric ($P<0.01$) acids (Figure 46). In the LFD rabbits, the structure of the bacterial community was correlated to the propionic ($P<0.05$) and butyric ($P<0.05$) acids.

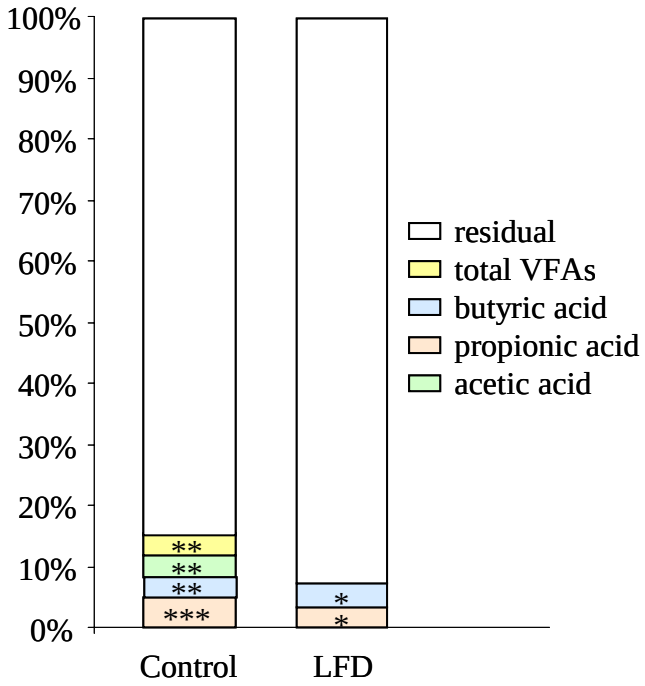


Figure 46. Variance partitioning with partial RDA of CE-SSCP data from control and low-fiber diet rabbits according to the stepwise selected environmental parameters.
Abbreviations: *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

5. DISCUSSION

Fiber corresponds to a heterogeneous group of chemical compounds composed mainly of cellulose and hemicellulose and in a lesser proportion pectin, gums, mucilages and lignin. The beneficial role of fiber on the rabbit health has been well documented (Bennegadi *et al.*, 2001; Gidenne, 2003; Montagne *et al.*, 2003) and is mostly based on enhanced fermentative activity in the cæcum (Carabaño *et al.*, 2008). Molecular methods, here CE-SSCP coupled with qPCR, permitted to study the effects of a reduction of the dietary fiber concentration on composition, structure and diversity index of the cæcal bacterial community. The reduction of 6.5% of cellulose and 8.6% of hemicellulose in the dietary supply can be considered as a drastic reduction of fiber for the abilities of the rabbit digestive physiology but it corresponded to a slight disturbance for the cæcal ecosystem since it cellulose and hemicellulose contents decreased only of 2.7% and 3% respectively. The reduction of fiber decreased the feed intake of animals, which permits them to maintain their energy intake (Gidenne *et al.*, 2000; Lebas *et al.*, 1982; Partridge *et al.*, 1989). This disturbance affected both the quantity of main bacteria and the structure of the bacterial community as well as its environment. These changes could be measured two days after the beginning of the disturbance and remained throughout all challenge.

5.1. NUTRIENT EFFECT ON THE BACTERIAL COMMUNITY

When reducing the fiber content in fermentative compartment, the structure of the bacterial community of the rabbit changed. In the hindgut fermentors of other mammals, studies concerning the effect of dietary fiber levels on bacterial community lead to contradictory results. In the pig, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis demonstrated that some OTUs were specific to dietary treatment while others were commons (Leser *et al.*, 2000). In contrast, in the dog, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis did not evidence any differences of the structure of the bacterial community when reducing of 10% the fiber level (Simpson *et al.*, 2002). These controversially results may be partly attributed to the magnitude of the disturbance and/or the buffering capacity of fermentors of each mammal species. In this study, the reduction of fiber level in the cæcum was sufficient to modify the bacterial community structure as well as the quantity of *Bacteria* and its major divisions. However, these modifications are of weak amplitude and did not affect the diversity index. Consequently, the disappearance of some species as a consequence of nutritional disturbance could be compensated by hidden species able to perform similar functions (Cardinale *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2004). A stronger or earlier dietary interventions than applied in this study seemed to be required to cause profound bacterial community changes with less functional redundancy possibility.

5.2. NUTRIENT EFFECT ON THE CÆCAL PARAMETERS

The cæcal environment was dryer, less acid and more reductive when the dietary fiber level decreases. We observed changed in the fermentative pattern with a decrease in the VFA production and an increase in the NH_3-N production. The increase of pH we observed may be explained by the lower quantity of VFA and especially of the acetic acid produced by the bacterial community. A lower production of VFA in the rabbit cæcum was previously described to be attributable to a decrease of the number of cellulolytic bacteria (Boulahrouf *et al.*, 1991). *Ruminococcus flavefaciens, Fibrobacter succinogenes* and *R. albus* were present in the rabbit cæcum (Abecia *et al.*, 2005; Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004; Monteils *et al.*, 2008) and have been shown responsible of cellulolyse in other animals (Daly *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2003). In our study, the decrease of the *Firmicutes* quantity and of the VFA concentration tends to comfort this assumption. We found that the reduction of fibers did not induce an increase of the butyric acid, in contrast with previous reports (Bellier & Gidenne, 1996; Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004; Gidenne *et al.*, 2000). In the rabbits, the butyric acid was previously described to be attributed to *Bacteroidetes* (Vernay & Marty, 1984) and an

increase of the *Bacteroidetes* quantity was observed when reducing the fibers intake (Bennegadi *et al.*, 2003). In contrast with this study, we found a significant but slight decrease of the quantity of *Bacteroides Prevotella* while the butyric acid concentration did not change.

5.3. DYNAMIC OF BACTERIAL COMMUNITY IN THE RABBIT CÆCUM

The dynamic of the cæcal ecosystem in absence of disturbance could be studied thanks to the control rabbits. Our results demonstrated that the bacterial community (structure, quantity of *Bacteria*, *Bacteroides Prevotella* and *Firmicutes*) and the environmental parameters (except dry matter) of the cæcum were stable over the 39 days of the experiment. Several studies previously demonstrated stability in the hindgut fermentor in rabbit (Michelland *et al.*, 2009a), in Human (Abell *et al.*, 2008; Abell & McOrist, 2007; Zoetendal *et al.*, 1998), in pig (Leser *et al.*, 2000) and in dog (Simpson *et al.*, 2002). Such stability may be partly attributed to the constant composition of nutrients entering the cæcum due to the constant composition of the diet and the distal position of this organ. We surprisingly found a stable bacterial community and no fluctuation of the environmental parameters in the rabbits fed a low-fiber diet. This stability means that the bacterial community was quickly adapted to the environmental modification, as soon as before the 2nd day after disturbance. The rapid adaptation of the bacterial community may be due to the slight amplitude of changes, induced by the disturbance, on the environmental parameters. In this study, the animals were fed the low-fiber diet pellet until the end of the experiment. Thus, we assume that the permanent disturbance may maintain stable the bacterial community as soon as adapted to the disturbance. All these results suggested that the bacterial community was able of rapid change and short settling time to a new equilibrium state in response to a dietary disturbance.

5.4. CORRELATION BETWEEN THE BACTERIAL COMMUNITY AND THE CÆCAL ENVIRONMENT

In this study, we evidenced significant but slight correlations between the bacterial communities, the quantity of bacterial divisions and the environmental parameters. The reductive conditions (measured by redox potential) and acidity (pH) was previously described as important parameters selecting bacterial species in digestive tract of other animals (Kamra, 2005). Strikingly, in our study the pH was only correlated to total *Bacteria* and *Firmicutes* quantities whereas the redox potential were not correlated to microbiota data. We assume that this lack of correlation of the pH and the redox potential may be attributed to the low change of these parameters in response to the dietary disturbance. In further studies, it would be

interesting to applied the nutritional disturbance in younger animals, in which cæcal parameters are not stabilized, to hope better evidenced the correlations.

6. CONCLUSION

In conclusion, the rabbit is a relevant model to study the effect of dietary composition on the bacterial community of mammals with hindgut fermentors in order to devise approaches for enhancing animal health outcomes. The present experiment demonstrated that a reduction of the dietary fiber concentration modified slightly the structure of the bacterial community of the cæcum, decreased the quantities of all bacterial divisions but did not change the diversity index. The cæcal environment became more reductive and less acid due to an increase of NH_3-N and a decrease of VFA concentrations. All these microbial and environmental modifications are measurable 2 days after the beginning of the challenge and remained throughout it. These results suggested that the bacterial community of rabbit cæcum was able of rapid change and short settling time to a new equilibrium state in response to a nutritionnal disturbance. Future studies should be designed with an earlier dietary intervention to test the susceptibility of the bacterial community in young animals and to better characterize the overall effect of the fiber quantity on the rabbit health.

7. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to technical assistance in the laboratory Carole Bannelier, Béatrice Gabinaud, Muriel Segura, Véronique Tartie and in the breeding center Patrick Aymard, Jacques De Dapper, Jean De Dapper, André Lapanouse. The work of the staff at the Centre de Ressources, Génotypage et Séquencage of Toulouse is gratefully acknowledged.

8. REFERENCES

Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ, McEwan NR (2005) Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* **244**(1)**:** 111-115

Abell GCJ, Cooke CM, Bennett N, Conlon MA, McOrist AL (2008) Phylotypes related to Ruminococcus bromii are abundant in the large bowel of humans and increase in response to a diet high in resistant starch. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 505-515

Abell GCJ, McOrist AL (2007) Assessment of the diversity and stability of faecal bacteria from healthy adults using molecular methods *Microbial Ecology in Health and Disease* **19:** 229–240

Anonymous (27 avril 1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française***:** 5608-5610

Bellier R, Gidenne T (1996) Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *British Journal of Nutrition* **75**(3)**:** 353-363

Bennegadi-Laurent N, Gidenne T, Licois D (2004) Nutritional and sanitary statuses alter postweaning development of caecal microbial activity in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology* **139:** 293-300

Bennegadi N, Fonty G, Millet L, Gidenne T, Licois D (2003) Effects of age and diatery fibre level on cæcal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease* **5:** 23-32

Bennegadi N, Gidenne T, Licois L (2001) Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit. *Animal Research* **50:** 401-413

Boulahrouf A, Fonty G, Gouet P (1991) Establishment, counts and identification of the fibrolytic bacteria in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current Microbiology* **22:** 1-25

Carabaño R, Badiola I, Chamorro S, Garcia J, Garcia-Ruiz AI, Garcia-Rebollar P, Gomez-Conde MS, Gutierrez I, Nicodemus N, Villamide MJaDB, J.C. (2008) New trends in rabbit feeding: influence of nutrition on intestinal health. review. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6** (Special Issue)

Cardinale BJ, Palmer MA, Collins SL (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* **415**(6870)**:** 426-429

Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I (2003) The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**(2)**:** 159-161

Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* **38**(2-3)**:** 141-151

Delbès C, Godon J-J, Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digestor bacterial community. *Anaerobe* **4:** 267-275

Forsythe SJ, Parker DS (1985) Urea turnover and transfer to the digestive tract in the rabbit. *British Journal of Nutrition* **53:** 183-190

Gidenne T (2003) Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* **81:** 105-117

Gidenne T, Pinheiro V, Falcao e Cunha L (2000) A comprehensive approach of the rabbit digestion : consequences of a reduction in dietary fibre supply. *Livestock Production Science* **64:** 225-237

Guerder F (2003) Bilan du réseau national de gestion technique de performances. *Cuniculture* **29:** 150-155

Guo X, Xia X, Tang R, Wang K (2008a) Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe* **14**(4)**:** 224-228

Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K (2008b) Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology* **47**(5)**:** 367-373

Haegeman B, Godon J-j, Sen B, Hamelin J (2008) Measurement of microbial diversity using fingerprints. *Environmental Microbiology.* Submitted

Kamra DN (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current Science* **89**(1)**:** 124-135

Kimsé M, Gidenne T, Bayourthe C, Monteils V (2008) A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit cæcum: relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Science* **17**(2): 1257-5011

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **27**(5)**:** 663-693

Krom MD (1980) Spectrophotometric determination of ammonia. *The analyst* **105**(1249)**:** 305-316

Langsrud Ø (2002) 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *The Statistician* **51:** 305-317

Langsrud Ø (2005) Rotation tests. *Statistics and Computing* **15:** 53-60

Layton A, McKay L, Williams D, Garrett V, Gentry R, Sayler G (2006) Development of bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6)**:** 4214-4224

Lebas F, Laplace JP, Droumenq P (1982) Effets de la teneur en énergie de l'aliment chez le lapin. Variations en fonction de l'âge des animaux et de la séquence des régimes alimentaires. *Annales de Zootechnie* **31:** 233–256.

Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology.*, 2 edn. Amsterdam: Elsevier.

Lelkes L (1987) A review of rabbit enteric-diseases: a new perspective. *Journal of Applied Rabbit Research* **10:** 55-61

Leser TD, Lindecrona RH, Jensen TK, Jensen BB, Moller K (2000) Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with Brachyspira hyodysenteriae. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8)**:** 3290-3296

Ludwig W, Strunk O, Westranm R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lübmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer K-H (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4)**:** 1363-1371

Michelland RJ, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2009a) Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* **in press**

Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Lamothe L, Cauquil L (2009b) Statfingerprints: a friendly graphical interface program for microbial fingerprint profiles processing and analysis. *Molecular Ecology Resources* **9**(5): 1359-1363

Michelland RJ, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Hamelin J, Fortun-Lamothe L (2009c) Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology* **107**(5): 1642-1650

Montagne L, Pluske JR, Hampson DJ (2003) A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology* **108**(1-4)**:** 95-117

Monteils V, Cauquil L, Combes S, Godon JJ, Gidenne T (2008) Potential core-species and satellite-species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 620-629

Partridge GG, Garthwaite PH, Findlay M (1989) Protein and energy retention by growing rabbits offered diets with increasing proportions of fibre. *Journal of Agricultural Science* **112:** 171–178

Peeters JE (1988) Recent advances in intestinal pathology of rabbits and further perspectives In *World rabbit congress*, Vol. 2, pp 293-313. Budapest, Hungary

Playne MJ (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **36**(8)**:** 638-644

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glockner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35(**21**):** 7188-7196

R development Core Team (2008) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Rosenzweig ML (1995) *Species diversity in space and time*, Vol. 10, Cambridge: Cambridge University Press.

Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI (2002) Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial ecology* **44**(2)**:** 186-197

Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**(1)**:** 6-20

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(11)**:** 4605-4614

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74:** 3583-3597

Vernay M, Marty J (1984) Absorption and metabolism of butyric acid in rabbit hind gut. *Comparative Biochemistry and Physiology* **77:** 89–96

Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe stes to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* **89:** 670-679

Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10)**:** 3854-3859

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *Journal of Nutrition* **134**(2)**:** 465-472

Zumstein E, Moletta R, Godon J-J (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 69-78

DISCUSSION GENERALE

Notre travail avait pour objectif de caractériser à l'aide d'outils moléculaires les écosystèmes digestifs dans deux espèces de mammifères herbivores : la vache et le lapin. Pour cela nous avons réalisé d'importants efforts méthodologiques pour la mise au point des techniques de CE-SSCP (bactéries et *Archaea*) et de qPCR (Bactéries totales, *Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella*) et l'exploitation statistique des profils CE-SCCP. A l'issue de ces mises au point nous avons étudié l'influence de différents facteurs de variation des écosystèmes digestifs dans les deux espèces afin de pouvoir réaliser une approche comparée entre les deux fermenteurs.

Cette volonté de réaliser une approche comparée pertinente a toutefois aboutis à des schémas expérimentaux différents pour s'adapter aux différences physiologiques entre les deux espèces. Nous avons par exemple étudié l'évolution postprandiale et la variabilité entre fractions de la communauté bactérienne uniquement dans le contenu ruminal de la vache. D'une part, la notion de repas est plus floue chez le lapin, qui réalise 20 à 30 repas par jour. D'autre part, chez le lapin, le contenu cæcal est très homogène et il n'est pas possible d'identifier plusieurs fractions. De plus, les perturbations nutritionnelles appliquées, bien qu'étant de même nature, ne sont pas de la même ampleur chez les deux animaux. En effet, avant perturbation, les régimes alimentaires des deux espèces cibles possèdent un ratio amidon/cellulose proche de 1. En revanche, durant le challenge nutritionnel, l'augmentation du ratio amidon/cellulose est beaucoup plus importante chez le lapin (4.7) que chez la vache (1.6). Enfin, pour des raisons économiques et techniques, les effectifs mis en place sont beaucoup plus importants dans les protocoles expérimentaux sur le que chez la vache.

Dans la partie qui va suivre, nous allons dans un premier temps réaliser une analyse critique des méthodologies utilisées, en évaluant leurs pertinences, intérêts et limites pour atteindre nos objectifs. Dans un deuxième temps, nous réaliserons une approche comparée des écosystèmes digestifs (rumen, cæcum et fèces) et discuterons de l'importance relative de différents facteurs de variation sur la variabilité de ces écosystèmes. Enfin, nous présenterons les relations entre le biotope et le microbiote.

1. ANALYSE CRITIQUE DE LA METHODOLOGIE

D'une point de vue méthodologique, l'originalité et la force de notre travail résident dans *i)* **le couplage** des diverses **techniques** récentes **de biologie moléculaire** (CE-SCCP et qPCR) pour la caractérisation du microbiote digestif avec la mesure des paramètres du biotope (pH, potentiel redox et paramètres fermentaires) afin d'avoir une approche plus

exhaustive des écosystèmes digestifs, *ii)* l'utilisation et **le développement de méthodes d'exploitation des informations** contenues dans les profils CE-SSCP pour caractériser les communautés bactériennes à la fois dans leur diversité et leur structure, et *iii)* **la création d'un logiciel** libre de droits, StatFingerprints, pour rendre accessible à la communauté scientifique nos recherches sur le traitement et l'analyse des profils CE-SSCP.

1.A. LA TECHNIQUE CE-SSCP

1.A.1. Atouts et limites

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi d'utiliser la CE-SSCP comme technique d'empreinte moléculaire pour étudier les communautés des écosystèmes digestifs chez la vache et le lapin. Nous pouvons identifier **trois limites à la méthode utilisée** pour la réalisation de nos objectifs.

La première limite concerne **les biais inhérents à l'extraction et à la purification de l'ADN** (Luna *et al.*, 2006 ; Martin-Laurent *et al.*, 2001; Stach *et al.*, 2001 ; Tang *et al.*, 2008) et à **l'amplification par PCR : choix des amorces, choix de l'enzyme et amplification différentielle** (Zhu *et al.*, 2002). Pour l'extraction nous avons utilisé le kit d'extraction QIAmp® DNA Stool Mini kit (Qiagen Ltd, West Sussex, Angleterre) qui a été montré comme efficace pour les écosystèmes digestifs (Li *et al.*, 2003). En ce qui concerne l'amplification par PCR, les premiers essais de notre travail (Etude expérimentale – Chapitre 2) ont été réalisés avec l'enzyme Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene) avec 30 cycles PCR. Cependant, des essais ultérieurs réalisés dans notre laboratoire (Combes *et al.* communication personnelle) ont montré, en accord avec les résultats de Zinger *et al.* (2007), que l'enzyme Isis DNA Polymerase (MP Biomedicals, Illkirch, France) produit une plus grande quantité d'amplicons pour une haute fidélité. Par conséquent, les dernières études (Etude expérimentale – Chapitre 3) ont été réalisées avec l'enzyme Isis DNA Polymerase. De plus, l'utilisation de 30 cycles d'amplification avec l'enzyme Isis DNA Polymerase sur les échantillons provenant du lapin a montré que les profils CE-SSCP saturaient. C'est pourquoi les derniers essais (Etude expérimentale – Chapitre 3) ont été réalisés avec 25 cycles d'amplification PCR pour les échantillons prélevés chez le lapin et 30 cycles d'amplification pour les échantillons prélevés chez la vache.

La deuxième limite de notre travail porte sur le fait que la CE-SSCP est fréquemment associée à **des phénomènes de co-migration**, de façon d'autant plus importante que la communauté est diverse. De ce fait, un seul pic ne correspond pas toujours à une seule espèce

mais peut être associé à un assemblage d'espèces (Kowalchuk & Stephen, 2001 ; Loisel *et al.*, 2006; Schmalenberger & Tebbe, 2003 ; Zinger *et al.*, 2007). Ainsi, Loisel *et al.* (2006) ont montré que dès qu'un milieu contient plus de 100 espèces des phénomènes de co-migration sont systématiquement observés en CE-SSCP. Les pics du profil CE-SSCP ne représentent alors que les espèces dominantes du microbiote (Fromin *et al.*, 2002; Nakatsu *et al.*, 2000). Plus ces phénomènes de co-migration sont importants, plus le signal est saturé, et plus les modifications de profils que l'on observe concernent les espèces majeures du microbiote et non les espèces mineures. Pour diminuer ces phénomènes de co-migration, une des solutions serait de réaliser les études sur des groupes phylogéniques plus restreints, regroupant donc moins d'espèces, à l'aide de couples d'amorces plus spécifiques. Les CE-SSCP seraient alors réalisées sur chacun de ces sous groupes bactériens et aboutiraient à des profils non ou moins saturés (Combes *et al.* communication personnelle). Ces phénomènes de co-migration ont probablement géné notre analyse des résultats des 2 derniers essais (Etude expérimentale – Chapitre 3). Ainsi, nous avons observé une modification des quantités de bactéries, *Firmicutes* et *Bacteroides Prevotella* en qPCR mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de façon parrallèle des modifications de la structure globale de la communauté bactérienne en CE-SSCP.

D'autre part, **la technique de CE-SSCP ne permet pas l'affiliation phylogénétique des pics** observés contrairement aux techniques de migration traditionnelles sur gel pour lesquelles un séquençage peut être réalisé après excision des bandes du gel (Costa *et al.*, 2006 ; Mohr & Tebbe, 2006; Schmalenberger & Tebbe, 2003). Pour les techniques basées sur une migration en capillaire, seule la T-RFLP permet une probabilité d'affiliation taxonomique par identification des fragments en fonction de la taille dans des bases de données spécifiques. Une migration d'espèces identifiées après clonage pourrait permettre en théorie une assignation *a posteriori* des pics obtenus au cours d'un essai en fonction de l'abscisse du pic. En effet, la migration avec la méthode CE-SSCP a été montrée très reproductible (Hong *et al.*, 2007; Hori *et al.*, 2005). Toutefois, le travail préalable de clonage et de séquençage est très long et n'a pas encore été réalisé dans les écosystèmes qui nous intéressent. De plus, il faudrait que le travail d'affiliation phylogénétique se fasse sur des profils CE-SSCP ne présentant pas de phénomènes de co-migration, notamment en découpant la commnauté bactérienne en divisions principales.

