

Thèse

Présentée à

L'UNIVERSITE DE PAU

ET

DES PAYS DE L'ADOUR

ECOLE DOCTORALE 211 : SCIENCES EXACTES ET LEURS APPLICATIONS

Par

Florian Vasai

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : Sciences Agronomiques, Biotechnologies agro-alimentaires

Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux, Environnement
et Microbiologie

**Etude de la composition du microbiote intestinal des canards.
Impact du gavage, de l'ajout d'un probiotique (*Lactobacillus
sakei*) et d'un composé organométallique (cadmium).**

Thèse soutenue le **12 décembre 2013** devant le jury composé de :

M. Philippe Goulas, Professeur, Université de Pau, HDR	Président du jury
M. Francis Enjalbert, Professeur, INP-ENVT, HDR	Rapporteur
Mme. Elisabeth Baéza, Ingénieur de recherche, INRA de Tours, HDR	Rapporteur
Mme. Christine Burel, Ingénieur de recherche, INRA S ^t Pée sur Nivelle	Examineur
M. Stéphane Davail, Professeur, Université de Pau, HDR	Directeur de thèse
Mme. Karine Brugirard-Ricaud, Maître de Conférences, Université de Pau	Directeur de thèse

Résumé

Le **microbiote** intestinal constitue un élément important pour l'hôte, il est impliqué notamment au niveau immunologique ou physiologique. La connaissance de la composition de ce microbiote est la première étape dans la compréhension des phénomènes qui lui sont associés. Les travaux de cette thèse se sont articulés selon plusieurs objectifs. La première étape a été de faire un état des lieux de la composition du microbiote de deux types génétiques parentaux : le canard **Pékin** (*Anas Platyrhynchos*), le canard de **Barbarie** (*Cairina Moschata*) ainsi que de leur hybride ; le canard **mulard**. Nous avons ainsi pu observer des compositions différentes selon le type génétique avec tout de même la prédominance dans chacune des trois espèces de deux phyla : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. Différentes conditions rencontrées dans l'environnement sont à même de créer un déséquilibre dans la composition du microbiote. Une des conditions possibles est un changement dans l'alimentation ainsi la seconde étape a été de voir l'impact du **gavage** sur les communautés bactériennes composant le microbiote. Celui-ci induit bien des modifications au sein du microbiote en privilégiant certaines classes bactériennes notamment les *Bacilli* et les *Clostridia* selon le type génétique. Un effet du gavage a été montré au niveau du microbiote iléal tandis que l'on retrouve un effet du type génétique ainsi que du gavage mais plus faible que dans l'**iléon** au niveau des **caeca**. Deux autres travaux ont été réalisés, le premier concernait l'ajout d'un **probiotique** (*Lactobacillus sakei*) sur le microbiote des canards mulards durant la phase de gavage. Nous avons montré que lors de cet ajout, nous observions une forte augmentation des lactobacilli au niveau de l'iléon. Enfin suite aux fortes contaminations retrouvées dans le sud-ouest ainsi que ses effets toxiques montrés dans différentes études, le dernier travail effectué a été de voir l'effet du **cadmium** sur le microbiote des canards Pékin et Barbarie. Nous avons pu ainsi observer les modifications de la communauté microbienne lors de l'ajout de cadmium ainsi l'accumulation de celui-ci dans les reins au cours du gavage. Des effets combinés entre le cadmium et la période de gavage ainsi qu'avec le type génétique ont été mis en lumière. Une tendance à une accumulation différentielle du cadmium a été observé selon le type génétique.

Mots clés : microbiote, Pékin, Barbarie, mulard, iléon, caeca, gavage, probiotique, cadmium

Study of ducks intestinal microbiota composition. Impact of overfeeding, addition of a probiotic (*Lactobacillus sakei*) and an organometallic compound (cadmium).

Abstract

The intestinal **microbiota** is an important element for the host; it is particularly involved in immunological or physiological level. Knowledge of the composition of the microbiota is the first step in understanding the phenomena associated with it. The work of this PhD was organized according to several objectives. The first step was to realize a molecular inventory of the microbiota composition of the two parental genetic types: the **Pekin** duck (*Anas Platyrhynchos*), the **Muscovy** duck (*Cairina moschata*) and their hybrid, the **mule** duck. We have observed different compositions depending on the genetic type although with a predominance of two phyla: the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* for all ducks species. Different conditions encountered in the environment are likely to create an imbalance in the composition of the microbiota. One is a change in diet; therefore the second step was to see the impact of **overfeeding** on bacterial communities. Overfeeding causes many changes in the bacterial microbiota and increase two classes: *Bacilli* and *Clostridia* according to the genetic type. The effect of overfeeding has been shown principally on the ileal microbiota while genetics and overfeeding both affected weekly cecal microbiota. We then studied the impact of adding a **probiotic** strain (*Lactobacillus sakei*) on the microbiota of mule ducks during the overfeeding period. We could see here a significant effect of this addition only in the ileum with a sharp increase in lactobacilli. Finally, due to high levels of contamination found in the southwest of France and its toxic effects on metabolism shown in various studies, the last work was to see the effect of **cadmium** on the microbiota of Pekin and Muscovy ducks. We observed changes in the microbial community when adding cadmium and see the accumulation of it in the kidneys during overfeeding. Combined effects between cadmium and the feeding period as well as the genetic type were highlighted. Finally, a differential Cadmium accumulation according to the genetic type was identified.

Keywords: microbiotia, Pekin, Muscovy, mule, ileum, ceca, overfeeding, probiotic, cadmium

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'assister à ma soutenance.

Je remercie Monsieur Philippe Goulas d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie Monsieur Olivier Donard de m'avoir accueilli au sein de l'IPREM durant ces trois années.

Je remercie également Monsieur Robert Duran pour m'avoir intégré à l'équipe Environnement et Microbiologie.

Je tiens à remercier Stéphane Davail pour avoir encadré ma thèse et m'avoir accueilli au sein de l'équipe basée sur Mont de Marsan.

Un grand merci à Karine Brugirard-Ricaud, ma co-directrice de thèse qui tout au long de ces trois années m'a guidé et m'a permis d'avancer dans mes travaux.

Je souhaite également remercier le Conseil Général des Landes pour leur soutien financier tout au long de la thèse.

Merci également au comité interprofessionnel des palmipèdes à foie gras pour leur soutien financier dans la réalisation des expérimentations.

Merci à l'équipe de l'IPREM du site de Mont de Marsan ainsi qu'à l'équipe enseignante de l'IUT, et au personnel administratif pour leurs conseils et leur aide.

Lors des différentes études réalisées lors de ma thèse j'ai pu travailler avec des personnes qui m'ont grandement apporté. Je remercie donc Sylvie Combes et Laurent Cauquil pour leur

patience et tous leurs conseils lors du traitement des données de séquençage et pour avoir accepté de participer à mon comité de thèse. Je remercie également Monsieur Xavier Fernandez pour son accueil au sein de l'équipe TANDEM.

Je remercie également Madame Sandrine Skiba pour avoir accepté de participer à mon comité de thèse et de m'avoir apporté de nombreux conseils pour le bon déroulement de ma thèse.

Je remercie tous les membres de la station expérimentale de Benquet pour leur aide dans la réalisation des différentes études notamment Marie-Dominique Bernadet et Gérard Guy pour leur aide.

Merci au personnel du Laboratoire des Pyrénées et des Landes et plus particulièrement Patrick Daniel pour son aide lors de la préparation des échantillons en vue du séquençage et pour l'étude expérimentale sur l'effet des probiotiques.

Mes plus grands remerciements vont à mes parents sans qui je n'aurais pas pu arriver là. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

SOMMAIRE

Travaux issus de la thèse	11
Liste des tableaux	13
Liste des figures	15
Liste des abréviations	17
Introduction générale	19
Etude Bibliographique	27
I. Modèles d'étude	29
1. Différents types génétiques utilisés et leur physiologie	29
1.1. <i>Cairina Moschata</i>	29
1.2. <i>Anas Platyrhynchos</i>	30
1.3. Mulard	30
2. Le gavage	31
II. Méthodes de détection du microbiote intestinal	32
1. Méthodes de détection	32
1.1. Méthodes culturelles	32
1.2. Techniques de Biologie Moléculaire	33
III. Le tube digestif et le microbiote intestinal des oiseaux	35
1. Le tube digestif des oiseaux	35
2. Relation microbiote-hôte	37

3.	Le microbiote intestinal des oiseaux	39
3.1.	Communautés microbiennes du tube digestif du poulet	41
3.2.	Microbiote intestinal chez les autres espèces	45
4.	Groupes bactériens principaux du microbiote intestinal des oiseaux	46
4.1.	<i>Lactobacillales</i>	46
4.2.	<i>Bacteroidales</i>	46
4.3.	<i>Clostridiales</i>	46
IV.	Effet de l'alimentation sur les animaux	47
1.	Impact de l'alimentation sur les animaux	47
2.	Cas d'une alimentation riche en amidon	48
V.	Les probiotiques	49
1.	Définition	49
2.	Modes d'action des probiotiques	49
3.	Effet des probiotiques sur la diversité du microbiote	51
VI.	Le cadmium	52
1.	Toxicité du cadmium	52
2.	Effets du cadmium chez les oiseaux	53
3.	Effet du cadmium sur la diversité du microbiote intestinal	54
	Matériels et Méthodes	55
I.	Expérimentations	57
1.	Conditions d'élevage des canards	57
2.	Essai probiotique	59
3.	Essai cadmium	60

II.	Prélèvements pour analyse du microbiote	61
III.	Extraction d'ADN	61
IV.	PCR en temps réel	62
V.	Séquençage en 454 des gènes codant pour l'ARNr 16S	64
VI.	Analyse des pyrotags	65
VII.	Taxonomie et analyses statistiques	65
VIII.	Dosage du cadmium	67
	Etudes expérimentales	69
	Article 1 : Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in <i>Anas platyrhynchos</i> (Pekin) and <i>Cairina Moschata</i> (Muscovy) ducks.	73
	Résumé	73
	Résultats complémentaires	88
	Article 2 : <i>Lactobacillus sakei</i> modulates mule ducks microbiota in ileum and ceca during overfeeding period.	99
	Résumé	99
	Résultats complémentaires	111

Article 3 : Cadmium affects the composition of intestinal microbiota in Pekin (<i>Anas platyrhynchos</i>) and Muscovy (<i>Cairina Moschata</i>) ducks.	115
---	-----

Résumé	115
--------	-----

Résultats complémentaires	141
---------------------------	-----

Discussion Générale	153
----------------------------	------------

Conclusions et Perspectives	167
------------------------------------	------------

Références Bibliographiques	175
------------------------------------	------------

Annexes	193
----------------	------------

Travaux issus de la thèse

Publications dans des journaux à comité de lecture :

Article 1 : Florian Vasaï, Karine Brugirard Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Laurent Cauquil, Olivier Bouchez, Sylvie Combes & Stéphane Davail. Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina Moschata* (Muscovy) ducks. **FEMS Microbiology Ecology**. **10.1111/1574-6941.12217**.

Article 2 : *Lactobacillus sakei* modulates mule ducks microbiota in ileum and ceca during overfeeding period. Florian Vasaï, Karine Brugirard Ricaud, Laurent Cauquil, Patrick Daniel, Céline Peillod, Karine Gontier, Abdelkader Tizaoui, Olivier Bouchez, Sylvie Combes & Stéphane Davail. 2013. **Poultry Science**. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03497>.

Article 3 : Cadmium affects the composition of intestinal microbiota in Pekin (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina Moschata*) ducks (en préparation).

Communications lors de congrès :

1. F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, C. Peillod, P.Daniel, S. Davail. **Effect of overfeeding on the intestinal microbial diversity in mule ducks**. 2012. INRA-ROWETT Gut Microbiology Symposium, Clermont-Ferrand, France. (Poster).
2. F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, P.Daniel, C. Peillod, S. Combes, L.Cauquil, O.Bouchez, S. Davail. 2013. **Effet d'un probiotique sur le microbiote intestinal des canards mulards durant le gavage**. Dixièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, La Rochelle, France. (Communication orale).

Posters réalisés lors de présentations de l'école doctorale 211 :

1. F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, S. Davail. 2011. **Effect of probiotics on the duck's gut microbiota during overfeeding**. Doctoriales transfrontalières, Anglet, France.

2. F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, S. Davail. 2012. **Effect of overfeeding, organic and organometallic compounds on the duck's gut microbiota.** Journées de l'école doctorale 211, Pau, France.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Evolution de la composition de la microflore du poulet en fonction de l'âge.

Tableau 2 : Abondance relative des taxons microbiens issus de contenus digestifs de l'intestin des oiseaux étudiés précédemment d'après (Kohl, 2012).

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques et fermentaires et microbiennes d'un aliment pour porc ensemencé ou non avec une souche de *Lactobacillus plantarum* (Van Winsen *et al.*, 2001).

Tableau 4 : Courbes de gavage utilisées lors des différentes études pour les deux types génétique étudiés et leur hybride (Pékin, Barbarie et Mulard).

Tableau 5 : Composition des aliments utilisés pour la phase de croissance et de gavage des animaux.

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour les analyses en PCR quantitative.

Tableau 7 : Liste des souches bactériennes utilisées lors des différentes études.

Tableau 8 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote dans l'iléon du canard Pékin.

Tableau 9 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote dans l'iléon du canard de Barbarie.

Tableau 10 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote des caeca du canard Pékin

Tableau 11 : Abondance relative des genres bactériens majoritaire du microbiote des caeca des canards de Barbarie.

Tableau 12 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon des canards Pékin. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais.

Tableau 13 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon des canards de Barbarie. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais.

Tableau 14 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans les caeca des canards Pékin. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais.

Tableau 15 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans les caeca des canards de Barbarie. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais.

Tableau 16 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote chez le canard mulard lors du gavage avec ou sans ajout de probiotiques dans l'iléon.

Tableau 17 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote chez le canard mulard lors du gavage avec ou sans ajout de probiotiques dans les caeca.

Tableau 18 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote lors de l'ajout de cadmium dans l'iléon des canards Pékin.

Tableau 19 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote lors de l'ajout de cadmium dans l'iléon des canards de Barbarie.

Tableau 20 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote lors de l'ajout de cadmium dans les caeca des canards Pékin.

Tableau 21 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote lors de l'ajout de cadmium dans les caeca des canards de Barbarie

Tableau 22 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon des canards Pékin et des canards de Barbarie. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log_{10} du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais.

Tableau 23 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans les caeca des canards Pékin et des canards de Barbarie. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log_{10} du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais.

Tableau 24 : Comparaison de l'abondance relative des différents taxons composant le microbiote de différentes espèces aviaires d'après (Kohl, 2012, Vasaï *et al.*, 2013).

Liste des figures

Figure 1 : Types génétiques parentaux et leur hybride utilisés lors de la thèse.

Figure 2 : Anatomie du tube digestif des volailles.

Liste des Abréviations

ACE	Abundance Coverage Estimator
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGCC	Acide gras à chaîne courte
AGV	Acide gras volatil
Cd	Cadmium
CP (PB)	Crude Protein (Protéines brutes)
CRAN	Comprehensive R Archive Network
g	Gramme
GC	Guanine/Cytosine
HCl	Acide Chlorhydrique
INERIS	Institut National de l'EnviRonnement industriel et des rISques
kg	Kilogramme
MJ	Mégajoule
MT	Métallothoiénine
nMDS	Nonmetric Multidimensional Scaling
Nt	Nucléotide
O ₂	Oxygène
OTU	Operational Taxonomic Unit

Pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
ppm	Partie par million
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction

Introduction Générale

D'après les résultats de l'année 2012 la production mondiale de foie gras est estimée à 26 800 tonnes de foie gras cru, ce chiffre est stable par rapport aux chiffres de 2011. Dans cette production l'Europe tient un rôle très important avec la quasi-totalité des foies gras produits (25 400 tonnes soit 94,78 %). La France, elle, au sein de l'Europe reste le pays majoritaire avec une production de 19 190 tonnes, viennent ensuite la Bulgarie et la Hongrie avec respectivement 2 800 et 2 570 tonnes. Cette production est partagée entre les produits à base d'oie et ceux à base de canard. Ces derniers représentent environ 90 % des tonnages selon les statistiques nationales des pays producteurs (CIFOG, 2013). Malgré des prédictions annonçant pour 2013 une baisse de la production de foie gras, le marché français reste tout de même fortement majoritaire. Parmi les principaux importateurs de foie gras français on retrouve l'Espagne, la Belgique et le Japon avec plus de 50 millions d'euros en cru et transformé (CIFOG, 2013). La production française de foie gras se répartit dans seulement quelques régions dont la Bretagne, le Poitou-Charentes, Pays de la Loire, Midi Pyrénées et enfin l'Aquitaine qui représente à elle seule plus de 50 % de la production. En plus de cette production de foie gras, la production de viande de canard est elle aussi importante et estimée en 2012 à 138 160 tonnes équivalent carcasses pour les canards gras (- 3 %) et 100 590 tonnes pour les canards maigres (+ 1 %). Lors des différentes étapes de la production à commencer par l'élevage, la qualité sanitaire des animaux est primordiale afin de garantir une qualité optimale pour les consommateurs. Jusqu'en 2006, l'utilisation d'antibiotiques en tant que facteurs de croissance était autorisée pour limiter les risques sanitaires en cas de problèmes lors de l'élevage ou du gavage (Nava *et al.*, 2005).

Depuis l'interdiction de l'utilisation de ces antibiotiques (European, 2003), de nombreuses pistes ont été explorées pour remplacer ceux-ci. En effet l'utilisation intensive d'antibiotiques risquait de provoquer l'émergence de bactéries résistantes et potentiellement pathogènes (Asakura *et al.*, 2001) chez l'Homme et les animaux et de perturber le microbiote

intestinal. Parmi les pistes explorées l'utilisation de probiotiques, qui sont des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante ont un effet bénéfique sur l'hôte a été testée. Ainsi, plusieurs études ont montré que chez le poulet de chair l'apport de probiotiques induisait une augmentation de l'efficacité alimentaire avec toutefois de fortes variabilités suivant les expérimentations (Simon *et al.*, 2001). Les probiotiques ont également des effets sur les performances zootechniques des jeunes poussins et canetons chez lesquels l'apport de probiotiques en phase de croissance a permis une augmentation de poids vif et de poids de foie de 10 à 15 % (Angelakis & Raoult, 2010). De plus, certaines enzymes ainsi que des prébiotiques (oligosaccharides ou polysaccharides par exemple), qui jouent le rôle de substrats pour favoriser la croissance de certaines bactéries, ont été utilisés chez les animaux en élevage avec des résultats proches de ceux qui ont été trouvés avec les probiotiques (Simon *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2009). Ces différents produits agissent chez les animaux lors de l'ingestion de l'aliment en ayant un effet direct sur leur microbiote. Les probiotiques entraînent une modification du microbiote intestinal des animaux ce qui pourrait expliquer l'augmentation des performances alimentaires en favorisant une flore bénéfique. La modification du microbiote par les probiotiques est un effet connu chez différents animaux mais aucune étude n'avait jamais été réalisée jusqu'à présent chez le canard que ce soit en fin d'élevage ou lors de la phase de gavage. De plus depuis les années 1950 de nombreuses études ont été réalisées chez le poulet notamment en ce qui concerne l'état des lieux du microbiote digestif du poulet (Fuller, 1984, Lu *et al.*, 2003, Gong *et al.*, 2007) mais seule une étude de la composition des caeca a été réalisée par microbiologie classique chez le canard (Ridsdale & Corry, 1999).

Le microbiote a un rôle très important pour l'hôte, il est impliqué de différentes façons dans la physiologie de celui-ci. Le microbiote est en relation étroite avec la paroi du tube digestif, et, est ainsi capable de modifier la structure et l'activité de celui-ci (Taschuk &

Griebel, 2012). Il est également impliqué dans la digestion ainsi que la transformation et l'assimilation de composés non utilisables directement par l'hôte ainsi que différents processus métaboliques (Wolin & Miller, 1983, Macfarlane & Gibson, 1994). Différents stress peuvent être rencontrés par les animaux qu'ils soient alimentaires ou environnementaux. Chez les canards, le processus de gavage qui consiste en l'apport quasi exclusif en carbohydrates sous la forme d'une suralimentation en maïs entraîne une perturbation importante (Saadoun & Leclercq, 1987). Le maïs, très riche en amidon est ensuite hydrolysé en glucose au niveau du tube digestif ce qui conduit à une modification importante du métabolisme lipidique des animaux entraînant une production importante d'acides gras qui sont stockés au niveau du foie (Hermier *et al.*, 1994). Cette accumulation de lipides provoque une stéatose hépatique et donc la production de foie gras. L'apport de ce régime riche en amidon durant le gavage peut également avoir un effet sur le microbiote intestinal en plus de son impact sur le métabolisme lipidique (Saez *et al.*, 2010). Le microbiote étant lui-même le siège de la digestion et de l'assimilation de ces nutriments ainsi que de leur transformation. Il est important de savoir si ce changement de régime a un effet sur celui-ci en induisant des modifications des communautés bactériennes commensales.

En plus de ces changements les animaux dans la nature peuvent également rencontrer dans l'environnement des composés pouvant apporter des conditions modifiant la physiologie et le métabolisme des animaux. C'est le cas des métaux lourds et notamment le cadmium qui est retrouvé en grande quantité dans l'environnement et principalement dans les eaux dans la région Aquitaine (Jouanneau *et al.*, 1990). Ce métal lourd lorsqu'il est ingéré (eau de boisson, alimentation) est stocké au niveau des tissus notamment les reins et le foie, entraîne un stress oxydant amenant des lésions tissulaires, des modifications du métabolisme lipidique et conduisant à la possible mort des animaux (Bendell, 2010). Ces changements observés sur le métabolisme lipidique et la physiologie des canards laissent à penser que le cadmium pourrait

également avoir un effet sur le microbiote intestinal car celui-ci est absorbé au niveau des muqueuses digestives (Breton *et al.*, 2013b). Différentes études chez les rats et les souris ont montré que l'apport de cadmium dans l'eau de boisson à fortes doses et sur des périodes relativement longues (de 23 à 50 ppm sur une période 45 jours) modifie fortement la concentration microbienne des animaux (Fazeli *et al.*, 2010).

L'objectif de cette thèse a été dans un premier temps de faire un « état des lieux » du microbiote digestif des canards de deux types génétiques parentaux qui sont le canard de Barbarie (*Cairina Moschata*) et le canard Pékin (*Anas Platyrhynchos*) ainsi que de leur hybride stérile, le canard mulard utilisé pour la production de foie gras commercial. Dans un deuxième temps, il était important d'évaluer l'effet du gavage sur la diversité du microbiote des canards. Nous avons dans un troisième temps, étudié l'effet de l'ajout de probiotiques sur ce microbiote lors de la phase de gavage uniquement chez le canard mulard avec une vérification de l'impact des probiotiques sur les performances zootechniques des animaux. Enfin, l'impact du cadmium sur le microbiote des canards de Barbarie et Pékin a été analysé durant la période de gavage (2 semaines) et ce à différentes doses : 0 ppm qui est une « contamination nulle » des animaux, 1 ppm qui est une contamination dite « naturelle » qui a été retrouvée chez les canards sauvages du sud-ouest de la France (Lucia, 2009, Lucia *et al.*, 2010a) et enfin une « contamination » aiguë de 10 ppm correspondant à une contamination excessive dix fois supérieure à ce qui a été retrouvé dans l'environnement.

Ce manuscrit se compose d'une étude bibliographique présentant les travaux antérieurs à ceux de la thèse ainsi que tous les aspects étudiés au cours de ces trois années. Une partie matériels et méthodes présentera ensuite les différentes conditions et techniques utilisées lors des expérimentations. Ensuite les différents travaux réalisés seront présentés sous la forme d'articles ainsi que les résultats complémentaires obtenus. La dernière partie de ce manuscrit

consistera en une discussion générale permettant de conduire à une réflexion sur les résultats obtenus ainsi que sur les perspectives pour la poursuite de ce travail.