1.A.2. Traitement du signal

Les modalités de traitement des profils CE-SSCP proposées par la majorité des programmes existants (GeneMarker de SoftGenetics Inc, DAx de Van Mierlo program ou GeneScan d'Applied Biosystems) restent rudimentaires et consistent à aligner les profils sur l'axe des abscisses et à normaliser les courbes avec un minimum de paramétrages possibles. Ce traitement des profils CE-SSCP reste insuffisant pour une exploitation optimale (Zemb *et al.*, 2007). Ainsi, par exemple, il a été montré que le bruit de fond sous les pics devait ête analysé (Loisel *et al.*, 2006). C'est la raison pour laquelle, dans ce travail de thèse, nous avons développé des algorithmes pour traiter de façon plus efficace les profils CE-SSCP. Ces algorithmes ont été regroupés dans un porgramme informatique -StatFingerprints-. En ce qui concerne le traitement des profils et par rapport aux autres programmes existants (hormis Safum de Zemb *et al.* 2007), le programme StatFingerprints permet *i)* de ré-orienter la ligne de base des profils, *ii)* d'aligner l'axe des ordonnées des profils, *iii)* de paramétrer complétement l'algorithme de détection des pics au sein des profils, et *iv)* de prendre en compte l'information contenue dans le bruit de fond aussi bien pour l'estimation de la diversité que pour l'analyse de la structure.

Toutefois, des améliorations pourraient être apportées, notamment en développant des algorithmes pour supprimer de façon objective les pics artefacts au sein des profils. En effet, les techniques actuelles utilisent un seuil définit par l'utilisateur de façon arbitraire au-dessous duquel les pics de tous les profils sont considérés comme des artefacts (Osborn *et al.*, 2000). Une amélioration consisterait à définir un seuil optimal pour chaque profil avant de les normaliser. Des valeurs de seuil propres à chaque profil peuvent ainsi être calculées en divisant l'aire totale de chaque profil par un diviseur commun. Ensuite les pics de chaque profil dont l'aire est inférieure au seuil de ce profil sont supprimés et la proportion entre l'aire initiale du profil CE-SSCP et le nombre de pics restant est calculée. En répétant ces étapes avec des diviseurs différents, on peut ainsi définir un diviseur optimal en gardant celui qui engendre le ratio aire totale initiale/ nombre de pics restants le plus constant parmi tous les profils du jeu de données. Ce diviseur optimal engendre un seuil propre à chaque profil qui permet de distinguer de façon objective les pics artefacts des vrais pics.

1.A.3. Estimation de la diversité

La diversité microbienne est un indicateur qui prend en compte le nombre d'espèces (richesse) et l'abondance relative de chaque espèce. Cependant, les techniques d'empreintes

moléculaires ne permettent pas de connaître la richesse réelle de l'échantillon car les espèces les plus rares sont masquées par les espèces dominantes lors des phénomènes de co-migration (Forney *et al.*, 2004; Pedros-Alio, 2006). L'importance de ces phénomènes de co-migration peut être renseignée en analysant le bruit de fond sous les pics du profil CE-SSCP (Loisel *et al.*, 2006). Dans ce travail de thèse, ce bruit de fond a été pris en compte dans le calcul de la diversité en utilisant l'algorithme développé par Haegeman *et al*. (2008). La diversité calculée ainsi à partir des profils CE-SSCP correspond à une très bonne estimation de la diversité réelle de Simpson et ce, quelle que soit la richesse ou la régularité de l'abondance relative des espèces (Haegeman *et al.*, 2008).

1.A.4. Analyse de la structure des communautés microbiennes

Notre travail concernant la structure des communautés bactériennes a consisté en une analyse fine des profils CE-SSCP : *i)* apparition ou disparition de pics, ou *ii)* modification de l'abondance relative des pics en fonction des facteurs de variation étudiés. Ce travail fait appel à des analyses statistiques multivariées. En effet, les profils CE-SSCP sont comparés deux à deux pour produire une matrice de proximité. Pour explorer cette matrice, les profils peuvent être classés hiérarchiquement sous forme de dendogramme ou bien représentés sous forme de points agencés les uns par rapport aux autres en utilisant une méthode d'ordination telle que l'ACP ou le nMDS (Legendre & Legendre, 1998). Toutefois, il est important de noter que les résultats du classement hiérarchique dépendent fortement de l'algorithme utilisé et que les techniques d'ordination et de classement hiérarchique engendrent des pertes d'information (Kropf *et al.*, 2004). C'est pourquoi, la seule observation visuelle de ces représentations pour l'analyse de la structure de la communauté, comme cela est fréquemment réalisé, est, à notre avis, insuffisante et doit être confirmée par un test statistique. Dans notre travail, nous avons systématiquement conforté les observations de regroupements au sein des ordinations par des tests statistiques tels que l'ANOSIM ou la FF-MANOVA. De plus, lorsque les regroupements (par facteurs de variation) ont été significatifs, nous avons déterminé quels pics au sein des profils CE-SSCP expliquent les différences entre les regroupements en utilisant des tests statistiques univariés sur chaque scan des profils CE-SSCP. Cette analyse est rarement appliquée et permet pourtant de rendre compte des modifications de pics par rapport aux facteurs de variation. En revanche, l'identification des pics eux-mêmes, comme une suite de scans consécutifs, s'est révélée très délicate en raison de la difficulté à classer certains pics au sein de catégories définies par des fenêtres de scans. En effet, lors d'essais préliminaires, il nous a été impossible de classer certains pics au sein de

catégories car ils chevauchaient deux catégories prédéfinies. De plus, nous pensons que la détection de ces pics nécessite de faire des choix arbitraires : *i)* définition du seuil arbitraire au deçà duquel les pics sont considérés comme des artefacts, et *ii)* définition du début et de la fin d'un pic.

La plupart des méthodes statistiques que nous avons mises en œuvre n'ont, à notre connaissance, pas été utilisées pour l'analyse des profils moléculaires des écosystèmes digestifs. En ce sens, notre **travail apporte une contribution significative à la compréhension et aux méthodes d'étude de ces écosystèmes**.

En résumé, nous avons choisi d'utiliser la CE-SSCP pour une caractérisation globale de l'ensemble de la communauté microbienne des fermenteurs digestifs de la vache et du lapin. En effet, bien qu'elle soit exposée aux biais relatifs à toutes les techniques basées sur la PCR (biais d'extraction et de purification de l'ADN, biais d'amplification PCR), la CE-SSCP est une des techniques les plus robustes et les plus sensibles. Elle est donc parfaitement adaptée pour discriminer les nombreuses espèces présentes dans les fermenteurs digestifs. Toutefois sa résolution reste insuffisante au regard de la diversité spécifique et de ce fait des saturations du signal CE-SSCP sont observées. En conséquence, les outils d'analyse utilisés et les interprétations faites des résultats doivent prendre en compte ces phénomènes de saturation. Tout au long de ce travail, nous avons limité autant que possible ce biais, notamment par l'utilisation d'un indice de diversité adapté.

1.B. LA QPCR

1.B.1. Choix des divisions bactériennes étudiées

Dans les écosystèmes digestifs de la vache (Kocherginskaya *et al.*, 2001 ; Tajima *et al.*, 1999) et du lapin (Abecia *et al.*, 2005; Monteils *et al.*, 2008), les bactéries présentes se divisent en deux divisions largement majoritaires : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. De plus, au sein de la division *Bacteroidetes*, les taxons présents dans les systèmes digestifs sont les *Bacteroides Prevotella*. Dans ce travail de thèse, nous avons donc choisi de diviser la communauté bactérienne en ces deux groupes largement majoritaires les *Firmicutes* et les *Bacteroides Prevotella* afin de mieux caractériser les populations bactériennes. La plupart des auteurs s'attachent davantage à caractériser des micro-organismes responsables de voies métaboliques majeures comme la fibrolyse (Denman & McSweeney, 2006; Koike & Kobayashi, 2001 ; Krause *et al.*, 2000 ; Mosoni *et al.*, 2007). Toutefois, plusieurs travaux

récents s'efforcent de caractériser les *Firmicutes* et les *Bacteroides Prevotella* car le ratio *Firmicutes*/*Bacteroides Prevotella* serait en corrélation directe avec l'obésité chez l'Homme (Armougom & Raoult, 2008; Ley *et al.*, 2005) et le porc (Guo *et al.*, 2008a) ainsi qu'avec la santé digestive chez l'Homme (Hopkins & Macfarlane, 2002).

1.B.2. La qualité des amorces PCR

Au cours de notre travail, nous avons défini de nouvelles amorces pour quantifier les *Firmicutes* et les *Bacteroides Prevotella*. La spécificité des amorces a été évaluée en calculant le pourcentage de séquences hybridées par les amorces du groupe ciblé d'une part (hybridation spécifique) et d'autre part des groupes non ciblés (hybridation non spécifique) en utilisant le logiciel ARB (Ludwig *et al.*, 2004) avec la base de données SSURef_96_SILVA_04_10_08_opt.arb du projet SILVA (Pruesse *et al.*, 2007). Guo *et al*. (2008b) ont utilisé des amorces pour quantifier les *Firmicutes*. Les amorces définies dans notre travail sont plus spécifiques que celles utilisées par Guo *et al*. (78% *vs* 71% des séquences ciblées et 4% *vs* 15% des séquences non ciblées). Ainsi notre **système de détection des *Firmicutes* est plus spécifique** que ceux précédemment décrits.

Layton *et al*. (2006) ont utilisé des amorces et des sondes pour quantifier les *Bacteroides Prevotella*. Bien que le pourcentage d'hybridation de nos amorces *Bacteroides Prevotella* soit inférieur pour le groupe ciblé (92% *vs* 97% soit 718 séquences), nous avons toutefois nettement amélioré le pourcentage d'hybridation non spécifique (0% contre 3% soit 7058 séquences). De plus, la température d'hybridation de nos amorces *Bacteroides Prevotella* est très proche (59.5°C et 60.1°C) de celle recommandée (60°C) pour l'utilisation du TaqMan® universal PCR master mix (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). En conséquence, **notre système de détection des *Bacteroides Prevotella* reste spécifique** et surtout parfaitement en adéquation avec la température d'hybridation conseillée.

En résumé, afin de mieux caractériser les communautés bactériennes des fermenteurs digestifs, nous avons utilisé des techniques de qPCR sur les divisions bactériennes qui y sont majoritairement présentes (*Firmicutes* et les *Bacteroides Prevotella*). La qPCR permet de rendre compte de l'aspect quantitatif des communautés étudiées contrairement à la CE-SSCP qui nous donne une représentation qualitative et semi-quantitative du microbiote. Les informations fournies par les deux techniques sont donc parfaitement complémentaires et permettent de mieux caractériser le microbiote.

Les méthodes de détection que nous avons mises au point sont plus spécifiques pour les *Firmicutes* et les *Bacteroides Prevotella* que les méthodes précédemment décrites.

2. COMPARAISON DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES CHEZ LA VACHE ET LE LAPIN

2.A. INTERETS ET OBJECTIFS DE L'APPROCHE COMPAREE

Les deux modèles retenus dans le cadre de notre travail, la vache et le lapin, ont été choisis car la physiologie digestive de leur fermenteur est représentative des deux principales stratégies évolutives rencontrées chez les mammifères herbivores. Chez la vache, le rumen est de grande taille, compartimenté et situé en amont du tube digestif. En revanche, chez le lapin le cæcum est de petite taille, non-compartimenté et situé en fin de tube digestif.

Une approche comparée de deux modèles aussi différents permet de mieux appréhender le fonctionnement global des fermenteurs digestifs. En effet, aussi différents soient ils, un des principaux services rendu par le fermenteur digestif de la vache et du lapin est la dégradation des composés peu digestibles (fibres) pour les rendre accessibles à l'hôte. L'approche comparée permet de décrire les caractéristiques communes des communautés microbiennes partagées par les fermenteurs digestifs étudiés mais aussi les particularités propres à chaque fermenteur. L'objectif de ce travail était de caractériser les communautés procaryotiques des fermenteurs digestifs des herbivores en termes de richesse, de diversité, de structure et de composition des communautés procaryotiques.

Ce travail a également apporté des éléments de réponse sur la caractérisation des écosystèmes digestifs étudiés en l'absence ou en présence d'une perturbation induite.

2.B. COMPARAISON DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES CHEZ LES DEUX ESPECES

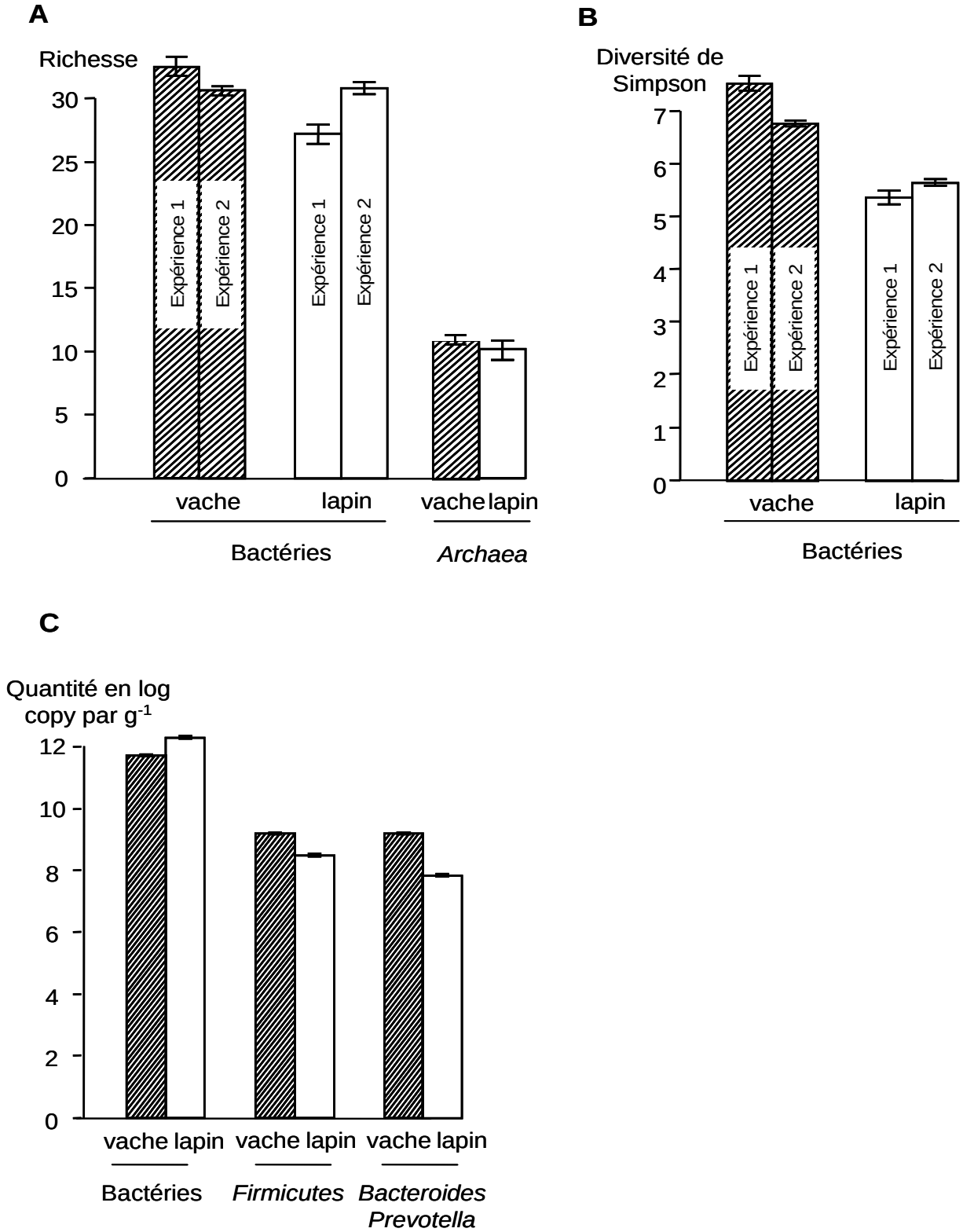


Figure 47. Comparaison des communautés procaryotiques du rumen de la vache et du cæcum de lapin pour les bactéries et les *Archaea* en termes de richesse (A), de diversité de Simpson (B) et de densités de Bactéries, de *Firmicutes* et de *Bacteroides Prevotella* (C).
La richesse est exprimée en nombre de pics au sein des profils CE-SSCP et correspond donc au nombre d'espèces majoritaires

En estimant le nombre moyen de copies du gène 16S par cellule à 2.9 (Acinas *et al.*, 2004), la communauté bactérienne du rumen, en conditions normales (*e.g.* individu adulte, avec un régime standard, sans perturbation induite) est composée en moyenne de 2.0×10^{11} bactéries ml^{-1}, 6.3×10^{8} *Firmicutes* ml^{-1}, et 5.7×10^{8} *Bacteroides Prevotella* ml^{-1} pour une diversité moyenne de Simpson de 6.2 ± 0.8 (Etude expérimentale – Chapitre 3). La communauté bactérienne du cæcum du lapin, en conditions normales, est composée en moyenne de 1.3×10^{12} bactéries ml^{-1}, 2.1×10^{8} *Firmicutes* ml^{-1}, et 4.6×10^{7} *Bacteroides Prevotella* ml^{-1} pour une diversité moyenne de Simpson de 5.6 ± 0.8. Ainsi, d'un point de vue quantitatif, les communautés procaryotiques diffèrent donc entre ces deux fermenteurs digestifs. Les communautés de bactéries et d'*Archaea* du rumen sont plus riches (+8 % de pics pour les bactéries, +12 % pour les *Archaea* ; Figure 47A) que celles du cæcum et pour les bactéries plus diverses (+19 % pour l'indice de Simpson ; Figure 47B). Ces différences de richesse et de diversité de Simspon sont confirmées par l'observation des profils CE-SSCP moyens qui sont plus saturés chez la vache que chez le lapin (Figure 48). Le microbiote du rumen de la vache contient également une proportion moindre de bactéries (-4.9 %) mais davantage de *Firmicutes* (+8 %) et de *Bacteroides Prevotella* (+15 %) que le cæcum du lapin (Figure 47C). De plus, les structures des communautés de bactéries (Figure 49A) et d'*Archaea* (Figure 49B) diffèrent entre le rumen et le cæcum.

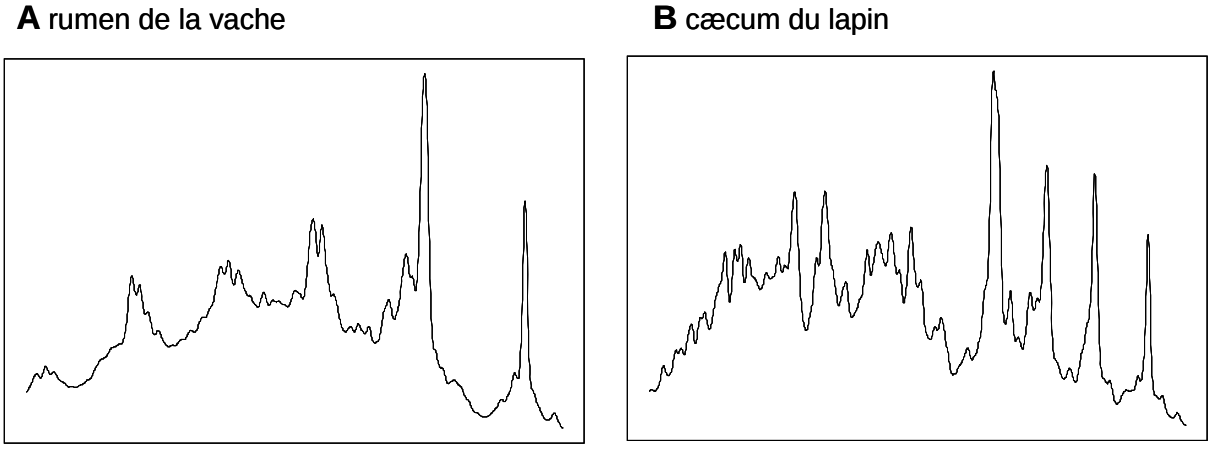


Figure 48. Comparaison des profils CE-SSCP moyens du rumen de la vache (A) et du cæcum du lapin (B).
D'après les études expérimentales du chapitre 3

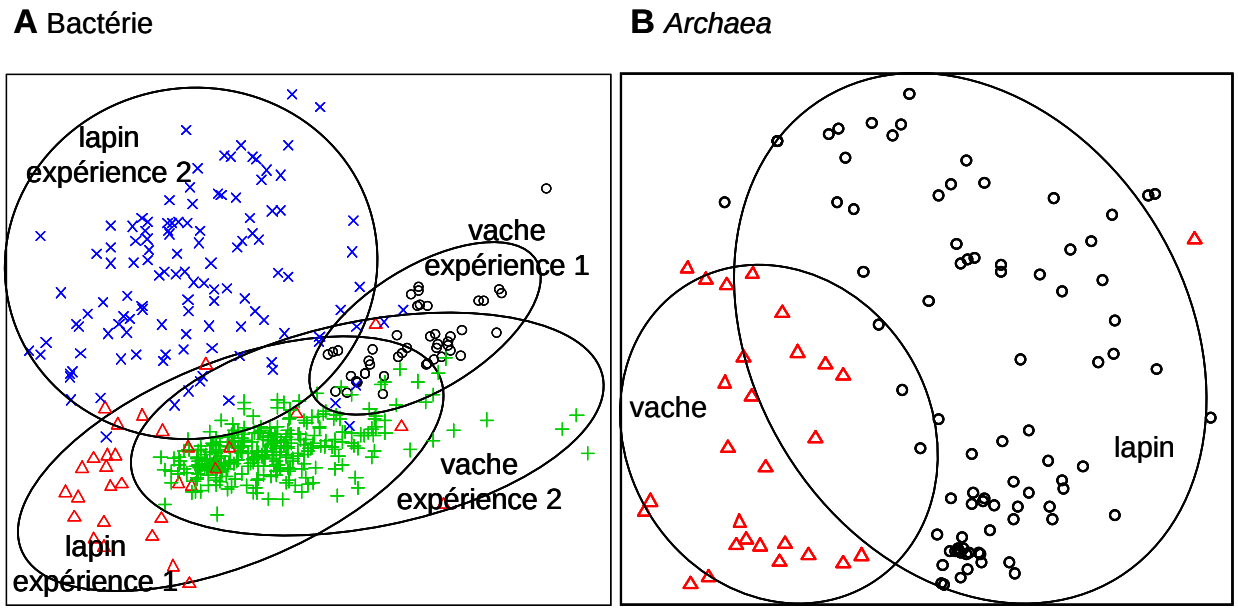


Figure 49. Comparaison de la structure de la communauté de bactérie (A) et d'*Archaea* (B) dans le rumen de la vache et le cæcum du lapin par nMDS.
La comparaison des profils CE-SSCP a été réalisée avec les distances euclidiennes et avec le coefficient de Dice-Sørensen respectivement pour les bactéries et les *Archaea*. Pour les communautés de bactérie (A) sont réprésentés les échantillons du rumen de la vache lors des expériences 1 (○) et 2 (+) et ceux du cæcum du lapin lors des expériences 1 (Δ) et 2 (×). Pour les communautés d'*Archaea* sont représentés les échantillons du rumen de la vache (Δ) et du cæcum du lapin (○).

Les spécificités des communautés de bactéries et d'*Archaea* pour chacune des deux espèces de mammifères herbivores étudiées peuvent être expliquées par des différences d'environnements dans lesquels évoluent les populations. En effet, dans nos conditions expérimentales, le contenu ruminal de la vache est moins acide (pH=6.67 ± 0.11 pour le rumen et pH=6.10 ± 0.29 pour le cæcum) et plus réducteur (Eh=-222 ± 17 mV pour le rumen et Eh=-192 ± 26 mV pour le cæcum) et contient moins d'AGV (77.0 ± 15.6 mM pour le rumen et 94.7 ± 16.6 mM pour le cæcum) et plus de NH_3-N (8.3 ± 2.5 mM pour le rumen et 6.0 ± 3.3 mM pour le cæcum) que le contenu du cæcum de lapin (Etude expérimentale – Chapitre 3). Ces paramètres environnementaux sélectionnent probablement les espèces de micro-organismes en fonction de leurs contraintes écologiques spécifiques (Ley *et al.*, 2006). Une autre hypothèse pour expliquer la spécificité espèce hôte/microbiote pourrait être une co-évolution spécifique entre chaque espèce hôte et son microbiote. Ainsi, la plus grande diversité et la plus grande richesse observées dans le rumen par rapport au cæcum pourraient être attribuées à la plus grande hétérogénéité des substrats entrant dans le rumen et donc du contenu ruminal, en comparaison aux substrats entrant dans le cæcum et donc au contenu cæcal. En effet, l'hétérogénéité est source d'une importante diversité de conditions

environnementales qui fourni une grande variété de micro-niches différentes favorables à l'apparition d'espèces différentes, spécifiques à chaque micro-niche (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008a). Cette relation entre hétérogénéité environnementale et diversité biologique est classiquement observée en macro-écologie et semble également avoir lieu dans certains écosystèmes microbiens comme dans les sédiments de marais salants (Horner-Devine *et al.*, 2004).

La spécificité espèce hôte/microbiote que nous observons ne peut toutefois pas se généraliser aux autres espèces de mammifères. En effet, étant donné que nous avons choisi des modèles biologiques les plus différents possibles quant à leur physiologie et leur anatomie digestive, il est possible que chez deux espèces de mammifères plus proches, cette specificité ne soit pas vérifiée. Des études comparatives complémentaires sur animaux plus proches permettraient de mieux définir l'importance de l'anatomie digestive, de la physiologie digestive, des conditions environnementales et des phénomènes potentiels de co-évolution dans la sélection des espèces procaryotiques au sein des écosystèmes digestifs.

En résumé, les communautés procaryotiques des fermenteurs digestifs sont spécifiques à chaque modèle étudié : la vache et le lapin. Les communautés du rumen sont plus riches (bactéries et *Archaea*), plus diverses (bactéries) et abritent des densités en *Firmicutes* et en *Bacteroides Prevotella* plus importantes que celles du cæcum du lapin. En revanche, la densité totale de bactéries est plus importante dans le cæcum du lapin que dans le rumen de la vache.

2.C. VARIABILITE INTERINDIVIDUELLE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES AU SEIN D'UNE MEME ESPECE

2.C.1. Cas des bactéries

Etant donné que les communautés bactériennes des fermenteurs digestifs abritent plusieurs centaines d'espèces, il est probable que les espèces présentes et leur abondance respective diffèrent d'un individu à l'autre. De tels résultats ont été mis en évidence chez la vache au niveau du côlon (Dowd *et al.*, 2008), chez l'Homme (Abell *et al.*, 2008 ; Abell & McOrist, 2007; Green *et al.*, 2006 ; Zoetendal *et al.*, 1998) et chez le chien (Simpson *et al.*, 2002). En revanche, une étude menée dans le cæcum de la caille n'a pas permis de mettre en évidence de différences entre individus (Scupham, 2007). Dans le rumen du mouton, les données de la bibliographie apportent des résultats contradictoires. Ainsi, au cours d'une étude portant sur l'alimentation, Sadet *et al.* (2007) ont démontré par classification hiérarchique des profils DGGE que les communautés bactériennes se regroupent d'abord en

fonction du régime alimentaire et dans une moindre mesure en fonction de la fraction ruminale (liquide, solide) mais ne se regroupent pas en fonction de l'individu. A l'inverse, Edwards (2005) a montré sur le même modèle (rumen du mouton) que les communautés bactériennes se regroupent d'abord par individu et non pas par l'effet d'un traitement antibiotique. Ces exemples illustrent la difficulté de mettre en évidence l'effet « individu hôte ». Nous formulons l'hypothèse que cette difficulté trouve deux origines. D'une part, l'étude d'un facteur de variation nécessite une répétition de l'échantillonnage. En conséquence, pour tester si l'écosystème digestif d'un individu héberge une communauté qui lui est propre, il faut échantillonner les mêmes individus soit à différents intervalles de temps, soit à différentes zones de prélèvements à un instant donné. Dans les deux cas, il existe une confusion partielle de l'effet « individu hôte » et de l'effet du temps ou de la zone d'échantillonnage. En conséquence, si l'effet « individu hôte » est significatif cela signifie que les communautés bactériennes présentent un patron commun qui se maintient soit dans le temps soit dans l'espace et ce indépendamment de la possible variabilité induite par l'effet temps ou espace. D'autre part, lorsque l'on cumule l'étude de la variabilité individuelle avec celle d'un ou plusieurs autres facteurs de variation, les résultats concernant l'effet « individu hôte » peuvent dépendre des autres effets étudiés. Or, les outils statistiques multivariés (ordinations, classification hiérarchique, tests basés sur une hypothèse) font ressortir en priorité les facteurs qui induisent le plus de variabilité et ne permettent pas de tester efficacement les interactions. C'est pourquoi, l'effet « individu hôte » sur la variabilité des communautés bactériennes peut apporter des résultats contradictoires en fonction de l'ampleur de l'effet des autres facteurs de variation étudiés au même moment.

A notre connaissance, avant nos travaux, aucune étude ne s'est intéressée à étudier la variabilité individuelle des communautés bactériennes du cæcum chez le lapin et du rumen chez la vache. Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de différences de communautés bactériennes entre les individus dans ces deux fermenteurs digestifs (richesse, diversité, structure, densité de bactéries, de *Firmicutes* et de *Bacteroides Prevotella*). En plus des considérations précédemment évoquées, nous formulons l'hypothèse qu'une absence de variabilité individuelle peut également s'expliquer par le fait que dans nos études les animaux sont suffisamment proches, génétiquement et environnementalement, pour contraindre les communautés bactériennes de la même façon. En effet, les animaux que nous avons utilisés sont issus de lignées sélectionnées depuis plusieurs générations (néozélandais x californien pour le lapin, Prim' Holstein pour la vache) ce qui entraine une forte similarité génétique

entre les individus (notion de race). De plus, l'élevage en conditions contrôlées (alimentation, logement, paramètres d'ambiance) tend à uniformiser les espèces présentes dans l'environnement qui peuvent coloniser le tractus digestif et le développement des hôtes réduisant ainsi leur influence sur la communauté bactérienne qu'ils hébergent. A l'opposé, il a été montré que l'importante variabilité des communautés bactériennes entre individus chez l'Homme peut être due aux habitudes alimentaires spécifiques à chaque individu (Flint *et al.*, 2007).

2.C.2. Cas des *Archaea*

Nos résultats démontrent que les communautés d'*Archaea* (richesse, structure) sont similaires entre individus au sein d'une même espèce : vache ou lapin. Des études, *in vivo* et *in vitro* sur l'émission de méthane des lapins adultes montrent que certains individus produisent une forte quantité de méthane alors que d'autres en produisent de faibles quantités (Belenguer *et al.*, 2008; Marounek *et al.*, 1999; Piattoni *et al.*, 1996). Chez l'homme, une situation similaire est observée avec des individus dits « producteurs » de méthane ($>10^8$ cellules ml^{-1}) et des individus dits « non producteurs » (10^2 à 10^3 cellules ml^{-1} ; Doré *et al.*, 1995; El Oufir *et al.*, 1996; Pochart *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que les individus non producteurs de méthane hébergent des communautés d'*Archaea* différentes et qu'une voie métabolique d'hydrogénotrophie est utilisée préférentiellement. Ainsi, l'acétogenèse réductrice a été mise en évidence chez les rongeurs (Prins & Lankhorst, 1977). Chez l'Homme et chez le rat cette variabilité dans la composition de la communauté d'*Archaea* semble davantage être due à des facteurs environnementaux et alimentaires qu'au génome de l'hôte (Florin *et al.*, 2000). De façon similaire, dans nos études, les animaux au sein d'une même espèce (vache ou lapin) partagent le même environnement (conditions de détention et d'élevage), et la même alimentation. De ce fait, si les observations de Florin *et al*. (2000) se vérifient chez la vache et le lapin, l'absence de spécificité des individus au sein d'une même espèce peut s'expliquer par cette homogénéité de l'environnement et de l'alimentation.

En résumé, au sein d'une même espèce hôte, l'existence d'une variabilité dans la composition de leur microbiote digestif entre individus hôtes est probable en raison du nombre d'espèces hébergées. Toutefois cette variabilité est peu aisée à mettre en évidence et son ampleur reste assez méconnue. Ainsi, en l'état actuel, nos travaux n'ont pas démontré chez la vache et chez le lapin, l'existence d'un patron spécifique à chaque individu qui se maintiendrait dans le temps et dont l'effet serait aussi important ou plus

important que d'autres effets induits. Nous suggérons que la similarité génétique entre des animaux issus de lignées sélectionnées et la forte standardisation des paramètres d'élevage de ces animaux tendent à uniformiser l'influence de l'hôte sur la composition de sa communauté bactérienne.

2.D. STRUCTURATION SPATIALE DES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES

2.D.1. Comparaison des différents fermenteurs au sein du tube digestif d'une même espèce

Nous avons comparé les communautés procaryotiques présentes à différents sites du tube digestif chez la vache et chez le lapin. Chez la vache, nous avons comparé les communautés du rumen, du réticulum et des fèces (comme représentant du contenu colique). Chez le lapin, nous avons comparé les communautés procaryotiques présentes dans le contenu cæcal, les cæcotrophes et les crottes dures (comme représentant du contenu colique). Nos résultats montrent que les communautés procaryotiques sont spécifiques de chaque compartiment au sein du tube digestif, que ce soit chez la vache ou chez le lapin. Cette spécificité semble également se vérifier chez d'autres mammifères comme chez le mouton (Lin *et al.*, 1997), la chèvre (Lin *et al.*, 1997), le porc (Lin *et al.*, 1997 ; Simpson *et al.*, 1999) et l'Homme (Marteau *et al.*, 2001; Zoetendal *et al.*, 2002b). Mais nos résultats montrent également que la proximité spatiale ou physiologique des sites de prélèvements entraine une proximité dans les communautés qu'ils hébergent. Ainsi, chez la vache, les communautés de bactéries (Figure 50A et Figure 47B) et d'*Archaea* (Figure 50C) du rumen et des fèces ont des structures différentes. A l'inverse, dans le réticulo-rumen, que le prélèvement soit réalisé en partie ventrale ou dorsale du rumen ou dans le réticulum, les communautés microbiennes sont similaires (Figure 51A). Chez le lapin, la richesse des communautés de bactéries et d'*Archaea*, la diversité bactérienne (non montré) et la structure des communautés d'*Archaea* (Figure 47C) du contenu cæcal, des cæcotrophes et des crottes dures sont similaires mais la structure des communautés bactériennes diffère légèrement. De plus, si la structure des communautés bactériennes diffère entre les trois types d'échantillons, celles du cæcum et des cæcotrophes sont plus proches entre elles que celle des crottes dures (Figure 52A et Figure 47B). Le cæcum est en effet situé en position distale du tube digestif et est adjacent au côlon d'où proviennent les crottes dures (De Blas & Wiseman, 1998) tandis que les cæcotrophes correspondent à du contenu cæcal couvert d'une couche de mucus qui a transité dans le colon avant excrétion (Carabaño & Piquer, 1998).

La physiologie des divers organes digestifs et la composition chimique de leur contenu peuvent expliquer ces situations. Ainsi, le pH, le degré d'anaérobiose et la composition du substrat entrant dans le rumen et le côlon de la vache varient de façon importante. Ces variabilités physico-chimique et de composition engendre des conditions environnementales différentes qui peuvent en partie expliquer les différences de structure observées. Plusieurs auteurs (Miller, 1995; Minato *et al.*, 1992; Morvan *et al.*, 1996) démontrent que le nombre d'*Archaea* est lié à celui des organismes cellulolytiques et donc à la proportion de fibres dans le fermenteur. Or 50 à 80 % de la fibrolyse a lieu dans le rumen. Par conséquent, une proportion de fibres moins importante dans les fèces que dans le rumen (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008c) pourrait expliquer la moindre richesse en *Archaea* dans les fèces que dans le rumen.

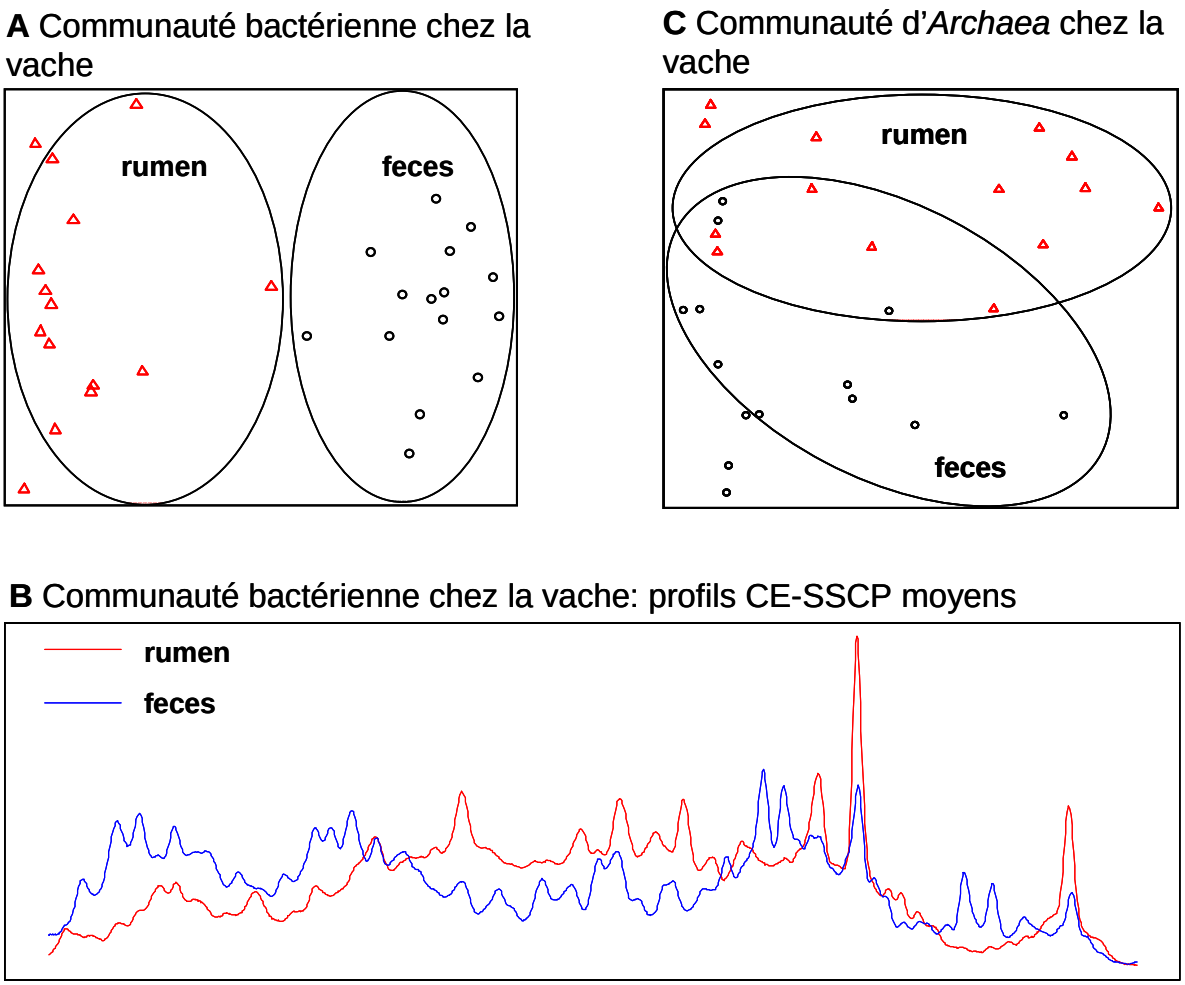
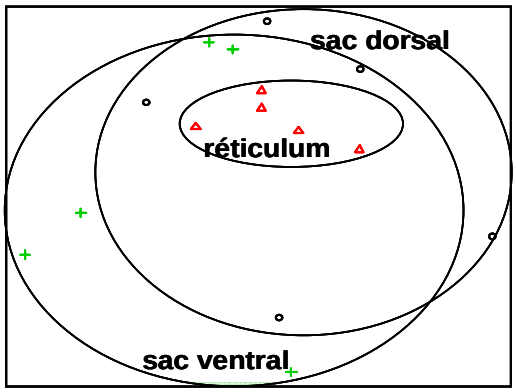


Figure 50. Comparaison de la structure des communautés de bactéries (A) et d'*Archaea* (C) entre le rumen (Δ) et les feces (○) de la vache. Comparaison des profils CE-SSCP moyens (B) du rumen (-) et des fèces (-).

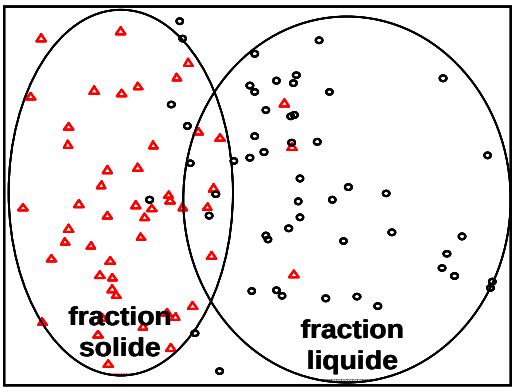
Chez le lapin, la composition chimique des cæcotrophes est proche de celle du contenu cæcal mais diffère de celle des crottes dures. Ainsi, les cæcotrophes contiennent plus de

protéines (300 et 170 $g.kg^{-1}$ de matière sèche respectivement pour les cæcotrophes et les crottes dures) tandis que les crottes dures comportent plus de fibres (180 et 300 $g.kg^{-1}$ de matière sèche respectivement pour les cæcotrophe et les crottes dures ; Carabaño *et al.*, 1988; Fraga *et al.*, 1991). Ces différences de composition engendrent des conditions environnementales différentes et pourraient donc être à l'origine des différences observées sur les communautés.

A Communauté bactérienne dans différentes zones du rumen de la vache



B Communauté bactérienne entre deux fraction du sac ventral du rumen de la vache



C Communauté bactérienne chez la vache: profils CE-SSCP moyens en fonction des fractions du rumen ventral

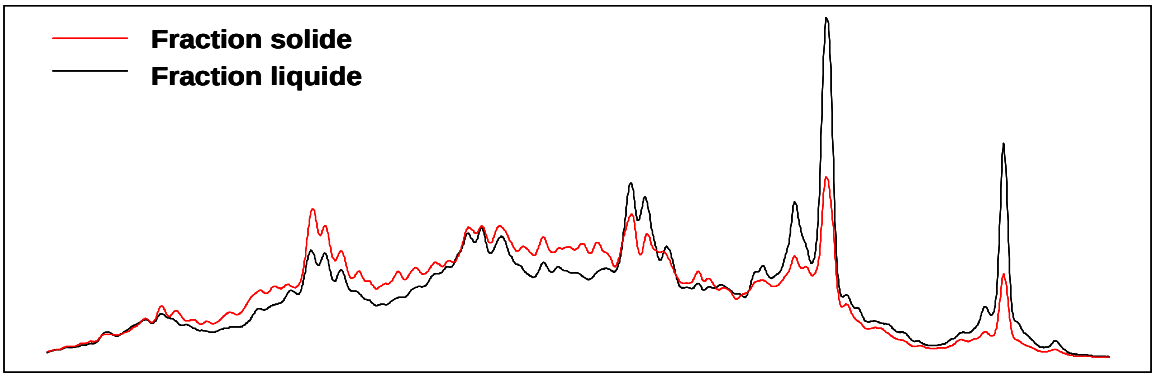
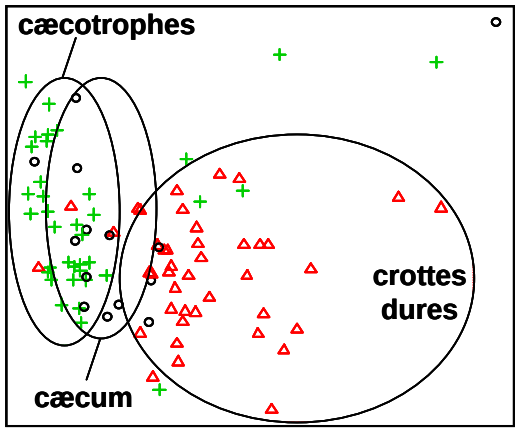


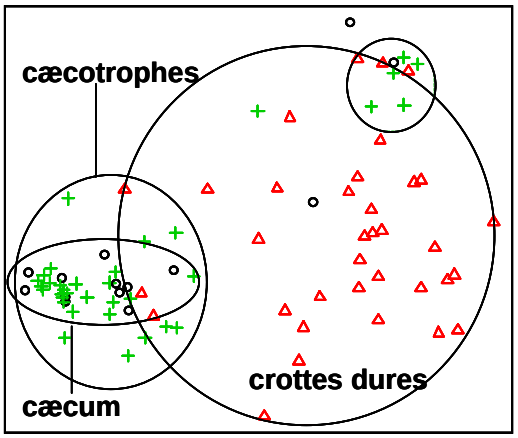
Figure 51. Comparaison de la structure des communautés bactériennes entre les compartiments du rumen (A) et entre les fractions (liquide, solide) au sein du sac ventral du rumen (B). Comparaison des profils CE-SSCP moyens de la fraction solide et de la fraction liquide au sein du sac ventral du rumen (C).