Etude

Bibliographique

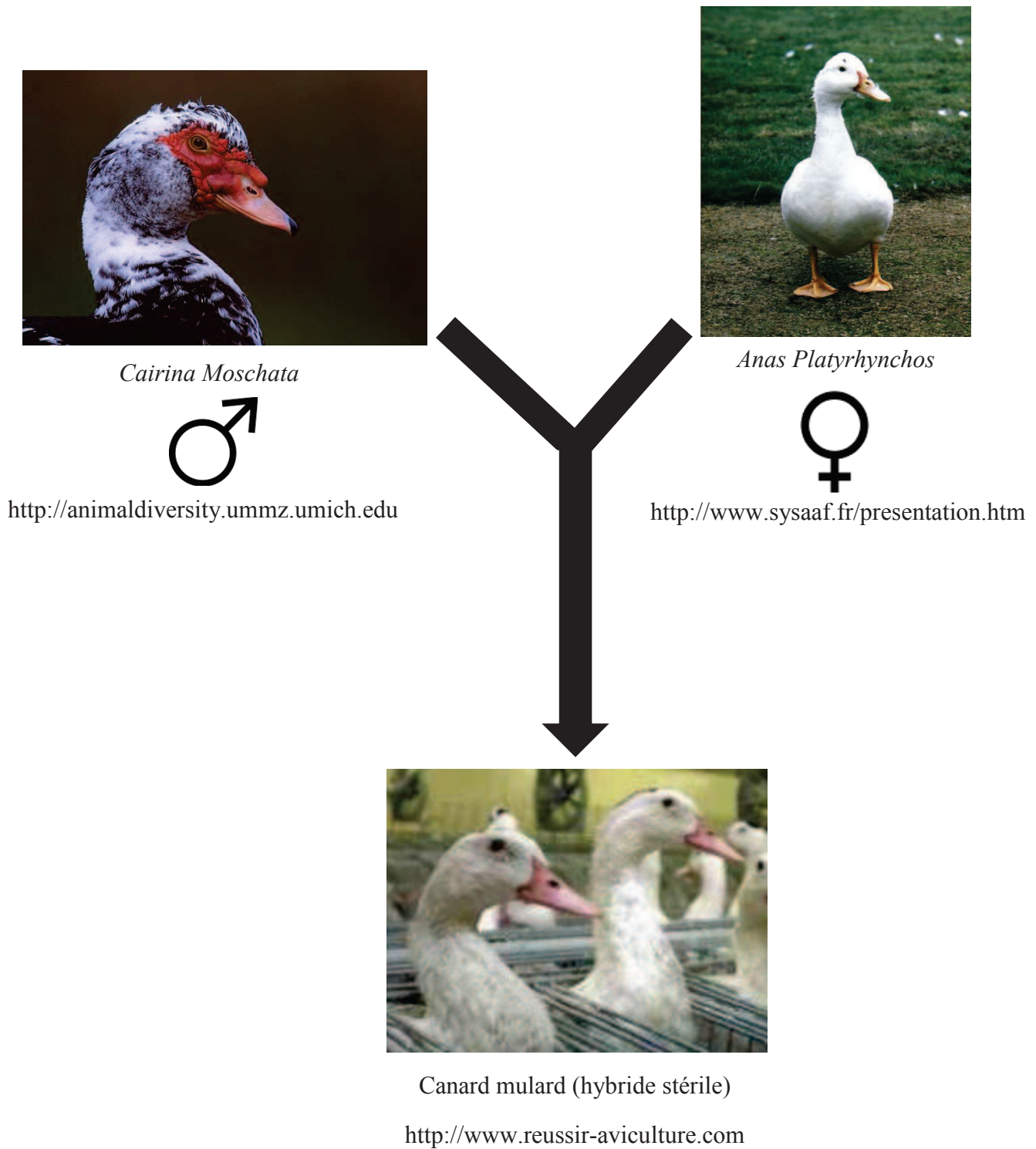


Figure 1 : Types génétiques parentaux et leur hybride utilisés lors de la thèse.

I. Modèles d'étude

La réalisation de cette thèse a nécessité l'utilisation de plusieurs types génétiques de canards dont le canard de Barbarie (*Cairina Moschata*), le canard Pékin (*Anas Platyrhynchos*) ainsi que leur hybride stérile appelé le canard mulard.

1. Différents types génétiques utilisés et leur physiologie

1.1. *Cairina Moschata*

Cairina Moschata ou canard musqué possède une forme domestique appelé canard de Barbarie, un des trois types génétiques de canards utilisés lors de ces études. C'est un oiseau d'origine tropicale capable tout de même de s'adapter à des températures allant jusqu'à -12°C. Il possède un plumage clair dans sa version domestique et possède une peau rouge sur la tête (figure 1). Ces canards ont un comportement calme et silencieux. Les mâles sont beaucoup plus lourds que les femelles et présentent des caractéristiques physiologiques différentes des autres types génétiques utilisés. Ils ont une bonne réponse au gavage avec un poids en moyenne avant gavage de 5418 ± 245 g et un poids vif de 6393 ± 441 g après deux semaines de gavage (Baéza *et al.*, 2005). Les canards de Barbarie ont tendance à stocker fortement les lipides au niveau du foie lors du gavage, ce qui conduit à des foies de taille importante (467 ± 90 g) mais de mauvaise qualité due à une texture granuleuse et un taux de fonte élevé (Baéza *et al.*, 2005).

1.2. *Anas Platyrhynchos*

Anas Platyrhynchos ou canard Pékin est un canard domestique utilisé principalement pour sa viande et ses qualités de bon reproducteur car il possède un taux de ponte élevé (environ 220 à 230 œufs sur 40 semaines) avec un taux moyen d'environ 80% en « pur » contre 66% en intergénétique (Brun & Larzul, 2003, Pingel *et al.*, 2012). Son plumage est blanc et il possède un bec jaune. Le mâle est plus lourd que la femelle avec un léger dimorphisme sexuel (4 kg vs 3,5 kg) (Pingel *et al.*, 2012). Leur poids vif avant gavage est moins élevé (4623 ± 426 g) (Baéza *et al.*, 2005). Ces canards sont faciles à élever car ils sont robustes et sociables. Les canards Pékin possèdent une physiologie différente des canards de Barbarie et ne sont pas utilisés en gavage. Effectivement des études précédentes ont montrés que lors du gavage le stockage des lipides synthétisés se fait essentiellement vers les tissus périphériques au détriment du foie (Chartrin *et al.*, 2006, Chartrin *et al.*, 2013). Ces derniers de petites tailles (318 ± 75 g) sont donc non propices à la commercialisation (Baéza *et al.*, 2005). Par contre leur taux de fonte à la cuisson est plus faible que celui du canard de Barbarie (Théron, 2011).

1.3. Mulard

Le canard mulard est un hybride stérile issu du croisement interspécifique entre une femelle Pékin et un mâle Barbarie (Davail *et al.*, 2003b). C'est le type génétique commercial utilisé pour la production de foie gras. On retrouve chez le canard mulard les propriétés physiologiques des deux types génétiques parentaux à savoir un poids vif élevé de 4455 ± 392 g avant gavage et de 6473 ± 351 g après deux semaines de gavage, une production de foie

gras importante (494 ± 97 g) et de bonne qualité ainsi qu'une viande savoureuse (Baéza *et al.*, 2005).

2. Le gavage

Historiquement le gavage est apparu dès l'Egypte ancienne où des palmipèdes étaient gavés pour obtenir des animaux bien gras. Le gavage se base sur un mécanisme naturel des oiseaux migrateurs qui en prévision de la migration accumulent des lipides. C'est actuellement le système utilisé pour l'obtention du foie gras chez les palmipèdes car il permet d'accroître la taille du foie d'un facteur 10 (Hermier *et al.*, 2003). Ce phénomène chez les oiseaux est non pathologique et réversible (Babilé *et al.*, 1996, Hermier *et al.*, 1999). Le foie ayant un rôle épurateur, il va stocker un maximum de graisse conduisant à une stéatose hépatique chez les animaux (Davail *et al.*, 2003a). Le gavage accentue cette capacité physiologique des palmipèdes et a été exploité pour la production artisanale ou industrielle de foie gras principalement dans quelques pays comme la France, l'Espagne, la Hongrie, la Bulgarie ou la Belgique (CIFOG, 2013). En élevage, les animaux sont gavés dès l'âge de 12 semaines jusqu'à l'âge de 14 semaines par un apport excessif de carbohydrates sous la forme de maïs de 300 g en début de gavage à 600-700 g en fin de gavage selon la courbe appliquée ce qui va stimuler la lipogenèse et conduire à une stéatose hépatique (Hermier *et al.*, 1999). Au bout de cette période le foie peut représenter jusqu'à 10 % de la masse corporelle de l'animal (Hermier *et al.*, 1994). Il a été montré que l'aptitude à la stéatose hépatique dépendait du type génétique de canard. En effet les canards de Barbarie après gavage possèdent un foie sensiblement plus gros que le canard Pékin tandis que le mulard montre un rendement intermédiaire entre les deux types génétiques parentaux (467 ± 90 g vs 494 ± 97 g vs 318 ± 75 g) (Baéza *et al.*, 2005). Les canards Pékin, eux, ont tendance à accumuler les lipides au niveau

périphérique pendant le gavage, ce qui peut s'expliquer par un taux de sécrétion des lipides plus important que chez le canard de Barbarie (Hermier *et al.*, 2003).

II. Méthodes de détection du microbiote intestinal

1. Méthodes de détection

L'étude du microbiote intestinal passe par la connaissance de la composition des communautés bactériennes. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour détecter et déterminer la composition du microbiote. Les paragraphes suivants décrivent les méthodes de détection utilisées pendant les essais réalisés lors de cette thèse.

1.1.Méthodes culturelles

Une des techniques consiste en l'ensemencement en boîte de Pétri ou en tube gélosé permettant la culture et l'isolement des microorganismes constituant la matrice à étudier. Des milieux spécifiques doivent être utilisés pour permettre l'isolement de ces bactéries notamment à cause des conditions de milieu à reproduire. Différents nutriments ainsi que des conditions propres à chaque groupe bactérien sont nécessaires (pH, présence d'O₂ ou non,...). Cette technique ne permet de déterminer qu'une petite partie de la communauté. En effet, jusqu'à 90 % des bactéries sont dites viables mais non cultivables (Lan *et al.*, 2002, Apajalahti *et al.*, 2004) et les conditions précises de culture sont indéterminées pour de nombreuses espèces. C'est une méthode restrictive qui passe obligatoirement par la connaissance des conditions de cultures des bactéries du milieu étudié.

1.2. Techniques de biologie moléculaire

Pour pallier notamment au problème des bactéries viables mais non cultivables, des techniques basées sur la détection de l'ADN indépendamment des méthodes culturales ont été mises en place. De plus, elles permettent d'obtenir une composition plus fine du microbiote pouvant aller jusqu'à l'espèce bactérienne identifiée selon les techniques employées.

1.2.1. Polymerase chain reaction

La Polymerase Chain Reaction ou PCR est une technique de biologie moléculaire permettant d'avoir une approche semi-quantitative de la concentration des espèces composant le microbiote étudié. La PCR va permettre l'amplification de fragments d'ADN (le plus souvent l'ADN ribosomal 16S « ADNr 16S » chez les procaryotes) grâce à des amorces (petits fragments d'ADN d'environ 20 pb). Le choix des amorces permet la détection d'une cible donnée (phylum, genre, famille, espèce,...). Celles-ci vont s'apparier aux brins simples d'ADN préalablement dénaturés et permettre une élongation des brins néoformés par action de l'ADN polymérase et ainsi obtenir de nombreuses copies du fragment recherché de façon exponentielle à chaque cycle d'amplification (Mullis *et al.*, 1986).

1.2.2. qPCR

La qPCR ou PCR quantitative se base sur le principe de la PCR, la différence principale est que la qPCR permet la quantification de la quantité d'ADN en temps réel. Pour permettre une détection à chaque cycle la qPCR se base sur la détection d'un fluorochrome. L'intensité

de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de séquences amplifiées et permet donc de déterminer la quantité initiale d'ADN recherché. La technique utilisée est celle du SYBR Green qui est une molécule qui se fixe durant l'hybridation des amorces ainsi que pendant l'élongation du brin néoformé d'ADN en ayant la capacité de se fixer aux molécules doubles brins en émettant une fluorescence (Kubista *et al.*, 2006).

1.2.3. Pyroséquençage

Le séquençage permet la détection totale de la composition d'un échantillon complexe par étude des régions variables de l'ADNr 16S. Les techniques de séquençages nécessitent au préalable une étape de PCR permettant d'obtenir un matériel génétique en quantité suffisante. Des amorces encadrant les régions variables de l'ADNr 16S sont donc utilisées pour permettre la discrimination des différentes populations selon leur polymorphisme. L'ajout d'un nucléotide à chaque étape du séquençage permet de déterminer la composition des séquence, si le fragment ajouté au milieu réactionnel est incorporé au fragment d'ADN durant la formation du brin complémentaire il y a libération d'une molécule de pyrophosphate. Les réactions chimiques engendrées par cette libération permettent l'émission d'un signal lumineux qui est alors scanné pour déterminer la séquence des échantillons étudiés. De nombreuses étapes préalables pour la préparation des échantillons sont nécessaires notamment la fixation des séquences aux billes de verre mais ceci permet l'obtention de nombreuses séquences rapidement.

III. Le tube digestif et le microbiote intestinal des oiseaux

1. Le tube digestif des oiseaux

D'après Leclercq & Larbier, (1992) le tube digestif des oiseaux se décompose en plusieurs segments allant du bec au cloaque et étant composé du jabot, proventricule, gésier, pancréas, les trois segments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon), des caeca et du rectum (Figure 2). Chaque segment a des conditions physiologiques différentes.

- Le jabot est un organe extensible qui permet le stockage des aliments en attendant la digestion. Ce stockage est régulé par le taux de remplissage du gésier. Une première digestion chimique a lieu dans le jabot grâce à l'action de la salive qui se mélange à l'aliment.
- Le proventricule est un estomac qui va permettre la sécrétion d'HCl et de pepsine permettant une protéolyse dont le site d'action se situe dans le gésier.
- Le gésier permet une action mécanique sur les aliments réduisant la taille des particules ingérées. Au sein de cet organe se produit également une action protéolytique permettant une digestion partielle des protéines.
- Le pancréas produit des hormones (insuline, glucagon) et un suc ayant une action amylolytique, protéolytique et lipolytique.

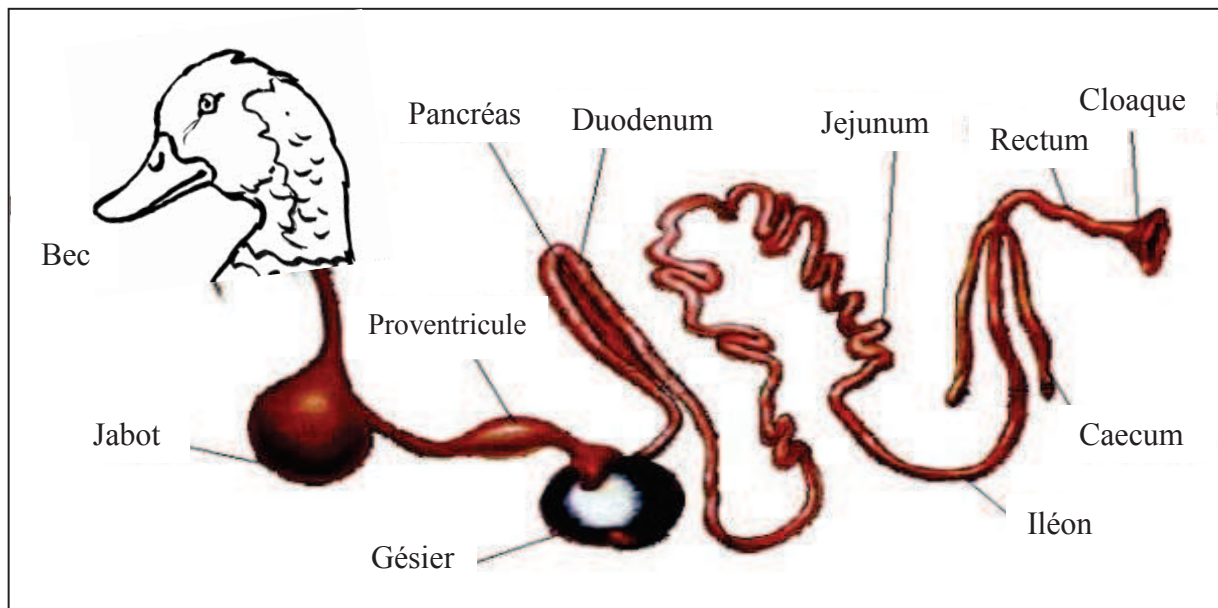


Figure 2 : Anatomie du tube digestif des volailles.

- L'intestin grêle permet de terminer les processus entamés en amont à savoir la digestion enzymatique notamment celle des glucides (duodénum) et l'absorption des produits de la digestion nécessaires à l'hôte (jéjunum et iléon). Il se divise en trois parties.
 - Le duodénum, segment démarrant au niveau du pancréas
 - Le jéjunum qui suit le duodénum et qui se termine au niveau du diverticule de Meckel
 - L'iléon démarrant au diverticule de Meckel et se terminant à la jonction iléo-caecale
- Les caeca représentent la partie terminale du tube digestif. Ils sont reliés à l'iléon et forment deux diverticules. Ils sont impliqués dans la formation d'acides aminés et d'acides gras volatils (AGV). L'entrée des différents fluides se fait par un péristaltisme inverse permettant seulement l'entrée des liquides et de fines particules.

2. Relation microbiote-hôte

De par son contact étroit avec la muqueuse intestinale le microbiote a un rôle très important dans la physiologie et l'activité intestinale de l'hôte. Par exemple, le microbiote peut modifier la structure du tube digestif comme cela a été montré en comparant des animaux

axéniques (dépourvus de flore digestive) et des animaux conventionnels (Ducluzeau, 1999) ou au niveau du rumen où le développement de la paroi et des papilles ruminales sont sous la dépendance des métabolites produits par le microbiote (Fonty, 1984). En effet, chez ces animaux axéniques on peut observer plusieurs différences physiologiques notamment une *lamina propria* (tissu conjonctif situé sous les épithéliums qui tapissent les muqueuses digestives) plus fine, peu développée et quasiment dépourvue de lymphocytes. Il a également été observé une hypertrophie de certains segments de l'intestin notamment les caeca chez les rongeurs ou le lapin (Fonty *et al.*, 1979). La vascularisation de l'intestin est également régie par les microorganismes qui transmettent des signaux permettant une augmentation du nombre de capillaires.

Le microbiote est également impliqué dans l'activité du tube digestif notamment dans la stimulation de la réponse immunitaire (Moreau *et al.*, 1982, Leser & Mølbak, 2009). Il peut agir en activant le tissu lymphoïde (Moreau & Gaboriau-Routhiau, 2001) et les précurseurs de l'immunité cellulaire tels que les lymphocytes, macrophages ou immunoglobulines (IgA) subissant une activité antigénique. Il a été montré que la présence de certaines bactéries à gram négatif (*Escherichia coli*, *Bacteroides*) permettait d'atteindre une stimulation de l'immunité de l'hôte égale à la moitié de l'activité observée avec une flore complète (Moreau *et al.*, 1982). La notion d'effet de barrière permet aussi de démontrer le rôle important du microbiote dans le bien-être de l'hôte (Ducluzeau & Raibaud, 1979). En effet, la flore autochtone du tube digestif empêche l'implantation de bactéries exogènes (allochtone) et donc potentiellement pathogènes exerçant ainsi un effet bactériostatique sur les microorganismes non implantés (Servin & Coconnier, 2003). La production de certains composés tels que de l'acide lactique ou de bactériocines par les bactéries lactiques par exemple permet d'expliquer cet effet bactériostatique. Cette sélection peut également être observée par l'occupation des

niches écologiques ou par un phénomène de compétition entre bactéries (Czerucka & Rampal, 2002, Servin, 2004).

Le microbiote est également impliqué dans la physiologie de l'hôte. Chez de nombreux mammifères le microbiote permet l'utilisation de certains composés tels que des polysaccharides végétaux comme la cellulose qui sont non dégradables par l'hôte (Dehority, 1997, Backhed *et al.*, 2004). La présence de bactéries fibrolytiques, cellulolytiques et amylolytiques (*Prevotella ruminocola*, *Ruminococcus amylophilus*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, ...) permet de garantir un apport en énergie et la production de substrats disponibles. Ceci permet notamment une dépense énergétique plus faible pour l'hôte de dépendre de l'activité microbienne pour ces réactions que de passer par ses propres voies de dégradations telle que l'hydrolyse par des enzymes endogènes (Stevens & Hume, 1998).

3. Le microbiote intestinal des oiseaux

L'implantation du microbiote digestif se fait dès les premiers jours de la vie et évolue en fonction de l'âge (Mackie *et al.*, 1999, Favier *et al.*, 2002). Le microbiote des canards est à ce jour très peu étudié et c'est le poulet qui reste encore aujourd'hui l'espèce aviaire la mieux décrite. Les études menées en microbiologie classique ont montrées que les différentes zones du tractus digestif présentent des activités microbiennes différentes. En effet les segments les plus abondants en microorganismes du tube digestif sont le jabot, les trois segments de l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et les caeca tandis que les autres segments sont eux beaucoup moins riches en microorganismes, dû à des conditions de culture moins adéquates (pH, présence de molécules antibactériennes). Les études ont également permis de distinguer deux zones distinctes : une zone où la communauté bactérienne est anaérobie facultative allant du jabot jusqu'à la partie terminale de l'iléon et une zone anaérobie stricte au

niveau des caeca. Les techniques de biologie moléculaire sont venues confirmer les résultats de microbiologie classique tout en affinant la composition. Par exemple, la majorité des bactéries détectées par la réalisation de banques de clones sont apparentées à deux phyla différents : les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* quel que soit le segment étudié (Zhu *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003, Ahmed *et al.*, 2008). L'étude de la composition de l'intestin (jéjunum + iléon) chez le poulet a montré la présence de bactéries gram + à faible GC% notamment des *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae* ainsi que celle de bactéries gram - telle que la classe des *Bacteroidaceae*. Le pourcentage de ces différentes classes évolue en fonction de l'âge avec tout de même une prédominance de la classe des *Lactobacillaceae* au niveau de ces segments (Mead, 1989). Dans les caeca, on retrouve les mêmes classes présentes avec cette fois-ci une prédominance des *Clostridiaceae* ainsi qu'un pourcentage important de *Fusobacteriaceae* qui sont des bactéries à gram + à fort pourcentage en GC (Mead, 1989). Des études par méthodes culturales ont montré une stabilisation de la composition du microbiote ; environ 20 jours pour l'iléon et entre 30 et 40 jours dans les caeca (cf tableau 1) (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007b).

Malgré cette stabilisation la composition du microbiote a tendance à varier tout au long de la vie de l'animal. Cette composition est influencée par de nombreux facteurs comme le génotype ou le sexe chez le poulet (Lumpkins *et al.*, 2008, Lumpkins *et al.*, 2010). La génétique peut également influencer la composition du microbiote comme cela a été montré chez la souris par exemple (Friswell *et al.*, 2010, Kovacs *et al.*, 2010). Les principaux facteurs de variation de cette composition microbienne sont principalement l'alimentation, les caractéristiques physiologiques et l'environnement d'élevage (Mulder *et al.*, 2009, Hammons *et al.*, 2010, Karasov *et al.*, 2011, Stanley *et al.*, 2012). La composition de l'alimentation ainsi que des modifications au niveau de celle-ci entraînent des changements au niveau de la

communauté bactérienne, changements qui seront décrits plus loin dans le paragraphe III (Serino *et al.*, 2011).

Segment digestif	Groupe	Classe	% de chaque classe à un âge donné					
			3 j	7 j	14 j	21 j	28 j	49 j
Intestin : Jéjunum + Iléon	Gram +, bas G + C%	<i>Lactobacillaceae</i>	61,1	63,3	63,7	65,8	86,3	69,8
		<i>Clostridiaceae</i>	16,9	1,1	6,9	14,9	6,4	19,2
		<i>Bacillaceae</i>						4,0
		<i>Staphylococcaceae</i>	2,1			2,6		
		<i>Streptococcaceae</i>	2,1	17,8	16,7	2,6	0,9	
		<i>Enterococcaceae</i>	3,2	15,6	12,8	2,6	2,7	2,0
	Gram +, fort G + C%	<i>Fusobacteriaceae</i>				4,4		
		<i>Bifidobacteriaceae</i>		1,1				
	Gram – Protéobactéries		13,7					
	Gram -	<i>Bacteroidaceae</i>				2,6		1,0
Caeca	Gram +, bas G + C%	<i>Lactobacillaceae</i>	25,7	4,3	9,9	1,0	0,9	7,2
		<i>Clostridiaceae</i>	51,4	85	73	56,6	56,1	74,2
		<i>Bacillaceae</i>			2,7	4,0	1,8	
		<i>Streptococcaceae</i>	2,9					1,0
		<i>Enterococcaceae</i>	1,9	2,2	0,9			2,0
	Gram +, fort G + C%	<i>Fusobacteriaceae</i>		2,2	9,0	27,3	35,1	7,2
			15,2		0,9			
	Gram -	<i>Flavobacteriaceae</i>	1,0					
		<i>Bacteroidaceae</i>	1,0	1,0		1,0	0,9	3,1

Tableau 1 : Evolution de la composition de la microflore intestinale du poulet en fonction de l'âge.

D'après (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007b).

3.1. Communautés microbiennes du tube digestif du poulet

Très peu d'études de la composition du microbiote intestinal du canard ont été réalisées tandis qu'il existe de nombreux travaux sur les communautés microbiennes composant le tube

digestif du poulet. La description suivante va donc s'appuyer sur les données connues concernant le tube digestif du poulet.

3.1.1. Dans le jabot

Le jabot est composé d'environ 10^8 à 10^9 bactéries par gramme de contenu frais (Bjerrum *et al.*, 2006). Dans ce segment sont retrouvés essentiellement des bactéries anaérobies facultatives avec une prédominance du genre *Lactobacillus* (Gong *et al.*, 2007). D'autres genres bactériens tels que les *Bacteroides*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et des entérobactéries ont également été détectés dans ce segment (Bjerrum *et al.*, 2006).

3.1.2. Proventricule

Le proventricule par ses conditions physico-chimiques notamment une forte concentration en HCl et pepsine ne permet pas une colonisation de ce segment.

3.1.3. Le gésier

Le gésier est en aval du proventricule et possède un environnement acide ce qui a tendance à diminuer la teneur en microorganismes. On retrouve ici de 10^7 à 10^8 bactéries par gramme de contenu frais avec encore ici les *Lactobacillus* qui sont retrouvés majoritairement. Les mêmes genres bactériens que dans le jabot sont détectés mais en concentration moins importantes (Shakouri *et al.*, 2009).

3.1.4. Duodénum et jéjunum

Comme dans les segments précédents, les genres bactériens *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et des entérobactéries sont détectés avec encore une fois une prédominance du genre *Lactobacillus*. On retrouve dans chacun de ces segments de 10^8 à 10^9 bactéries par gramme de contenu frais (Engberg *et al.*, 2004).

3.1.5. Iléon

On retrouve dans ce segment de 10^8 à 10^9 bactéries par gramme de contenu. Les lactobacilles sont une fois de plus les plus représentés allant de 10^7 à 10^9 bactéries par gramme de contenu frais. On observe une plus grande diversité dans l'iléon que dans les segments précédents avec notamment une concentration importante de bactéries anaérobies facultative des genres *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* mais aussi des bactéries anaérobies strictes telles que les *Clostridium* et *Bacteroides* (Wise & Siragusa, 2006).