La structure des communautés bactériennes a été étudiée dans le sac ventral du rumen (+), dans le sac dorsal du rumen (○), dans le réticulum (Δ) puis entres les fractions solide (Δ, -) et liquide (○, -) du sac ventral du rumen.

A Communauté bactérienne chez le lapin



C Communauté d'*Archaea* chez le lapin



B Communauté bactérienne chez le lapin: profils CE-SSCP moyens

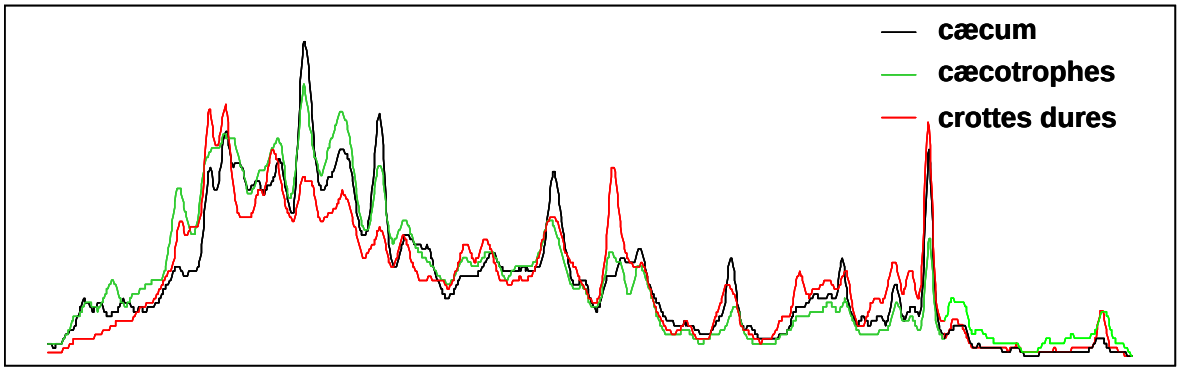


Figure 52. Comparaison de la structure des communautés de bactéries (A) et d'*Archaea* (C) entre le cæcum (○), les cæcotrophes (+) et les crottes dures (Δ) du lapin. Comparaison des profils CE-SSCP moyens du cæcum (-), des cæcotrophes (-) et des crottes dures (- ; B).

2.D.2. Variabilité entre fractions au sein du compartiment ventral du rumen

Chez le lapin, le contenu cæcal forme une pate homogène. Une différentiation des fractions liquide ou solide n'est donc pas pertinente. C'est la raison pour laquelle, cette notion n'a été abordée que pour le rumen de la vache. La structure des communautés bactériennes des fractions solide et liquide de la zone ventrale du rumen sont différentes (Figure 51B et Figure 51C). La fraction solide abrite une communauté bactérienne plus riche (Figure 53A) et plus diverse (Figure 53B) que la fraction liquide. De plus, la fraction solide du rumen contient une densité plus importante de bactéries, de *Firmicutes* et de *Bacteroides Prevotella* que la fraction liquide (Figure 53C). Ces différences ont déjà été observées dans le rumen de la vache (Cho *et al.*, 2006; Tajima *et al.*, 1999), dans le rumen du mouton (Larue *et al.*, 2005; Tajima *et al.*, 1999) et dans le côlon de l'Homme (Walker *et al.*, 2008). Les bactéries de la

fraction solide du rumen sont en contact avec un substrat hétérogène qui fournit aux bactéries de nombreuses conditions environnementales à l'échelle microscopique. Cette plus grande variété de micro-niches pour la fraction solide du rumen en comparaison avec la fraction liquide permettrait la colonisation d'un plus grand nombre d'espèces en accord avec nos résultats. Cette relation entre l'hétérogénéité des habitats d'un écosystème et la diversité spécifique a déjà été observée chez les microorganismes colonisant les sédiments des marais salants (Horner-Devine *et al.*, 2004).

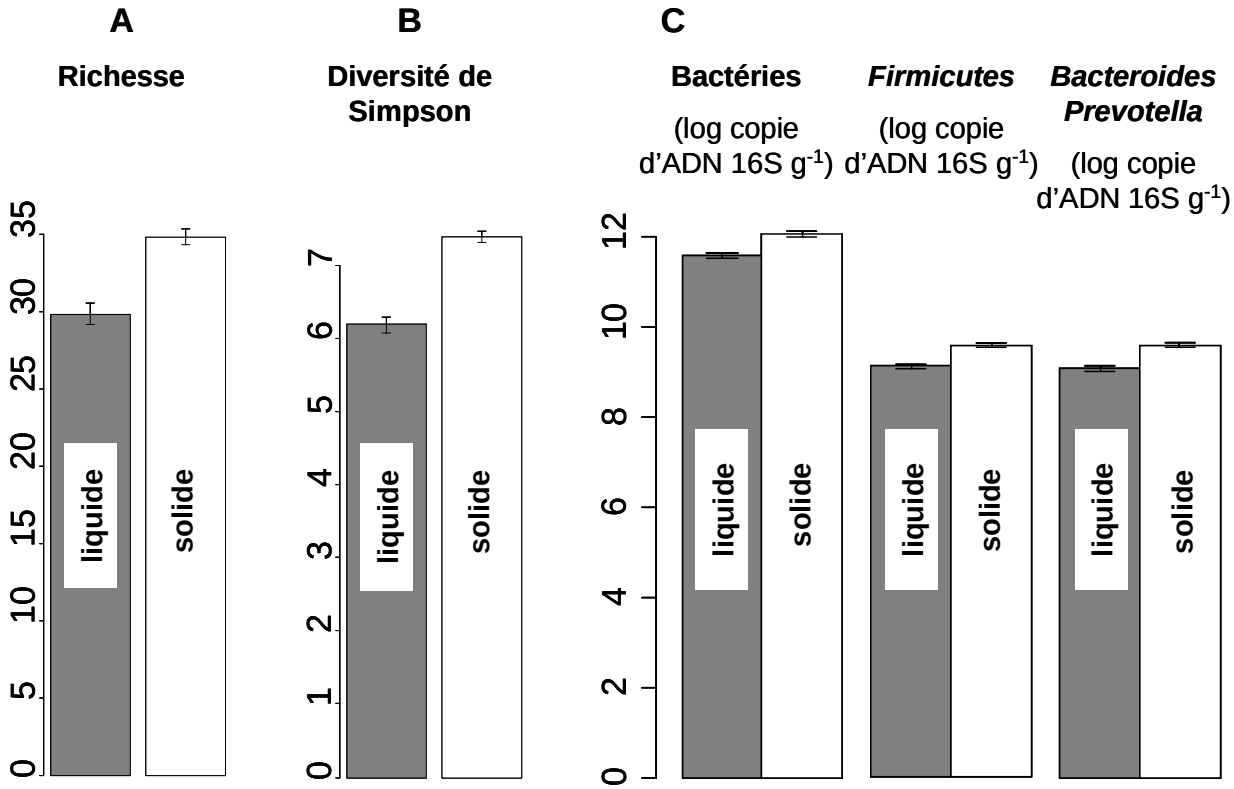


Figure 53. Comparaison de la richesse bactérienne (A), de la diversité de Simpson (B) et des densités de bactéries, *Firmicutes* et *Bacteroides Prevotella* (C) entre la fraction liquide et solide du contenu ruminal du sac ventral.
La richesse est exprimée en nombre de pics au sein des profils CE-SSCP et correspond donc au nombre d'espèces majoritaires

En résumé, les différents compartiments du tube digestif abritent des communautés de bactéries et d'*Archaea* qui sont d'autant plus distinctes qu'ils sont distants et qu'ils présentent une physiologie différente et un contenu de composition différente. De plus, au sein du rumen, la communauté présente dans la fraction solide apparait plus riche et plus diverse que celle présente de façon planctonique dans la fraction liquide. D'un point de vue pratique, notre travail démontre que les cæcotrophes peuvent être utilisés comme matrice alternative d'échantillonnage du contenu cæcal. Cette alternative permettra de collecter des échantillons, à moindre coût, sans

perturbation des animaux, et de réaliser ainsi un suivi dynamique des communautés pour un même individu.

2.E. EVOLUTIONS TEMPORELLES

2.E.1. Dynamique naturelle des communautés procaryotiques

Dans ce travail nous avons étudié les évolutions temporelles chez les communautés procaryotiques des fermenteurs digestifs, en l'absence de perturbations induites, et pour des écosystèmes en état climacique (animaux pré pubères pour le lapin ou pubères pour la vache). Nos résultats montrent que la position du fermenteur sur le tube digestif semble influencer sa dynamique naturelle. Ainsi, dans l'écosystème ruminal de la vache, situé en amont du tube digestif, toutes les caractéristiques bactériennes étudiées (richesse, diversité, structure, quantification des bactéries, des *Firmicutes* et des *Bacteroides Prevotella*) fluctuent de manière sporadique et imprévisible mais significative entre les semaines successives de prélèvement (Figure 40). Toutefois, ces oscillations autour d'un état sont de faible amplitude en comparaison des évolutions observées suite à une perturbation induite (nutritionnelle dans notre cas). En revanche, les communautés bactériennes du rumen (diversité et structure) restent stables au cours d'une journée jusqu'à 6 heures post-prandiales. A l'inverse, dans le cæcum qui est situé en aval du tube digestif, la communauté bactérienne (diversité, structure, quantification des bactéries, des *Firmicutes* et des *Bacteroides Prevotella*) reste stable dans le temps (Figure 43). Une telle stabilité a déjà été observée chez d'autres mammifères : l'Homme (Abell *et al.*, 2008; Abell & McOrist, 2007; Zoetendal *et al.*, 1998), le porc (Leser *et al.*, 2000) et le chien (Simpson *et al.*, 2002). Ces mammifères possèdent, comme le lapin, un fermenteur situé en position distale du tractus. Toutes ces données suggèrent qu'en l'absence de perturbation, la communauté bactérienne du cæcum est en état d'équilibre stable alors que celle du rumen est en état d'équilibre dynamique (Tuljapurkar & Semura, 1977). Un état d'équilibre dynamique est classiquement observé dans d'autres écosystèmes microbiens (Chave *et al.*, ; Fernandez *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 2007 ; Wingreen & Levin, 2006) mais n'a pas été observé chez le mouton par DGGE dont le rumen est également en situation proximale (Edwards *et al.*, 2005). Il a été montré qu'un tel état n'engendre pas forcément d'évolution dans les fonctionnalités de l'écosystème (Fernandez *et al.*, 1999).

Nos données suggèrent que la stabilité d'un écosystème serait favorisée lorsque le flux et la composition des nutriments entrant dans le fermenteur est plus constante, comme dans le cas du cæcum du lapin. A l'opposé, les communautés seraient plutôt en équilibre dynamique

lorsque le flux et la composition des nutriments ainsi que les conditions environnementales (température, dioxygène) sont plus variables. Ainsi, chez la vache, l'ingestion alimentaire entraine une entrée brusque de matières premières végétales et de dioxygène qui sont à une température plus faible que la température de l'écosystème ou de l'hôte. Toutefois, l'absence d'évolution post-prandiale ne corrobore pas cette explication. D'autres études sont nécessaires pour vérifier la validité de cette hypothèse et permettraient ainsi une meilleure compréhension du fonctionnement des fermenteurs digestifs des mammifères.

Les communautés d'*Archaea* présentent des comportements différents puisqu'elles semblent être stables dans les deux fermenteurs étudiés (rumen et cæcum). Des résultats similaires ont été observés chez l'Homme et le rat (Florin *et al.*, 2000). Cette absence d'évolution temporelle peut être expliquée par la faible richesse des communautés d'*Archaea* dans les systèmes digestifs, qui par conséquent ne peuvent pas faire de 'ré-ajustements' permanents de leurs microbiotes par redondance fonctionnelle (Cardinale *et al.*, 2002). Elle peut également être expliquée par nos choix méthodologiques (nested PCR puis analyse en mode binaire) qui rendent les analyses plus grossières et les différences subtiles plus difficiles à mettre en évidence.

2.E.2. Dynamique des communautés bactériennes suite à une perturbation

Nous avons étudié la dynamique des communautés bactériennes suite à une perturbation ponctuelle (prélèvement par voie chirurgicale dans le cæcum du lapin) ou maintenue dans le temps (augmentation du ratio amidon/fibres dans l'alimentation de la vache et du lapin). Ces deux types de perturbations (ponctuelle ou maintenue) apportent des réponses différentes sur le fonctionnement des écosystèmes. Ainsi, une perturbation ponctuelle permet d'apporter des réponses sur les capacités de résilience d'un écosystème et d'appréhender son seuil d'irréversibilité. D'un point de vue écologique, la résilience exprime l'aptitude d'un écosystème à retrouver sont état initial plus ou moins vite après une perturbation tandis que le seuil d'irréversibilité caractérise une perturbation dont l'amplitude dépasse la capacité de résilience de l'écosystème (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008a; Ives & Carpenter, 2007). En complément, les perturbations qui sont maintenues dans le temps permettent d'apprécier la réactivité et le temps d'adaptation nécessaire à un écosystème pour faire face aux nouvelles conditions qui lui sont imposées ou permettent au contraire d'apprécier son pouvoir de résistance à une perturbation (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2008a ; Ives & Carpenter, 2007).

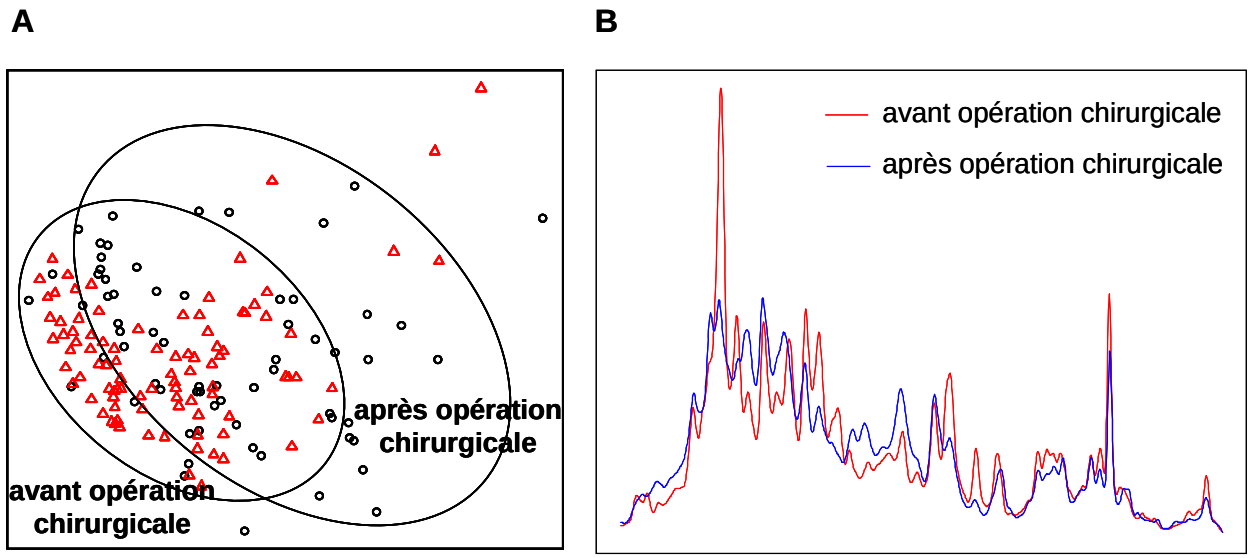


Figure 54. Structure de la communauté bactérienne du cæcum du lapin avant (Δ) et après (○) opération chirurgicale pour accéder au cæcum (A). Comparaison des profils CE-SSCP moyens des communautés bactériennes du cæcum avant (-) et après (-) la perturbation (B).

L'acte chirurgical que nous avons pratiqué sur le cæcum du lapin entraine *i)* une entrée de dioxygène dans le fermenteur qui fonctionne normalement en conditions anaérobiques (Kimsé *et al.*, 2008) et *ii)* une réponse inflammatoire locale qui peut influencer le microbiote à proximité de l'épithélium. Nos données montrent que les communautés bactériennes (structure, diversité et richesse) sont fortement perturbées une semaine après l'intervention chirurgicale et restent stables autour de cet état de perturbation jusqu'à la fin de l'étude, soit 2 semaines après la perturbation (Figure 33 ; Figure 54). Ce résultat suggère que la perturbation appliquée a eu une amplitude qui est proche du seuil d'irréversibilité du système. Des mesures réalisées quelques mois après cette perturbation permettraient de valider cette hypothèse. Pour l'étude de l'écosystème ruminal, toutes les données de notre travail proviennent de vaches porteuses de canules au niveau du rumen. Ces canules ont été posées plusieurs mois avant le début de nos essais et les réactions inflammatoires éventuelles avaient disparu au moment de nos prélèvements. L'utilisation de canules ruminales pour des raisons expérimentales est très répandue et aucune donnée ne permet de soupçonner une influence néfaste de cette pratique sur l'activité fermentaire des communautés microbiennes. De ce point de vue, les communautés bactériennes du rumen semblent plus robustes que celles du cæcum des lapins. Cette différence peut être reliée au positionnement proximal du rumen sur le tractus digestif qui s'accompagne d'entrée de dioxygène au moment de l'ingestion, à l'opposé du cæcum dans lequel n'entre pas de dioxygène ambiant. Toutefois, comme nous l'avons suggéré cette situation explique également probablement la différence fontionnelle entre les deux écosystèmes (équilibre dynamique *vs* équilibre stable).

La réponse des écosystèmes bactériens du rumen et du cæcum à une augmentation continue du ratio amidon/fibres dans l'alimentation de l'individu hôte présente des similarités et des différences. Dans les deux cas, une modification des communautés bactériennes est observée en réponse à la perturbation. Cette modification apparaît très rapidement après le début de la perturbation et se maintient tout au long de la perturbation. Ainsi, dans le rumen, toutes les mesures réalisées sur le microbiote (richesse, diversité, structure, quantification des bactéries, des *Firmicutes* et des *Bacteroides Prevotella*) ont diminués, parfois faiblement mais toujours significativement (Figure 40). Dans le cæcum, la perturbation que nous avons appliquée a également engendré des modifications de la communauté bactérienne (structure, quantification des bactéries, des *Firmicutes* et des *Bacteroides Prevotella*) dès le deuxième jour après la perturbation et ces modifications se sont maintenues durant les 39 jours d'observation (Figure 43). En revanche, l'indice de diversité est resté stable dans le temps (Figure 43). Pendant la perturbation, les vaches n'étaient pas en situation d'acidose et la mortalité des lapins n'était pas supérieure à celle des animaux témoins. Ces résultats suggèrent que la perturbation appliquée était d'ampleur modérée et que les communautés bactériennes du rumen et du cæcum se sont adaptées très rapidement à cette perturbation d'ampleur modérée. Toutefois, les communautés bactériennes du rumen et du cæcum présentent aussi des différences dans leur réponse à cette perturbation. Ainsi, chez la vache, pendant la période de perturbation, nous observons dans la communauté bactérienne ruminale des fluctuations sporadiques, dont la succession, l'ampleur et la fréquence ne permettent pas d'identifier une tendance évolutive particulière. En revanche, chez le lapin, la communauté bactérienne cæcale atteint après la perturbation un nouvel état de stabilité qui ne varie pas pendant le reste de la période de perturbation. Cette situation est probablement à rapprocher des observations précédemment réalisées pour ces deux écosystèmes en conditions non perturbées. Même en situation perturbée, l'écosystème ruminal semble se caractériser par un équilibre dynamique tandis que dans le cæcum les communautés bactériennes semblent être dans un équilibre statique.

En résumé, nos travaux démontrent que, chez des animaux adultes, la communauté bactérienne du fermenteur digestif de la vache (rumen) fluctue ponctuellement dans le temps selon un état d'équilibre dynamique alors que celle du fermenteur digestif du lapin (cæcum) reste stable dans le temps (état d'équilibre statique). Ces données peuvent être réliées à la position des fermenteurs sur le tube digestif qui sont soumis à des conditions et des flux de nutriments plus variables en

situation proximale qu'en situation distale. La réponse de ces fermenteurs à une perturbation nutritionnelle maintenue dans le temps démontre leur capacité d'adaptation et confirme leurs différences de fonctionnement (statique ou dynamique) observées en conditions non perturbées. Il est à noter que bien que l'équilibre de la communauté bactérienne du cæcum soit statique, celle-ci présente une capacité à s'adapter rapidement lors d'une perturbation.

3. LES RELATIONS ENTRE LES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET LEUR ENVIRONNEMENT

D'une façon générale, nos études n'ont pas permi de mettre en avant des corrélations importantes entre les caractéristiques de la communauté bactérienne (richesse, diversité, structure, quantité de Bactéries, de *Firmicutes* et de *Bacteroides Prevotella*) et les paramètres environnementaux (pH, potentiel d'oxydoréduction, concentrations en acides gras volatils, concentration en NH_3-N, concentrations en fibres alimentaires). Ces faibles corrélations ont été observées à la fois chez la vache et chez le lapin, que ce soit en conditions perturbées ou non. Toutefois, dans le rumen de la vache, lors de nos deux expériences nous avons mis en évidence une corrélation significative avec la concentration en NH_3-N. Le pouvoir réducteur (mesuré par le potentiel redox) et le pH sont des paramètres physico-chimiques connus pour sélectionner les espèces bactériennes dans les fermenteurs digestifs des animaux (Kamra, 2005). Etonnement dans nos études nous n'avons pas établi de relations directes avec ces paramètres que ce soit en l'absence de perturbation ou sous la contrainte d'une perturbation. Cette absence de corrélation pourrait être attribuée aux faibles changements de ces paramètres en réponse à la perturbation. Dans des études ultérieures, il serait intéressant d'appliquer des perturbations nutritionnelles plus conséquentes pour induire des changements importants des paramètres du milieu afin d'essayer de mettre en évidence des relations entre ces paramètres et la modification du microbiote.

En résumé, nous n'avons pas pu établir de fortes corrélations entre les caractéristiques des communautés bactériennes et les paramètres environnementaux mesurés. Toutefois, il semble que la concentration en NH_3-N soit toujours corrélée, mais faiblement, aux communautés bactériennes du rumen de la vache. Des perturbations plus importantes affectant de façon plus conséquente l'écosystème digestif permettraient sans doute de progresser dans la connaissance des relations entre le microbiote et son biotope.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Nous avions pour objectif de contribuer à une meilleure connaissance de l'écologie des communautés procaryotiques des fermenteurs digestifs des mammifères herbivores. Nous nous sommes intéressés à caractériser la variabilité taxonomique (entre espèces animales), individuelle, spatiale (inter- et intra- fermenteurs digestifs) et temporelle (dynamique journalière et hebdomadaire avec ou sans perturbation induite, dynamique post-prandiale) des communautés procaryotiques et à établir le lien entre ces communautés et leur environnement. L'originalité de nos travaux a consisté à comparer les communautés procaryotiques de deux modèles animaux, la vache et le lapin, dont les physiologies digestives sont très différentes et représentatives des deux principales stratégies évolutives rencontrées chez les mammifères herbivores actuels. Cette approche présente l'avantage de contribuer à identifier les caractéristiques écologiques des communautés procaryotiques qui sont communes à tous les fermenteurs digestifs et celles qui sont spécifiques à chaque stratégie évolutive.

D'un point de vue méthodologique, les communautés procaryotiques ont été caractérisées sur les gènes codant pour l'ARNr 16S en termes de diversité et de structure par CE-SSCP et en termes de densité en Bactéries totales, en *Firmicutes* et en *Bacteroides Prevotella* par la mise au point de systèmes de détection qPCR plus spécifiques que ceux précédemment décrits. Nous avons élaboré et utilisé de nouveaux algorithmes bioinformatiques et biostatistiques pour traiter et analyser les profils CE-SSCP et mis à la disposition de la communauté scientifique un logiciel libre de droits pour l'analyse des profils d'empreintes moléculaires (programme StatFingerprints sous R). Ces nouveaux outils nous ont permi de minimiser les artefacts de la CE-SCCP (décalages verticaux et horizontaux des signaux, intensité différentielle, saturation), et d'extraire le maximum d'informations écologiques contenues dans ces signaux (diversité, structure, espèces majoritaires, espèces rares). **En perspective**, il semble intéressant de **développer des algorithmes** permettant de supprimer de façon objective les pics artefacts au sein des profils. En effet, avec les techniques actuelles l'utilisateur définit lui-même et de façon arbitraire un seuil au-dessous duquel les pics sont considérés comme des artefacts. Une solution consisterait à définir un seuil optimal pour chaque profil avant de les normaliser. Pour cela, des valeurs de seuils propres à chaque profil peuvent être calculées en tenant compte de l'aire totale du profil étudié. Dans nos travaux, nous avons obtenu des profils CE-SSCP très saturés pour l'analyse des bactéries, c'est-à-dire avec un nombre modéré de pics et un bruit de fond important, car les amorces utilisées ciblaient l'ensemble des espèces bactériennes. A l'avenir, il serait donc intéressant **d'affiner l'image qualitative** que l'on a de la communauté bactérienne en

réalisant des analyses CE-SSCP pour cibler, non plus les bactéries totales, mais des sous groupes taxonomiques bactériens renfermant moins d'espèces. L'information obtenue sur les espèces sera ainsi plus précise d'un point de vue qualitatif mais aussi quantitatif. De plus, la limite principale de la CE-SSCP reste l'impossibilité d'identifier les espèces correspondant aux différents pics. En complément, des travaux de séquençage exhaustifs, permis par les nouvelles technologies ultra haut débit nous permettraient de compléter la caractérisation des communautés étudiées.

D'un point de vue cognitif, nos travaux démontrent que, dans des conditions normales, l'écosytème ruminal est composé de 2.0×10^{11} bactéries ml^{-1}, 6.3×10^{8} *Firmicutes* ml^{-1}, et 5.7×10^{8} *Bacteroides Prevotella* ml^{-1} qui habitent dans un milieu acide (pH=6.67), réducteur (Eh=-222 mV) contenant 77.0 mM d'AGV et 8.3 mM de NH_3-N. L'écosytème cæcal du lapin est composé en moyenne de 1.3×10^{12} bactéries ml^{-1}, 2.1×10^{8} *Firmicutes* ml^{-1}, et 4.6×10^{7} *Bacteroides Prevotella* ml^{-1} qui habitent dans un milieu acide (pH=6.10), réducteur (Eh=-192 mV) et qui contient en moyenne 94.7 mM d'AGV et 6.0 mM de NH_3-N. Ces résultats indiquent **une spécificité espèce hôte/microbiote** dans les deux modèles étudiés qui suggére un rôle déterminant de la physiologie digestive de l'hôte et/ou des phénomènes de co-évolution hôte/microbiote. Comparer des modèles biologiques plus proches en terme de physiologie digestive ou de taxonomie, deux espèces de ruminants ou deux espèces de lagomorphes, permettrait de confirmer ces hypothèses. Nos travaux n'ont pas mis en évidence de spécificité individuelle des communautés microbiennes digestives qui peut être expliquée par la proximité génétique des individus utilisés et/ou la forte standardisation de leurs conditions d'élevage. La comparaison des microbiotes chez des individus homozygotes (vrais jumeaux) ou encore chez des individus appartenant à la même espèce mais à des races différentes permettrait de mieux comprendre l'importance respective du génotype de l'hôte et de son environnement dans le déterminisme de son microbiote.

Nos travaux montrent que **les communautés microbiennes évoluent le long du tractus digestif** de sorte que plus les compartiments sont éloignés spatialement et physiologiquement, plus leurs microbiotes sont différents. Nous avons également confirmé une différence entre la communauté présente de façon planctonique dans la fraction liquide du contenu ruminal et celle attachée ou associée aux particules alimentaires dans la fraction solide. A l'état basal, la **communauté bactérienne du rumen** montre une fluctuation continue qui suggère **un état d'équilibre dynamique**. En revanche, **dans le cæcum** et sans perturbation, **la communauté bactérienne** semble **en équilibre statique**. Nous formulons

l'hypothèse que cette différence trouve son origine dans la situation du fermenteur sur le tractus digestif. En situation proximale, le fermenteur est soumis au moment de l'ingestion à des variations dans les paramètres du milieu (dioxygène, température) et dans les flux de nutriments (vitesse d'entrée et nature) qui peuvent modifier le microbiote sans remettre en cause sa fonction ni son équilibre. A l'opposé, dans les fermenteurs en situation distale, les paramètres du milieu et les nutriments entrant sont plus constants. Des travaux complémentaires sur d'autres espèces de mammifères herbivores permettraient de vérifier cette hypothèse et d'améliorer nos connaissances sur l'évolution temporelle de ces communautés. De plus, nos travaux démontrent qu'**une perturbation nutritionnelle de faible ampleur et maintenue dans le temps modifie légèrement les communautés bactériennes**. La **réponse** de la communauté bactérienne est **rapide** et les **délais d'ajustement** de la communauté nécessaires pour aboutir à un nouvel état d'équilibre semblent **courts**, suggérant une forte réactivité et une importante capacité d'adaptation. Toutefois, une opération chirurgicale sur fermenteur anaérobie semble une perturbation ponctuelle, de nature à dépasser le seuil de réversibilité du système. En perspective, il semble important de mieux préciser le lien entre l'amplitude de la perturbation et la réponse des communautés bactériennes en termes de résistance, de résilience, de temps d'adaptation et d'inertie du système. Des modèles de perturbations d'amplitudes plus fortes permettraient également de mettre en évidence des corrélations entre le microbiote et son biotope plus marquées que celles obtenues dans ce travail.

D'un point de vue finalisé, l'utilisation des antibiotiques chez les animaux d'élevage est de plus en plus réglementée. Cela nécessite la mise en place de nouvelles stratégies alimentaires, notamment dans la filière cunicole puisque l'on observe chez les lapins une forte mortalité causée par des pathologies digestives. Par ailleurs, dans la filière des bovins laitiers, les systèmes intensifs sont de plus en plus fréquents et nécessitent des rations énergétiques à base de glucides rapidement fermentescibles qui peuvent entrainer une acidification pathologique du rumen (acidose). Nos travaux confirment que l'alimentation, et notamment **la teneur en fibres de la ration est une voie de modulation possible pour ces écosystèmes matures**. Toutefois, il pourrait être plus efficace d'orienter les communautés microbiennes au cours de leur implantation dans le tractus digestif (après la naissance) pour améliorer la santé digestive chez le lapin et l'efficacité digestive chez la vache. En effet, durant cette période, le microbiote est particulièrement réceptif aux facteurs abiotiques. Cependant, si les modalités

de réorientation du microbiote au bénéfice de l'hôte restent à déterminer, la nutrition constituerait probablement un levier de choix pour orienter le microbiote.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe M, Iriki T, Tobe N, Shibui H (1981) Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo rumen of cattle. *Applied and environmental Microbiology* **41:** 758-765

Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ, McEwan NR (2005) Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* **244**(1)**:** 111-115

Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ, McEwan NR (2007) Effect of antibiotics on the bacterial population of the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Letters* **272:** 144-153

Abell GCJ, Cooke CM, Bennett N, Conlon MA, McOrist AL (2008) Phylotypes related to Ruminococcus bromii are abundant in the large bowel of humans and increase in response to a diet high in resistant starch. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 505-515

Abell GCJ, McOrist AL (2007) Assessment of the diversity and stability of faecal bacteria from healthy adults using molecular methods *Microbial Ecology in Health and Disease* **19:** 229–240

Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF (2004) Divergence and redundancy of 16s rRNA sequences in genomes with multiple rrn operon. *Journal of Bacteriology* **186**(9)**:** 2629-2635

Adjiri D, Bouillier Oudot M, Lebas F, Candau M (1992) Simulation in vitro des fermentations caecales du lapin en fermenteur à flux semi-continu. 1) Rôle du prétraitement du substrat alimentaire. *Reproduction Nutrition Development, 32, 351-360*

Adjiri D, Bouillier Oudot M, Lebas F, Candau M (1995) In vitro simulation of rabbit caecal fermentation in a semi-continuous flow fermentor .3. Effect of the quantity of dry matter introduced daily and reproductibility of the method. *Reproduction Nutrition Development* **35**(2)**:** 121-128

Ahmadian A, Ehn M, Hober S (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **363:** 83-94

Akin DE (1994) Ultrastructure of plant cell walls degraded by anaerobic fungi. In *Anaerobic fungi: biology, ecology and function.*, Mountfort DO, Orpin CG (eds), pp 169-190. New Yok, USA: Marcel Dekker Inc.

Akin DE, Borneman WS (1990) Role of rumen fungi in fiber degradation. *Journal of Dairy Science* **73**(10)**:** 3023-3032

Allen MS (1997) Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* **80**(7)**:** 1447-1462

Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990) Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology* **172**(2)**:** 762-770

Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z (2004) Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult Sci* **83**(7)**:** 1093-1098

An D, Dong X, Dong Z (2005) Prokaryote diversity in the rumen of yak (Bos grunniens) and Jinnan cattle (Bos taurus) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* **11:** 207-215

Andersen JB, Sehested J, Invartsen KL (1999) Effect of dry cow feeding strategy on rumen pH, concentration of volatile fatty acids and rumen epithelium development. *Acta Agriculturae Scandinavica* **49:** 149-155

Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyran P, Engstrand L (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS one* **3**(7)**:** e2836

Anonymous (27 avril 1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française***:** 5608-5610

Argenzio RA, Southworth M (1974) Sites of organic acid production and absorption in gastrointestinal tract of the pig. *American Journal of Physiology* **228:** 454-460

Armougom F, Raoult D (2008) Use of pyrosequencing and DNA barcodes to monitor variations in Firmicutes and Bacteroidetes communities in the gut microbiota of obese humans. *BMC Genomics* **9**(576)

Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F (2007) Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology* **59**(3)**:** 600-610

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **307:** 1915-1920

Badiola I, Perez de Rozas AM, Roca M, Carabano R, Gomez M, Garcia J, Blas Cd (2005) Characterization of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism. In *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, September 7-10, 2004, Pueblo, Mexico*, pp 746-751. Corronsac France

Barlaan EA, Sugimori M, Furukawa S, Takeuchi K (2005) Electronic microarray analysis of 16S rDNA amplicons for bacterial detection. *Journal of Biotechnology* **115**(1)**:** 11-21

Barone R, Pavaux C, Blin PC, Cuq P (1973) *Atlas d'anatomie du lapin*, Paris, France.

Beaumont R, Deswysen AG (1991) Mélange et propulsion du contenu du réticulo-rumen. *Reproduction Nutrition Development* **31:** 335-359

Begon M, Harper JL, Townsend CR (eds) (1996) *Ecology. Individuals, populations and communities*. Oxford: Blackwell Science, 1068pp

Belenguer A, Balcells J, Guada JA, Decoux M, Milne E (2005) Protein recycling in growing rabbits: contribution of microbial lysine to amino acid metabolism. . *British Journal of Nutrition* **94**(5)**:** 763-770

Belenguer A, Fondevila M, Balcells J, Abecia L, Lachica M, Carro M (2008) In vivo and in vitro study of caecal fermentation pattern and methanogenesis in rabbits. In *9th World Rabbit Congress*. Verona, Italy

Belge A, BakIr B, Özçelik A (2002) A technique of duodenal cannulation in sheep. *Small Ruminant Research* **44**(2)**:** 167-171

Bellier R, Gidenne T (1996) Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *British Journal of Nutrition* **75**(3)**:** 353-363

Bellier R, Gidenne T, Vernay M, Colin M (1995) In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* **73**(1)**:** 128-135

Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martinez-Arias A, Golyshina OV, Zumarraga M, Yakimov MM, Garcia-Arellano H, Alcalde M, Fernandez VM, Elborough K, Andreu JM, Ballesteros A, Plou FJ, Timmis KN, Ferrer M, Golyshin PN (2006) Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of Biological Chemistry* **281**(32)**:** 22933-22942

Bennegadi-Laurent N, Gidenne T, Licois D (2004) Nutritional and sanitary statuses alter postweaning development of caecal microbial activity in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology* **139:** 293-300

Bennegadi N, Fonty G, Millet L, Gidenne T, Licois D (2003) Effects of age and diatery fibre level on cæcal microbial communities of conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease* **5:** 23-32

Bennegadi N, Gidenne T, Licois L (2001) Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit. *Animal Research* **50:** 401-413

Bernalier-Donadille A (2004) Flore intestinale : principales fonctions métaboliques. In *Flore microbienne intestinale, physiologie et pathologie digestive*, Rambaud JC, Buts, J.P, Corthier, G., Flourié, B., (ed), pp 61-80. Montrouge, France: John Libbey Eurotext

Bernalier A, Fonty G, Bonnemoy F, Gouet P (1993) Inhibition of the cellulolytic activity of Neocallimastix frontalis by Ruminococcus flavefaciens. *Journal of General Microbiology* **139**(4)**:** 873-880

Bernalier A, Lelait M, Rochet V, Grivet J-P, Gibson GR, Durand M (1996a) Acetogenesis from H2 and CO2 by methane- and non-methane-producing human colonic bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **19**(3)**:** 193-202

Bernalier A, Rochet V, Leclerc M, Doré J, Pochart P (1996b) Diversity of H2/CO2 utilizing acetogenic bacteria from feces of non-methane producing humans. *Current Microbiology* **33:** 94-97

Besle JM, Jouany JP, Cornu A (1995) Transformations of structural phenylpropanoids during cell wall digestion. *FEMS Microbiology Reviews* **16**(1)**:** 33-52

Bettarel Y, Sime-Ngando T, Amblard C, Dolan J (2004) Viral activity in two contrasting lake ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **70:** 2941-2951

Björnhag G (1972) Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swedish Journal of Agricultural Research* **2:** 125-136

Blackwood CB, Marsh T, Kim S-H, Paul EA (2003) Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2)**:** 926-932

Blas E, Fernández-Carmona J, Cervera C (1988) Effect of digestive activity and starch intake on amylase activity in saliva and pancreatic juice of rabbit. In *4th Congress of the World Rabbit Science Association*, Vol. 3, pp 68-73. Budapest, Hongrie

Bloom SA (2003) Similarity indices in community studies : potential pitfalls. *Marine Ecology Progress Series* **88**(1)**:** 125-128

Boadi D, Benchaar C, Chiquette J, Masse D (2004) Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* **84**(3)**:** 319-335

Bonnafous R, Raynaud P (1970) Recherche sur les variations de densité des micro-organismes dans le colon du lapin domestique. *Experienta* **26:** 52

Borg I, Groenen PJF (2005) *Modern multidimensional scaling: theory and applications*, New York: Springer-Verlag.

Boulahrouf A, Fonty G, Gouet P (1991) Establishment, counts and identification of the fibrolytic bacteria in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current Microbiology* **22:** 1-25

Bray JR, Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities in southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27:** 325-349

Brenner DJ, Grimont PAD, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF (1993) Classification of Citrobacteria by DNA hybridization: designation of Citrobacter farmeri sp. nov., Citrobacter youngae sp. nov., Citrobacter braakii sp. nov., Citrobacter werkmanii sp. nov., Citrobacter sedlakii sp. nov., and three unnamed Citrobacter genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**(4)**:** 645-658

Brinkmann N, Martens R, Tebbe CC (2008) Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of Manduca sexta (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Applied and Environmental Microbiology* **74**(23)**:** 7189-7196

Brodie EL, DeSantis TZ, Joyner DC, Baek SM, Larsen JT, Andersen GL, Hazen TC, Richardson PM, Herman DJ, Tokunaga TK, Wan JM, Firestone MK (2006) Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(9)**:** 6288-6298

Brossard L, Chaucheyras-Durand F, Michalet-Doreau B, Martin C (2006) Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric acidosis in sheep : new type of interaction. *Animal Science* **82:** 829-836

Brownlee A (1956) The developpement of the rumen papillae in cattle fed on different diets. *British Veterinary Journal* **112:** 369-375

Bryant MP, Burkey LA (1953) Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science* **36:** 205-217

Bryant MP, Robinson IM (1963) Apparent incorporation of ammonia and amino acid carbon during growth of selected rumen bacteria. *Journal of Dairy Science* **46:** 150-154

Butine TJ, Leedle JA (1989) Enumeration of selected anaerobic bacterial groups in cecal and colonic contents of growing-finishing pigs. *Applied and Environmental Microbiology* **55**(5)**:** 1112-1116

Cann AJ, Fandrich SE, Heaphy S (2005) Analysis ofthe virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes. *Virus Genes* **30:** 151-156

Carabaño R, Badiola I, Chamorro S, Garcia J, Garcia-Ruiz AI, Garcia-Rebollar P, Gomez-Conde MS, Gutierrez I, Nicodemus N, Villamide MJaDB, J.C. (2008) New trends in rabbit feeding: influence of nutrition on intestinal health. review. *Spanish Journal of Agricultural Research* **6**(Special Issue)

Carabaño R, Fraga MJ, Santomá G, de Blas JC (1988) Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. *Journal of Animal Science* **66:** 901-910

Carabaño R, Merino JM (1996) Effect of ileal cannulation on feed intake, soft and hard faeces excretion throughout the day in rabbits. In *Proc. 6th Congress of the World Rabbit Science Ass.*, Vol. 1, pp 121-126. Ass. Fr. Cuniculture, Lempdes, France.

Carabaño R, Piquer J (1998) *The digestive system of the rabbit*, Vol. Chapter 1, CABI Publishing edn.: Wallingford, United Kingdom.

Cardinale BJ, Palmer MA, Collins SL (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* **415**(6870)**:** 426-429

Carré B, Brillouet JM (1989) Determination of water-insoluble cell-walls in feeds : interlaboratory study. *Journal of the Association Of Analalytic Chemists* **72:** 463-467

Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alio C, Muyzer G (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(2)**:** 499-508

Case RJ, Boucher Y, Dahllof I, Holmstrom C, Doolittle WF, Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(1)**:** 278-288

Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I (2003) The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**(2)**:** 159-161

Cavicchioli R, Curmi PMG, Saunders N, Torsten T (2003) Pathogenic archaea: do they exist? *BioEssays* **25**(11)**:** 1119-1128

Chapman MG, Underwood AJ (1999) Ecological patterns in multivariate assemblages: information and interpretation of negative values in ANOSIM tests. *Marine Ecology Progress Series* **180:** 257-265

Chassard C, Scott KP, Marquet P, Martin JC, Del'homme C, Dapoigny M, Flint HJ, Bernalier-Donadille A (2008) Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 496-504

Chave M, Dabert P, Brun R, Godon JJ, Poncet C (2008) Dynamics of rhizoplane bacterial communities subjected to physicochemical treatments in hydroponic crops. *Crop Protection* **27**(3-5)**:** 418-426

Chesson A, Stewart CS, Wallace RJ (1982) Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **44**(3)**:** 597-603

Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M (2000) Ruminant fat plasticity : nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie* **49:** 181-205

Cho SJ, Cho KM, Shin EC, Lim WJ, Hong SY, Choi BR, Kang JM, Lee SM, Kim YH, Kim H (2006) 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**(1)**:** 92-101

Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, Bisgaard M (2004) Comparative phylogenies of the housekeeping genes atpD, infB and rpoB and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**(5)**:** 1601-1609

Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral Ecology* **18**(1)**:** 117-143

Clarke KR, Warwick RM (2001) *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, 2 edn. Plymouth, UK.

Clarke RTJ, Bauchop T (1977) *Microbial ecology of the gut*, London, UK.