3.1.6. Les caeca

Les caeca possèdent l'environnement le plus riche en bactéries de tout le tube digestif allant de 10^8 à 10^{11} bactéries par gramme de contenu (Engberg *et al.*, 2004). Les caeca possèdent un environnement dépourvu en oxygène, on retrouve donc une flore anaérobie stricte dont les genres dominants sont les *Clostridium* allant de 10^8 à 10^{10} bactéries par gramme de contenu. Il s'agit plus particulièrement des bactéries des clusters IV et XIV (Apajalahti *et al.*, 2004) mais également d'autres genres tels que les *Bacteroides* (jusqu'à 10^9 bactéries par gramme) ainsi que *Escherichia* (jusqu'à 10^{10} bactéries par gramme) et

Espèces	Pingouin d'Adélie <i>Pygoscelis adeliae</i>	Mouette <i>Larus spp.</i>	Oie du Canada <i>Branta canadensis</i>	Autruche <i>Struthio Camelus</i>	Dinde <i>Meleagris Gallopavo</i>	Poulet <i>Gallus gallus</i>	Hoatzin <i>Opisthocomus hoazin</i>
Source	Fèces	Fèces	Fèces	Caecum	Caecum	Caecum	Proventricule
Phyla	% communauté						
Firmicutes	39,2	54,6	71,6	50,9	32,3	70	66,3
Bacteroidetes	14,7	1,1	10,1	39,4	54,2	1,9	29,9
Actinobacteria	32,3	6,4	7,0	-	< 0,1	4,9	0,8
Proteobacteria	9,8	23	10,4	-	3,4	21,5	1,6
Tenericutes	3,9	8,9	0,2	-	-	< 0,1	0,2
Fibrobacteres	-	-	-	6,5	-	-	-
Spirochaetes	-	1,1	-	1	-	-	0,2
Fusobacteria	-	0,7	-	-	-	-	-
Planctomycetes	-	0,4	-	-	-	-	-
Cyanobacteria	-	0,4	-	-	-	-	-
Verrucomicrobia	-	-	-	0,3	-	-	< 0,1
Synergistetes	-	-	-	-	-	-	0,2
TM7	-	-	0,1	-	-	-	< 0,1
Lentisphaerae	-	-	-	-	-	-	< 0,1
Archae	-	-	-	1,9	-	-	-
Inconnu	-	3,4	0,5	-	7,3	1,7	0,6
Source	(Banks <i>et al.</i> , 2009)	(Lu <i>et al.</i> , 2008b)	(Lu <i>et al.</i> , 2009)	(Matsui <i>et al.</i> , 2010)	(Scupham <i>et al.</i> , 2008)	(Zhu <i>et al.</i> , 2002)	(Godoy-Vitorino <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 2 : Abondance relative des taxons microbiens issus de contenus digestifs de l'intestin des oiseaux étudiés précédemment d'après (Kohl, 2012).

Lactobacillus (jusqu'à 10^9 bactéries par gramme) qui sont aéro-tolérants (Mead, 1989, Wise & Siragusa, 2006)

La composition du microbiote du canard a été réalisée par des méthodes culturales. En accord avec ce qui a été trouvé chez le poulet on observe deux flores distinctes : une flore anaérobie facultative représentant seulement 2,5% de la communauté tandis que les anaérobies strictes représentent la majorité de la population avec en particulier une prédominance des *Clostridia* (Barnes *et al.*, 1972, Salanitro *et al.*, 1978, Ridsdale & Corry, 1999).

3.2. Microbiote intestinal des autres espèces aviaires

Différentes études menées chez d'autres oiseaux notamment au niveau des caeca et/ou des fèces ont montré une variabilité importante entre les différentes espèces concernées (Kohl, 2012) (Tableau 2). Cette variabilité est due à plusieurs facteurs cités précédemment à savoir la génétique, l'environnement et l'alimentation qui tiennent une part importante dans la maturation du microbiote chez l'hôte. Suivant les espèces auxquelles on s'intéresse le microbiote change totalement avec par exemple chez l'oie une prédominance des *Firmicutes* (71,6 %) suivi du phyla des Protéobactéries (10,4 %) ce qui est une composition proche de celle observée chez le poulet par Zhu *et al* (2002). Cependant chez la dinde, on observe une majorité du phylum des *Bacteroidetes* (54,2 %) ainsi que des *Firmicutes* (32,3 %) tandis que les Protéobactéries ne représentent ici que 3,4 % de la population (Scupham *et al.*, 2008). Chez l'hoatzin, au niveau du proventricule sont retrouvés en abondance les phyla des *Firmicutes* (66,3 %) ainsi que celui des *Bacteroidetes* (29,9 %) (Godoy-Vitorino *et al.*, 2008).

4. Groupes bactériens principaux du microbiote intestinal des oiseaux

4.1. *Lactobacillales*

Cet ordre bactérien regroupe des bactéries anaérobies facultatives dont font partie les familles des *Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae* et *Streptococcaceae*. Les bactéries retrouvées le plus souvent et de façon majoritaires au niveau du microbiote intestinal font partie de la famille des *Lactobacillaceae* et du genre *Lactobacillus*. Les bactéries de ce genre sont capables de fermenter des glucides pour produire de l'acide lactique (Klein *et al.*, 1998). Les espèces retrouvées chez le poulet sont capables d'hydrolyser l'amidon (Champ *et al.*, 1983). Ces bactéries sont capables d'adhérer aux surfaces et notamment aux muqueuses de la paroi intestinale permettant ainsi une colonisation du tube digestif (Vélez *et al.*, 2007).

4.2. *Bacteroidales*

Cet ordre est composé de bactéries anaérobies strictes avec une forte activité fermentative. La majorité des microorganismes détectés sont du genre *Bacteroides*, ces bactéries ont des activités hydrolytiques, cellulolytiques, hémicellulolytiques, amylolytiques et protéolytiques. Elles sont également capables de fermenter plusieurs oses tels que le glucose, le saccharose ou plusieurs pentoses (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007a).

4.3. *Clostridiales*

Ce groupe comprend des bactéries anaérobies strictes dont les familles les plus représentées au sein du microbiote intestinal sont les *Clostridiaceae*, on retrouve également

des *Ruminococcaceae*. Certaines espèces composant ce groupe ont des activités cellulolytiques, hémicellulolytiques, amylolytiques, lipolytiques et protéolytiques (*Ruminococcus* sp, *Clostridium* sp,...). Elles présentent également des activités fermentatives avec activité saccharolytique ou utilisant des acides organiques (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007a).

IV. Effet de l'alimentation sur les animaux

1. Impact de l'alimentation sur les animaux

L'alimentation est un facteur important influençant le microbiote du tractus digestif (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007c, Hammons *et al.*, 2010, Karasov *et al.*, 2011). Elle conditionne en effet l'apport en nutriments et en énergie nécessaire aux activités microbiennes. Certaines souches semblent être plus sensibles aux changements d'alimentation que d'autres. En effet chez les rats il a été montré que l'utilisation d'aliments fermentés permettait d'obtenir une flore plus riche en lactobacilli tandis que l'on observe inversement une diminution des *Enterobacteriaceae* (Van Winsen *et al.*, 2001). Chez le poulet le passage d'un régime standard (maïs 48,5% / tourteau de soja 41,7%) à un régime riche en blé a pour conséquence l'augmentation d'une souche de *Lactobacillus agilis* (type R1) au détriment d'une autre *Lactobacillus agilis* (type R5) et qui devient alors majoritaire au niveau du proventricule (Hammons *et al.*, 2010). Il a également été montré qu'il y a une corrélation entre la composition du microbiote et l'efficacité de conversion des aliments (Stanley *et al.*, 2012). En effet, une étude a été menée montrant que des animaux ayant une capacité élevée de conversion des aliments présentaient un microbiote caecal ayant une diversité plus

importante (24 espèces bactériennes non apparentées avec une abondance relative significativement différente) par rapport aux animaux ayant une faible efficacité (Stanley *et al.*, 2012).

2. Cas d'une alimentation riche en amidon

Dans le cas des régimes riches en amidon des études ont montrées que chez le cheval l'équilibre du microbiote est bouleversé avec une diminution des bactéries cellulolytiques (méthodes culturales) qui diminuent tandis que les Lactobacilles, les Streptocoques et les bactéries utilisant l'acide lactique augmentent (environ 1 log). En effet, l'effet acidogène d'un tel régime tends à favoriser une flore spécifique notamment amylolytique et productrice d'acide lactique (Medina *et al.*, 2002). Chez la vache, une alimentation riche en amidon impacte également la communauté microbienne avec l'augmentation de l'abondance relative de trois genres bactériens (*Barnesiella*, *Oribacterium* et *Olsenella*) tandis que plusieurs autres genres voient leur abondance diminuer fortement (Zened *et al.*, 2013). Chez la souris une alimentation avec des amidons résistants (non digestibles) a également montré des changements de communautés au niveau des caeca avec l'augmentation de bactéries appartenant au phylum des *Firmicutes*, des bifidobacteria et des lactobacilli (Tachon *et al.*, 2013). De plus certains acides gras à chaîne courte (AGCC) permettent un apport important en énergie favorisant certaines espèces bactériennes ce qui pourrait avoir un impact bénéfique sur la suppression de bactéries pathogènes en fin de tractus digestif (Kleessen *et al.*, 1997, Tachon *et al.*, 2013).

V. Les Probiotiques

1. Définition

Les probiotiques sont des microorganismes vivants qui ont un effet bénéfique sur le microbiote de l'hôte (Fuller, 1995). Les probiotiques peuvent réguler de façon bénéfique la dynamique des populations afin d'améliorer l'état sanitaire de l'hôte (Netherwood *et al.*, 1999, La Razione, 2003). Différents microorganismes sont utilisés comme probiotiques et notamment les genres bactériens tels que certains *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* ainsi qu'une levure *Saccharomyces cerevisiae* mais les genres les plus utilisés sont le genre *Bifidobacterium* et surtout *Lactobacillus*. Nombreuses de ces souches sont depuis longtemps utilisées pour la fabrication de produits fermentés (bière, yaourt, vin,...) et depuis quelques années sont utilisées comme additifs alimentaires chez les animaux et chez l'Homme.

2. Modes d'action des probiotiques

Le site d'action des probiotiques est au niveau du tube digestif, donc la première contrainte rencontrée par les souches utilisées est qu'elles doivent impérativement atteindre leur cible vivantes (Marteau *et al.*, 1993). Elles doivent donc être résistantes aux différents environnements rencontrés dans le tube digestif. Ainsi les souches de *Lactobacillus* notamment, ont la faculté d'atteindre leurs cibles encore vivantes et en concentration assez importante pour avoir un effet (Marteau *et al.*, 1993). A cause de l'effet de barrière induit par la flore endogène de l'hôte, il est impossible aux probiotiques de s'implanter de façon permanente au sein du microbiote et elles sont donc éliminées (Chaucheyras-Durand. *et al.*,

1998). De ce fait pour pouvoir conserver un effet durable du probiotique il est nécessaire de le distribuer de manière quotidienne.

L'utilisation de probiotiques ayant des activités de dégradation des nutriments permet de réguler et faciliter les fonctions d'absorption et de digestion de l'hôte, c'est notamment le cas pour les bactéries lactiques présentant une lactase et permettant une meilleure digestion du lactose chez les individus déficients (Marteau *et al.*, 1997). De la même façon l'addition de *Saccharomyces cerevisiae* ayant une activité saccharase permet une meilleure hydrolyse du saccharose pour les personnes déficientes en saccharase (Harms *et al.*, 1987). Dans le même objectif, l'utilisation de bactéries possédant une activité fibrolytique et cellulolytique permet une meilleure digestion et une meilleure assimilation des composés végétaux non assimilables par l'hôte en temps normal. Pour finir, la présence en plus d'une activité amylase importante améliorant l'hydrolyse de l'amidon va favoriser la digestion et potentiellement le bien-être notamment chez les animaux nourris exclusivement avec du maïs comme c'est le cas chez les canards lors du gavage. Ceci entraîne également un apport d'énergie non négligeable pour l'hôte par l'augmentation de l'absorption du glucose par exemple (Lodemann *et al.*, 2006). Des effets directs sur la muqueuse de l'intestin chez les porcelets ont été montrés lors de l'ajout de *Saccharomyces boulardii* modifiant la morphologie de celle-ci ainsi qu'une abondance de macrophages dans le mucus prouvant ainsi l'effet du probiotique sur le tissu digestif de l'hôte et indirectement sur la santé de celui-ci (Savoini *et al.*, 2003). Dans cette même étude l'ajout de *S. boulardii* a permis d'augmenter significativement le poids des porcelets en post-sevrage.

3. Effet des probiotiques sur la diversité microbiote

L'apport de probiotiques en tant qu'additif alimentaire peut induire des modifications au niveau de la structure des communautés microbiennes digestives de l'hôte (Netherwood *et al.*, 1999). En plus de son action sur la physiologie de l'hôte, les probiotiques ont également des effets sur la flore autochtone du tube digestif. Ils permettent de réguler l'activité fermentaire du microbiote et ainsi favoriser l'action des acides gras à chaîne courte sur la muqueuse intestinale (Sakata *et al.*, 2007). L'utilisation de bactéries lactiques en tant que probiotiques a un effet bénéfique sur l'environnement digestif. En effet la production d'acide lactique permet la formation d'un environnement limitant grâce à la baisse du pH intestinal empêchant ainsi la prolifération et le maintien de bactéries pathogènes (Van Winsen *et al.*, 2001) (tableau 3). Une modulation environnementale cette fois-ci positive a été montrée dans le rumen lors de l'ajout de *S. cerevisiae* favorisant le développement de la flore endogène par la production de facteurs de croissance par exemple (Chaucheyras *et al.*, 1996). Outre cette modification environnementale, une des possibles actions des bactéries lactiques en tant que probiotiques se manifeste par un phénomène de compétition avec les différents microorganismes (La Ragione *et al.*, 2004) pour l'utilisation des différents substrats de l'alimentation ainsi que pour l'occupation des niches écologiques. La production de bactériocines qui sont des peptides antimicrobiens par les bactéries lactiques au niveau du tube digestif permettent également l'élimination de bactéries pathogènes pour l'hôte (Servin, 2004). L'utilisation d'aliments fermentés par ajout de souches probiotiques permet d'accroître la qualité sanitaire des aliments et favorise la flore autochtone.

	Aliment témoin	Aliment fermenté
<i>L. plantarum</i> (log CFU/g)	< 2,8	9,4 **
pH	5,7	4,1 **
Lactate mM	20	261 **
Acétate mM	< 0,8	25 **
Butyrate mM	< 0,8	2,3 *

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques et fermentaires et microbiennes d'un aliment pour porc ensemencé ou non avec une souche de *Lactobacillus plantarum* d'après van Winsen (2001). ** différences significatives, $P < 0,01$.

VI. Le cadmium

Les contaminants environnementaux présents en forte concentration notamment dans certains sites comme c'est le cas dans le sud-ouest peuvent avoir une influence sur les animaux au niveau de leur physiologie ou de la composition de leur microbiote.

1. Toxicité du cadmium

Le cadmium est un métal lourd retrouvé naturellement dans l'environnement et qui se retrouve dans les eaux par érosion des roches. Cependant la majorité du cadmium retrouvé dans la nature est due à l'activité humaine notamment en tant que déchets de l'industrie métallurgique, sidérurgique et les activités minières (Source INERIS). C'est un des contaminants les plus répandus dans le monde avec une production mondiale d'environ 20 000 tonnes (Sénat, 2013). Au niveau régional, l'estuaire de la Gironde présente une forte

contamination au cadmium dans les eaux, due à des anciennes activités d'extraction de minerais (Jouanneau *et al.*, 1990).

L'incorporation du cadmium se fait au niveau intestinal de façon active ou passive et ce par ad- (attachement en surface) ou absorption (incorporation) (Morozzi *et al.*, 1986, Halttunen *et al.*, 2008). En effet le microbiote représente la première barrière pour contrer l'accumulation du cadmium chez l'hôte (Breton *et al.*, 2013a). Cette diffusion peut se faire de deux manières appelées transport paracellulaire et transcellulaire. Le transport paracellulaire se fait par diffusion passive et implique le passage à travers les jonctions formées entre cellules voisines. Le transport transcellulaire implique le passage à travers l'intestin et est composé d'une à trois étapes : liaison à la membrane apicale, le transport à travers le cytoplasme et la circulation dans la membrane basolatérale (Khanal & Nemere, 2008).

Le cadmium une fois ingéré se complexe aux métallothionéines (MT) qui sont de petites protéines impliquées dans la régulation homéostatique des métaux essentiels et la protection contre les métaux lourds (Oliveira *et al.*, 2008). Le complexe ainsi formé devient très stable et ne peut être éliminé (Klaassen *et al.*, 1999). Il va notamment affecter des mécanismes physiologiques important chez l'hôte et notamment chez les oiseaux.

2. Effets du cadmium chez les oiseaux

De nombreuses contaminations au cadmium ont été reportées chez les oiseaux et notamment chez les canards sauvages (Bendell, 2010). Le cadmium s'accumule dans un premier temps au niveau du foie puis ensuite au niveau des reins qui sont la cible finale du métal où il cause des lésions au niveau de cet organe tel qu'une inflammation du tissu interstitiel (Hughes *et al.*, 2000). En plus des dommages générés au niveau rénal il cause

également des dommages osseux, un retard de croissance ainsi qu'une perte de poids (Hughes *et al.*, 2003). Les animaux jeunes sont plus exposés que les animaux adultes. Cependant ces derniers peuvent être touchés au niveau de leur reproduction en réduisant la production des œufs et la qualité de leurs coquilles (Burger, 2008). L'ingestion de cadmium entraîne aussi une augmentation des cellules caliciformes et des lymphocytes granulaires de la muqueuse intestinale (Berzina *et al.*, 2007). Il a été montré que l'accumulation du cadmium au niveau des tissus est différente selon le type génétique étudié. En effet, les canards de Barbarie (*Cairina Moschata*) accumulent moins et plus lentement le cadmium que les canards Pékin (*Anas Platyrhynchos*) (Lucia *et al.*, 2009a, Lucia *et al.*, 2010b) du fait d'un taux de MT basal plus important chez le canard Pékin.

3. Effet du cadmium sur la diversité microbiote intestinal

Le cadmium étant en contact direct avec le microbiote intestinal lors de l'ingestion de celui-ci, un impact sur les communautés microbiennes est possible. Il a cependant été montré que le cadmium n'est ni mutagène ni génotoxique chez les bactéries (Rossman *et al.*, 1992) mais induit des modifications au sein de la communauté bactérienne (Fazeli *et al.*, 2010). Une étude chez les souris a mis en lumière l'impact du cadmium sur le microbiote lors de l'ingestion de différentes concentrations de cadmium (de 23 à 50 ppm) dans l'eau de boisson durant 45 jours. Les auteurs ont ainsi montré une forte baisse de l'ordre de plusieurs log (de 2 à 5 selon les espèces testées) de la population de différents groupes bactériens avec un effet plus important chez les bactéries gram +. Tous les segments du tube digestif étudiés étaient touchés par cette contamination (Fazeli *et al.*, 2010).

Matériels et Méthodes

		Barbarie et Pékin	Mulard
		g en humide	
J1	1	306	200
J2	2	331	225
	3	331	250
J3	4	363	275
	5	363	300
J4	6	395	325
	7	395	350
J5	8	427	375
	9	427	400
J6	10	460	410
	11	460	420
J7	12	492	430
	13	492	440
J8	14	524	450
	15	524	460
J9	16	548	470
	17	548	470
J10	18	548	470
	19	548	470
J11	20	548	470
	21	548	470
J12	22	548	470
	23	548	470
J13	24	548	470
	25	548	470
Total		11774	10010

Tableau 4 : Courbes de gavage utilisées lors des différentes études pour les deux types génétiques étudiés et leur hybride (Pékin, Barbarie et Mulard).

I. Expérimentations

1. Conditions d'élevage des canards

Toutes les procédures expérimentales portant sur les canards sont conformes aux lignes directrices nationales françaises pour le bien-être à des fins de recherche. Des canards mulards (MMGxPKL), Barbarie et Pékin mâles ont été élevés dans une structure d'élevage appartenant à l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) au «Domaine d'Artiguères», Benquet, France, numéro d'agrément: B40-037-1. Dès le premier jour de vie jusqu'à 4 semaines d'âge, ils ont été nourris *ad libitum* avec des granulés de 2 mm sur la base d'un régime fournissant 11,93 MJ / kg d'aliment et 17,5% de PB. De 5 à 12 semaines d'âge, les oiseaux ont été nourris avec l'aliment croissance fournissant 11,72 MJ / kg d'aliment et 15,5% de PB. Au bout de 12 semaines d'âge, tous les oiseaux ont été pesés. Les oiseaux utilisés pour le gavage ont été choisis en fonction de leur poids vif à 12 semaines pour être représentatifs de la variabilité du poids vif de la population. Parmi les canards sélectionnés, certains ont été sacrifiés avant gavage. Les animaux restants ont été alimentés dans des cages collectives de 4 canards. Ils ont été nourris avec une gaveuse hydraulique ("GAVEUSE 300 mg" Dussau, Distribution SAS Pecorade, Landes, France) avec un aliment constitué de 58% de farine de maïs et 42% de grains de maïs. La courbe de gavage était adaptée au type génétique étudié. La composition et les principales caractéristiques des différents aliments utilisés dans cette étude est répertoriée dans le tableau 5. Les canards ont été nourris deux fois par jour pendant 2 semaines. Les contenus digestifs de 20 canards de chaque segment ont été prélevés à 13 semaines (repas 12) et à 14 semaines (repas 25).

Pour l'étude de l'impact du gavage sur le microbiote des canards Barbarie, mulard et Pékin un état des lieux de la flore digestive avant gavage a été nécessaire. Par la suite pour la

Aliment démarrage				Aliment croissance				Aliment gavage	
Ingrédients %		Nutriments %		Ingrédients %		Nutriments %		Nutriments %	
Blé	15	EM MJ/kg	11.93	Blé	35	EM MJ/kg	11.7	EM MJ/kg	-
Maïs	32.6	Humidité	12.46	Maïs	38.69	Humidité	12.61	Humidité	-
Tourteau de colza déshuilé	7	Protéines brutes	17.5	Tourteau de colza déshuilé	12	Protéines brutes	15	Protéines brutes	8.91
Tourteau de tournesol	8	Matière grasse	2.66	Tourteau de tournesol	11.35	Matière grasse	2.26	Matière grasse	3.68
Carbonate de sodium	1.17	Cellulose	5.46	Carbonate de sodium	1.375	Cellulose	5.28	Cellulose	2.77
Phosphate bicalcique	0.675	Cendres	5.24	Phosphate bicalcique	0.575	Cendres	4.99	Cendres	-
Lysine	0.336	Amidon	40.21	Lysine	0.298	Amidon	47.32	Amidon	75.91
Sel	0.25	Lysine	0.92	Sel	0.36	Lysine	0.701	Lysine	-
Méthionine	0.235	Méthionine	0.506	Méthionine	0.086	Méthionine	0.36	Méthionine	-
Chlorure de choline	0.06	Méth+Cystine	0.85	Chlorure de choline	0.04	Méth+Cystéine	0.705	Méth+Cystéine	-
Premix + vitamine	0.3	Thréonine	0.672	Premix + vitamine	0.23	Thréonine	0.548	Thréonine	-
		Tryptophane	0.203			Tryptophane	0.173	Tryptophane	-
		Ac Linoléique	1.43			Ac linoléique	1.2	Ac linoléique	-
		Calcium	0.948			Calcium	0.95	Calcium	-
		Phosphore	0.575			Phosphore	0.519	Phosphore	-
		Sodium	0.139			Sodium	0.15	Sodium	-
		Phosphore dispo	0.358			Phosphore dipo	0.299	Phosphore dipo	-
		pH	-			pH	-	pH	5.36

Tableau 5 : Composition et principales caractéristiques des aliments utilisés pour les phases de démarrage, de croissance et de gavage des animaux.

comparaison Barbarie/Pékin des canards non gavés ont été élevés en parallèle des animaux gavés. Les contenus de l'iléon et des caeca des animaux de chaque type génétique ont été prélevés à 13 et 14 semaines permettant ainsi de comparer les communautés bactériennes des canards gavés et non gavés aux mêmes âges.

2. Essai probiotique

Pour cet essai 250 canards mulards ont été élevés. Jusqu'à 12 semaines, les animaux ont été nourris comme décrit précédemment. Lors de la mise en gavage l'ensemble des animaux a été pesé et 228 canards ont été sélectionnés. Les animaux ayant des poids extrêmes ont été retirés. Parmi les canards sélectionnés, 20 ont été abattus avant gavage. Les animaux restants ont été mis en gavage dans des cages collectives de 4 canards par loge et répartis en deux groupes. Un groupe servant de témoin qui a été gavé classiquement et servant à voir l'effet du gavage sur le microbiote intestinal des canards mulards et un second groupe gavé avec un apport en probiotiques dans la pâtée. La souche probiotique de *Lactobacillus sakei* sous forme lyophilisée a été remise en suspension dans de l'eau (10^9 cellules/ml) puis mélangée à la pâtée de gavage pour pouvoir étudier l'effet d'un probiotique sur le microbiote intestinal des canards mulards au cours du gavage. Des prélèvements des contenus de l'iléon et des caeca ont été réalisés à 13 semaines (mi-gavage, après 12 repas) et à 14 semaines (fin gavage, après 25 repas). Les contenus ont ensuite été analysés par PCR en temps réel (qPCR) puis certains de ces échantillons ont été sélectionnés et séquencés par pyroséquençage en 454.