Clauss M, Lechner-Doll M (2001) Differences in selective reticulo-ruminal particle retention as a key factor in ruminant diversification. *Oecologica* **129:** 321-327

Clemens ET (1977) Sites of organic acid production and patterns of digesta movement in the gastrointestinal tract of the rock hyrax. *Journal of Nutrition* **107:** 1954-1961

Clemens ET, Maloiy GMO (1982) The digestive physiology of three East African herbivores: the elephant, rhinoceros and hippopotamus. *Journal of Zoology* **198:** 141-156

Coleman GS (1979) Rumen ciliate protozoa. In *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, Levandowsky M, Hutner SH (eds), Vol. 2, 2nd edn, pp 381–408. New York, USA: Academic Press

Collinson ME, Hooker JJ (1991) Fossil evidence of interactions between plants and plant-eating mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **333:** 197-200

Comline RS, Silver IA, Steven DH (1968) Physiological anatomy of the ruminant stomach. In *Handbook of physiology*, Visscher MB, Hastings AB, Pappenheimer JR, Rahn H (eds), pp 2647-2671. Washington, USA: American Physiology Society

Corring T, Rérat A (1983) Digestion and absorption of nutrients. In *A survey of enzymatic digestion in simple-stomached animals.*, pp 9-26. Bern, Suisse: H. Bickel et Y. Schutz Eds

Corthier G, Sokol H, Doré J (2007) Diversité du mcrobiote et de ses fonctions. *Obesity* **2:** 215-220

Costa R, Götz M, Mrotzek N, Lottmann J, Berg G, Smalla K (2006) Effects of site and plant species on rhizosphere community structure as revealed by molecular analysis of different microbial guilds. *FEMS Microbiology Ecology* **56:** 236–249

Cotta MA (1992) Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(1)**:** 48-54

Cotta MA, Hespell RE (1986) Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In *Control of digestion and metabolism in ruminants*, Milligan LP, Grovum WL, Dobson A (eds). Englewood cliffs, New Jersey, USA: Prentice-Hall

Counotte GHM, Prins RA, Janssen RHAM, Debie MJA (1981) Role of Megasphaera elsdenii in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **42**(4)**:** 649-655

Cox TF, Cox MAA (2003) Multidimensional scaling. *Technometrics* **45**(2)**:** 328-328

Cuillerier E, Marteau P (2002) Physiologie gastro-intestinale de l'Homme. In *Aliments fonctionnels*, M. R (ed), pp 21-40. Paris, France: Tec&Doc Lavoisier

Cummings JH, Banwell JG, Segal I, Coleman N, Englyst HN, Macfarlane GT (1990) The amount and composition of large bowel contents in man. *Gastroenterology* **98**(A)**:** 408

Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99, pp 10494–10499.

Czerkawski JW, Cheng KJ (1988) Compartimentation in the rumen. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, Hobsn PN (ed), p 361. New York, USA: Elsevier Science Publishing

Dahllöf I (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology***:** 213-217

Dahllof I, Baillie H, Kjelleberg S (2000) rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8)**:** 3376-3380

Daly K, Stewart CS, Flint HJ, Shirazi-Beechey SP (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* **38**(2-3)**:** 141-151

Damuth J (1992) Taxon-free characterization of animal communities. In *Terrestrial ecosystems through time*, Behrensmeyer AK, Damuth J, DiMichele W, Potts R, Sues HD, Wing S (eds), pp 183-203. Chicago,USA: University of Chicago Press

Davey AWF (1965) Variations in ruminal pH, volatile fatty acid concentration and proportions of the individual acids. *Proceedings New Zealand Society of Animal Production***:** 25-106

De Blas C, Wiseman J (1998) *The nutrition of the rabbit*, Wallingford, UK: CABI Publishing.

De Puytorac P, Grain J, Mignot JP (1987) *Précis de protistologie*, Paris: Boubée.

Decuypere JA, Vervaeke IJ, Henderickx HK, Dierick NA (1977) Gastro-intestinal cannulation in pigs: a simple technique allowing multiple replacements. *Journal of Animal Science* **45**(3)**:** 463-468

Dehority BA (1975) Characterization studies on rumen bacteria isolated from Alaskan reindeer (Rangifer tarandus L.). In *1st Int. Reindeer and Caribou Symp.*, Vol. 1, pp 228–240. Fairbanks, Alaska

Dehority BA (1986) Microbes in the foregut of arctic ruminants. In *Control of digestion and metabolism in ruminants*, Milligan LP, Grovum WL, Dobson A (eds), pp 307-325. Englewoods Cliff, N.J.: Reston Book, Prentice Hall

Dehority BA (1991) Effects of microbial synergism on fibre digestion in the rumen. *Proceedings of the Nutrition Society* **50:** 149-150

Dehority BA, Grubb JA (1976) Basal medium for the selective enumeration of rumen bacteria utilizing specific energy sources. *Applied and Environmental Microbiology* **32**(5)**:** 703-710

Delbès C, Godon J-J, Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digestor bacterial community. *Anaerobe* **4:** 267-275

Delong EF, Pace NR (2001) Environmental diversity of Bacteria and Archaea. *Systematic Biology* **50:** 470-478

Demeyer D, Fievez V (2000) Ruminants et environnement : la méthanogenèse. *Annales de Zootechnie* **49:** 95-112

Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M (2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports* **35**(2)**:** 265-274

Denigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC, Hamosh P (1988) Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* **959:** 38-45

Denman SE, McSweeney CS (2006) Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology* **58**(3)**:** 572-582

Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS (2007) Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* **62**(3)**:** 313-322

Deplancke B, Hristova KR, Oakley HA, McCracken VJ, Aminov R, Mackie RI, Gaskins HR (2000) Molecular ecological analysis of the succession and diversity of sulfate-reducing bacteria in the mouse gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(5)**:** 2166-2174

Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biology* **6**(11)**:** e280

Dewrée R, Meulemans L, Lassence C, Desmecht D, Ducatelle R, Mast J, Licois D, Vindevogel H, Marlier D (2007) Experimentally induced epizootic rabbit enteropathy : clinical, histopathological, ultrastructural, bacteriological and haematological findings. *World Rabbit Science* **15:** 91-102

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* **26:** 297-302

Ding Z, Rowe JB, Godwin IR, Xu Y (1997) The buffering capacity of caecal digesta exceeds that of rumen digesta from sheep fed pasture or roughage diets. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**(5)**:** 723-728

Dobson DE, Prager EM, Wilson AC (1984) Stomach lysozymes of ruminants. *Journal of Biological Chemistry* **259**(18)**:** 11607-11616

Doré J, Pochart P, Bernalier A, Goderel I, Morvan B, Rambaud JC (1995) Enumeration of H2 utilizing methanogenic archaea, acetogenic and sulfate-reducing bacteria from human feces. *FEMS Microbiology Ecology* **17:** 279–284

Doreau M, Ferlay A (1994) Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology* **45:** 379-396

Dowd S, Callaway T, Wolcott R, Sun Y, McKeehan T, Hagevoort R, Edrington T (2008) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* **8**(1)**:** 125

Dunbar J, Barns SM, Ticknor LO, Kuske CR (2002) Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(6)**:** 3035-3045

Duthoit F, Godon J-J, Montel M-C (2003) Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(7)**:** 3840-3848

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**(5728)**:** 1635-1638

Eckburg PB, Lepp PW, Relman DA (2003) Archaea and their potential role in human disease. *Infection and Immunity* **71**(2)**:** 591–596

Edwards JE, McEwan NR, McKain N, Walker N, Wallace RJ (2005) Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep. *Microbiology* **151**(3)**:** 717-725

Edwards JE, McEwan NR, Travis AJ, Wallace RJ (2004) 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **86:** 263-281

El Oufir L, Flourie B, Bruley des Varannes S, Barry JL, Cloarec D, Bornet F, Galmiche JP (1996) Relations between transit time, fermentation products, and hydrogen consuming flora in healthy humans. *Gut* **38**(6)**:** 870-877

Elyse P (2002) La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology***:** 2-11

Farlow JO (1987) Speculations about the diet and digestive physiology of herbiviorous dinosaurs. *Paleobiology* **13:** 60-72

Fekete S, Bokori J (1985) The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *Journal of Applied Rabbit Research* **8**(2)**:** 68-71

Fenchel T, Finlay BJ (1995) *Ecology and evolution in anoxic worlds,* London, England: Oxford University Press.

Feng Y, Duan C-J, Pang H, Mo X-C, Wu C-F, Yu Y, Hu Y-L, Wei J, Tang J-L, Feng J-X (2007) Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75(**2)**:** 319-328

Fernandez A, Huang S, Seston S, Xing J, Hickey R, Criddle C, Tiedje J (1999) How stable is stable? Function versus community composition. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8)**:** 3697-3704

Ferrando R, Henry N, Klur M, Mégard JP (1972) Teneur en azote et en acides aminés des caecotrophes et autres fèces des lapins à collier recevant ou non des antibiotiques dans leurs rations. *Annales de la Nutrition et de l'Alimentation* **26:** 189-196

Ferrer M, Beloqui A, Golyshina OV, Plou FJ, Tatyana AN, Chernikova N, Fernández-Arrojo L, Ghazi I, Ballesteros A, Elborough K, Timmis KN, Golyshin PN (2007) Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. *Biotechnology Journal* **2**(2)**:** 207-213

Fioramonti J, Ruckebusch Y (1976) La motricité caecale chez le lapin. 3) Dualité de l'excrétion fécale. *Annales de Recherches Vétérinaires* **7:** 281-295

Flint HJ (1997) The rumen microbial ecosystem : some recent developments. *Trends in Microbiology* **5:** 483 - 488

Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P (2007) Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environmental Microbiology* **9:** 1101 - 1111

Florin THJ, Gu Z, Kirk KM, Martin NG (2000) Shared and unique environmental factors determine the ecology of methanogens in humans and rats. *American Journal of Gastroenterology* **95(**10)**:** 2872-2879

Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2008a) Ecologie microbienne digestive et écologie générale, taxonomie et systèmes de classification des procaryotes, notion d'espèce. In *Les écosystèmes digestifs*, Lavoisier (ed), pp 157-193. Paris, France

Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2008b) Interactions entre l'hôte et sa microflore digestive. In *Les écosystèmes digestifs*, Lavoisier (ed), pp 195-233. Paris, France

Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2008c) Les communautés microbiennes du tube digestif des mammifères: diversité et structure. In *Les écosystèmes digestifs*, Lavoisier (ed), pp 71-118. Paris, France

Fonty G, Chaucheyras-Durand F (2008d) Niches écologiques potentielles des principales espèces microbiennes. In *Les écosystèmes digestifs*, Lavoisier (ed), pp 157-193. Paris, France

Fonty G, Chavarot M, Lepetit J, Canistro J, Favier R (1999) Mechanical resistance of wheat straw after incubation in cultures of ruminal cellulolytic microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* **80:** 297-307

Fonty G, Gouet P (1989) Fibre-degrading microorganisms in the monogastric digestive tract. *Animal Feed Science and Technology* **23:** 91-107

Fonty G, Gouet P, Jouany JP, Senaud J (1983a) Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumens of meroxenic lambs. *Journal of General Microbiology* **129:** 213-223

Fonty G, Gouet P, Jouany JP, Senaud J (1987) Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *Journal of General Microbiology* **133:** 1835-1843

Fonty G, Joblin K, Chavarot M, Roux R, Naylor G, Michallon F (2007) Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(20)**:** 6391-6403

Fonty G, Jouany JP, Forano E, Gouet P (1995) L'écosystème microbien du réticulorumen. In *Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion.*, Jarrige R, Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (ed), pp 299-348. Paris, France

Fonty G, jouany JP, Thivend P, Gouet P, Senaud J (1983b) A descriptive study of rumen digestion in meroxenic lambs according to the nature and complexity of the microflora. *Reproduction Nutrition Development* **23:** 857-873

Forney LJ, Zhou X, Brown CJ (2004) Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current Opinion in Microbiology* **7**(3)**:** 210-220

Forsberg CW, Cheng KJ, White BA (1997) Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In *Gastrointestinal Microbiology* Mackie RI, White BA (eds), pp 319–379. New York, USA: Chapman and Hall

Forsythe SJ, Parker DS (1985a) Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *Journal of Applied Bacteriology*

Forsythe SJ, Parker DS (1985b) Urea turnover and transfer to the digestive tract in the rabbit. *British Journal of Nutrition* **53:** 183-190

Fraga MJ, De Ayala PP, Carabaño R, De Blas JC (1991) Effect of type of fiber on the rate of passage and on the contribution of soft feces to nutrient intake of finishing rabbits. *Journal of Animal Science* **69:** 1566-1574.

Frey JC, Rothman JM, Pell AN, Nizeyi JB, Cranfield MR, Angert ER (2006) Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(5)**:** 3788-3792

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**(11)**:** 634-643

Frostegard A, Courtois S, Ramisse V, Clerc S, Bernillon D, Le Gall F, Jeannin P, Nesme X, Simonet P (1999) Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(12)**:** 5409-5420

Galbraith EA, Antonopoulos DA, White BA (2004) Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environmental Microbiology* **6**(9)**:** 928-937

Gans J, Wolinsky M, Dunbar J (2005) Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* **309**(5739)**:** 1387-1390

Garca-Martnez J, Acinas SG, Anton AI, Rodrguez-Valera F (1999) Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods* **36:** 55-64

Garcia J-L, Patel BKC, Ollivier B (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* **6**(4)**:** 205-226

Garcia J, de Blas JC, carabaño R, Garcia P (1995) Effect of type of lucerne hay on caecal fermentation and nitrogen contribution through caecotrophy in rabbits. *Reprod Nutr Dev* **35:** 267-275

Gardner A, West SA, Griffin AS (2007) Is bacterial persistence a social trait? *PLoS ONE* **2**(8)**:** e752

Garrett EF, Pereira MN, Nordlund KV, Armentano LE, Goodger WJ, Oetzel GR (1999) Diagnostic methods for detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **82:** 1170-1178

Ghiglione JF, Larcher M, Lebaron P (2005) Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **40:** 229-240

Gian Marco L, Dell'Anno A, Danovaro R (2006) DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology* **8**(2)**:** 308-320

Gidenne T (1987) Utilisation digestive de rations riches en lignines chez le lapin en croissance : mesures de flux et de transit dans différents segments digestifs. . *Annales de Zootechnie* **36:** 95-108

Gidenne T (1992) Effect of fibre level, particle size and adaptation period on digestibility and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbit. *British Journal of Nutrition* **67:** 133-146

Gidenne T (1996) Conséquences digestives de l'ingestion de fibres et d'amidon chez le lapin en croissance : vers une meilleure définition des besoins. *Productions Animales* **9**(4)**:** 243-254

Gidenne T (1997) Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science* **51**(1-3)**:** 73-88

Gidenne T (2003) Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* **81:** 105-117

Gidenne T, Belier R (1992) Etude in vivo de l'activité fermentaire caecale chez le lapin. Mise au point et validation d'une nouvelle technique de canulation caecale. *Reproduction Nutrition Development* **32:** 365-376

Gidenne T, Bellier R, Bouyssou T (1993) An improved technique for cecal cannulation in the rabbit - effect of sampling time after feeding on cecal VFA pattern. *Annales de Zootechnie* **42**(2)**:** 163

Gidenne T, Jehl N, Segura M, Michalet-Doreau B (2002) Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology* **92:** 107-118

Gidenne T, Lapanouse A (2000) Technical note : the measurement of soft faeces production is affected by the type of colar. *World Rabbit Science* **8:** 41-42

Gidenne T, Pinheiro V, Falcao e Cunha L (2000) A comprehensive approach of the rabbit digestion : consequences of a reduction in dietary fibre supply. *Livestock Production Science* **64:** 225-237

Gidenne T, Poncet C (1985) Digestion, chez le lapin en croissance, d'une ration à taux élevé de constituants pariétaux : étude méthodologique pour le calcul de digestibilité apparente, par segment digestif. *Annales de Zootechnie* **34**(4)**:** 429-446

Goad DW, Goaf CL, Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimental induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science* **76:** 234-241

Gordon AD (1999) *Classification*, second edn. London.

Gouet P, Fonty G (1979) Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* **19:** 553-566

Green GL, Brostoff J, Hudspith B, Michael M, Mylonaki M, Rayment N, Staines N, Sanderson J, Rampton DS, Bruce KD (2006) Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *Journal of Applied Microbiology* **100**(3)**:** 460-469

Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ (2004) Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* **432**(7018)**:** 747-750

Grenet E, Breton A, Barry P, Fonty G (1989a) Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonisation as affected by diet composition. *Animal Feed Science and Technology* **26:** 55-70

Grenet E, Fonty G, Jamot J, Bonnemoy F (1989b) Influence of diet and monensin on development of anaerobic fungi in the rumen, duodenum, cecum, and feces of cows. *Applied and Environmental Microbiology* **55:** 2360-2364

Günther S, Groth I, Grabley S, Munder T (2006) Design and evaluation of an oligonucleotide-microarray for the detection of different species of the genus Kitasatospora. *Journal of Microbiological Methods* **65**(2)**:** 226-236

Guerder F (2003) Bilan du réseau national de gestion technique de performances. *Cuniculture* **29:** 150-155

Guo X, Xia X, Tang R, Wang K (2008a) Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe* **14**(4)**:** 224-228

Guo X, Xia X, Tang R, Zhou J, Zhao H, Wang K (2008b) Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Letters in Applied Microbiology* **47**(5)**:** 367-373

Guo Y, Zhu N, Zhu S, Deng C (2007) Molecular phylogenetic diversity of bacteria and its spatial distribution in composts. *Journal of Applied Microbiology* **103**(4)**:** 1344-1354

Gutell RR, Larsen N, Woese CR (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **58**(1)**:** 10-26

Habel RE (1975) *The anatomy of the domestic animals*, Saunders, Philadelphia.

Hach CC, Bowden BK, Kopelove AB, Brayton SV (1987) More powerful peroxide Kjeldahl digestion method. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **70**(5)**:** 783–787

Hackstein JHP, van Alen TA (1996) Fecal methanogens and vertebrate evolution. *Evolution* **50:** 559-572

Haegeman B, Godon J-j, Sen B, Hamelin J (2008) Measurement of microbial diversity using fingerprints. *Environmental Microbiology.* En préparation.

Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* **5**(10)**:** R245-R249

Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW (2002) Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* **68:** 2982 - 2990

Harrop CJF, Hume ID (1980) Digestive tract and digestive function in monotremes and nonmacropod marsupials. In *Compative Physiology: Primitive Mammals,* K. Schmidt-Nielsen LB, and C. R. Taylor. (ed), pp 63-77. New York: Cambridge Univ. Press

Hartigan JA (1975) *Clustering algorithms,* New York,USA: Wiley.

Hartnell GF, Scatter LD (1979) Determination of rumen fill, retention time and ruminal turnover rates of ingesta at different stages of lactation in dairy cows. *Journal of Animal Science* **48:** 381-392

Hayashi K (1991) PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research* **1**(1)**:** 34-38

Hedlund BP, Staley JT (2002) Phylogeny of the genus Simonsiella and other members of the Neisseriaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**(4)**:** 1377-1382

Hintz HF (1969) Review article: comparison of digestion coefficients obtained with cattle, sheep, rabbits and horses. *Veterinarian***:** 6:45

Hobson PN, Mann SO, Summers R (1976) Rumen micro-organisms in red deer, hill sheep and reindeer in the scottish highlands. In *Royal Society of Edinburgh. Section B: Natural environment*, pp 171-180.

Hong H, Pruden A, Reardon KF (2007) Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. *Journal of Microbiological Methods* **69**(1)**:** 52-64

Hong S-H, Bunge J, Jeon S-O, Epstein SS (2006) Predicting microbial species richness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(1)**:** 117-122

Hooper LV (2004) Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends in Microbiology* **12**(3)**:** 129-134

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon J (2002) How host-microbial interactions shape nutrient environment of mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* **22:** 283-307

Hopkins MJ, Macfarlane GT (2002) Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with Clostridium difficile infection. *Journal of Medical Microbiology* **51**(5)**:** 448-454

Hori T, Haruta S, Ueno Y, Ishii M, Igarashi Y (2005) 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. *Journal of Microbiological Methods* **66**(1)**:** 165-169

Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB, Bohannan BJ (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432:** 750-753

Hotelling H (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *British Journal of Educational Psychology* **24:** 417–441

Huffaker RC (1982) Biochemistry and physiology of leaf proteins. In *Encyclopaedia of plant physiology*, Verlag S (ed), pp 370-400. Berlin

Hugenholtz P, Tyson GW (2008) Microbiology : metagenomics. *Nature* **455**(7212)**:** 481-483

Hugues JB, Hellman JJ, Ricketts TH, Bohannan JM (2001) Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67:** 4399-4406

Hume ID (1997) Fermentation in the hindgut of mammals. In *Gastrointestinal microbiology*, Mackie RI, White, B.A. (ed), Vol. 1, pp 85-115. London, England: Chapman & Hall

Hume ID, Warner ACI (1980) Evolution of microbial digestion in mammals. In *Digestive physiology and metabolism in ruminants*, Ruckebusch Y, Thivend P (eds), pp 665–684. Lancaster, England: MTD Press

Hungate RE (1966) The Rumen and its Microbes. . New York and London: Academic Press

Hungate RE (1968) Ruminal fermentation. In *Handbook of physiology*, C.F. C (ed), pp 2725-2745. Washington, USA: Amer. Physiol. Society

Irwin DM, Wilson AC (1990) Concerted evolution of ruminant stomach lysozymes. Characterization of lysozyme cDNA clones from sheep and deer. *Journal of Biological Chemistry* **265**(9)**:** 4944-4952

Ives AR, Carpenter SR (2007) Stability and diversity of ecosystems. *Science* **317**(5834)**:** 58-62

Jaccard P (1901) Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* **37:** 547-579

Janssen PH, Kirs M (2008) Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* **74:** 3619-3625

Jarrige R (1966) The composition of sheep faeces and its relation to forage digestibility. In *9th International Grassl. Congress*, pp 809-814. Sao Paulo (Brasil)

Jarrige R, Grenet E, Demarquilly C., Besle JM (1995a) Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques*, éditions I (ed), pp 383-406. Paris

Jarrige R, Grenet E, Demarquilly C., Besle JM (1995b) Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In *Nutrition des ruminants domestiques*, éditions I (ed), pp 27-81. Paris

Jarvis GN, Strömpl C, Burgess DM, Skillman LC, Moore ERB, Joblin KN (2000) Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current microbiology* **40**(5)**:** 327-332

Jilge B (1982) Monophasic and diphasic patterns of the circadian caecotrophy rythm of rabbits. *Laboratory Animals* **16:** 1-6

Joblin KN (1999) Ruminal acetogens and their potential to a lower ruminant methane emissions. *Australian journal of agricultural research* **50**(8)**:** 1285-1339

Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**(8)**:** 2483-2492

Jolles J, Jolles P, Bowman BH, Prager EM, Stewart CB, Wilson AC (1989) Episodic evolution in the stomach lysozymes of ruminants. *Journal of Molecular Evolution* **28**(6)**:** 528-535

Jones WJ, Nagle DP, Whitman WB (1987) Methanogens and the diversity of archaebacteria. *Microbiological Reviews* **51**(1)**:** 135-177

Jouany JP (1978) Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen : leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le ruminant. Université de Clermont ferrand II,

Jouany JP (1991) Defaunation of the rumen. In *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, Jouany JP (ed), p 245. Paris, France

Jouany JP (1994) Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *Productions Animales* **7**(3)**:** 207-225

Jouany JP (1996) Effect of rumen protozoa on nitrogen utilisation by ruminants. *Journal of Nutrition* **126:** 1335-1346

Jouany JP, Broudiscou L, Prins RA, Komisarczuk-Bony S (1995) Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques.*, Jarrige R, Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (ed), pp 349-383. Paris, France: Inra éditions

Jouany JP, Ushida K (1998) The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **12:** 113-128

Julliand V, de Vaux A, Millet L, Fonty G (1999) Identification of Ruminococcus flavefaciens as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8)**:** 3738-3741

Kamra DN (2005) Rumen microbial ecosystem. *Current Science* **89**(1)**:** 124-135

Kaplan CW, Astaire JC, Sanders ME, Reddy BS, Kitts CL (2001) 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed lactobacillus acidophilus NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(4)**:** 1935-1939

Karnati SK, Yu Z, Sylvester JT, Dehority BA, Morrison M, Firkins JL (2003) Technical note : specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science* **81:** 812-815

Kent AD, Yannarell AC, Rusak JA, Triplett EW, McMahon KD (2007) Synchrony in aquatic microbial community dynamics. *ISME Journal* **1**(1)**:** 38-47

Kimse M (2009) Impact de l'addition de microorganismes exogènes sur le fonctionnement de l'écosystème cæcal : approche comparée avec le rumen. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse

Kimsé M, Gidenne T, Bayourthe C, Monteils V (2008) A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit cæcum: relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Science* **17**(2): 1257-5011

King S, Mc Cord BR, Riefler RG (2005) Capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism analysis for monitoring soil bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **60**(1)**:** 83-92

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM (2001) RRNDB: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Research* **29**(1)**:** 181–184

Klieve AV, Bain PA, Yokoyama MT, Ouwerkerk D, Forster RJ, Turner AF (2004) Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium Ruminococcus albus AR67. *Letter of Applied Microbiology* **38:** 333-338

Klieve AV, Bauchop T (1988) Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **54:** 1637-1641

Klieve AV, Swain RA (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(7)**:** 2299-2303

Kocherginskaya SA, Aminov RI, White BA (2001) Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe* **7**(3)**:** 119-134

Koike S, Kobayashi Y (2001) Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: Fibrobacter succinogenes, Ruminococcus albus and Ruminococcus flavefaciens. *FEMS Microbiology Letters* **204**(2)**:** 361-366

Koike S, Pan J, Kobayashi Y, Tanaka K (2003a) Kinetics of in sacco fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science* **86**(4)**:** 1429-1435

Koike S, Yoshitani S, Kobayashi S, Tanaka K (2003b) Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **229:** 23-30

Komarek RJ, Leffel EC (1961) Gas-tight cannula for rumen fistula. *Journal of Animal Science* **20:** 782-784

Konstantinov SR, Zhu W-Y, Williams BA, Tamminga S, De Vos WM, Akkermans ADL (2002) Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology* **43:** 225-235

Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E, Bauer J (2008) Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust. *Journal of Microbiological Methods* **73:** 49-56

Kowalchuk GA, Stephen JR (2001) Ammonia-oxidizing bacteria : a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* **55:** 485–529

Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS (2003) Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **27**(5)**:** 663-693

Krause DO, Smith WJM, Ryan FME, Mackie RI, McSweeney CS (2000) Use of 16S-rRNA based techniques to investigate the ecological succession of microbial populations in the immature lamb rumen: tracking of a specific strain of inoculated *Ruminococcus* and interactions with other microbial populations *in Vivo*. *Microbial Ecology* **38:** 365-376

Krom MD (1980) Spectrophotometric determination of ammonia. *The analyst* **105**(1249)**:** 305-316

Kropf S, Heuer H, Grüning M, Smalla K (2004) Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods* **57**(2)**:** 187-195

Kurata S, Kanagawa T, Kamagata Y, Yamada K, Yokumako T, Torimura M, Kurane R (2001) T-RFLP analysis using a new real-time quantitative PCR method with a quenching primer (QP-PCR). In *Ninth International Symposium on Microbial Ecology*.

Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, Takami H, Morita H, Sharma VK, Srivastava TP, Taylor TD, Noguchi H, Mori H, Ogura Y, Ehrlich DS, Itoh K, Takagi T, Sakaki Y, Hayashi T, Hattori M (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Research* **14**(4)**:** 169-181

Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB, Hedgpeth J (2000) 3′-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research* **15**(28)**:** 655-661

Kysela DT, Palacios C, Sogin ML (2005) Serial analysis of V6 ribosomal sequence tags (SARST-V6) : a method to efficient, high-throughput analysis of microbial community composition. *Environmental Microbiology* **7:** 356-364

Lange M, Westermann P, Kiær Ahring B (2004) Archaea in protozoa and metazoa. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66:** 465-474

Langer P (1991) Evolution of the digestive tract in mammals. *Verh Dtsch Zool Ges* **84:** 169-193

Langsrud Ø (2002) 50-50 multivariate analysis of variance for collinear responses. *The Statistician* **51:** 305-317

Langsrud Ø (2005) Rotation tests. *Statistics and Computing* **15:** 53-60

Larue R, Yu Z, Parisi VA, Egan AR, Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology* **7**(4)**:** 530-543

Layton A, McKay L, Williams D, Garrett V, Gentry R, Sayler G (2006) Development of bacteroides 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6)**:** 4214-4224

Lebas F, Laplace JP (1974) note : sur l'excrétion fécale chez le lapin. *Annales de Zootechnie* **23:** 577-581

Lebas F, Laplace JP, Droumenq P (1982) Effets de la teneur en énergie de l'aliment chez le lapin. Variations en fonction de l'âge des animaux et de la séquence des régimes alimentaires. *Annales de Zootechnie* **31:** 233–256.

Leclerc M, Delgenes J-P, Godon J-J (2004) Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. *Environmental Microbiology* **6**(8)**:** 809-819

Lee SC, Prosky L, Vries JW (1992) Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods-enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* **75:** 395-416

Leedle JA, Hespell RB (1980) Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **39**(4)**:** 709-719

Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical ecology.*, 2 edn. Amsterdam: Elsevier.

Lelkes L (1987) A review of rabbit enteric-diseases: a new perspective. *Journal of Applied Rabbit Research* **10:** 55-61

Lelkes L, Chang C (1987) Microbial dysbiosis in rabbit mucoid enteropathy. *Laboratory Animal Science* **37:** 757-764

Leng RA, Nolan JV (1984) Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* **67:** 1072-1089

Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Moller K (2002a) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(2)**:** 673-690

Leser TD, Boye M, Amenuvor JZ, Jensen TK, Moller K (2002b) Development of a microarray for structural analysis of pig gastrointestinal bacterial communities. *Reproduction Nutrition Development* **42**(1:S3)

Leser TD, Lindecrona RH, Jensen TK, Jensen BB, Moller K (2000) Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with Brachyspira hyodysenteriae. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(8)**:** 3290-3296

Lévèque C (2001) *Ecologie. De l'écosystème à la biosphère.*: Dunod.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* **102**(31)**:** 11070-11075

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **124**(4)**:** 837-848

Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, Topp E (2003) Evaluation of QIAamp® DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. *Journal of Microbiological Methods* **54**(1)**:** 13-20

Lin C, Raskin L, Stahl DA (1997) Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **22**(4)**:** 281-294

Lin C, Stahl DA (1995) Taxon-specific probes for the cellulolytic genus Fibrobacter reveal abundant and novel equine-associated populations. *Applied and Environmental Microbiology* **61**(4)**:** 1348-1351

Livi S, Cordisco C, Damiani C, Romanelli M, Crosetti D (2006) Identification of bivalve species at an early developmental stage through PCR-SSCP and sequence analysis of partial 18S rDNA. *Marine Biology* **149**(5)**:** 1149-1161

Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, Godon JJ (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and singlestrand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8:** 720-731

López-Cortés N, Reyes-Duarte D, Beloqui A, Polaina J, Ghazi I, Golyshina OV, Ballesteros A, Golyshin PN, Ferrer M (2007) Catalytic role of conserved HQGE motif in the CE6 carbohydrate esterase family. *FEBS Letters* **581**(24)**:** 4657-4662

Lorente M, Fraga MJ, Carabaño R, de Blas JC (1988) Coprophagy in lactating does fed different diets. *Journal of Applied Rabbit Research* **11:** 11-15

Ludwig W, Strunk O, Westranm R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Förster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lübmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer K-H (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**(4)**:** 1363-1371

Luna GM, Dell'Anno A, Danovaro R (2006) DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environmental Microbiology* **8**(2)**:** 308-320

Mackie RI (2002) Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. *Integrative and Comparative Biology* **42**(2)**:** 319-326

Mackie RI, Gilchrist FMC (1979) Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology* **38**(3)**:** 422-430

Mackie RI, White BA, Isaacson RE. (1997) Gastrointestinal microbiology. In Hall Ca (ed.), New York, Vol. 1.

Magurran AE (2004) *Measuring biological diversity.*, Oxford: Blackwell publishing.

Marden JP (2006) Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 chez le ruminant : approche thermodynamique chez la vache laitière. Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse

Marden JP, Bayourthe C, Enjalbert F, Moncoulon R (2005) A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **88**(1)**:** 277-281

Marounek M, Fievez V, Mbanzamihigo L, Demeyer D, Maertens L (1999) Age and incubation time effects on in vitro caecal fermentation pattern in rabbits before and after weaning. *Archives of Animal Nutrition* **52**(2)**:** 195-201

Marounek M, Vovk SJ, Skřivanová V (1995) Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. . *British Journal of Nutrition* **73**(3)**:** 463-469

Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G (2001) Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10)**:** 4939-4942

Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(9)**:** 4397-

Martin C, Fonty G, Michalet-Doreau B (2002) Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in Ruminants. In *Gastrointestinal microbiology in animals*, SA M (ed), pp 1-17. India: Research Signpost

Martin C, Morgavi D, Doreau M, Jouany JP (2006) Comment réduire la production de méthane chez les ruminants? *Fourrages* **187:** 283-300

Martinsen TC, Bergh K, Waldum HL (2005) Gastric juice: a barrier against infectious diseases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **96**(2)**:** 94-102

Mayr E (1963) *Animal species and evolution*: Harvard University Press.

McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ (1994) Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science* **72**(11)**:** 3004-3018

McAllister TA, Cheng KJ (1996) Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science and Technology* **62**(1)**:** 29-36

McCowan RP, Cheng KJ, Costerton JW (1980) Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **39**(1)**:** 233-241

McCracken VJ, Simpson JM, Mackie RI, Gaskins HR (2001) Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *Journal of Nutrition* **131**(6)**:** 1862-1870

McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA (1981) *Animal Nutrition.*, 3rd edn. New York,USA: Longman.

McKenna P, Hoffmann C, Minkah N, Aye PP, Lackner A, Liu Z, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Bushman FD (2008) The macaque gut microbiome in health, lentiviral infection, and chronic enterocolitis. *PLoS Pathogens* **4**(2)**:** e20

Michalet-Doreau B, Fernandez I, Peyron C, Millet L, Fonty G (2001) Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development* **41:** 187-194

Michelland R, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Monteils V, Fortun-Lamothe L (2008) Characterization of bacterial communities in caecum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). In *proceedings of the nineth World Rabbit Congress*, p 294. Verona, Italy

Michelland R, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2007) Caractérisation des communautés bactériennes dans le rumen et les feces de bovins adultes par PCR-SSCP. In *Colloque d'Ecologie Microbienne*, p 71. La Grande Motte, France

Michelland RJ, Combes S, Monteils V, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (2009a) Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* **in press**

Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Lamothe L, Cauquil L (2009b) Statfingerprints: a friendly graphical interface program for microbial fingerprint profiles processing and analysis. *Molecular Ecology Resources* **in press**

Michelland RJ, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Hamelin J, Fortun-Lamothe L (2009c) Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology* **in press**

Milinkovitch MC, Guillermo O, Meyer. A (1993) Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **361:** 346-348

Miller T (1995) Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reprodution*, Verlag FE (ed), pp 317-331. Stuttgart, Germany

Miller TL, Wolin MJ (1986) Methanogens in human and animal intestinal tracts. *Systematic and Applied Microbiology* **7:** 223-229

Miller TL, Wolin MJ, Kusel EA (1986) Isolation and characterization of methanogens from animal feces. *Systematic and Applied Microbiology* **8:** 234-238

Minato H, Otsuka M, Shirasaka S, Itabashi H, Mitsumori. M (1992) Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *Journal of General and Applied Microbiology* **38:** 447-456

Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M (2001) Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science* **84**(6)**:** 1294-1309

Mitchelson KR, Cheng J (2001) *Capillary electrophoresis of nucleic acids*, Vol. 163: Humana press.

Mohr KI, Tebbe CC (2006) Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology* **8:** 258–272

Montagne L, Pluske JR, Hampson DJ (2003) A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology* **108**(1-4)**:** 95-117

Monteils V, Cauquil L, Combes S (2009a) Evolution spontanée de la communauté bactérienne ruminale selon la nature de la ration. In *3ème journée d'animation scientifique du département PHASE,* p in press. Tours, France

Monteils V, Cauquil L, Combes S, Godon JJ, Gidenne T (2008) Potential core-species and satellite-species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology* **66**(3)**:** 620-629

Monteils V, Rey M, Gidenne T (2009b) Mid to long term stability of ruminal physicochemistry in dairy cows fed a fibre- or a starch-based diet. In *XIth International Symposium on Ruminant Physiology,* p in press. Clermont-Ferrand, France

Moore KJ, Jung HJG (2001) Lignin and fiber digestion. *Journal of Range Management* **54:** 420-430

Moreau H, Gargouri Y, Lecat D, Junien JL, Verger R (1988) Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochimica et Biophysica Acta* **959:** 247-252

Morvan B, Bonnemoy F, Fonty G, Gouet P (1996) Quantitative determination of H2-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Current Microbiology* **32**(3)**:** 129-133

Morvan B, Dore J, Rieu-Lesme F, Foucat L, Fonty G, Gouet P (1994) Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiology Letters* **117**(3)**:** 249-256

Mosoni P, Chaucheyras-Durand F, Bera-Maillet C, Forano E (2007) Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology* **103:** 2676-2685

Moss A, Jouany JP, Newbold CJ (2000) Methane production by ruminants : its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* **49**(3)**:** 231-253

Moss AR (1993) *Methane-Global Warming and Production by Animals.*, Canterbury, UK: Chalcombe Publications.

Murtagh F (1985) Multidimensional clustering algorithms. In *Compstat*. Wuerzburg

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. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(3)**:** 695-700

Nagaraja TG (2002) Ruminal microorganisms and digestive disorders in cattle. In *Gastrointestinal microbiology in animals*, SA M (ed), pp 41-60. India: Research Signpost

Nagaraja TG, Titgemeyer EC (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science* **90**(13_suppl)**:** E17-38

Nagashima K, Hisada T, Sato M, Mochizuki J (2003) Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(2)**:** 1251-1262

Nakatsu CH, Torsvik V, Øvreas L (2000) Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of America Journal* **64:** 1382-1388

Nelson KE, Zinder SH, Hance I, Burr P, Odongo D, Wasawo D, Odenyo A, Bishop R (2003) Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. *Environmental Microbiology* **5**(11)**:** 1212-1220

Nettmann E, Bergmann I, Mundt K, Linke B, Klocke M (2008) Archaea diversity within a commercial biogas plant utilizing herbal biomass determined by 16S rDNA and *mcr*A analysis. *Journal of Applied Microbiology* **105**(6)**:** 1835-1850

Neufeld JD, Yu Z, Lam W, Mohn WW (2004) Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. *Environmental Microbiology* **6**(2)**:** 131-144

Nocek JE (1997) Bovine acidosis: implication on laminitis. *Journal of Dairy Science* **80:** 1005-1028

Nordstrom DK (1977) Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**(12)**:** 1835-1841

Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M, P. S (1996) ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular Microbial Ecology Manual*, Akkermans ADL, van Elsas JD, de Bruijn FJ (eds). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers

Nozière P, Hoch T (2007) Modelling fluxes of volatile fatty acids from rumen to portal blood. In *Nutrient digestion and utilisation in farm animals: modeling approaches*, Kebreab JDE, Bannink A, Gerints WJJ, France J (eds). Wallingford, U.K.: CAB International

Nunoura T, Oida H, Miyazaki J, Miyashita A, Imachi H, Takai K (2008) Quantification of mcrA by fluorescent PCR in methanogenic and methanotrophic microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **64**(2)**:** 240-247

Odenyo AA, Mackie RI, Stahl DA, White BA (1994) The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for Ruminococcus species and evidence for bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology* **60**(10)**:** 3688-3696

Orpin CG (1977) On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomycetes Neocallimastix frontalis, Piromonas communis and Sphaeromonas communis. *Journal of General Microbiology* **101:** 181-189

Orpin CG (1981). Fungi in ruminant degradation. . *Agricultural Science Seminar: Degradation of plant cell wall material.*

Orpin CG, Mathiesen SD, Greenwood Y, Blix AS (1985) Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (Rangifer tarandus platyrhynchus). *Applied and Environmental Microbiology* **50**(1)**:** 144-151

Osborn AM, Moore ERB, Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 39-50

Otten L, De Ruffray P (1996) Major differences between the rrnA operons of two strains of Agrobacterium vitis. *Archives of Microbiology* **166**(1)**:** 68-70

Otten L, Ruffray P, Lajudie P, Michot B (1996) Sequence and characterisation of a ribosomal RNA operon fromAgrobacterium vitis. *Molecular and General Genetics MGG* **251**(1)**:** 99-107

Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR (1998) Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science* **76**(1)**:** 275-286

Padilha MTS, Licois D, T. G, Carré B, Fonty G (1995) Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction Nutrition Development* **35**(4)**:** 375-386

Pairet M, Bouyssou T, Ruckebusch Y (1986) Colonic formation of soft feces in rabbits : a role for endogenous prostaglandins. *American Journal of Physiology* **250:** 302-308

Palackal N, Lyon C, Zaidi S, Luginbühl P, Dupree P, Goubet F, Macomber J, Short J, Hazlewood G, Robertson D, Steer B (2007) A multifunctional hybrid glycosyl hydrolase discovered in an uncultured microbial consortium from ruminant gut. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**(1)**:** 113-124

Partridge GG, Garthwaite PH, Findlay M (1989) Protein and energy retention by growing rabbits offered diets with increasing proportions of fibre. *Journal of Agricultural Science* **112:** 171–178

Paynter MJB, Ewert DL, Chalupa W (1969) Some morphological types of bacteriophages in bovine rumen contents. *Applied microbiology* **18**(5)**:** 942-943

Pearson HA (1967) Rumen microorganisms in Buffalo from southern Utah. *Applied Microbiology* **15**(6)**:** 1450-1451

Pearson HA (1969) Rumen microbial ecology in mule deer. *Applied Microbiology* **17**(6)**:** 819–824

Pedros-Alio C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* **14**(6)**:** 257-263

Peeters JE (1988) Recent advances in intestinal pathology of rabbits and further perspectives In *World rabbit congress*, Vol. 2, pp 293-313. Budapest, Hungary

Pelmont J (1993) Acétogènes. In *Bactéries et environnement*, Bornarel J (ed), pp 357-381. Grenoble, France: Presse universitaire de Grenoble

Penney R.L. FGE, Galask R.P., Petzold C.R., (1986) The microflora of the alimentary tract of rabbits in relation to pH, diet and cold. *J Appl Rabbit Res* **9**(4)**:** 152-156

Peters RH (1991) *A critique for ecology*, Cambridge.

Petersen JN, Bereded-Samuel Y, Skeen RS (1998) The effect of oxygen exposure on the methanogenic activity of an anaerobic bacterial consortium. *Environmental Progress* **17**(2)**:** 104-110

Piattoni F, Demeyer D, Maertens L (1996) In vitro study of the age-dependent caecal fermentation pattern and methanogenesis in young rabbits. *Reproduction Nutrition Development* **36**(3)**:** 253-261

Pickard WD, Stevens CE (1972) Digesta flow through the rabbit large intestine. *American Journal of Physiology* **222:** 1161-1166

Piknova M, Filova M, Javorsky P, Pristas P (2004) Different restriction and modification phenotypes in ruminal lactate-utilizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **236**(1)**:** 91-95

Playne MJ (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **36**(8)**:** 638-644

Pochart P, Lemann F, Flourie B, Pellier P, Goderel I, Rambaud JC (1993) Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* **105:** 1281–1285

Portsmouth JI (1977) The nutrition of rabbits. In *Nutrition and the climate environment*, Butterworths (ed), pp 93-111. London

Prins RA, Lankhorst A (1977) Synthesis of acetate from CO2 in the caecum of some rodents. *FEMS Microbiology Letters* **1:** 255–258

Proto V (1965) Esperienze di coprofagia nel coniglio. *Productions Animales* **4:** 1-21

Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, Peplies J, Glockner FO (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* **35**(21)**:** 7188-7196

Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ, DelVecchio VG (2001) Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of Bacillus anthracis. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(8)**:** 3720-3727

R development Core Team (2007) *R: a language and environment statistical computing.*, Vienna, Austria: R foundation for statistical computing.