3. Essai cadmium

Un total de 280 canards (140 Barbarie et 140 Pékin) ont été élevés jusqu'à l'âge de 12 semaines. Avant la mise en gavage 20 canards de chaque type génétique ont été abattus et le contenu de l'iléon et des caeca ainsi que le foie et les reins ont été récupérés à chaud. Les animaux restants ont été mis en gavage. Lors du gavage les animaux de chaque type génétique ont été gavés selon trois conditions différentes. Dans chaque cas l'aliment a été le même cependant les animaux ont reçu lors de chaque repas une gélule contenant 0, 1 (correspondant à la contamination naturelle du bassin aquitain (Jouanneau *et al.*, 1990) ou 10 ppm (contamination aiguë) de cadmium (VWR, 1,000 mg Cd in water Titrisol® étalon pour SAA). La préparation des gélules a été faite de la façon suivante : les gélules vides ont été placées dans un gélulier puis remplies avec de la farine utilisée pour l'alimentation des canards. Un puits est formé afin de déposer la quantité de cadmium souhaitée, pour la concentration de 1 ppm (soit 1 mg/kg) la valeur à ajouter est calculée par rapport à la dose alimentaire du repas correspondant en matière sèche, de même pour la concentration de 10 ppm (soit 10 mg/kg). Le cadmium est recouvert de farine afin qu'il puisse être absorbé et les gélules sont ensuite fermées afin d'être données aux animaux lors du gavage. Les prélèvements ont été réalisés à 13 et 14 semaines en récoltant les contenus digestifs de l'iléon et des caeca ainsi que les reins afin de doser le cadmium absorbé par l'hôte (Lucia *et al.*, 2009a). Vingt animaux par condition et par type génétique ont été abattus. Les contenus de 10 animaux par condition ont été analysés par qPCR puis certains d'entre eux ont été séquencés par pyroséquençage en 454.

II. Prélèvements pour analyse du microbiote

Les canards ont été saignés après éthernarcose, 3h après le dernier repas afin d'homogénéiser le niveau de remplissage de l'appareil digestif des canards. Les canards de chaque type génétique avec un poids similaire ont été choisis en 3 points: à 12 semaines (avant gavage), 13 semaines (repas 12) et 14 semaines (repas 24). L'iléon et les caeca ont été immédiatement recueillis et conservés sur la glace. Les contenus digestifs de l'iléon et des caeca ont été prélevés en vidant les segments par pression et homogénéisés. Les échantillons ont été conservés à -20 ° C pour les analyses moléculaires ultérieures.

III. Extraction d'ADN

L'ADN total des échantillons d'iléon et caeca a été extrait en utilisant le QIAamp DNA Stool Minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant avec 220 mg comme matrice de départ. Une étape de lyse supplémentaire a été effectuée en utilisant du lysozyme (Sigma, Saint-Louis, États-Unis) afin d'améliorer l'extraction de l'ADN des bactéries gram-positives présentes dans les échantillons (Johansen *et al.*, 2007). L'ADN extrait (à partir de la culture digestive contenu) a été élué dans 200 µL de tampon d'élution et conservé à -20° C jusqu'aux analyses.

Cible	Sequence (5' - 3')	T (°C)	Reference
All bacteria	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	58	Walter <i>et al</i> (2001)
<i>Firmicutes</i>	TGAAACTYAAAGGAATTGACG ACCATGCACCACCTGTC	61.5	Bacchetti De Gregoris <i>et al</i> (2011)
<i>Bacteroidetes</i>	CRAACAGGATTAGATACCCT GGTAAGGTTCTCTCGCGTAT	61.5	Bacchetti De Gregoris <i>et al</i> (2011)
<i>Bacteroides</i>	GAGAGGAAGGTCCCCCAC CGCTACTTGGCTGGTTCAG	60	Layton <i>et al</i> (2006)
<i>Lactobacillus</i> group	CACCGCTACACATGGAG AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	Walter <i>et al</i> (2001)
<i>Clostridium</i>	TTACTGGGTGTAAAGGG TAGAGTGCTCTTGCGTA	60	Van Dyke et McCarthy (2002)
<i>Enterococcus</i>	CCCTTATTGTTAGTTGCCATATT ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	61	Rinttila <i>et al</i> (2004)
<i>Enterobacteria</i>	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	63	Bartosch <i>et al</i> (2004)

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées pour les analyses en PCR quantitative.

IV. PCR en temps réel

Toutes les amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 6. Les réactions ont été réalisées en double dans des plaques à 48 puits dans un volume final de 15 µL. Le mélange PCR se compose de 7,5 µL de SybrGreen Universal PCR Master Mix (Quanta biosciences), 5,5 µL d'amorces à 500 nm et 2 µL d'ADN matrice aux dilutions appropriées ou de l'eau dans le cas du contrôle négatif. Les PCR en temps réel ont été réalisées dans un appareil Stepone (Applied Biosystems). Les amplifications ont été réalisées avec les conditions suivantes: une étape de dénaturation initiale de 10 min à 95 °C puis 35 cycles de 15 sec à 95 °C, hybridation / extension pendant 1 min (température spécifique à chaque couple d'amorces) et un cycle final à 95 °C pendant 15 s. Enfin, l'analyse de la courbe

de fusion a été faite par chauffage lent des mixPCR à partir de 60 °C jusqu'à 95 °C afin de vérifier la spécificité du produit amplifié. Des mesures simultanées de fluorescence ont été acquises et, le cycle seuil (Ct) a été déterminé avec le logiciel StepOne Applied Biosystems.

Souche	Cible	Reference
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	CIP548T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	All bacteria	NCIMB8826
	<i>Firmicutes</i>	
	<i>Lactobacillus group</i>	
<i>Lactobacillus sakei</i>		
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i>	CIP5432
<i>Bacteroides dorei</i>	<i>Bacteroides</i>	NSMZ17855
	<i>Bacteroidetes</i>	
<i>Clostridium spp.</i>	<i>Clostridium</i>	Laboratory strain
	<i>Firmicutes</i>	

Tableau 7 : Liste des souches bactériennes utilisées lors des différentes études.

Les courbes d'étalonnage ont été générées à partir de dilutions successives au 1/10ème dans de l'eau à partir de concentrations connues d'ADN génomique (tableau 7) et ont été utilisées pour quantifier le nombre de copies de chaque échantillon, grâce au cycle seuil déterminé par la méthode de la dérivée seconde (Tichopad *et al.*, 2003). Les résultats sont présentés par nombre de copies d'ADNr 16S et exprimés par gramme d'échantillons frais et transformés log10 pour l'analyse statistique.

V. Séquençage en 454 des gènes codant pour l'ARNr 16S.

Les amplicons correspondant aux régions variables V3-V4 du gène codant pour l'ARNr 16S (460 pb sur *Escherichia coli*, numéro GenBank J01695) ont été amplifiés en utilisant deux amorces bactériennes 343F qui est l'amorce sens (TACGGRAGGCAGCAG; Liu *et al.*, 2007) et anti-sens 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT; Andersson, 2008). Chaque amorce a une séquence de codes-barres de dix nucléotides sur l'extrémité 5' qui est unique pour chaque échantillon. La préparation des amplicons a été réalisée dans un volume total de 100 µL contenant du tampon 1X PCR, dNTP à 200 M, 1U de Isis DNA polymérase (MP Biomédical), 0,5 M de chaque amorce et 1-5 ng de matrice d'ADN. Le programme d'amplification est composé de l'étape initiale de dénaturation à 94 °C pendant 2 min; 32 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 s, l'hybridation des amorces à 60 °C pendant 30 s, de l'élongation à 72 °C pendant 30 s et une étape d'extension finale à 72 °C pendant 7 min. Les produits PCR ont été purifiés avec le kit de purification PCR QIAquick (Qiagen), suivi par une quantification du rendement et de l'estimation de la qualité d'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre ND-100 Nano-Drop. La taille des produits de PCR a été confirmée par électrophorèse sur gel, puis les produits PCR purifiés ont été quantifiés en utilisant le kit Quant-iT picogreen ds DNA Assay (Invitrogen, Saint Aubin, France) grâce à un système de détection de séquence ABI Prism 7900HT (Life Technology, Invitrogen, A-BIOSYSTEM, Villebon-sur-Yvette, France). Le séquençage des gènes codant pour les régions V3-V4 de l'ARNr 16S a été réalisé par séquençage haut débit 454 GS FLX (454 Life Sciences - Roche) à l'aide de la technologie Titanium selon les instructions du fabricant. Les amplicons de 450 pb ont été rassemblées en utilisant des quantités équimolaires de chacun des produits de PCR. Pour l'analyse, les échantillons ont été reconnus par les couples d'étiquettes propres à chaque

échantillon qui avaient été fixés sur les amorces universelles fournies par Roche au cours de l'amplification.

VI. Analyse des pyrotags

Les séquences de gènes codant pour l'ARNr 16S aussi appelées 16S pyrotags ont été obtenues par pyroséquençage en 454 pour les 125 échantillons. Les 16S pyrotags ont été triés en fonction de leurs étiquettes respectives pour former un total de 125 librairies de pyrotags représentant les 125 échantillons d'iléon et caeca prélevés. Les séquences ont été successivement filtrées à l'aide d'un script Python développé par la plate-forme bio-informatique de Toulouse, en supprimant d'abord les séquences trop courtes (moins de 150 nucléotides (nt); celles avec au moins une base ambiguë N ou avec une série d'homopolymères (> 8), celles avec des erreurs au niveau des amorces (deux erreurs autorisés) et, enfin, celles n'ayant aucune erreur sur les amorces, mais avec une longueur inférieure à 350 paires de bases (pb).

VII. Taxonomie et analyses statistiques

Après le nettoyage, les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel MOTHUR v 1.24 (Schloss *et al.*, 2009). Les séquences ont été alignées sur la base de données SILVA fournie par le logiciel MOTHUR (14 956 séquences correspondant aux séquences uniques dans la base de données SSU REF v102) (Pruesse *et al.*, 2007) et une qualité d'alignement a été calculée en utilisant le fichier de structures secondaires de SILVA. Après avoir calculé une

distance deux à deux entre les séquences alignées, elles ont été regroupées par unités taxonomiques opérationnelles (OTU, avec un cutoff de 0,05). Les courbes de raréfaction, les ACE (Abundance-based coverage estimator) et les indices de richesse Chao1 ont été calculés, y compris la raréfaction et les estimateurs de Chao1 au moyen de la librairie VEGAN sous R (Oksanen *et al.*, 2010). L'index de diversité Shannon a été calculé selon Hayek & Buzas (1996).

Les séquences ont été analysées sous R (<http://www.r-project.org/>) pour obtenir les résultats de la composition du microbiote selon nos conditions de traitement. L'analyse statistique de la similitude (ANOSIM) entre différentes conditions a été réalisée en utilisant 10 000 permutations. La valeur R ANOSIM indique la mesure dans laquelle les groupes différents ($R > 0,75$, groupes bien séparés; $0,50 < R < 0,75$, groupes séparés mais avec chevauchement; $0,25 < R < 0,50$, groupes séparés mais avec un fort chevauchement). Ces valeurs ont également été explorées graphiquement par analyse multidimensionnelle non métrique (nMDS).

Les analyses de variance ANOVA ont été réalisées sous R en utilisant un modèle mixte grâce à la librairie nlme (Linear and Nonlinear Mixed Effects Models) fournie par la CRAN. Ces analyses tiennent compte de plusieurs paramètres indépendants ainsi que de paramètres combinés spécifiques de chaque expérimentation. Les valeurs obtenues tiennent compte des variations statistiques au niveau de la famille bactérienne. Seules les valeurs ayant une p-value $< 0,05$ sont considérées comme significatives et ont été traitées.

Les Heatmap ont été réalisées sous R grâce aux librairies pheatmap, marray et bioDist qui permettent de vérifier graphiquement la diversité des différentes familles bactériennes selon les échantillons ainsi que de réaliser un regroupement des différents échantillons selon leur composition.

Pour les résultats obtenus par PCR en temps réel, un test de Mann-Whitney a été utilisé (test non paramétrique) sous R. Soit $(x_1, x_2, \dots, x_{n_1})$ et $(y_1, y_2, \dots, y_{n_2})$ deux échantillons (observations) indépendants de tailles respectives n_1 et n_2 . Si $n_1 \geq 8$ et $n_2 \geq 8$ alors la statistique U suit approximativement une loi normale. L'hypothèse nulle (H_0) est la suivante : la somme des rangs pour l'échantillon X est analogue à celle de Y . On définit $U_{X,Y} = \min(U_X; U_Y)$ qui permet de tester l'hypothèse (H_0). Si les tailles n_1 et n_2 sont inférieures à 20 et supérieures à 8, pour un seuil de significativité α ($\alpha = 5\% = 0,05$ en général), les tables de Mann-Whitney nous fournissent une valeur critique c pour décider :

si $U_{X,Y,obs} > c$, on accepte l'hypothèse (H_0);

si $U_{X,Y,obs} \leq c$, on refuse l'hypothèse (H_0):

Les valeurs indiquées dans le texte sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM.

VIII. Dosage du cadmium

La détermination en cadmium a été réalisée sur 3 individus par type génétique (Pékin et Barbarie) par condition (avant gavage, mi-gavage et fin gavage) et par niveau de contamination (0, 1 et 10 ppm). Les dosages ont été effectués sur les reins des animaux sélectionnés. Les échantillons ont été placés à l'étuve à 45°C pendant 48 h afin de déterminer leur poids sec puis ensuite ils ont subi une digestion acide avec 3 mL d'acide nitrique à 65% et ensuite placés à 100°C pendant 3 h. Après dilution dans de l'eau ultrapure la concentration des échantillons est mesurée par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique avec une correction Zeeman du bruit de fond et utilisant une atomisation par un four graphite.

Dans le but d'éviter les interférences, les analyses sont effectuées avec un mélange de 20 μL d'échantillon et 4 μL de palladium et 3 μL de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Etudes Expérimentales

Objectifs du travail de thèse

La connaissance du microbiote intestinal des volailles est majoritairement décrite chez le poulet d'élevage. Des données de composition du microbiote intestinal du canard sont très peu nombreuses et uniquement obtenues par méthodes culturales. Ces méthodes culturales se seront avérées insuffisantes pour décrire de la manière la plus exhaustive possible la composition des écosystèmes microbiens.

Dans ces conditions, ce travail a été réalisé afin d'apporter des connaissances bien plus précises sur la composition et la diversité du microbiote intestinal des canards. Ces différents travaux ont donc été menés notamment grâce des analyses en PCR en temps réel et également par la réalisation d'un pyroséquençage en haut débit en 454.

L'objectif de la thèse était donc triple. Dans un premier temps, l'état des lieux de la composition de la communauté microbienne de deux types génétiques (Pékin et Barbarie) ainsi que de leur hybride mulard a été réalisée. En parallèle l'effet du gavage, régime alimentaire déséquilibré, sur les deux types parentaux et leur hybride (canard mulard) a été évalué.

Un deuxième essai, a permis d'étudier l'effet d'un probiotique (*Lactobacillus sakei*) ajouté en phase de gavage sur des canards mulards uniquement. Ces probiotiques agissent de façon bénéfique sur la santé de l'hôte et peuvent notamment modifier le microbiote intestinal chez plusieurs animaux et améliorer leurs performances zootechniques.

Enfin, une troisième et dernière étude a été menée proposant de voir les effets d'un métal lourd, le cadmium, connu pour être un contaminant environnemental des eaux notamment dans la région sud-ouest. L'impact du cadmium a ainsi été étudié sur le microbiote

des canards Pékin et Barbarie en phase de gavage pour différentes concentrations en cadmium.

Ces travaux ont fait l'objet de préparations d'articles soumis dans des journaux internationaux à comité de lecture.

- **Article 1 :** Florian Vasaï, Karine Brugirard Ricaud, Marie Dominique Bernadet, Laurent Cauquil, Olivier Bouchez, Sylvie Combes & Stéphane Davail. Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina Moschata* (Muscovy) ducks. **FEMS Microbiology Ecology**. **10.1111/1574-6941.12217**.
- **Article 2 :** *Lactobacillus sakei* modulates mule ducks microbiota in ileum and ceca during overfeeding period. Florian Vasaï, Karine Brugirard Ricaud, Laurent Cauquil, Patrick Daniel, Céline Peillod, Karine Gontier, Abdelkader Tizaoui, Olivier Bouchez, Sylvie Combes & Stéphane Davail. 2013. **Poultry Science**. **<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03497>**
- **Article 3 :** Cadmium affects the composition of intestinal microbiota in Pekin (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina Moschata*) ducks.

Article 1 : Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina Moschata* (Muscovy) ducks.

FEMS Microbiology Ecology

Afin de faire l'inventaire moléculaire et évaluer l'effet du gavage sur la composition du microbiote iléal et du caecal, un pyroséquençage haut débit basé sur l'étude des gènes codant pour l'ARNr 16S a été utilisé sur 2 types génétiques (Pékin et Barbarie). Les canards ont été gavés pendant 12 jours avec un aliment composé de 58% de farine de maïs et de 42% de grain de maïs. Des échantillons ont été prélevés avant gavage (à 12 semaines), à 13 semaines (mi gavage) et à 14 semaines (fin gavage), 3 heures après le repas. Des canards du même âge nourris *ad libitum* ont été sacrifiés en même temps que les animaux gavés. Quel que soit le segment digestif, le type génétique et la méthode d'alimentation les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les deux phyla majoritaires au sein de la communauté bactérienne des canards (au moins 80%). Avant gavage, les échantillons d'iléon étaient composés majoritairement par des bactéries de la classe des *Bacilli*, *Clostridia* et *Bacteroidia* ($\geq 70\%$) alors que les échantillons de caeca sont composés de *Bacteroidia* et *Clostridia* à hauteur d'environ 90% de la population totale que ce soit chez les canards Pékin ou Barbarie. Après gavage, la diversité ainsi que la richesse des échantillons ont diminués dans l'iléon tandis que ces mêmes indices ont augmentés dans les caeca. Des changements majeurs dans la composition de la communauté bactérienne ont été observés dans l'iléon tandis que les caeca, eux, sont moins affectés par le gavage. Le gavage augmente ainsi l'abondance relative de certaines familles dont les *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae* et

Enterococcaceae dans l'iléon alors que dans les caeca, le type génétique affecte particulièrement trois familles: *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae* et *Desulfovibrionaceae*.

Mots-clés: diversité microbienne; canard ; iléon ; caeca ; gavage; type génétique; pyroséquençage en 454.



RESEARCH ARTICLE

Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina moschata* (Muscovy) ducks

Florian Vasaï¹, Karine Brugirard Ricaud¹, Marie Dominique Bernadet², Laurent Cauquil^{3,4,5}, Olivier Bouchez⁶, Sylvie Combes^{3,4,5} & Stéphane Davail¹

¹IUT des Pays de l'Adour, IPREM-EEM UMR 5254, Mont de Marsan, France; ²INRA Artiguères, Benquet, France; ³UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, INRA, Castanet-Tolosan, France; ⁴UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, Université de Toulouse INPT ENSAT, Castanet-Tolosan, France; ⁵UMR 1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, Université de Toulouse INPT ENVT, Toulouse, France; and ⁶Plateforme Génomique Bâtiment CRGS-CNRS, INRA Auzelle, Castanet-Tolosan Cedex, France

Correspondence: Karine Brugirard Ricaud, IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan, France. Tel.: +33 558 513 707; fax: +33 558 513 703; e-mail: karine.bugirardricaud@univ-pau.fr

Received 25 July 2013; revised 30 August 2013; accepted 9 September 2013.

DOI: 10.1111/1574-6941.12217

Editor: Julian Marchesi

Keywords

duck microbial diversity; ileum; ceca; overfeeding; genotype; 454 pyrosequencing.

Abstract

To investigate the effect of overfeeding on the ileal and cecal microbiota of two genotypes of ducks (Pekin and Muscovy), high-throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing was used. The ducks were overfed for 12 days with 58% maize flour and 42% maize grain. Samples were collected before the overfeeding period (at 12 weeks), at 13 weeks, at 14 weeks, and 3 h after feeding. In parallel, ducks fed *ad libitum* were killed at the same ages. Whatever the digestive segment, the genotype, and the level of intake, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the dominant phyla in the bacterial community of ducks (at least 80%). Before overfeeding, ileal samples were dominated by *Bacilli*, *Clostridia*, and *Bacteroidia* classes ($\geq 70\%$), and cecal samples, by *Bacteroidia* and *Clostridia* classes (around 90%) in both Pekin and Muscovy ducks. The richness and diversity decreased in the ileum and increased in the ceca after overfeeding. Overfeeding triggers major changes in the ileum, whereas the ceca are less affected. Overfeeding increased the relative abundance of *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, and *Enterococcaceae* families in the ileum, whereas genotype affects particularly three families: *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae*, and *Desulfovibrionaceae* in the ceca.

Introduction

The intestinal microbiota plays a major role in animal's health and host physiology (Backhed *et al.*, 2004), for example, in immunological development or nutrient utilization (Gordon & Pesti, 1971). Microbiota interacts with the intestinal mucosa and can modify their structures and activity (Taschuk & Griebel, 2012). Different stresses experienced by animals such as a change in diet can modify the composition of the microbiota (Serino *et al.*, 2011) as happens when overfeeding ducks during the fatty liver ('foie gras') production. During this period, the animals are overfed exclusively with maize, which is rich in carbohydrates (especially starch), to induce a hepatic steatosis resulting in the storage of fatty acids in the liver. This unbalanced diet could affect the equilibrium of the

gut bacterial community. Indeed, the digestive tract is colonized by a large number of bacterial species. In chickens, the bacterial activity is more intense in the crop, the ceca, and small intestine in comparison with proventriculus gizzard and pancreas (Fuller, 1984). Most of the bacteria identified by clone library analysis belong to the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* (Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2008). Studies in classical microbiology and molecular biology show that the three segments of the small intestine contain facultative anaerobic bacteria, while the ceca contain strict anaerobic bacteria (Mead & Adams, 1975; Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). Lactobacilli are the major bacterial population in the small intestine (duodenum, jejunum, and ileum), whereas *Clostridium* spp. and *Bacteroides* spp. (obligate anaerobes) are dominant in the ceca with both

culture-dependent and molecular methods (Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). The microbiota of several bird species has been studied by molecular analysis, but not in ducks (Kohl, 2012). The objective of this study was to identify the microbiota composition of two genotypes of ducks, Pekin (*Anas platyrhynchos*), which are used for their rapid growth and reproduction, and Muscovy (*Cairina moschata*), which have a high capacity for fat storage. It has been shown that during overfeeding, Pekin ducks tend to achieve significant storage in peripheral tissues, while the liver storage is less than in others species (Davail *et al.*, 2003a; Hermier *et al.*, 2003) and suggested that lipoprotein lipase (LPL), which hydrolyzes the lipoproteins rich in triacylglycerol, can partly explain lipid distribution between liver and hepatic tissues (Davail *et al.*, 2003b). Interestingly, the LPL activity remains high during the overfeeding period in Pekin ducks and dramatically decreases in Muscovy ducks. This study is the first inventory of intestinal microbiota in ducks in both ileum and ceca. Furthermore, the genetic impact was evaluated using the two genotypes Muscovy and Pekin, and the effect of overfeeding to know the impact of a food stress on the microbiota was studied using a FLX amplicon pyrosequencing.

Material and methods

Experimental design

All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French national guidelines for the care of animal for research purposes. Male ducks were raised in a breeding structure belonging to the French National Research Institute for Agronomy (INRA) at the 'domaine d'Artiguères', Benquet, France. From the first day of life to 4 weeks of age, they were fed *ad libitum* with 2-mm granules on a diet providing 11.93 MJ kg⁻¹ of food and crude protein (CP) 17.5% ('starter diet'). From 5 to 12 weeks of age, the birds were fed with 4-mm granules on a restricted diet providing 11.72 MJ kg⁻¹ of food and CP 15.5%. The composition of the different feeds used in this study is listed in Table 1. At 12 weeks of age, all animals were weighed, and 25 ducks were selected. Of these, three of each genotype and 25 ducks were killed before overfeeding. The remaining 12 animals (called overfed ducks) were fed in cages containing four ducks. They were hydraulically fed with food consisting of 58% maize flour and 42% maize grain ('overfeeding feed'). The digestive contents from three ducks of each treatment and each genotype were removed at 13 weeks (meal 12) and at 14 weeks (meal 24), 3 h after feeding. Furthermore, at 12 weeks, seven ducks (called not-overfed) were fed normally with 4-mm granules on a restricted diet

providing 11.72 MJ kg⁻¹ of food and CP 15.5%. Finally, the animals were killed at 13 and 14 weeks (the same age as overfed ducks).

Sampling for microbiota analysis

The ducks were killed by exsanguination after electric stunning, 3 h following the last meal to homogenize the filling level of the ducks' digestive tract. Ducks of each genotype with similar weight were selected at three times: at 12 weeks (before overfeeding), 13 weeks (meal 12), and 14 weeks (meal 24). Ileum and ceca were immediately collected and kept on ice. The digestive contents of the ileum and ceca were collected by gently squeezing the organ. The digestive contents of each animal were studied individually and were stored at -20 °C for short-time molecular analysis.

DNA extraction and high-throughput sequencing and analysis of 16S rRNA gene amplicons

Total DNA from ileal and cecal samples was extracted using the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the instructions of the manufacturer with 220 mg as starting material. An additional lysis step is made using lysozyme (Sigma, Saint-Louis, MO) to improve the DNA extraction of the gram-positive bacteria present within the samples (Johansen *et al.*, 2007). The extracted DNA (from culture or digestive contents) was eluted in 200 µL of elution buffer and stored at -20 °C until real-time PCR analysis. Amplicons from the V3 to V4 regions of 16S rRNA genes (460 bp on *Escherichia coli*, GenBank accession number J01695) of day 12 samples were amplified using bacterial forward 343F (TACGGRAGGCAGCAG; Liu *et al.*, 2007) and reverse 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT; Andersson *et al.*, 2008) primers. Each primer had a barcode sequence of ten nucleotides at the 5' end, which was unique for each sample. The preparation of amplicons was performed in a total volume of 100 µL containing 1× PCR buffer, 200 µM of dNTP, 1 U lysis DNA polymerase (MP Biomedicals), 0.5 µM of each primers, and 1–5 ng of DNA template. The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94 °C for 2 min; 32 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s, and elongation at 72 °C for 30 s; and a final extension step at 72 °C for 7 min. The PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) followed by DNA yield quantification and quality estimation using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer. The size of the PCR products was confirmed by gel electrophoresis, and then, the purified PCR products were quantified using the Quant-iT

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets

Starter diet				Overfeeding feed (dry corn) DM%*	
Ingredients		Nutrient			
Wheat	35	ME Vol kg ⁻¹	2085	ME Vol kg ⁻¹	–
Corn	38.69	Humidity	12.61	Humidity	–
Rapeseed oil free	12	CP	15	CP	8.91
Sunflower cake	11.35	Fat	2.26	Fat	3.68
Sodium carbonate	1.375	Cellulose	5.28	Cellulose	2.77
Dicalcium phosphate	0.575	Ashes	4.99	Ashes	–
Lysine	0.298	Starch	47.32	Starch	75.91
Salt	0.36	<i>Nutrient level (% of raw material)</i>		<i>Nutrient level (% of raw material)</i>	
Methionine	0.086	Lysine	0.701	Lysine	–
Choline chloride	0.04	Methionine	0.36	Methionine	–
Premix + vitamin	0.23	Meth + cystine	0.705	Meth + cystine	–
		Threonine	0.548	Threonine	–
		Tryptophane	0.173	Tryptophane	–
		Linoléic Ac	1.2	Linoléic Ac	–
		Calcium %	0.95	Calcium	–
		Phosphorus	0.519	Phosphorus	–
		Sodium	0.15	Sodium	–
		Available Phosphorus	0.299	P.Disp Vo	–
		pH	–	pH	5.36

CP, crude protein.

*Dry matter %.

PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen, Saint Aubin, France) on a ABI prism 7900 HT sequence detection system (Life technology, Invitrogen, A-BIOSYSTEM, Villebon-sur-Yvette, France). The sequencing of the 16S rRNA genes was performed by 454 GS FLX (454 Life Sciences – Roche) and Titanium chemistry according to the manufacturer's instructions. Amplicons of 450 bp were pooled using equal amounts of each PCR product. For the analysis, samples were recognized by couples of tag sequence, which had been fixed on the universal primers provided by Roche during the amplification.

Pyrotag handling and analysis

A total of 498 772 16S rRNA gene sequences (also referred to as 16S pyrotags) were obtained from 454 Titanium pyrosequencing run for the 49 samples. The 16S pyrotags were sorted on the basis of their respective barcodes to form a total of 49 pyrotag library representing the 49 collected ileal and cecal samples. Sequences were sequentially filtered using a Python script developed by the bioinformatic platform of Toulouse, first removing those sequences with a short sequencing length (< 150 nt; 56 393 sequences removed), those with at least one ambiguous base (13 759 sequences removed) or with a long homopolymer (> 8; 206 sequences), those which did not match the proximal PCR primer sequences (with two mismatches allowed; 1441 sequences removed), and finally those having both primers, but with a length

shorter than 350 pb (912 sequences removed). A total of 426 061 sequences were retained corresponding to 9582 ± 5624 sequences per samples.

Taxonomical classification and statistical analysis

Filtered sequences were analyzed using MOTHUR software, version 1.24 (Schloss *et al.*, 2009). Readings were aligned over the SILVA alignment database provided by MOTHUR software (14 956 sequences corresponding to the unique sequences in the SSU REF database v102; Pruesse *et al.*, 2007), and an alignment quality was calculated using the SILVA secondary structure map file (1072 sequences were removed). After calculating a pairwise distance between aligned sequences, they were clustered into operational taxonomic units (OTU, cutoff of 0.05 using a furthest neighbor clustering). Rarefaction curves, abundance-based coverage estimator (ACE), and Chao1 richness were calculated including rarefaction and Chao1 estimator. The Shannon diversity index was calculated according to Hayek & Buzas (1996). The sequences were analyzed using R (<http://www.r-project.org/>) to obtain the results of the composition of the microbiota in our treatment conditions. Statistical analysis of similarity (ANOSIM) between band patterns was carried out using 10 000 permutations. 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; and $0.25 < R < 0.50$, separated but strongly overlapping groups). These proximity values were also graphically explored by nonmetric multidimensional scaling (nMDS). When values are given in the text, they are expressed as mean $\pm$ SEM.

Results

Ileal microbial community in Pekin and Muscovy ducks

The microbial diversity in ileal samples of Pekin and Muscovy ducks was estimated by calculating the number of OTUs. In Pekin ducks, the number of OTUs with a cutoff of 0.05 was 1147 ± 638 with coverage per sample of $91.1 \pm 3.3\%$. The average number of sequences was 5202 ± 3435 , and 12 different phyla were listed for 184 different taxa. Furthermore, the Chao1, the ACE, and the Shannon index were 2167 ± 509 , 3114 ± 747 , and 4.0 ± 0.5 , respectively (Table 2). In Muscovy ducks, 1022 ± 275 OTUs with a cutoff of 0.05 were detected. The average number of sequences per sample was $11\,533 \pm 1944$, and the sequences were affiliated with nine phyla and 214 different taxa. The different diversity indices for these samples before overfeeding were 1816 ± 384 for the Chao1 indices, 2420 ± 510 for ACE, and 5.2 ± 0.8 for the Shannon diversity index (Table 2). The two major phyla in both Pekin and Muscovy ducks were *Firmicutes* ($71.5 \pm 13.2\%$ and $48.7 \pm 11.9\%$, respectively) and *Bacteroidetes* ($16.4 \pm 15.3\%$ and $21.8 \pm 12.3\%$, respectively). *Proteobacteria* represented around $10.6 \pm 6.0\%$ in Pekin and $26.4 \pm 9.6\%$ in Muscovy (Fig. 1a). Finally, other phyla such as *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Deferribacteres*, *Spirochetes*, or *Acidobacteria* represented $< 2\%$ or 3.5% of the population in Pekin and Muscovy ducks, respectively (Fig. 1a). To evaluate the microbiota composition at finer taxonomic

levels, class distributions were analyzed. In Pekin ducks, *Firmicutes* were dominated by *Bacilli* (53.6%) and *Clostridia* (22.9%), *Bacteroidia* (from the phylum *Bacteroidetes*) accounted for 16.1%, and the classes *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* that are part of the *Proteobacteria* were represented at levels of 3.9% and 0.4%, respectively (Fig. 1b). The *Actinobacteria* represented $< 1\%$ of the population of the ileum (Fig. 1b). In Muscovy ducks, *Firmicutes* were mainly composed of *Clostridia* (36.7%), *Bacilli* (11.7%), and *Bacteroidia* (21%). Regarding the phylum *Proteobacteria*, the major classes were *Gammaproteobacteria* (18.1%) and *Deltaproteobacteria* (5.6%) (Fig. 1b). Finally, 173 genera were detected in Pekin ducks, and 196 genera, in Muscovy ducks.

Cecal microbial community in Pekin and Muscovy ducks

The average number of ceca OTUs with a cutoff of 0.05 was 901 ± 137 with coverage per sample of $91.1 \pm 3.3\%$ in Pekin ducks, whereas there were 1251 ± 569 OTUs in Muscovy ducks (Table 2). The average number of sequences in Pekin was 8626 ± 2614 with eight phyla represented by 111 different taxa and in Muscovy 8784 ± 5979 represented by 118 taxa grouped in eight different phyla. Regarding the Chao1, the ACE, and the Shannon index, the values were 1782 ± 390 , 2631 ± 493 , and 5.2 ± 0.2 , respectively, in Pekin ducks and 2512 ± 469 , 3765 ± 706 , and 5.8 ± 0.2 , respectively, in Muscovy ducks. In Pekin ducks, the cecal microbiota was mainly composed of *Bacteroidetes* ($64.8 \pm 2.5\%$) and *Firmicutes* representing $27.5 \pm 3.3\%$ of the population, while there was only $3.92 \pm 1.2\%$ of *Proteobacteria*. In Muscovy ducks, *Bacteroidetes* ($50.9 \pm 2.1\%$), *Firmicutes* ($40.5 \pm 2.9\%$), and *Proteobacteria* ($7.1 \pm 1.3\%$) were also dominant. Other phyla, such as *Actinobacteria*, *Deferribacteres*, *Spirochetes*, and *Synergistetes*, represented $< 2\%$ of

Table 2. Estimators of diversity during overfeeding in ileum and ceca of Muscovy and Pekin ducks

Segment Period	Ileum				Ceca			
	Bof	Mof	Eof	SEM*	Bof	Mof	Eof	SEM*
Muscovy								
Number of operational taxonomic unit	1022	345	444	211	1251	1972	1430	216
Chao1 estimated richness	1816	576	778	384	2512	4014	2722	469
ACE	2420	807	989	510	3765	6032	4096	706
Shannon diversity index	5.2	2.7	2.6	0.8	5.8	5.6	5.2	0.2
Pekin								
Number of operational taxonomic unit	1147	480	279	262	901	1216	1552	187
Chao1 estimated richness	2167	951	453	509	1782	2407	2959	340
ACE	3114	1313	601	747	2631	3651	4326	451
Shannon diversity index	4.0	2.9	2.3	0.5	5.2	5.2	5.5	0.1

ACE, abundance-based coverage estimator; Bof, before overfeeding (12 weeks); Mof, mid-overfeeding (13 weeks); Eof, end overfeeding.

*Standard error of the mean.

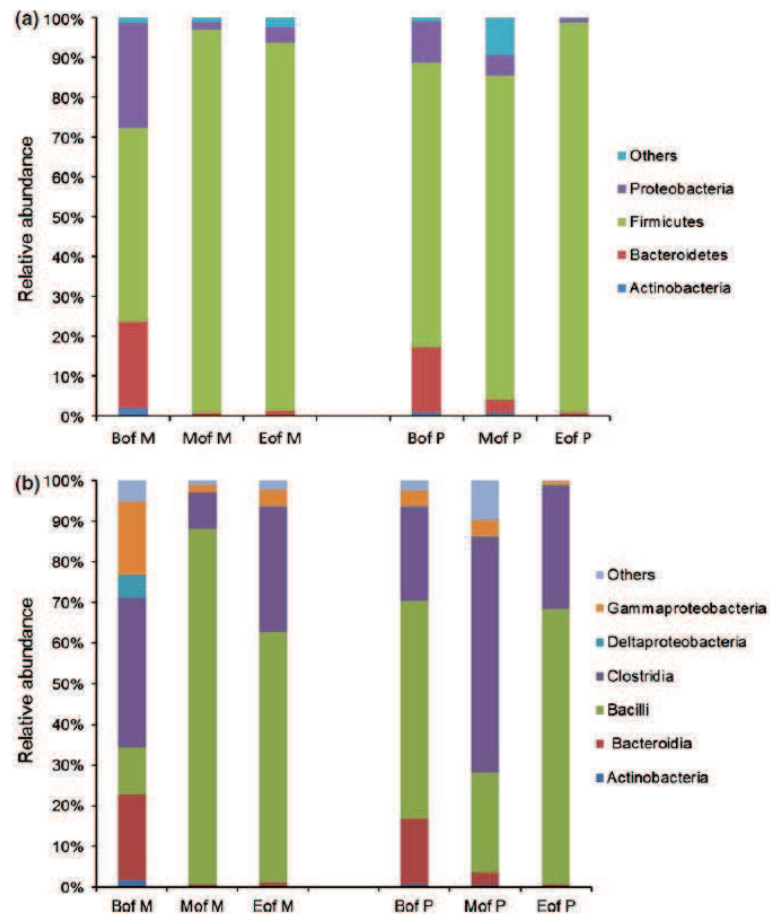


Fig. 1. Percentage distribution of sequences (%) evaluated at the phylum (a) and class (b) levels to the total number of sequences in the ileum of Muscovy (M) and Pekin (P) ducks during overfeeding (Bof, before overfeeding (12 weeks); Mof, mid-overfeeding (13 weeks); Eof, end of overfeeding).

the community and were not present in all samples (Fig. 2a). At the class level, the *Bacteroidetes* was dominated by *Bacteroidia* (64.3% in Pekin and 50.1% in Muscovy) and *Clostridia* (23.1% in Pekin and 37.1%). *Bacilli* sequences accounted for 4.2% and 2.6% from the *Firmicutes* phyla and those from *Deltaproteobacteria* for 1.4% and 5.8%, in Pekin and Muscovy duck samples, respectively. *Gammaproteobacteria* (1.2%) and *Actinobacteria* were detected only in Pekin duck samples (Fig. 2b). Sequences from the other phyla accounted for < 2% of the community (Fig. 2a). Finally, in Pekin and Muscovy cecal samples, 88 and 113 genera were detected, respectively.

Effect of overfeeding on the ileal and cecal microbial community in Pekin and Muscovy ducks

Overfeeding reduced Chao1 richness, the ACE, and the Shannon index in ileal samples, whereas these different

richness or diversity estimators increased in cecal samples regardless of the genotype of ducks, but with variation (Table 2).

Effect on ileum

Furthermore, the ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* in ileal samples tended to increase during overfeeding, but with high variation (Bof = 43.8 ± 20.7 , Mof = 3082.5 ± 1589.5 , Eof = 507.6 ± 444.7) in Pekin and (Bof = 156.1 ± 92.1 , Mof = 471.8 ± 337.2 , Eof = 408.7 ± 321.9) in Muscovy ducks (Fig. 7). After the different level of intake (overfeeding or not) and the length of the overfeeding period (1 or 2 weeks), the comparison of bacterial communities was analyzed by nMDS profiles (representing the distribution of different families). Ileal sampling distinguished two separate clusters: overfed ducks were found in one cluster and the not-overfed ones in others regardless of the length of overfeeding or genotype of the animals (Fig. 3). The ANOSIM *R*-value indicated the extent to which the

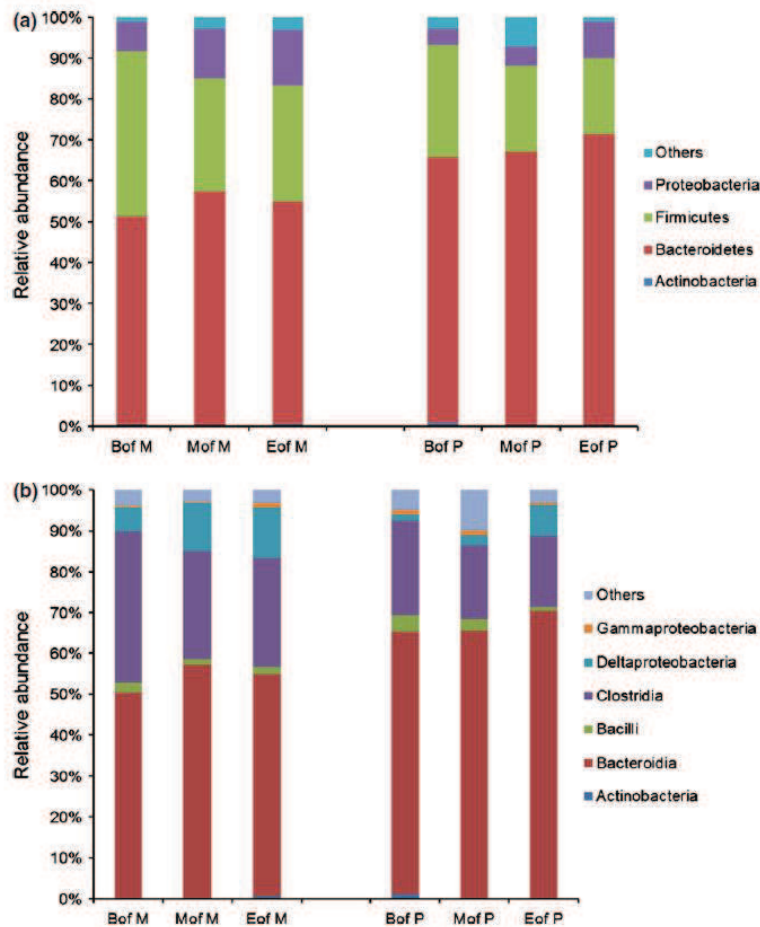


Fig. 2. Percentage distribution of sequences (%) evaluated at the phylum (a) and class (b) levels to the total number of sequences in the ceca of Muscovy (M) and Pekin (P) ducks during overfeeding (Bof, before overfeeding (12 weeks); Mof, mid-overfeeding (13 weeks); Eof, end of overfeeding).

groups differed. For ileal samples, two separate but overlapping groups were observed: $R_{\text{ANOSIM}} = 0.575$ and a $P < 0.001$, which indicates an effect of overfeeding on the bacterial community. Furthermore, there was also an effect of the overfeeding period, namely a statistical difference between the first period (at 12 weeks or before overfeeding) and the last one (at 14 weeks). Two separated but strongly overlapping groups were obtained with $R_{\text{ANOSIM}} = 0.419$ and a $P = 0.009$. This statistical difference was only observable between these two periods (data not shown). The separation of samples by the level of intake was confirmed using the heat map method (Fig. 4). The different effects observed were due to changes in different families such as *Leuconostocaceae* for the genotype effect or mainly *Lactobacillaceae* or *Streptococcaceae* for the period effect. All statistical changes (P -value < 0.05) are listed in Table 3, and there were no interactions. For each sample, the diversity of all families detected has been observed; families with the largest diversity were *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae*, and

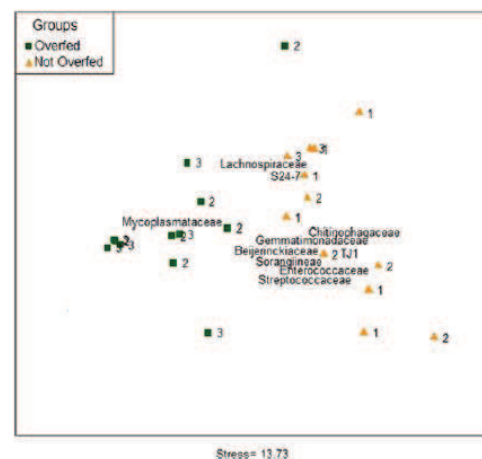


Fig. 3. nMDS profile showing the distribution of different families of the different samples studied overfed (■) or not-overfed (▲) in three periods of overfeeding in the ileum. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding.

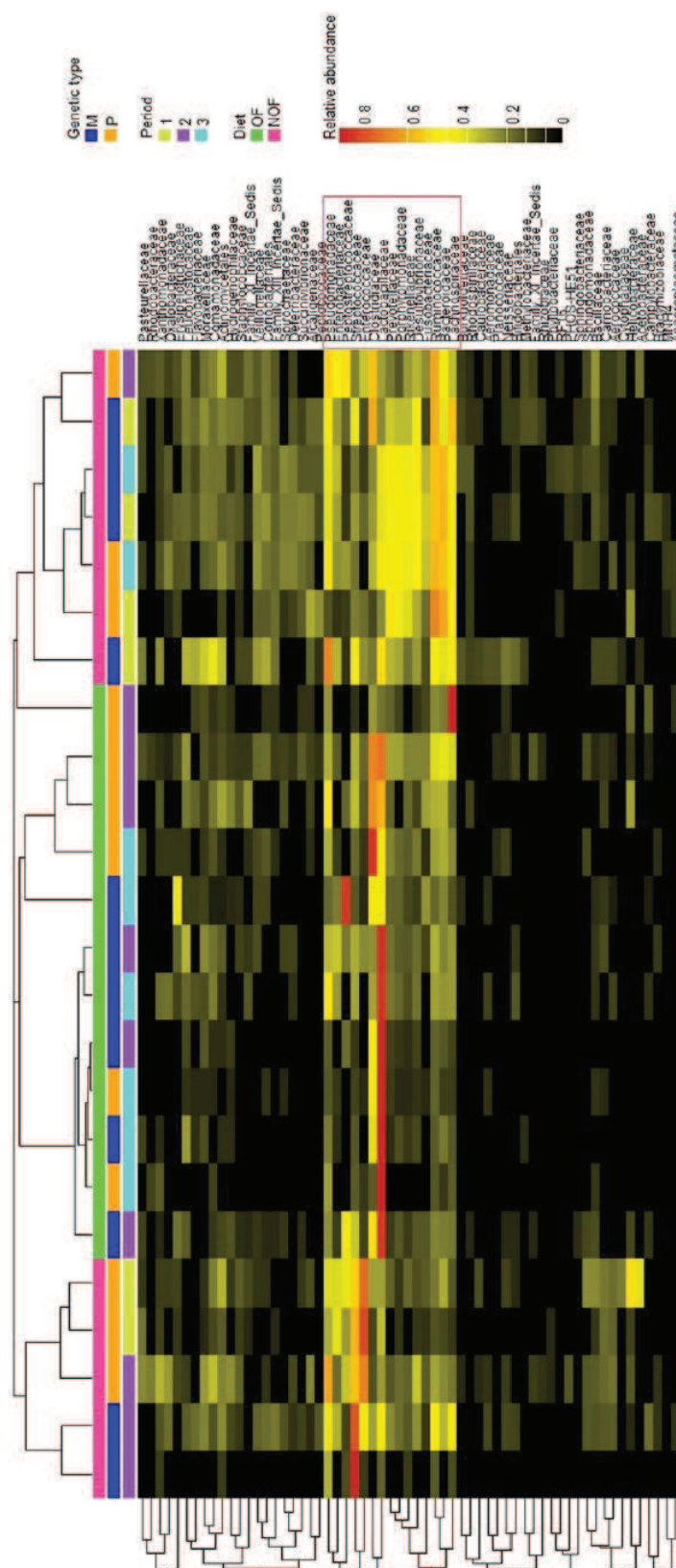


Fig. 4. Heat map of the bacterial community at the family levels of Muscovy (M) and Pekin (P) for overfed (OF) or not-overfed (NOF) ducks in the ileum. Samples and taxa were clustered according to Ward algorithm based on a Manhattan distance matrix. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding.

Table 3. Statistical effect of the genotype and period on different families with a significant *P*-value (< 0.05) in the ileum of Muscovy and Pekin ducks

		Muscovy		Pekin	
	<i>P</i> -value	Mean	SEM*	Mean	SEM*
Genotype effect					
<i>Leuconostocaceae</i>	0.028	0.45	0.17	0.14	0.07
Feeding period effect					
<i>Enterococcaceae</i>	0.003	0.70	0.57	13.08	6.93
<i>Staphylococcaceae</i>	0.009	0.05	0.02	0.05	0.02
<i>Actinomycetales</i>	0.014	0.31	0.16	0.48	0.18
<i>Lactobacillaceae</i>	0.016	38.79	12.18	23.20	10.39
<i>Carnobacteriaceae</i>	0.024	0.03	0.01	0.08	0.04
<i>Streptococcaceae</i>	0.033	14.61	8.91	4.72	2.23

*Standard error of the mean.

Streptococcaceae, which played an important role in the clustering (Fig. 4).

Effect on ceca

In ceca samples, the ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* (Bof = 0.4 ± 0.1 , Mof = 0.3 ± 0.1 , Eof = 0.3 ± 0.1) was stable in Pekin ducks during overfeeding, whereas the richness estimators increased. Regarding cecal samples, nMDS profiles also showed that the samples were slightly separated according to the treatment (overfed or not): *R*_{ANOSIM} = 0.116 and *P* = 0.010 (Fig. 5a). As in ileal samples, the heat map method revealed the separation by genotype and level of intake (Fig. 6). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in Muscovy ducks tended to decrease at mid-overfeeding and increase at the end of overfeeding (Bof = 0.8 ± 0.1 , Mof = 0.5 ± 0.1 , Eof = 0.9 ± 0.6 ; Fig. 7). A significant difference (*P* < 0.05) was observed between the two genotypes for the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio. Several families were responsible for these effects especially *Bacteroidaceae*, *Desulfovibrionaceae*, and *Lachnospiraceae* for the genotype effect or *Streptococcaceae* for the overfeeding effect. All changes for these families were significant (*P* < 0.05) and are listed in Table 4. In our samples, seven families showed a high diversity: *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Rikenellaceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, and *Bacteroidaceae*. Interestingly, there was also a genotype effect between Pekin and Muscovy ducks regardless of age or the period of overfeeding, with a few separations in to groups: *R*_{ANOSIM} = 0.195 and a *P* = 0.001 (Figs 5b and 6).