R development Core Team (2008) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

R development Core Team (2009) *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Ramette A (2007) Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **62**(2)**:** 142-160

Ramírez-Moreno S, Martínez-Alonso M, Méndez-Alvarez S, Gaju N (2005) Seasonal microbial ribotype shifts in the sulfurous karstic lakes Cisó and Vilar, in northeastern Spain. *International Microbiology* **8**(4)**:** 235-242

Raoult D (2008) Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **27**(8)**:** 631-634

Rea S, Bowman JP, Popovski S, Pimm C, Wright ADG (2007) Methanobrevibacter millerae sp. nov. and Methanobrevibacter olleyae sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57:** 450-456

Rigottier-Gois L, Rochet V, Garrec N, Suau A, Doré J (2003) Enumeration of *Bacteroides* species in human faeces by fluorescent *in situ* hybridisation combined with flow cytometry using 16S rRNA probes. *Systematic and Applied Microbiology* **26:** 110-118

Roger V, Fonty G, Komisarczuk-Bony S, Gouet P (1990) Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria Ruminococcus flavefaciens and Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(10)**:** 3081-3087

Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* **11:** 3-11

Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* **242:** 84-89

Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281:** 363-365

Rosenzweig ML (1995) *Species diversity in space and time*, Vol. 10, Cambridge: Cambridge University Press.

Ross JA, Scott A, Gardner IC (1989) Ultrastructural observations on the caecum of the rabbit. . *Journal of Anatomy* **164:** 165-173

Ruckebusch Y, Hörnicke H (1977) Motility of the rabbit's colon and caecotrophy. *Physiology & Behavior* **18:** 871-878

Russell JB, Wilson DB (1996) Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* **79**(8)**:** 1503-1509

Sadet S. (2008) Etude de la diversité des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire. INRA, Clermont Ferrand, France, pp. 73-80.

Sadet S, Martina C, Meunier B, Morgavi D (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**(7)**:** 939-944

Scheifinger CC, Linehan B, Wolin MJ (1975) H2 production by Selenomonas ruminantium in the absence and presence of methagenic bacteria. *Applied Microbiology* **29:** 480-483

Schloss PD, Handelsman J (2006) Toward a Census of Bacteria in Soil. *PLoS Computational Biology* **2**(7)**:** e92

Schmalenberger A, Tebbe CC (2003) Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology* **12**(1)**:** 251-262

Schmitt-Wagner D, Friedrich MW, Wagner B, Brune A (2003) Phylogenetic diversity, abundance, and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (Cubitermes spp.). *Applied and Environmental Microbiology* **69**(10)**:** 6007-6017

Scupham AJ (2007) Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiology Ecology* **60:** 136-147

Scupham AJ, Jones JA, Wesley IV (2007) Comparison of DNA extraction methods for analysis of turkey cecal microbiota. *Journal of Applied Microbiology* **102**(2)**:** 401-409

Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J (2003) Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* **52**(2)**:** 237-242

Sen B, Hamelin J, Bru-Adan V, Godon JJ, Chandra TS (2008) Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of Applied Microbiology* **105**(6)**:** 2123-2132

Serfilippi D, Donaldson RM (1986) Production and secretion of intrinsic factor by isolated rabbit gastric mucosa. . *American Journal of Physiology* **251:** 287-292

Sharp R, Ziemer CJ, Stern MD, Stahl DA (1998) Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* **26**(1)**:** 71-78

Shaw JC, Ensor WL, Tellechea HF, Lee SD (1960) Relation of diet to rumen volatile fatty acids digestibility, efficiency of gain and degree of unsaturation of body fat in steers. *The Journal of Nutrition* **71:** 203-208

Shimizu T, Ohshima S, Ohtani K, Hoshino K, Honjo K, Hayashi H, Shimizu T (2001) Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in Clostridium perfringens. *Systematic and Applied Microbiology* **24**(2)**:** 149-156

Shin EC, Cho KM, Lim WJ, Hong SY, An CL, Kim EJ, Kim YK, Choi BR, An JM, Kang JM, Kim H, Yun HD (2004) Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology* **97**(2)**:** 378-383

Simpson EH (1949) Measurement of diversity. *Nature* **163**

Simpson JM, Martineau B, Jones WE, Ballam JM, Mackie RI (2002) Characterization of fecal bacterial populations in canines: effects of age, breed and dietary fiber. *Microbial ecology* **44**(2)**:** 186-197

Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI (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. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(11)**:** 4705-4714

Simpson JM, McCracken VJ, White BA, Gaskins HR, Mackie RI (1999) Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *Journal of Microbiological Methods* **36:** 167-179

Singh B, Gautam SK, Verma V, Kumar M, Singh B (2008) Metagenomics in animal gastrointestinal ecosystem: potential biotechnological prospects. *Anaerobe* **14**(3)**:** 138-144

Skillman, Evans, Naylor, Morvan, Jarvis, Jorblin (2004) 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**(5)**:** 277-285

Skillman LC, Evans PN, Strompl C, Joblin KN (2006) 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* **42**(3)**:** 222-228

Slade LM, Hintz HF (1969) Comparison of digestion in horses, ponies, rabbits and guinea pigs. *Journal of Animal Science* **28:** 842-843

Slyter LL (1976) Influence of acidosis on rumen function. *Journal of Animal Science* **43:** 910-929

Smalla K, Oros-Sichler M, Milling A, Heuer H, Baumgarte S, Becker R, Neuber G, Kroppf S, Ulrich A, Tebbe CC (2007) Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* **69:** 470-479

Smith CJ, Osborn AM (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**(1)**:** 6-20

Snipes RL (1978) Anatomy of the rabbit cecum. *Anatomy and Embryology* **155:** 57-80

Snipes RL, Clauss W, Weber A, Hörnicke H (1982) Structural and functional differences in various divisions of rabbit colon. *Cell & Tissue Research* **225:** 331-346

Sørensen T (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *K Dan Vidensk Selsk Biol Skr* **5:** 1-34

Sorlini C, Brusa T, Ranalli G, Ferrari A (1988) Quantitative determination of methanogenic bacteria in the feces of different mammals. *Current Microbiology* **17:** 33-36

Spreadbury D (1978) A study of the protein and amino acid requirements of the growing New Zealand White rabbit with emphasis on lysine and the sulphur-containing amino acids. *British Journal of Nutrition* **39**(3)**:** 601-613

Stach JEM, Bathe S, Clapp JP, Burns RG (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiology Ecology* **36:** 139-151

Stevens CE (1977) Comparative physiology of the digestive system. In *Duke's Physiology of Domestic Animals*, Ithaca. MJS (ed), 9th edn, pp 216-232. New York: Cornell Univ. Press

Stevens CE (1980) The gastrointestinal tract of mammals: major variations. In *Comparative Physiology: Primitive Mammals,*, K. Schmidt-Nielsen LB, and C. R. Taylor. (ed), pp 52-62. New York: Cambridge Univ. Press

Stevens CE (1983) Comparative anatomy and physiology of the herbivore digestive tract. In *Second Annual Dr. Scholl Conference on the Nutrition of Captive Wild Animals*, pp 8-16. Chicago

Stevens CE, Hume ID (1998) Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews* **78**(2)**:** 393-427

Stevens CS, Hume ID (1995) *Comparative physiology of the vertebrate digestive system.*, New York: Cambridge Univ. Press.

Stewart CB, Schilling JW, Wilson AC (1987) Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* **330:** 401–404

Stewart CS, Bryant MP (1988) The rumen bacteria. In *The rumen microbial ecosystem* Hobson PN (ed), pp 21-71. London, England: Elsevier

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(11)**:** 4799-4807

Sultan S, Gupta PK, Kundu SS, Hari S, Lodhi GN (2006) Relative digestion, metabolism and microbial activity in sheep and goat on grass-concentrate diet. *Range Management and Agroforestry* **27**(1)

Sundset MA, Edwards JE, Cheng YF, Senosiain RS, Fraile MN, Northwood KS, Praesteng KE, Glad T, Mathiesen SD, Wright AD (2008) Molecular diversity of the rumen microbiome of norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microbial Ecology*

Suzuki MT, Giovannoni SJ (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(2)**:** 625-630

Suzuki MT, Taylor LT, DeLong EF (2000) Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(11)**:** 4605-4614

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Benno Y (2001a) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(6)**:** 2766-2774

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H, Benno Y (1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology* **29**(2)**:** 159-169

Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Mastui H, Nakamura M, Aminov R, Benno Y (2000) Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* **6:** 273-284

Tajima K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI (2001b) Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbiology Letters* **200**(1)**:** 67-72

Tang J-n, Zeng Z-g, Wang H-n, Yang T, Zhang P-j, Li Y-l, Zhang A-y, Fan W-q, Zhang Y, Yang X, Zhao S-j, Tian G-b, Zou L-k (2008) An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods* **75**(3)**:** 432-436

Taniguchi K, Obitsu T, Ohmura H, Hiraga A, Hata H, Aida H, Akiyama K, Tanaka K (2003) Use of a rigid-type polyethylene T-cannula, silicone tubing, and adhesion netting for surgical cannulation of ileum of the horse. *Journal of Veterinary Medical Science* **65**(8)**:** 927-930

Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(6)**:** 2578-2588

Tatsuoka N, Mohammed N, Mitsumori M, Tajima K, Hara K, Kurihara M, Itabashi H (2007) Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Animal Science Journal* **78**(5)**:** 512-518

Thomasson JR, Voorhies MR (1990) Grasslands and grazers. In *Paleobiology: A synthesis*, Publ. BS (ed), pp 84-87. Oxford

Tokura M, Chagan I, Ushida K, Kojima Y (1999) Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology* **39**(3)**:** 123-128

Torsvik V, Daae FL, Sandaa R-A, Ovreas L (1998) Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* **64:** 53-62

Tuljapurkar SD, Semura JS (1977) Dynamic equilibrium under periodic perturbations in simple ecosystem models. *Journal of Theoretical Biology* **21**(66)

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI (2007) The human microbiome project. *Nature* **449**(7164)**:** 804-810

Uden P, Van Soest PJ (1982) The determination of digesta particle size in some herbivores. *Animal Feed Science Technology* **7:** 35-44

Ushida K, Jouany JP (1985) Effect of protozoa on rumen protein degradation in sheep. *Reproduction Nutrition Development* **25:** 1075-7081

Van der Linden Y, Van gylswyk NO, Schwartz HM (1984) Influence of supplementtation of corn stover with corn grain on the fibrolytic bacteria in the rumen of sheep and their relation to the intake and digestion of fiber. *Journal of Animal Science* **59:** 772-783

Van der Wielen PW, Lipman LJ, van KF, Biesterveld S (2002) Competitive exclusion of Salmonella enterica serovar Enteritidis by Lactobacillus crispatus and Clostridium lactatifermentans in a sequencing fed-batch culture. *Applied and Environmental Microbiology* **68:** 555 - 559

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74:** 3583-3597

Varloud M, Roussel A, Boisot P, Julliand V (2007) A technique for the collection and the study of biochemical and microbial characteristics of postprandial gastric contents from conscious horses. *Animal Feed Science and Technology* **133**(3-4)**:** 259-274

Veiga P, Juste C, Lepercq P, Saunier S, Béguet F, Gérard P (2005) Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiology Letters* **242**(1)**:** 81-86

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers Y-H, Smith HO (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the sargasso sea. *Science* **304**(5667)**:** 66-74

Vermorel M (1995) Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France.Variations selon le type d'animal et le niveau de production. *Productions Animales* **8:** 265-272

Vernay M, Marty J (1984) Absorption and metabolism of butyric acid in rabbit hind gut. *Comparative Biochemistry and Physiology* **77:** 89–96

Vernay M, Raynaud P (1975) Répartition des acides gras volatils dans le tube digestif du lapin domestique. 1) Lapins alimentés en luzerne et en avoine. *Annales de Recherches Vétérinaires* **6:** 357-368

Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP (2006) Identification and quantification of Archaea involved in primary endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(4)**:** 1274-1282

Vossenberg JLCMV, Joblin KN (2003) Biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids to stearic acid by a strain of Butyrivibrio hungatei from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* **37**(5)**:** 424-428

Walker AW, Duncan SH, Harmsen HJM, Welling GHGW, Flint HJ (2008) The species composition of the human intestinal microbiota differs between particle-associated and liquid phase communities. *Environmental Microbiology* **10**(12)**:** 3275-3283

Wallace RJ, Brammall ML (1985) The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein rumen. *Journal of General Microbiology* **131:** 821-832

Wallace RJ, Onodera R, Cotta MA (1997) Metabolism of nitrogen-containing compounds. In *The rumen microbial ecosystem*, Hobson PN, Stewart CS (eds), pp 283-328. Londres, England: Chapman & Hall

Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N, Ghassemian M, Richardson TH, Stege JT, Cayouette M, McHardy AC, Djordjevic G, Aboushadi N, Sorek R, Tringe SG, Podar M, Martin HG, Kunin V, Dalevi D, Madejska J, Kirton E, Platt D, Szeto E, Salamov A, Barry K, Mikhailova N, Kyrpides NC, Matson EG, Ottesen EA, Zhang X, Hernandez M, Murillo C, Acosta LG, Rigoutsos I, Tamayo G, Green BD, Chang C, Rubin EM, Mathur EJ, Robertson DE, Hugenholtz P, Leadbetter JR (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**(7169)**:** 560-565

Wei F, Feng Z, Wang Z, Zhou A, Hu J (1999) Use of nutrient in bamboo by the red panda (Ailurus fulgens). *Journal of Zoology* **248:** 535-541

Welch JG (1982) Rumination, particle size and passage from the rumen. *Journal of Animal Science* **54:** 885-894

Wertz JE, Goldstone C, Gordon DM, Riley MA (2003) A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *Journal of Evolutionary Biology* **16**(6)**:** 1236-1248

Whitford MF, Forster RJ, Beard CH, Gong J, Teather RM (1998) Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* **4:** 153-163

Williams AG, Coleman GS (1997) The rumen protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*, HPNaS C.S. e (ed), pp 73-139. London, England: Blackie Academic and Professionnal

Williams CM (2000) Dietary fatty acids and hulman health. *Annales de Zootechnie* **49**(3)**:** 165-180

Williams VJ, Christian KP (1956) Rumen studies in sheep. IlI The effect of feed intake on the concentrations of microbial end-products. *New Zealand Journal of Science and Technology* **38:** 403

Windham WR, Akin DE (1984) Rumen fungi and forage fiber degradation. *Applied and Environmental Microbiology* **48**(3)**:** 473-476

Wingreen NS, Levin SA (2006) Cooperation among microorganisms. *PLoS Biology* **4**(9)**:** e299

Wolda H (1981) Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia* **50:** 296-302

Wolin MJ, Miller TL (1983) Carbohydrate fermentation. In *Human intestinal flora and disease*, Hentges DA (ed), pp 147-165. New York, USA: Academic Press

Wright ADG, Xuanli MA, Obispo NE (2008) Methanobrevibacter phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microbial Ecology* **56:** 390-394

Wrong OM, Edmonds LJ, Chadwick VS (1981) *The large intestine*: MTP.

Yanagita K, Kamagata Y, Kawaharasaki M, Suzuki T, Nakamura Y, Minato H (2000) Phylogenetic analysis of methanogens in sheep rumen ecosystem and detection of Methanomicrobium mobile by fluorescence in situ hybridization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**(8)**:** 1737-1742

Yergeau E, Kang S, He Z, Zhou J, Kowalchuk GA (2007) Functional microarray analysis of nitrogen and carbon cycling genes across an Antarctic latitudinal transect. *ISME J* **1**(2)**:** 163-179

Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005) Group-specific primer and probe stes to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnology and Bioengineering* **89:** 670-679

Yu Z, Morrison M (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* **36**(5)**:** 808-812

Yu Z, Yu M, Morrison M (2006) Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environmental Microbiology* **8**(4)**:** 603-611

Zemb O, Haegeman B, Delgenes JP, Lebaron P, Godon JJ (2007) Safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular Ecology Notes* **7**(5)**:** 767-770

Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run J-Q, Wei CL, Soh SWL, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F, Ruan Y (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biology* **4**(1)**:** e3

Zhu XY, Zhong T, Pandya Y, Joerger RD (2002) 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(1)**:** 124-137

Ziemer CJ, Sharp R, Stern MD, Cotta MA, Whitehead TR, Stahl DA (2000) Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology* **2**(6)**:** 632-643

Zinger L, Gury J, Alibeu O, Rioux D, Gielly L, Sage L, Pompanon F, Geremia RA (2008) CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *Journal of Microbiological Methods* **72**(1)**:** 42-53

Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia R (2007) Improvements of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial ecology* **54**(2)**:** 203-216

Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-

specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10)**:** 3854-3859

Zoetendal EG, Ben-Amor K, Harmsen HJM, Schut F, Akkermans ADL, de Vos WM (2002a) Quantification of uncultured Ruminococcus obeum-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(9)**:** 4225-4232

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *Journal of Nutrition* **134**(2)**:** 465-472

Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM (2002b) Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(7)**:** 3401-3407

Zuckerkandl E, Pauling L (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology* **8**(2)**:** 357-366

Zumstein E, Moletta R, Godon J-J (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**(1)**:** 69-78

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize the specific (*Bos taurus vs Oryctolagus cuniculus*), individual, spatial (inter- and intra- digestive fermentors) and temporal (in undisturbed or disturbed conditions) variability of the digestive ecosystems (prokaryotic communities and biotope) in herbivorous mammals by comparing two animal models, cow and rabbit, and by using molecular methods (CE-SSCP and qPCR). Concerning methodology, we developed the StatFingerprints program to improve processing and statistical analysis of CE-SSCP profiles and better extract ecological information they contained about structure and diversity of communities. We also developed more specific (*Firmicutes* and *Bacteroides Prevotella*) primers than those available. From a cognitive point of view, our work demonstrated a strong effect of host species on ecosystem: communities presented a higher richness (+8 %, +12 % for bacteria and *Archaea*, respectively), a greater diversity (+19 % for bacteria) but are less abundant (-4.9 % bacteria) in cow rumen than in rabbit cæcum. The rumen biotope is less acid (+0.6 pH unit), more reductive (-30 mV), and contains a lower concentration of fatty acids (-19%) and a higher concentration of NH_3-N (+39%) than cæcal biotope. Taken together, these results suggested a determining role of the digestive physiology of the host and of coevolution phenomena between the host and its microbiota. Our results did not permit to evidence an individual effect on the procaryotic communities suggesting that the genetic similarity between animals we used and/or the strong standardization of breeding conditions (housing, food etc) tended to reduce the influence of the individuals on their prokaryotic communities. We showed that the procaryotic communities evolved along the digestive tract in relation to the physiology and the environmental conditions of the various compartments in which they live. In addition, in the rumen, we evidenced a variability of the bacterial community related to the fraction considered, liquid or solid. Our data suggested that, both in basal and disturbed situations, the bacterial communities of the two host species did not evolve in the same way in time. Indeed, in the rumen of the cow and basal condition, the bacterial community fluctuated sporadically suggesting a dynamic balance whereas it remains in a stable state in the cæcum of the rabbit. The two communities reacted quickly (<2 days) and adapted quickly to an increased ratio starch/fibres to reach a new balance, dynamic in the rumen and stable in the cæcum. On the other hand, our work did not highlight important correlations between the bacterial communities and the parameters of their environments. From a finalized point of view, these data confirmed that the nutrition is a relevant way to try to reorientate the functioning of digestive ecosystems in these two species, toward a better digestive health and/or efficiency.

Keyswords: cow, rabbit, CE-SSCP, qPCR, bacteria, *Archaea*, dynamic, disturbance, nutrition, diversity, structure, ecology

RESUME

L'objectif de ce travail était de caractériser la variabilité spécifique (*Bos taurus vs Oryctolagus cuniculus*), individuelle, spatiale (inter- et intra- fermenteurs digestifs) et temporelle (en conditions non perturbée ou perturbée) des écosystèmes digestifs des mammifères herbivores (communautés procaryotiques et biotope) en comparant deux modèles animaux, la vache et le lapin, et en utilisant des outils moléculaires (CE-SSCP et qPCR). D'un point de vue méthodologique, nous avons développé un programme informatique, StatFingerprints, pour améliorer le traitement et l'analyse statistique des profils CE-SSCP et ainsi mieux extraire l'information écologique qu'ils contiennent en termes de structure et de diversité des communautés. Nous avons également mis au point des systèmes de qPCR plus spécifiques (*Firmicutes* et *Bacteroides Prevotella*) que ceux précédemment décrits. D'un point de vue cognitif, nos travaux démontrent une forte influence de l'espèce hôte sur les caractéristiques de son écosystème : les communautés sont plus riches (+8 %, +12 % pour les bactéries et les *Archaea*, respectivement), plus diverse (+19 % pour les bactéries) mais moins abondantes (-4.9 % de bactéries) dans le rumen de la vache que dans le cæcum du lapin. Le biotope ruminal est moins acide (+0.6 unité pH), plus réducteur (-30 mV), et contient moins d'acides gras volatils (-19%) et plus de NH_3-N (+39%) que le biotope cæcal. Cela suggère un rôle déterminant de la physiologie digestive de l'hôte et/ou des phénomènes de coévolution hôte/microbiote. Nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence un effet de « l'individu hôte » sur les caractéristiques de sa communauté microbienne suggérant que la proximité génétique entre les individus (race) et/ou la forte standardisation des conditions d'élevage (logement, alimentation etc.) tendent à uniformiser l'influence des individus sur le déterminisme de leurs communautés procaryotiques. Nous avons montré qu'il existe une évolution des communautés microbiennes le long du tractus digestif en relation avec la physiologie et les conditions environnementales des différents compartiments à laquelle s'additionne, dans le rumen, une variabilité liée à la fraction, liquide ou solide, considérée. Nos données suggèrent qu'à l'état basal et en situation de perturbation, les communautés procaryotiques des deux espèces hôtes n'évoluent pas de la même façon dans le temps. Ainsi, dans le rumen de la vache, la communauté bactérienne fluctue de façon sporadique suggérant un état d'équilibre dynamique alors qu'elle reste dans un état d'équilibre statique dans le cæcum du lapin. Les deux communautés réagissent de façon rapide (<2jours) et s'adaptent rapidement à une augmentation du ratio amidon/fibres pour atteindre un nouvel équilibre, dynamique dans le rumen et statique dans le cæcum. En revanche, nos travaux n'ont pas mis en évidence de corrélations importantes entre les communautés bactériennes et les paramètres de leur environnement. D'un point de vue finalisé, ces données confirment que la nutrition est une voie d'action pertinente pour essayer de réorienter le fonctionnement des écosystèmes digestifs chez ces espèces d'intérêt zootechnique, vers une meilleure santé et/ou efficacité digestive.

Mots clés : vache, lapin, CE-SSCP, qPCR, bactérie, *Archaea*, dynamique, perturbation, nutrition, diversité, structure, écologie