Discussion

In this study, high-throughput sequencing was used for the first time to identify the microbial diversity of ileal and cecal samples from ducks, after which the effect of

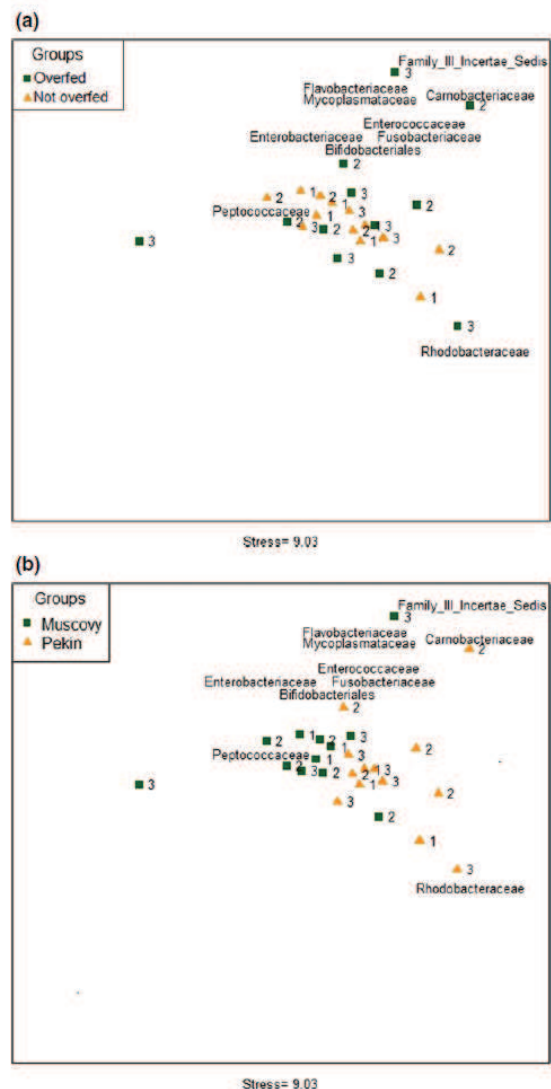


Fig. 5. nMDS profile showing the distribution of different families of the different samples studied (a) overfed (■) or not-overfed (▲) and (b) Muscovy (■) or Pekin (▲) ducks in three periods of overfeeding in the ceca. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding.

overfeeding or genetics on that diversity was studied. At the phylum level, *Firmicutes* and *Bacteroidetes* (more than 80% of sequences) were major bacteria in the duck gut microbiota. Most studies on microbiota have shown that *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the two most dominant phyla in different organisms such as birds or mammals suggesting an important conserved role in intestinal microbiota metabolism (Ley et al., 2008; Kohl, 2012). Costello et al. (2010) suggest that the common ancestor of amniotes (birds, reptiles, and mammals) harbored a

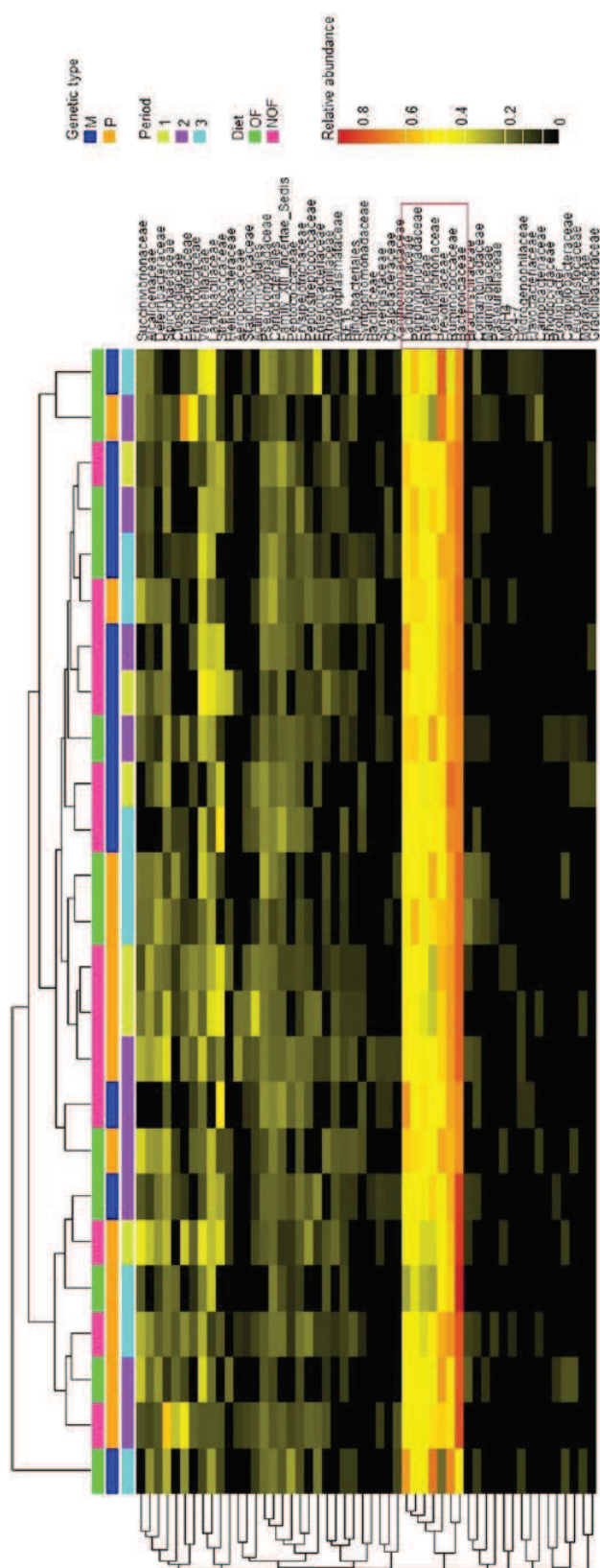


Fig. 6. Heat map of the bacterial community at the family levels of Moscow (M) and Pekin (P) for overfed (OF) or not-overfed (NOF) ducks in the ceca. Samples and taxa were clustered according to a Ward algorithm based on a Manhattan distance matrix. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding.

Table 4. Statistical effect of the genotype and period on different families with a significant *P*-value (*P* < 0.05) in the ceca of Muscovy and Pekin ducks

	<i>P</i> -value	Muscovy		Pekin	
		Mean	SEM*	Mean	SEM*
Genotype effect					
<i>Deferribacteraceae</i>	0	0.06	0.03	0.34	0.09
<i>Succinivibrionaceae</i>	0	0.07	0.03	0.74	0.22
<i>Peptococcaceae</i>	0.003	0.15	0.05	0.03	0.02
<i>Lachnospiraceae</i>	0.005	9.67	1.44	4.89	0.65
Family_XIII_Incertae_Sedis	0.006	0.30	0.07	0.09	0.02
<i>Alcaligenaceae</i>	0.008	0.08	0.04	0.39	0.10
<i>Clostridiaceae</i>	0.01	0.01	0.01	0.17	0.09
<i>Bacteroidaceae</i>	0.01	25.12	2.73	37.08	3.21
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0.019	8.94	2.07	4.66	1.09
<i>Fusobacteriaceae</i>	0.037	0.08	0.04	1.80	1.35
Feeding period effect					
<i>Comamonadaceae</i>	0.001	0.02	0.01	0.02	0.01
<i>Streptococcaceae</i>	0.004	1.85	0.78	0.57	0.28
<i>Anaeroplasmataceae</i>	0.023	0.03	0.01	0.05	0.02

*Standard error of the mean.

microbiota composed essentially of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Furthermore, as previously described in chickens, ceca were dominated by obligate anaerobes (*Bacteroidetes* including *Bacteroidia* and *Firmicutes* including *Clostridia*) in both Pekin and Muscovy ducks, but differences occur with chickens. In this study, cecal segments were dominated by *Bacteroidetes* in ducks, whereas *Firmicutes* (especially the class *Clostridia*) is the major phylum in chickens (Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). Interestingly, turkeys also show *Bacteroidetes* as the major phylum in cecum regardless of the phylogenetic distance between turkey and ducks, suggesting that environmental conditions and diet could play a more important role than genetics. Furthermore, although *Firmicutes* were dominant in ileal segments in chickens and ducks, interesting changes have been identified at the class and family levels (Barnes, 1979; Mead, 1989; Lu *et al.*, 2003). In chickens and Pekin ducks, sequences related to the *Bacilli* order (from *Firmicutes*) were dominant (80% for chickens and 51% for ducks), but the family distribution was quite different. In Pekin ducks, the genera *Streptococcus* spp. and *Enterococcus* spp. represented most of the *Bacilli* sequences (50%), while in chickens, around 70% of sequences are related to the *Lactobacillus* genus (Lu *et al.*, 2008). Regarding Muscovy ducks, the bacterial community in the ileum was not dominated by facultative anaerobes, but by obligate anaerobes such as *Clostridia* and *Bacteroidia*. In humans, the ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* is closely related to weight; it increases in obese people and may decrease during weight loss (Ley *et al.*, 2006). In this study, it tended to increase in the ileal segment, but

with high variation (Fig. 7). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio appeared to be correlated with overfeeding in the ileum and with genotype in the ceca. Overfeeding in ducks promotes an important hepatic steatosis induced by an increased rate of lipogenesis from carbohydrates and a defect in hepatic lipid secretion (Saadoun & Lederq, 1987; Fournier *et al.*, 1997). It is well known that overfed Pekin ducks have a higher lipid content in peripheral tissues (muscle and adipose tissues), while liver storage is lower than in other species (Davail *et al.*, 2003a; Chartrin *et al.*, 2006). Otherwise, the LPL activity in ducks correlates positively with a higher storage in peripheral tissues instead of fat storage in the liver (Saez *et al.*, 2010). Interestingly, in mammals, the microbiota triggers the storage of triglycerides through suppression of the intestinal expression of fasting-induced adipocyte factor, a circulating LPL inhibitor (Backhed *et al.*, 2004). Could these changes in the microbial community during overfeeding affect a predisposition to liver or peripheral fat storage in ducks? In our study, overfeeding reduced the bacterial diversity estimated by the Shannon index in ileal samples. Overfeeding affected the relative abundance of *Firmicutes* and especially some genera from the *Bacilli* class (*Lactobacillaceae*, *Enterococcaceae*, and *Streptococcaceae*) regardless the genotype. The relative abundance of *Lactobacillaceae* spp. increased strongly with overfeeding in both Pekin and Muscovy ducks leading to a decrease in most other families. These bacteria are well known as amylolytic and lactate-producing bacteria and frequently increase in animals (e.g. pigs and rats) fed with diets rich in starch (Wang *et al.*, 2002; Regmi *et al.*, 2011). In cattle, it has been shown that *Lactobacillus* spp. increase with high-concentrate diets containing more than 70% of starch (Brown *et al.*, 2006). Furthermore, *Streptococcaceae*, another amylolytic bacterial family, is decreased by overfeeding in Pekin and Muscovy ducks, whereas in cows, Fernando *et al.* (2010) report the increase in *Streptococcus* spp. with a high grain diet and especially *Streptococcus bovis*. In birds, the effect of diets on the abundance of *Enterococcus* spp. and *Streptococcus* spp. has not yet been published. Another member of *Bacilli*, the *Enterococcaceae* family, was affected, but only in Pekin ducks. Very little is known in birds regarding the effect of diets on these different families. A very small effect of the genotype was also detected in the *Leuconostocaceae* family, from the class *Bacilli*, a new family identified in 2010 (Schleifer, 2010). Finally, regarding ileal samples, regardless of the genotype and the length of the diet, they were only separated by the diet type (overfed or not), and the most affected bacterial groups were the *Lactobacillaceae*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae*, *Streptococcaceae*, and *Ruminococcaceae* (Fig. 4 or Fig. 3). Interestingly, in cecal samples, the effect of the genotype was more

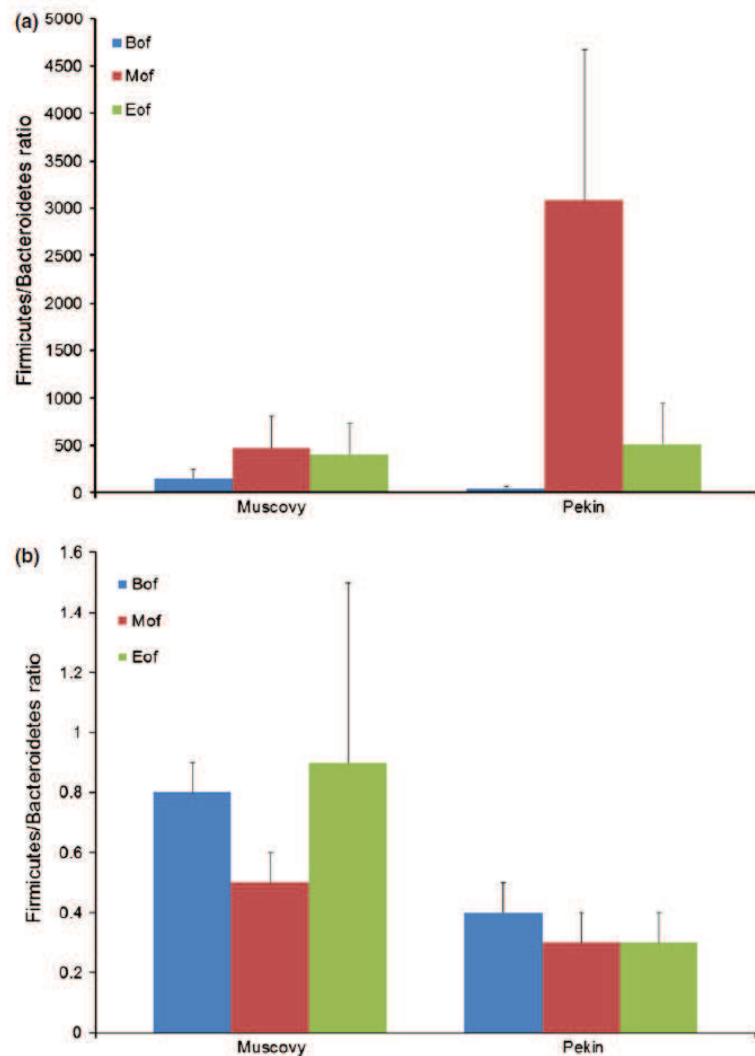


Fig. 7. Firmicutes/Bacteroidetes ratio of Muscovy and Pekin ducks during overfeeding (before overfeeding: Bof, mid-overfeeding: Mof, and end of overfeeding: Eof) in ileum (a) and ceca (b).

important than the effect of overfeeding, suggesting that the complexity and the anaerobic environment of the ceca did not allow important changes in the bacterial community. Furthermore, it has been suggested that transit times are longer in the ceca, permitting a better microbial fermentation (Rehman *et al.*, 2007). The physiology of Pekin and Muscovy ducks is quite different as previously described, and several metabolites such as short-chain fatty acids (SCFA) or amino acids from the ceca could be a part of that difference (Józefiak *et al.*, 2004). Three families show significant differences between Pekin and Muscovy ducks: *Lachnospiraceae*, *Bacteroidaceae*, and *Desulfovibrionaceae* from three different phyla. Moreover, *Lachnospiraceae* from *Firmicutes* and *Bacteroidaceae* are two families with bacteria with amylolytic and cellulolytic properties (Cotta, 1987; Wedekind *et al.*, 1988; Flint *et al.*, 2012).

Regarding *Desulfovibrionaceae*, some family members can produce acetate (one well known SCFA) and are among the sulfate-reducing bacteria (Devereux *et al.*, 1990). There was also a need to find an effect of overfeeding on three families in both Pekin and Muscovy ducks: *Streptococcaceae* in ileal samples and two poorly documented families, *Comamonadaceae* (from *Proteobacteria*) and *Coriobacteriales* (wall-less bacteria belonging to *Firmicutes* and the *Mollicutes* class). Finally, in cecal samples, the bacterial community could be separated by both the genotype (Fig. 5a) and the level of intake (Fig. 5b), but the former had the greater effect. Heat maps confirmed these results, and the most affected bacterial groups were the families described above (Fig. 6). The genetic effect on microbiota composition was also well described in mice (Friswell *et al.*, 2010; Kovacs *et al.*, 2010).

In conclusion, this study using a high-throughput pyrosequencing based on the 16S rRNA gene in ileal and cecal samples from ducks provides a first inventory of the microbial community and the effect of overfeeding and genotype on the abundance of major different groups. Overfeeding affected the richness diversity of ileal and cecal samples and had a significant effect in modifying the bacterial community in the ileum, whereas genotype mainly affected the ceca. The microbial diversity of ducks' microbiota was dominated by *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Further investigations are necessary to understand the functional microbiota in ducks and enhance the digestibility of resistant starch during overfeeding periods in ducks. This would be of great interest for researchers studying intestinal microbiota in poultry, and this new knowledge could be used to prepare birds to overfeeding.

Acknowledgements

We thank the 'Conseil Général des Landes' and the 'Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras' (CIFOG) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for ducks. We thank Annabelle Troegeler-Meynadier for his constructive comments on the manuscript. We are grateful to Stéphanie Dollet, Sandra Biasutti (IUT des Pays de l'Adour, 40004 Mont de Marsan, France), and Béatrice Gabinaud (INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Eco-système et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France) for their excellent technical assistance. We would also like to thank Jérôme Lluch and Clémence Genthon (INRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, Castanet-Tolosan, France).

References

- Ahmed N, Qu A, Brulc JM *et al.* (2008) Comparative metagenomics reveals host specific metavirolomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS ONE* **3**: e2945.
- Andersson AF, Lindberg M, Jakobson H, Bäckhed F, Nyrén P & Engstrand L (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* **3**: e2836.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF & Gordon JI (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *P Natl Acad Sci USA* **101**: 15718–15723.
- Barnes E (1979) The intestinal microflora of poultry and game birds during life and after storage. *J Appl Bacteriol* **46**: 407–419.
- Brown MS, Ponce CH & Pulikanti R (2006) Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: performance and ruminal metabolism. *J Anim Sci* **84**: E25–E33.
- Chartrin P, Bernadet M-D, Guy G *et al.* (2006) Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks? *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* **145**: 413–418.
- Costello EK, Gordon JI, Secor SM & Knight R (2010) Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. *ISME J* **4**: 1375–1385.
- Cotta MA (1987) Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol* **54**: 772–776.
- Davail S, Rideau N, Guy G, André J-M, Hermier D & Hoo-Paris R (2003a) Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* **134**: 707–715.
- Davail S, Rideau N, Guy G, André JM & Hoo-Paris R (2003b) Pancreatic hormonal and metabolic responses in overfed ducks. *Horm Metab Res* **35**: 439–443.
- Devereux R, Shao-Hua H, Doyle CL, Orkland S, Stahl DA, LeFall J & Whitman WB (1990) Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* **172**: 3609–3619.
- Fernando SC, Purvis HT, Najar FZ *et al.* (2010) Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7482–7490.
- Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P & Forano E (2012) Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes* **3**: 289–306.
- Fournier E, Peresson R, Guy G & Hermier D (1997) Relationships between storage and secretion of hepatic lipids in two breeds of geese with different susceptibility to liver steatosis. *Poult Sci* **76**: 599–607.
- Friswell MK, Gika H, Stratford IJ, Theodoridis G, Telfer B, Wilson ID & McBain AJ (2010) Site and strain-specific variation in gut microbiota profiles and metabolism in experimental mice. *PLoS ONE* **5**: e8584.
- Fuller R (1984) Microbial activity in the alimentary tract of birds. *Proc Nutr Soc* **43**: 55–61.
- Gordon H & Pesti L (1971) The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. *Bacteriol Rev* **35**: 390–429.
- Hayek LC & Buzas MA (1996) *Surveying Natural Populations*. Columbia University Press, New York, NY.
- Hermier D, Guy G, Guillaumin S, Davail S, André J-M & Hoo-Paris R (2003) Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* **135**: 663–675.
- Johansen CH, Bjerrum L & Pedersen K (2007) Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Vet Scand* **49**: 30.
- Józefiak D, Rutkowski A & Martin SA (2004) Carbohydrate fermentation in the avian ceca: a review. *Anim Feed Sci Technol* **113**: 1–15.
- Kohl KD (2012) Diversity and function of the avian gut microbiota. *J Comp Physiol B* **182**: 591–602.
- Kovacs A, Ben-Jacob N, Tayem H, Halperin E, Iraqi FA & Gophna U (2010) Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Microb Ecol* **61**: 423–428.

- Ley RE, Tumbaugh PJ, Klein S & Gordon JI (2006) Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**: 1022–1023.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C *et al.* (2008) Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**: 1647–1651.
- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: e120.
- Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ & Lee MD (2003) Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol* **69**: 6816–6824.
- Lu J, Hofacre C, Smith F & Lee MD (2008) Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. *Animal* **2**: 669–676.
- Mead G (1989) Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *J Exp Zool* **3**: 48–54.
- Mead GC & Adams BW (1975) Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. *Br Poult Sci* **16**: 169–176.
- 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 Res* **35**: 7188–7196.
- Regmi PR, Metzler-Zebeli BU, Ganzle MG, van Kempen TATG & Zijlstra RT (2011) Starch with high amylose content and low *in vitro* digestibility increases intestinal nutrient flow and microbial fermentation and selectively promotes Bifidobacteria in pigs. *J Nutr* **141**: 1273–1280.
- Rehman H, Vahjen W, Awad WA & Zentek J (2007) Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch Anim Nutr* **61**: 319–335.
- Saadoun A & Leclercq B (1987) *In vivo* lipogenesis of genetically lean and fat chickens: effects of nutritional state and dietary fat. *J Nutr* **117**: 428–435.
- Saez G, Baeza E, Bernadet MD & Davail S (2010) Is there a relationship between the kinetics of lipoprotein lipase activity after a meal and the susceptibility to hepatic steatosis development in ducks? *Poult Sci* **89**: 2453–2460.
- Schleifer KH (2010) Family V. Leuconostocaceae fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3 (The Firmicutes), 2nd edn (De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH & Whitman WB, eds), pp. 624. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7537–7541.
- Serino M, Luche E, Gres S *et al.* (2011) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* **61**: 543–553.
- Taschuk R & Griebel PJ (2012) Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Anim Health Res Rev* **13**: 129–141.
- Wang X, Brown IL, Khaled D, Mahoney MC, Evans AJ & Conway PL (2002) Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *J Appl Microbiol* **93**: 390–397.
- Wedekind KJ, Mansfield HR & Montgomery L (1988) Enumeration and isolation of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria from human feces. *Appl Environ Microbiol* **54**: 1530–1535.
- Zhu XY, Zhong T, Pandya Y & Joerger RD (2002) 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol* **68**: 124–137.

Résultats complémentaires :

Des résultats non présentés dans l'article ont également été obtenus. Les tableaux suivants présentent l'abondance relative des différents genres majoritaires au sein des différents segments pour les deux types génétiques étudiés. Les résultats de qPCR sont également présentés pour les différents groupes ou genres bactériens recherchés.

Iléon Pékin	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage
(Abondance relative %)			
Bacteroidetes			
Bacteroidia			
<i>Bacteroidales</i>			
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	8,63	2,00	0,45
<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	2,70	0,18	0,05
Firmicutes			
Bacilli			
<i>Lactobacillales</i>			
<i>Enterococcaceae;Enterococcus</i>	38,42	0,11	0,02
<i>Lactobacillaceae;Lactobacillus</i>	1,15	21,36	66,53
<i>Streptococcaceae;Streptococcus</i>	11,78	0,48	0,08
Clostridia			
<i>Clostridiales</i>			
<i>Clostridiaceae;Clostridium</i>	0,32	22,74	29,60
<i>Lachnospiraceae;Incertaine_Sedis</i>	2,02	32,16	0,13
<i>Ruminococcaceae;Incertaine_Sedis</i>	5,64	0,50	0,11
Proteobacteria			
Epsilonproteobacteria			
<i>Campylobacteriales</i>			
<i>Helicobacteraceae;Helicobacter</i>	4,04	0,41	0,00
Gammaproteobacteria			
<i>Enterobacteriales</i>			
<i>Enterobacteriaceae;Enteric_Bacteria_cluster</i>	2,16	0,05	0,02
<i>Pseudomonadales</i>			
<i>Pseudomonadaceae;Pseudomonas</i>	1,45	3,67	0,78
Non apparentées	0,46	8,91	0,04

Tableau 8 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote dans l'iléon des canards Pékin (n=3).

Au niveau de l'iléon des canards Pékin les genres majoritaires avant gavage sont des *Firmicutes* notamment des *Enterococcus* et *Streptococcus* ainsi que de *Bacteroides* (*Bacteroidetes*) (Tableau 8). Le gavage induit des modifications du microbiote sur certains genres bactériens. Les changements majeurs observés concernent la quasi disparition des *Enterococcus* et des *Streptococcus* tandis qu'on observe une augmentation importante des *Lactobacillus*, des *Clostridium* et des *Lachnospiraceae* ; *Incertae_Sedis* (position taxonomique non définie) qui représentent alors 75% de la communauté totale. L'augmentation des *Lachnospiraceae* est, elle transitoire. En effet, en fin de gavage on retrouve moins de 1% de cette famille tandis que l'on observe une augmentation des *Lactobacillus* de plus de 40%, ce genre bactérien représentant alors 66,53% de la communauté.

Iléon Barbarie	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage
(Abondance relative %)			
Bacteroidetes			
Bacteroidia			
<i>Bacteroidales</i>			
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	9,38	0,32	0,50
Firmicutes			
Bacilli			
Lactobacillales			
<i>Lactobacillaceae;Lactobacillus</i>	5,33	84,75	59,92
<i>Streptococcaceae;Lactococcus</i>	2,70	0,43	0,29
Clostridia			
Clostridiales			
<i>Clostridiaceae;Clostridium</i>	7,91	5,64	3,83
<i>Ruminococcaceae;Incetae_Sedis</i>	5,00	0,13	0,06
<i>Ruminococcaceae;uncultured</i>	2,08	0,14	0,18
Proteobacteria			
Deltaproteobacteria			
<i>Desulfovibrionales</i>			
<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	5,00	0,14	0,11
Gammaproteobacteria			
<i>Pseudomonadales</i>			
<i>Pseudomonadaceae;Pseudomonas</i>	14,51	0,84	3,25
Non apparentées	0,18	0,06	0,08

Tableau 9 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote dans l'iléon des canards de Barbarie (n=3).

Chez les canards de Barbarie on peut également observer une forte augmentation des *Lactobacillus* d'environ 80% à mi gavage mais en fin gavage une baisse de l'abondance de ce genre est retrouvée, les *Lactobacillus* représentant alors environ 60% de la population totale du microbiote, très proche de ce qui est identifié chez le canard Pékin. Cette augmentation est

accompagnée d'une quasi-disparition des *Bacteroides*, des *Ruminococcae Incertae Sedis* and *uncultured*, des *Desulfovibrio*. De plus, le genre *Clostridium* diminue au cours du gavage.

Néanmoins, malgré les différences observées entre les deux types parentaux, l'augmentation des *Lactobacillus*, suite au gavage est commune suggérant ainsi que le substrat maïs (carbohydate) est une source de carbone favorisant leur croissance (Rehman *et al.*, 2008).

Caeca Pékin				
(Abondance relative %)		Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage
Bacteroidetes				
Bacteroidia				
Bacteroidales				
	<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	40,88	26,96	44,07
	<i>Porphyromonadaceae;Parabacteroides</i>	3,54	2,35	3,07
	<i>Porphyromonadaceae;unclassified</i>	0,82	2,15	2,47
	<i>Prevotellaceae;Prevotella</i>	1,06	5,17	2,06
	<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	5,22	11,88	4,17
	<i>Rikenellaceae;RC9</i>	0,79	2,10	0,19
	<i>unclassified;unclassified</i>	6,61	7,83	9,42
Firmicutes				
Clostridia				
Clostridiales				
	<i>Lachnospiraceae;Incertaine_Sedis</i>	3,43	4,29	1,73
	<i>Ruminococcaceae;Incertaine_Sedis</i>	3,97	2,65	3,48
	<i>Ruminococcaceae;unclassified</i>	3,51	1,97	2,51
Proteobacteria				
Deltaproteobacteria				
Desulfovibrionales				
	<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	0,84	2,17	6,94
Non apparentées		1,07	0,52	0,51

Tableau 10 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote des caeca des canards Pékin (n=3).

Le microbiote des caeca des Pékin est composé principalement de *Bacteroidetes* et en particulier le genre *Bacteroides* (40,88%) (Tableau 10). Le gavage n'a qu'un très faible effet sur le microbiote caecal. En effet, une baisse transitoire d'environ 15% est observée au niveau du genre *Bacteroides* alors qu'on observe une augmentation elle aussi transitoire de *Prevotellaceae ;unclassified* à mi-gavage.

Caeca Barbarie	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage
(Abondance relative %)			
Bacteroidetes			
Bacteroidia			
Bacteroidiales			
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	25,29	33,21	18,18
<i>Porphyromonadaceae;Barnesiella</i>	2,85	4,99	4,17
<i>Porphyromonadaceae;Parabacteroides</i>	1,76	2,50	2,70
<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	4,18	3,11	4,87
<i>Rikenellaceae;Alistipes</i>	3,27	3,00	3,33
unclassified;unclassified	4,66	4,07	5,76
Firmicutes			
Clostridia			
Clostridiales			
<i>Lachnospiraceae;Incertaine_Sedis</i>	3,22	3,23	5,03
<i>Lachnospiraceae;unclassified</i>	2,44	2,07	2,13
<i>Ruminococcaceae;Incertaine_Sedis</i>	6,89	4,31	6,38
<i>Ruminococcaceae;Oscillibacter</i>	2,35	2,51	1,17
<i>Ruminococcaceae;unclassified</i>	5,12	3,47	1,61
<i>Ruminococcaceae;uncultured</i>	5,57	4,10	2,02
unclassified;unclassified	3,81	1,33	1,49
Proteobacteria			
Deltaproteobacteria			
Desulfovibrionales			
<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	4,88	10,99	11,14
Unclassified	0,55	0,58	0,61

Tableau 11 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote des caeca des canards de Barbarie (n=3).

La même cinétique est observée chez le canard de Barbarie avec cependant quelques différences (Tableau 11). Comme vu précédemment la concentration en *Bacteroidetes* est moins importante que chez le canard Pékin tandis que les *Firmicutes* sont, eux, plus représentés. Il y a également une augmentation des *Desulfovibrio* lors du gavage chez ce type génétique.

Iléon Pékin					
Période	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage	SEM	Significativité
Flore totale	11,35	10,17	9,93	0,44	1*, 3***
Bacteroidetes	6,94	7,25	6,93	0,11	1*
<i>Bacteroides</i>	7,67	7,28	6,76	0,26	2*, 3*
Firmicutes	9,60	10,11	10,67	0,31	-
<i>Clostridium</i>	8,12	7,37	7,33	0,26	-
<i>Lactobacillus</i>	10,44	9,20	9,76	0,36	-
Proteobacteria					
Enterobacteria	9,24	8,70	ND	2,99	2***, 3***

ND : non détecté

* $p < 0,05$

** $p < 0,02$

*** $p < 0,01$

1 : Avant gavage vs Mi gavage

2 : Mi gavage vs fin gavage

3 : Avant gavage vs fin gavage

Tableau 12 : Effet du gavage sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon de canard Pékin.

Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log_{10} du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais (n=20).

Les résultats de qPCR montrent également des changements significatifs au niveau des différentes cibles étudiées au niveau de l'iléon des canards Pékin (Tableau 12). On observe en effet que le gavage implique diminution de quantités de la flore totale entre les périodes avant gavage et mi-gavage ainsi que fin gavage. Différents groupes ou genres bactériens sont

également diminués comme par exemple le genre *Bacteroides* faisant partie des *Bacteroidetes* ainsi que les entérobactéries.

Iléon Barbarie					
Période	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage	SEM	Significativité
Flore totale	8,29	9,63	9,80	0,48	1***, 3***
Bacteroidetes	6,46	7,02	7,14	0,21	3*
<i>Bacteroides</i>	6,77	7,14	7,14	0,12	-
Firmicutes	8,87	10,06	10,69	0,53	3***
<i>Clostridium</i>	6,98	7,61	7,61	0,21	-
<i>Lactobacillus</i>	8,18	9,56	9,63	0,47	1***, 3***
Proteobacteria					
Enterobacteria	6,97	8,07	7,55	0,32	2***

*p<0,05

**p<0,02

***p<0,01

1 : Avant gavage vs Mi gavage

2 : Mi gavage vs fin gavage

3 : Avant gavage vs fin gavage

Tableau 13 : Effet du gavage sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon chez le canard de Barbarie Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais (n=20).

Les résultats de q PCR ont permis de confirmer que le gavage a également un effet sur les communautés microbiennes composant l'iléon des canards de Barbarie (Tableau 13). Les *Firmicutes* ainsi que les *Bacteroidetes* augmentent significativement entre avant gavage et fin gavage. Au sein des *Firmicutes* ce sont les *Lactobacillus* spp. qui sont augmentées significativement tandis qu'au sein des *Proteobacteria* ce sont les entérobactéries qui diminuent entre mi et fin gavage. Par conséquence, la flore totale augmente également durant le gavage.

Caeca Pékin					
Période	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage	SEM	Significativité
Flore totale	11,66	12,83	12,57	0,35	1***, 3***
Bacteroidetes	11,46	11,56	11,55	0,03	-
<i>Bacteroides</i>	11,56	11,42	12,27	0,26	2***, 3***
Firmicutes	12,38	12,88	12,99	0,19	1**, 3***
<i>Clostridium</i>	12,30	12,62	12,53	0,10	3*
<i>Lactobacillus</i>	11,30	10,08	10,56	0,35	-
Proteobacteria					
Enterobacteria	9,58	9,06	8,89	0,21	3***

*p<0,05

**p<0,02

***p<0,01

1 : Avant gavage vs Mi gavage

2 : Mi gavage vs fin gavage

3 : Avant gavage vs fin gavage

Tableau 14 : Effet du gavage sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon chez le canard Pékin.

Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais (n=20).

Au niveau des caeca des canards Pékin il y a des changements significatifs de la composition du microbiote même si les changements observés sont moins importants qu'au niveau de l'iléon (Tableau 14). Les genres *Clostridium* et *Bacteroides* augmentent statistiquement entre avant et fin gavage tandis que l'on observe une diminution des entérobactéries. De plus, la flore totale augmente entre avant et mi-gavage et également entre mi et fin gavage.

Caeca Barbarie					
Période	Avant gavage	Mi gavage	Fin gavage	SEM	Significativité
Flore totale	11,32	12,83	12,19	0,44	1***, 3***
Bacteroidetes	10,95	11,30	11,40	0,14	1*
<i>Bacteroides</i>	11,39	11,34	11,80	0,15	-
Firmicutes	12,09	12,68	12,42	0,17	1***, 3*
<i>Clostridium</i>	12,16	12,81	12,54	0,19	1***, 3*
<i>Lactobacillus</i>	10,17	10,39	10,11	0,09	-
Proteobacteria					
Enterobacteria	8,44	9,89	9,70	0,45	3*

*p<0,05

**p<0,02

***p<0,01

1 : Avant gavage vs Mi gavage

2 : Mi gavage vs fin gavage

3 : Avant gavage vs fin gavage

Tableau 15 : Effet du gavage sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon ou les caeca chez le canard Pékin et le canard de Barbarie. Test de Wilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu (n=20).

Comme pour les résultats cités précédemment l'effet du gavage est confirmé sur les cibles étudiées en qPCR (Tableau 15). Les *Bacteroidetes* et des *Firmicutes* augmentent statistiquement entre avant et mi-gavage. Les *Firmicutes* notamment le genre *Clostridium* ainsi que les entérobactéries augmentent également significativement entre la période avant gavage et fin gavage. La quantité des bactéries composant la flore totale se retrouve également changée entre les différentes périodes étudiées

Cette première étude a permis de mettre en évidence la composition du microbiote iléal et caecal de deux types génétiques de canards ainsi que leur réponse au processus de gavage. Les résultats obtenus nous montrent que le gavage induit plusieurs modifications au sein des communautés microbiennes composant le microbiote de ces animaux. Les différents

changements se font au sein même des différentes familles bactériennes modifiant également les communautés à tous les niveaux taxonomiques. Il a également été montré que les différences obtenues au niveau de l'iléon étaient en particulier dues au gavage tandis qu'au niveau des caeca, c'est le type génétique qui semble conditionner la composition du microbiote.

Article 2 : *Lactobacillus sakei* modulates mule ducks microbiota in ileum and ceca during overfeeding period.

Poultry Science

Après avoir étudié la composition du microbiote ainsi que l'effet du gavage chez les canards Pékin et Barbarie, le but de cette étude a été de faire un état des lieux de la composition du microbiote des canards mulards ainsi que d'étudier l'effet du gavage et de l'ajout d'une souche commerciale de *Lactobacillus sakei* (utilisée comme probiotique) sur le microbiote iléal et caecal. Cette étude a été réalisée en utilisant un pyroséquençage haut débit en 454 et la PCR en temps réel. Les canards sont gavés avec ou sans ajout de *L. sakei* pendant 12 j avec une alimentation composée de 58% de grains de maïs moulus et 42% de grains de maïs entiers. Des échantillons ont été prélevés avant gavage (à 12 semaines), à 13 semaines (repas 12) et à 14 semaines (repas 24), 3 heures après le repas. Quel que soit le segment digestif et le niveau de consommation les *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Proteobacteria* sont les phyla dominants dans la communauté bactérienne des canards mulards (au moins 90%). Avant gavage, les échantillons d'iléon étaient dominés par des bactéries de la classe des *Clostridia*, *Bacteroidia* et *Gammaproteobacteria* (80% et plus) et les échantillons de caeca par des *Bacteroidia* et *Clostridia* (environ 85%). Après gavage, les indices de richesse et de diversité diminuent dans l'iléon tandis qu'ils augmentent dans les caeca. Le gavage augmente l'abondance relative des *Firmicutes* et notamment le groupe des *Lactobacillus* dans les échantillons d'iléon. Même si seulement quelques modifications sont détectées dans la composition bactérienne des caeca les analyses en nMDS montrent des communautés bactériennes distinctes en fonction de la période de gavage et ce seulement dans les caeca. Les indices de richesse ont diminués lors de l'ajout de *L. sakei* à mi-gavage dans l'iléon alors que dans les caeca cette diminution est

observée uniquement en fin de gavage. L'ajout de *L. sakei* modifie plus la communauté bactérienne de l'iléon que celle des caeca. *Lactobacillus sakei* diminue l'abondance relative des *Bacteroides* à mi-gavage et l'abondance relative des enterobactéries en fin de gavage dans l'iléon. Ces différents résultats suggèrent que la communauté bactérienne des caeca est plus affectée par le gavage alors que la communauté bactérienne dans l'iléon est, elle, plus touchée par l'ajout de *L. sakei*.

Mots clés: diversité microbienne; canard; gavage; probiotique; pyroséquençage 454; PCR en temps réel.

METABOLISM AND NUTRITION

PS3497

***Lactobacillus sakei* modulates mule duck microbiota in ileum and ceca during overfeeding**

F. Vasai,* K. Brugirard Ricaud,*¹ L. Cauquil,†‡§ P. Daniel,¶ C. Peillod,|| K. Gontier,* A. Tizaoui,¶ O. Bouchez,** S. Combes,†‡§ and S. Davail*

*IPREM-EEM UMR5254, IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan, France; †INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; ‡Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France; §Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France; ¶LPL, 1 rue Marcel David, BP219, 40004 Mont de Marsan, France; ||ITAVI, 28 rue du Rocher, 75008 Paris, France; ¶IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan, France; and **Plateforme Génomique Bâtiment CRGS-CNRRV, INRA Auzeville, Chemin de Borderouge-BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

[AU1: Spell out abbreviations used in institution names if possible.]

ABSTRACT The supplementation with *Lactobacillus sakei* as probiotic on the ileal and cecal microbiota of mule ducks during overfeeding was investigated using high-throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing and real-time PCR. The ducks were overfed with or without *L. sakei* for 12 d with 56% ground corn and 42% whole corn. Samples were collected before the overfeeding period (at 12 wk), at 13 wk (meal 12 of overfeeding), and at 14 wk (meal 24), 3 h postfeeding. Whatever the digestive segment and the level of intake, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria* were the dominant phyla in the bacterial community of mule ducks (at least 90%). Before overfeeding, ileal samples were dominated by *Clostridia*, *Bacteroidia*, and *Gammaproteobacteria* (80% and up), and cecal samples by *Bacteroidia* and *Clostridia* (around 85%). The richness

and diversity decreased in the ileum and increased in the ceca after overfeeding. Overfeeding increased the relative abundance of *Firmicutes* and especially the *Lactobacillus* group in ileal samples. Nonmetric multidimensional scaling profiles separated the bacterial communities with respect to overfeeding only in cecal samples. Richness indicators decreased after *L. sakei* has been added at mid-overfeeding only in the ileum. In the ceca, the decrease of these indexes only occurred at the end of overfeeding. The addition of *L. sakei* triggers major changes in the ileum, whereas the ceca are not affected. *Lactobacillus sakei* decreased the relative abundance of *Bacteroides* at mid-overfeeding and the relative abundance of *Enterobacteria* at the end of overfeeding in the ileum.

Key words: duck microbial diversity, overfeeding, probiotic, 454 pyrosequencing, real-time PCR

TBC Poultry Science TBC:1-10
<http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03497>

INTRODUCTION

The intestinal microbiota play a major role in animal physiology and form a complex ecosystem. For example, intestinal bacteria can affect gut morphology and nutrition and are known to stimulate the immune response and to protect against pathogens (Moreau et al., 1982; Leser and Mølbak, 2009). In chickens, the bacterial activity is more intense in the crop, the small intestine (jejunum, duodenum, ileum), and the ceca in comparison with proventriculus, gizzard, and pan-

creas (Fuller, 1984). Culture-dependent methods have shown 2 major bacterial populations: facultative anaerobes from the crop to the small intestine and obligate anaerobes in the ceca (Fuller, 1984; Mead, 1989). In accordance with culture-dependent methods, molecular methods identified *Lactobacillus* spp. as the major bacterial group in the ileum (over 70% were *Lactobacillus* related) and 65% of the sequences in the ceca were *Clostridiaceae* related in chickens (Lu et al., 2003). Molecular approaches have shown that the composition of intestinal bacteria is modified by diets (Knarreborg et al., 2002; Hammons et al., 2010). The different phyla identified in bird microbiota are also present in mammals, but molecular inventory in the crop of hoatzin (a tropical bird) showed genera and species specific to birds over 94% of all sequences (Godoy-Vitorino et al.,

©TBC Poultry Science Association Inc.
 Received July 17, 2013.

Accepted December 16, 2013.

¹Corresponding author: karine.brugirardricaud@univ-pau.fr

2010). Furthermore, archaeobacteria have been identified in the chicken cecum (Saengkerdsut et al., 2007) and the crop of hoatzin (Wright et al., 2009). In goose feces, *Bacilli*, *Clostridia*, and *Bacteroidetes* were predominant (Lu et al., 2009). A study of the 2 parental genetic types (Pekin and Muscovy) showed that the ileal and cecal microbiota were mainly composed of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Furthermore, overfeeding has an effect on the bacterial composition of the microbiota of these ducks (Vasai et al., 2013). During this study, the nonoverfed animals at the same age have shown no evolution in their microbiota composition between 12 and 14 wk. Culture-dependent methods have shown that obligate anaerobes dominate their ceca (Ridsdale and Corry, 1999). During overfeeding (OF), the birds are exclusively fed with corn, which is rich in carbohydrates (especially starch). This diet induces an hepatic steatosis resulting in storage of fatty acids in the liver (named foie gras; Davail et al., 2003). We can hypothesize that this diet could affect the bacterial community.

Probiotics (live microorganisms) are known as beneficial to their host (Fuller, 1995). A study with chickens showed that dietary supplementation of probiotics induced significant changes in the microbial community structure of the gastrointestinal tract (Netherwood et al., 1999). Different modes of action have been described; for example, probiotics can reduce the presence of pathogenic bacteria in the digestive tract presumably by the production of bacteriocins, lactic acid, or both (Czerucka and Rampal, 2002; Servin and Coconnier, 2003; Servin, 2004). Competition between probiotic and endogenous bacteria can also occur with respect to the occupation of ecological niches (La Ragione, 2003). By strengthening the lactic acid bacteria presence, probiotics can also help establishing stable environmental conditions with a low pH limiting the development of pathogens (van Winsen et al., 2001). In addition, some lactobacilli strains exhibit significant hydrolytic action and favor digestion and absorption of nutrients, and make certain compounds available to the host. The addition of lactic acid bacteria to feed increased its safety and favored endogenous digestive bacteria (van Winsen et al., 2001). In the poultry industry, the interest in probiotics is increasing because growers in many countries can no longer use antibiotics as growth stimulants (Nava et al., 2005). In the current study, the effect of adding a probiotic (*Lactobacillus sakei*) during overfeeding of male mule ducks was investigated using real-time PCR and high-throughput pyrosequencing. This is the first report of a molecular inventory of bacterial community in ileum and ceca mule ducks during overfeeding.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French national guidelines for the

care of animals for research purposes. Male mule ducks (MMG × PKL[AU2: Spell out MMG and PKL.]) were raised in a breeding facility belonging to the French National Research Institute for Agronomy (INRA) at the Domaine d'Artiguères, Benquet, France, accreditation number B40-037-1. The birds were placed into one pen and reared under usual conditions of light [24 h of light for the first 3 d, then natural photoperiod and temperature (26°C for the first 3 d and then a decrease of 2°C every 3 d to reach 18°C)] at the Experimental Station for Waterfowl Breeding (INRA, Artiguères, France). From the first day of life to 4 wk of age, the ducks were fed ad libitum with 2 mm pellets of a diet (starter diet) providing 11.93 MJ/kg of feed and a CP of 17.5%. From 5 to 12 wk of age, birds were fed with a diet providing 11.7 MJ/kg of feed and a CP of 15% (grower diet). At 12 wk of age, all birds were weighed and 228 ducks were selected for OF studies based on their live weights being representative of the live weight variability of the population. Among the ducks selected, 20 were killed before OF. The remaining 208 birds were housed in collective cages of 4 ducks per box, outdoor access was denied during the overfeeding time. Birds were housed in a ventilated room. They were fed hydraulically with an automatic feed dispenser (Gaveuse Mg 300 Dussau, Distribution Sas, Pecorade, Landes, France) using a diet consisting of 56% cornflour and 42% corn grain (overfeeding diet) providing 13.9 MJ/kg of feed and a CP of 8.91% with or without probiotics (10^9 *L. sakei* live cells for one meal in the overfeeding food). The composition of the different feeds is listed in Table 1. During OF, birds were fed twice a day for 2 wk. Digestive contents from 20 ducks in the groups fed diets with and without probiotic were obtained after killing the birds at 13 wk (meal 12) and at 14 wk (meal 24). Ducks were killed by exsanguination after electric stunning 3 h following their last meal to homogenize the filling levels of the ducks' digestive tract. Ducks with similar weights were selected at 5 points. Depending on the time of analysis during OF, the experiment had the following 5 experimental groups, each having $n = 20$ ducks: baseline before OF at wk 12, 1 wk during OF without administration of *L. sakei*, 1 wk during OF with administration of *L. sakei*, 2 wk during OF without administration of *L. sakei*, and 2 wk during OF with administration of *L. sakei*. Ileum and ceca were collected immediately after slaughter and kept on ice. Digestive contents of the ileum and ceca were collected by gently applying pressure along the organ and stored at -20°C .

DNA Extraction

For DNA extraction from pure bacterial cultures (Table 2), the QIAamp DNA mini kit was used following the manufacturer's recommended procedure (Qiagen, Hilden, Germany). Genomic DNA from 220 mg of ileal and cecal samples were extracted employing the QIA DNA stool kit (Qiagen) according to the manufactur-

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets [AU17: Indicate units for ingredients and nutrients.]

Item	Starter diet	Grower diet	Overfeeding diet (dry corn) DM %
Ingredient			
Wheat	15	35	—
Corn	32.6	38.69	98
Rapeseed oil free	7	12	—
Sunflower cake	8	11.35	—
Sodium carbonate	1.17	1.375	—
Dicalcium phosphate	0.675	0.575	—
Lysine	0.336	0.298	—
Salt	0.25	0.36	—
Methionine	0.235	0.086	—
Choline chloride	0.06	0.04	—
Premix + vitamin	0.3	0.23	2
Nutrient			
ME, MJ/kg	11.93	11.7	13.9
Humidity	12.46	12.61	—
CP	17.5	15	8.91
Fat	2.66	2.26	3.68
Cellulose	5.46	5.28	2.77
Ashes	5.24	4.99	—
Starch	40.21	47.32	75.91
Nutrient level (% raw material)			
Lysine	0.92	0.701	—
Methionine	0.506	0.36	—
Methionine + cysteine	0.85	0.705	—
Threonine	0.672	0.548	—
Tryptophan	0.203	0.173	—
Linoleic acid	1.43	1.2	—
Calcium	0.948	0.95	—
Phosphorus	0.575	0.519	—
Sodium	0.139	0.15	—
Available phosphorus	0.358	0.299	—
pH	—	—	5.36

er's instructions. An additional lysis step using lysozyme (140 μ L of 10 mg/mL in TE [AU3: Spell out TE here and in next sentence.] buffer) (Sigma, St. Louis, MO) to improve the DNA extraction of gram-positive bacteria (Johansen et al., 2007). The extracted DNA was eluted in 200 μ L of TE buffer and stored at -20°C .

Real-Time PCR and Primers

Twenty birds per experimental groups (with or without probiotic according to overfeeding period) were used for qPCR [AU4: Spell out q.] analysis. All primers sets are listed in Table 3. Reactions were run in duplicate in 48-well plates in a final volume of 15 μ L. The PCR mix

consisted of 7.5 μ L of SybrGreen Universal PCR Master Mix (Quanta Bioscience [AU5: Add city and state/country. Same for Applied Biosystems.]), 5.5 μ L of 500 nM primers, and 2 μ L of template DNA of appropriate dilutions or water for the negative control. Real-time PCR were performed in a StepOne instrument (Applied Biosystems) with an initial 10-min step at 95°C , 35 cycles for 15 s at 95°C , annealing/extension for 1 min at the temperature specific for each primer set, and 1 final cycle at 95°C for 15 s. Melt curve analyses were done by slowly heating the PCR mixtures from 60 to 95°C , and the cycle threshold (Ct) was determined with the StepOne Applied Biosystems software. Standard curves were generated from 10-fold serial dilutions in water of known concentrations of genomic bacterial DNA (Table 2) and used to quantify the copy number of the respective PCR reaction, with cycle threshold determined by the second derivative maximum method (Tichopad et al., 2003). Results are presented as the number of 16S rDNA copies and expressed per gram of fresh samples and $\log_{10}$ transformed for statistical analysis.

High-Throughput Sequencing and Analysis of 16S rRNA Gene Amplicons

For pyrosequencing, 3 birds (yielding 3 ileums and 3 ceca) per experimental groups were used; however, only one ileal sample was analyzed from a bird before [AU6: Clarify.] (one sample). Amplicons from the V3 to V4 regions of 16S rRNA genes (corresponding to a 460-bp region of *Escherichia coli* 16S rDNA, GenBank number J01695) were produced using bacterial forward 343F (TACGGRAGGCAGCAG; Liu et al., 2007) and reverse 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT; Andersson et al., 2008) primers. The PCR was performed in a total volume of 100 μ L containing $1\times$ PCR buffer, 200 μ M of dNTP, 1 U of Isis DNA polymerase (MP Biomedicals [AU7: Add city and state/country.]), 0.5 μ M of each primer, and 1 to 5 ng of DNA template. The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min; 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s; and a final extension step at 72°C for 7 min. The PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) followed by DNA yield quantification and quality estimation us-

Table 2. Strains used for the preparation of standard curves for real-time PCR analysis

Strain	Primer targeted	Reference
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	CIP548T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	All bacteria	NCIMB8826
	<i>Firmicutes</i>	
	<i>Lactobacillus</i> group	
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcus</i>	CIP5432
<i>Bacteroides dorei</i>	<i>Bacteroides</i>	NSMZ17855
	<i>Bacteroidetes</i>	
<i>Clostridium</i> spp.	<i>Clostridium</i>	Laboratory strain
	<i>Firmicutes</i>	

Table 3. Targets and list of primers used for the enumeration of 16S rDNA sequences representing different bacterial groups by real-time PCR

Target	Sequence (5'-3')	Temperature (°C)	Reference
All bacteria	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GACTACCGAGGTATCTAATCCTGTT	58	Walter et al. (2001)
<i>Firmicutes</i>	TGAAACTYAAAGGAATTGACG ACCATGCACCACCTGTC	61.5	Bacchetti De Gregoris et al. (2011)
<i>Bacteroidetes</i>	CRAACAGGATTAGATACCCCT GGTAAGGTCCTCGCGTAT	61.5	Bacchetti De Gregoris et al. (2011)
<i>Bacteroides</i>	GAGAGGAAGGTCCCCCAC CGCTACTTGGCTGGTTCAG	60	Layton et al. (2006)
<i>Lactobacillus</i> group	CACCGCTACACATGGAG AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58	Walter et al. (2001)
<i>Clostridium</i>	TTACTGGGTGTAAAGGG TAGAGTGCTCTTGCGTA	60	Van Dyke and McCarthy (2002)
<i>Enterococcus</i>	CCCTTATTGTTAGTTGCCATATT ACTCGTTGTACTTCCCATTGT	61	Rinttilä et al. (2004)
<i>Enterobacteria</i>	CATTGACGTTACCCGAGAAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	63	Bartosch et al. (2004)

ing a Nano-Drop instrument. Sequencing of the 16S rRNA genes was performed with a 454 GS FLX instrument (454 Life Sciences, Roche [AU8: Add city and state/country.]) and Titanium chemistry according to the manufacturer's instructions. Amplicons of 450 bp were pooled using equal amount of each PCR product. For the analysis, samples were recognized by couples of multiplex identifier (mid: 11-bp nucleotide sequence), which were fixed on the universal primers provided by Roche during the amplification. All sequences that did not have a length between 150 and 600 bp, contained 10 homopolymers, 1 N (ambiguous base), or had a mismatch in the primer sequence were removed using Python script developed by the bioinformatics platform of Toulouse (<https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/ng6/index.php/16Scleaner> [AU9: Page not found. Please update (same for Toulouse link in next section).]).

The remaining sequences were treated with the R software (<http://www.r-project.org/>) to obtain the composition of the microbiota with respect to treatment conditions. Sequences were analyzed using Mothur software v. 1.24 (Schloss et al., 2009) and were aligned with the Silva database (14,956 sequences).

Pyrotag Processing and Analysis

A total of 292,043 16S rRNA gene sequences (also referred to as 16S pyrotags) were obtained with the 454 Titanium pyrosequencing run for the 28 samples. The 16S pyrotags were sorted based on their respective barcodes to form a total of 28 pyrotag library representing the 28 collected ileal and cecal samples. Sequences were sequentially filtered using a Python script developed by the bioinformatic platform of Toulouse (<https://mulcyber.toulouse.inra.fr/plugins/mediawiki/ng6/index.php/16Scleaner>), first by removing those sequences with a sequencing length less than 150 nt (35,880 sequences), those with at least one ambiguous base (8,887 sequences) or with a homopolymer stretch longer than

8 bases (140 sequences), those that did not match the proximal PCR primer sequences (with 2 mismatches allowed; 801 sequences), and finally those including both primer sequences but with a length shorter than 350 pb (295 sequences). A total of 246,090 sequences were retained corresponding to $8,789 \pm 1,510$ sequences per samples.

Taxonomic Classification and Statistical Analysis

Filtered sequences were analyzed using MOTHUR software v. 1.24; (Schloss et al., 2009) Readings were aligned with the SILVA alignment database provided by the MOTHUR software (14,956 [AU10: 14,956?] sequences corresponding to unique sequences in the SSU REF database v102; Pruesse et al., 2007), and an alignment quality was calculated using the SILVA secondary structure map file (1,072 sequences were removed). After calculating a pairwise distance between aligned sequences, the sequences were clustered into operational taxonomic units (OTU, cutoff 0.05 using a farthest neighbor clustering). Rarefaction curves, abundance-based coverage estimator (ACE; defines the coverage of sampling), and Chao1 richness (calculates the estimated true species diversity of a sample) were calculated with the Rarefaction and Chao1 Estimator. Shannon α -diversity [AU11: Confirm α -diversity.] index (measure biodiversity) was calculated according to Hayek and Buzas (1996), and the results of diversity indexes were obtained using the Vegan library on the R software (Oksanen et al., 2010). For real-time PCR results, the Mann-Whitney test (nonparametric test) in the R software was used. Two independent samples of respective sizes n_1 and n_2 were available. If n_1 and $n_2 \geq 8$, the U statistic follows a normal distribution. The null hypothesis (H_0) is the sum of the ranks for the sample X is analogous to Y. $U_{X,Y} = \min(U_X, U_Y)$ was defined for testing the hypothesis (H_0). If the size n_1 and n_2 are lower than 20 and higher than 8, for a

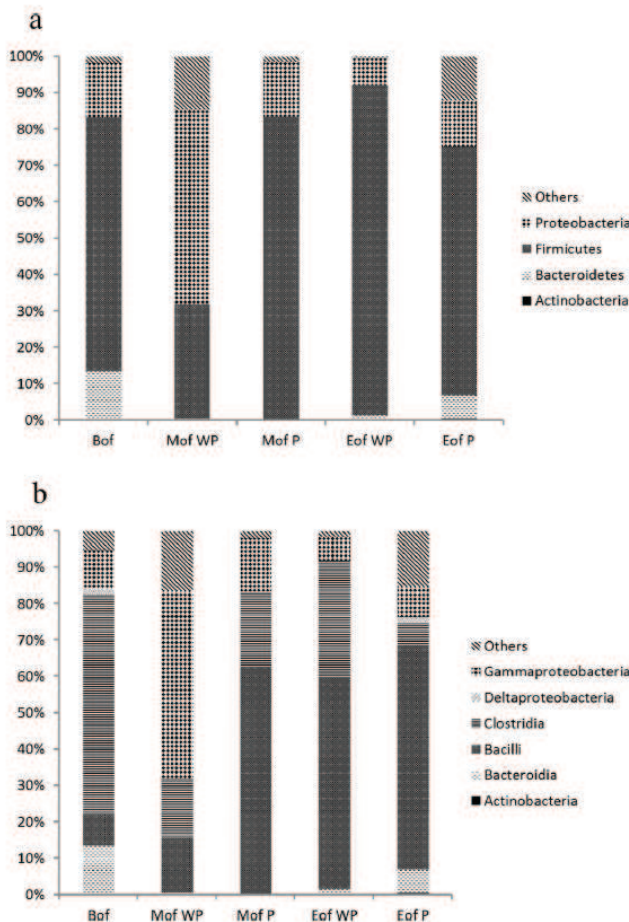


Figure 1. Percentage contribution of sequences (%) evaluated at the phylum (a) and class (b) levels to the total number of sequences in ileum during overfeeding (OF) and with or without probiotics (3 samples by experimental groups). Before OF (Bof), mid-OF without probiotics (Mof WP), mid-OF with probiotics (Mof P), end OF without probiotics (Eof WP), end OF (Eof P).

significance level α ($\alpha = 5\% = 0,05$), Mann-Whitney tables provide a critical value c to decide if $U_{X,Y,obs} > c$, H_0 was accepted; if $U_{X,Y,obs} \leq c$, H_0 was rejected.

RESULTS

Bacterial Community in Mule Ducks

Microbial diversity in samples was estimated by calculating the number of OTU. For all samples of the ileum, the number of OTU with a cutoff of 0.05 was 791 ± 63 with coverage by sample of $96.09 \pm 0.97\%$. The average number of sequences was 10,100; 8 different phyla were recorded for 118 different taxa. Furthermore, the Chao1, the ACE, and the Shannon index were, respectively, $1,472 \pm 105.3$, $1,943 \pm 136.3$, and 3.98 ± 0.17 (Table 4). The majority of the diversity of the ileum before OF was represented by *Firmicutes* sequences (70%). The rest was composed of *Proteobacteria* (14.98%) and *Bacteroidetes* (13.27%) sequences. Other phyla such as *Actinobacteria* or *Fusobacteria* represented less than 2% (Figure 1a). At the class level, the sequencing data indicated that the microbiota were mainly composed of *Clostridia* (60.50%) and *Bacilli* (8.63%) from the *Firmicutes*, *Bacteroidia* (13.14%) from the *Bacteroidetes*, and *Gammaproteobacteria* (10.73%) in the phylum *Proteobacteria*.

Regarding ceca samples, the number of OTU at a cutoff of 0.05 was $2,111 \pm 622$. The average number of sequences was 14,031 with 9 phyla represented by 138 different taxa. The Chao1, the ACE, and the Shannon index were, respectively, $4,129.49 \pm 1,166.61$, $6,246.55 \pm 1,760.35$, and 5.88 ± 0.27 (Table 4). The sequences retrieved from the ceca were mainly composed of *Bacteroidetes* sequences (57.03%). *Firmicutes* sequences amounted to 33.95% of the total, and *Proteobacteria* sequences accounted for 7.26% (Figure 2a). The sequences from 2 classes were dominant in the ceca, *Bacteroidia* (56.34%) from *Bacteroidetes*, and *Clostridia* (32.85%) from *Firmicutes*.

Effect of Overfeeding on the Microbial Community

Overfeeding triggered changes in bacterial microbiota in the ileum because before OF, the microbiota

Table 4. Estimators of diversity during overfeeding (OF) in ileum and ceca of mule ducks

Item	Period ¹					SEM
	Bof	Mof WP	Mof P	Eof WP	Eof P	
Ileum						
Number of operational taxonomic unit	791	441	302	320	569	63
Chao1 estimated richness	1,472.1	723.7	530.4	577.3	884.3	105.3
ACE ²	1,943.2	956.6	766.4	770.3	1,052.1	136.3
Shannon diversity index	3.98	3.52	2.59	2.94	3.22	0.17
Ceca						
Number of operational taxonomic unit	2,111	654	1257	780	361	209
Chao1 estimated richness	4,129.5	1,237.2	1,826.8	1,598.5	721.5	403.4
ACE	6,246.6	1,759.5	2,758.8	2,297.8	1,079	609.2
Shannon diversity index	5.88	4.74	5.15	4.63	4.46	0.19

¹Bof: before OF; Mof WP: mid-OF without probiotics; Mof P: mid-OF with probiotics; Eof WP: end OF without probiotics; Eof P: end OF. Three samples by experimental groups.

²ACE = abundance-based coverage estimator.

6

VASAI ET AL.

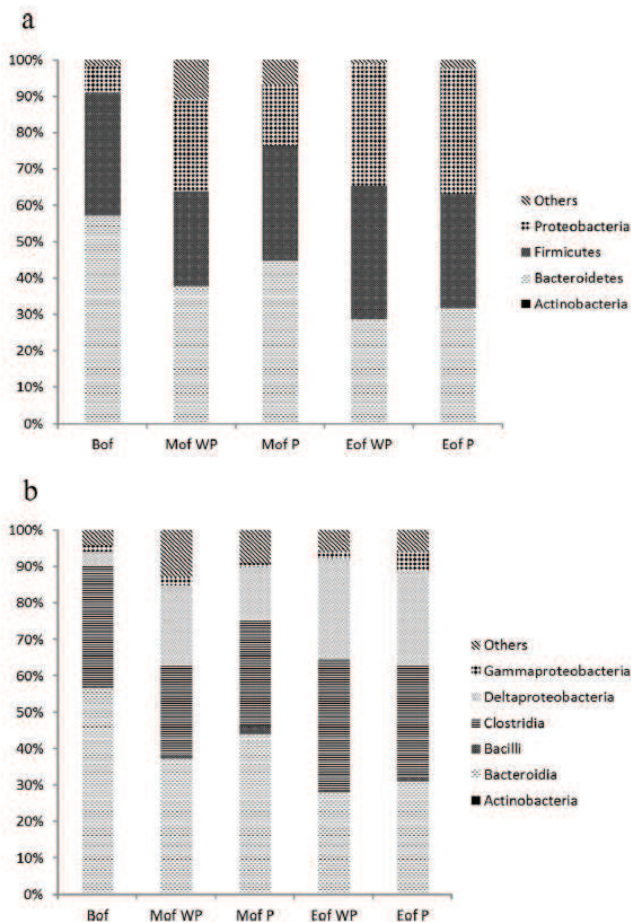


Figure 2. Percentage contribution of sequences (%) evaluated at the phylum (a) and class (b) levels to the total number of sequences in ceca during OF and with or without probiotics (3 samples by experimental groups). Before overfeeding (OF; Bof), mid-OF without probiotics (Mof WP), mid-OF with probiotics (Mof P), end OF without probiotics (Eof WP), end OF (Eof P).

was mainly composed of *Clostridia* (60.5%), followed by *Bacteroidia* (13.1%), *Bacilli* (8.6%), and *Gammaproteobacteria* (10.7%) as indicated by the sequencing data. At mid-OF, the *Gammaproteobacteria* were most represented (51.6%), whereas *Clostridia* represented only 16.3% of the population and *Bacteroidia* almost disappeared (0.4%). At the end of the OF phase, *Bacilli* (58.1%) were dominant but *Clostridia* still were an important component of the bacterial population with 32.3% (Figure 1b). Significant changes were observed using real-time PCR analysis of different targets. Toward mid-OF, a statistically significant decrease in *Bacteroides* and *Clostridium* was indicated by the pyrosequencing results. Between mid-OF and the end of OF, *Bacteroidetes* including *Bacteroides*, *Firmicutes* including *Enterococcus* numbers apparently decreased, whereas *Clostridium* number increased (Table 5).

The cecal microbiota consisted essentially of *Bacteroidia* (56.34%) and *Clostridia* (32.85%). Some changes were detected during OF but these 2 classes stayed

dominant during OF. At mid-OF, there was a significant increase in *Deltaproteobacteria* (21.79%), concomitant to a decrease in *Bacteroidia* (37.01%) and *Clostridia* (24.85%), but these 3 classes were still dominant at the end of OF, representing 90% of the total bacterial population (Figure 2b). Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) profiles (representing the repartition of different families) between different periods of OF in ceca indicated that the bacterial communities in cecal samples were separated with respect to the 3 different OF periods (Figure 3). Analyses of similarity yielded an r of 0.346 and a P -value of 0.09 between before and mid-OF, $r = 0.143$ and a $P = 0.09$ between mid and end OF and $r = 0.636$ and a $P = 0$ between the first and the last period of OF. These changes were confirmed by real-time PCR as a statistically significant decrease in *Bacteroidetes* and *Enterococcus* after 1 wk of OF. Between mid-OF and the end of OF the total bacterial load, *Bacteroides*, *Firmicutes* including *Clostridium*, and *Lactobacillus* group decreased (Table 5).

Effect of a Probiotic on the Microbial Community

In samples from probiotics-fed ducks, richness indicators decreased at mid-OF only in the ileum whereas in the ceca, the decrease of these indexes only occurred at the end of OF. In the ileum at mid-OF, the addition of *L. sakei* (which is part of the *Bacilli* class) triggered an increase in the *Bacilli* class from 15.05% without probiotics to 62.6% with them. This increase coincided with a decrease in *Gammaproteobacteria* from 51.57 to 14.89%, whereas the *Clostridia* increased slightly from 16.34 to 20.35%. At the end of OF, there was a decrease in the percentage of *Clostridia* (–25.95%) when *L. sakei* had been fed [AU12: Clarify], whereas conversely there was an increase in *Bacteroidia* of around 6.5% and of the *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Epsilonproteobacteria*. At the end of OF, the *Bacilli* represented more than 60% of the total population (Figure 1b). Analyses by nMDS showed that the bacterial community can be separated regarding the addition of *L. sakei*, since an r -value of 0.349 and a P of 0.025 were obtained. These data indicate separated but strongly overlapping groups (Figure 4). Real-time PCR data confirmed this effect on bacterial composition: *Bacteroides* statistically decreased at mid-OF with or without probiotics but with a strong effect when *L. sakei* was administered (Table 5). A slight decrease in total bacterial load and the representatives of the *Firmicutes* including the *Lactobacillus* group was observed. Sequences representing the *Enterobacteria* decreased strongly (Table 5).

Treatment with *L. sakei* did not trigger changes in the number of sequences representing the *Bacilli* in the ceca. At mid-OF, only a small percentage of corresponding *Bacilli* sequences (2.36%) were found. In contrast, *Deltaproteobacteria* sequences decreased from 21.79 to

PROBIOTICS AND INTESTINAL MICROBIOTA

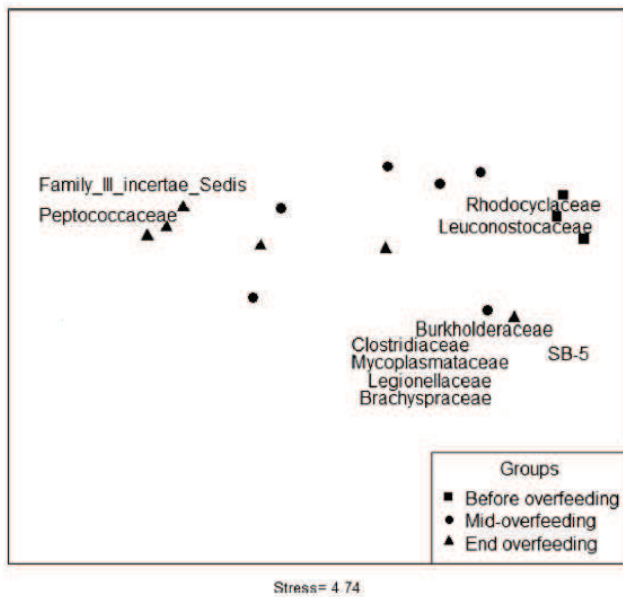


Figure 3. Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) profile showing the distribution of different families of the different samples studied before, mid, and end of overfeeding in ceca.

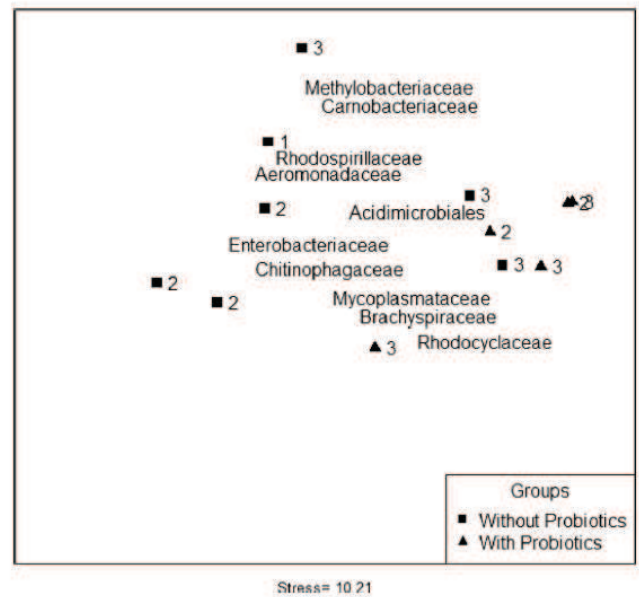


Figure 4. Nonmetric multidimensional scaling (nMDS) profile showing the distribution of different families of the different samples studied without or with probiotics in 3 periods of overfeeding (OF) in the ileum. Before (1), mid (2), and end (3) of OF in the ileum.

14.40% whereas *Clostridia* and *Bacteroidia* sequences increased by 4.20 and 6.83%, respectively. At the end of OF there was a decrease in *Clostridia* numbers (−5.23%), whereas there was a slight increase in *Bacteroidia* (+2.95%) and *Gammaproteobacteria* numbers (+3.34%) in samples from probiotics-fed birds (Figure

2b). The nMDS analysis did not show a separation of groups with respect to probiotics-fed and probiotic-free birds (data not shown). Statistical changes due to the probiotics used were also not observed with the real-time PCR analysis.

Table 5. Statistical effect of overfeeding (OF) and addition of probiotics on different phyla, genus, or groups in ileum or ceca of mule ducks¹

Item	Period ²					SE	Significance ³	P-value
	Bof	Mof WP	Mof P	Eof WP	Eof P			
Ileum (20 samples by experimental groups)								
All bacteria	8.39	8.95	9.98	9.32	8.74	0.61	d	0.019
<i>Bacteroidetes</i>	6.25	6.38	6.36	5.37	5.43	0.51	b	<0.001
<i>Bacteroides</i>	6.31	5.79	5.60	4.74	4.72	0.69	a	0.011
							c	0.026
							b	<0.001
<i>Firmicutes</i>	9.85	10.00	10.75	10.05	9.25	0.54	b	0.018
							d	0.0031
<i>Clostridium</i>	8.74	6.60	6.57	8.6	8.79	1.17	a	0.04
							b	<0.001
<i>Enterococcus</i>	4.90	5.01	5.33	3.69	4.32	0.65	b	0.0002
<i>Lactobacillus</i> group	8.33	8.66	9.43	9.04	8.74	0.41	d	0.033
<i>Proteobacteria</i>								
<i>Enterobacteria</i>	6.73	8.00	8.76	8.23	6.82	0.89	d	<0.001
Ceca (20 samples by experimental groups)								
All bacteria	11.27	11.78	11.88	10.10	10.4	0.81	b	<0.001
<i>Bacteroidetes</i>	9.98	9.19	8.96	8.46	8.87	0.56	a	<0.001
<i>Bacteroides</i>	10.07	10.47	10.30	8.29	8.85	0.97	b	<0.001
<i>Firmicutes</i>	10.92	12.23	12.04	11.05	11.07	0.62	b	0.0001
<i>Clostridium</i>	11.92	12.18	12.34	11.01	12.23	0.59	b	<0.001
<i>Enterococcus</i>	5.36	3.53	4.27	4.89	4.86	0.71	a	<0.001
<i>Lactobacillus</i> group	8.87	8.91	10.05	7.82	7.97	0.90	b	<0.001
<i>Proteobacteria</i>								
<i>Enterobacteria</i>	8.24	9.53	9.03	9.27	9.05	0.48	—	—

¹The median is expressed as log₁₀ copies number of 16S rDNA/g of fresh digestive content

²Bof: before OF; Mof WP: mid-OF without probiotics; Mof P: mid-OF with probiotics; Eof WP: end OF without probiotics; Eof P: end OF.

³Overfeeding effect: a: Bof versus Mof WP, b: Mof WP versus Eof WP. Probiotic effect: c: Mof WP versus Mof P, d: Eof WP versus Eof P.

DISCUSSION

As in many other studies on intestinal microbiota of birds and mammals, the current study provides evidence for the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* as the major phyla, a finding that suggests their important role in metabolism and host physiology (Ley et al., 2008; Kohl, 2012). The *Proteobacteria* were the second most common phylum after *Firmicutes* in ileal samples based on 454 pyrosequencing, as was also observed in feces of Canada geese (Lu et al., 2009) and in Muscovy ducks (*Cairina moschata*; Vasai et al., 2013). Interestingly, mule ducks are a hybrid of a male Muscovy and a female Pekin duck (*Anas platyrhynchos*). Pekin, Muscovy, and mule ducks differ in their ability to produce a fatty liver because Mule and Muscovy ducks show a lower capacity for fat storage than Pekin ducks. In contrast to chickens, where obligate anaerobes dominated ceca samples (the *Clostridia* class from *Firmicutes* and *Bacteroidetes*) and facultative anaerobes (*Bacilli* class and especially *Lactobacillus*) are dominant in the ileum (Lu et al., 2008), in mule ducks, obligate anaerobes were dominant in both ileal (class *Clostridia* and *Bacteroidia*) and cecal samples. Higher numbers of sequences representing the *Clostridia* in ducks than in chickens suggest that the bacterial digestive metabolism in chicken and ducks could be somewhat different.

Overfeeding increased the relative abundance of *Firmicutes* in the ileum and especially a component of the *Bacilli* class, the *Lactobacillus* group as previously described for Pekin and Muscovy ducks (Vasai et al., 2013). These bacteria are well known as amylolytic bacteria and frequently increase in animals such as pigs and rats fed diets rich in starch like pigs and rats [AU13: Please clarify sentence.] (Wang et al., 2002; Regmi et al., 2011). Interestingly, in cattle, it has been shown that *Lactobacillus* increase with diets containing more than 71% of starch on concentrate with a composition very close to that the feed used in the present study (Brown et al., 2006). According to the PCR results, *Bacteroides* and *Clostridium* numbers decreased, but interestingly, for *Clostridium* this decrease was reversed at the end of OF. The clustering of the results for the cecal samples shows a good separation into different groups regarding the OF period, before, mid, or end of OF, probably due to the negative effect on the total bacterial load especially the *Bacteroidetes* including *Bacteroides*, *Firmicutes* including *Clostridium*, *Lactobacillus* group, and *Enterococcus*. *Bacteroides* is well known to ferment a variety of plant polysaccharides like amylose starch (Salysers et al., 1977). Interestingly, when *Enterococcus faecium* was used as probiotic in piglets, it increased the nutrient availability and improved the absorption of glucose (Lodemann et al., 2006).

Lactobacillus sakei reduced the diversity indexes at mid-OF only in the ileum, whereas in the ceca, the decrease of these indexes only occurred at the end of OF. In newborn chicks and ducks inoculated intragastrically with *Lactobacillus* species, growth performance as well

Firmicutes/Bacteroides ratios increased in comparison with those of controls (Angelakis and Raoult, 2010), but in the current study no significant effect on growth performance and weight of the fatty liver was observed (data not shown). Feeding of *L. sakei* triggered an increase in ileal *Bacilli* numbers and a decrease in sequences representing the phylum. In poultry species, the use of lactobacilli alone or in mixtures of bacteria reduced the numbers of coliforms including *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Clostridium perfringens* as determined by culture-dependent methods (Fuller, 1977; Francis et al., 1978; Watkins et al., 1982; Watkins and Kratzer, 1983; Mountzouris et al., 2007). Molecular methods confirmed the changes induced by probiotics on bacterial communities (Netherwood et al., 1999). Real-time PCR has been used to confirm the beneficial effect of *L. sakei* by decreasing *Enterobacteria*, suggesting that *L. sakei* can protect against potential pathogens (Chaucheyras-Durand et al., 2006). The number of sequences representing *Bacteroides* significantly decreased with probiotic supplementation, suggesting some level of antagonisms between *L. sakei* and these bacteria. The separation of the sequence data into 2 separated groups based on the diets with and without the probiotic (Figure 4) suggests that the bacterial communities were more affected by *L. sakei* than by overfeeding. Because a decrease in the total bacterial load at the end of OF in the ileum was observed, it is possible that *L. sakei* inhibited growth of several other bacteria. The cecal samples showed a very different pattern than the ileal samples in response to probiotics. First of all, the probiotics did not change the microbial communities enough to see an effect based on nMDS analysis and bacterial composition. In chickens, it is well known that *Lactobacillus* spp. (facultative anaerobes) are an important component of the ileal microbiota, whereas *Clostridia* and *Bacteroides* (obligate anaerobes) are predominant in cecal samples (Lu et al., 2003). This observation could explain why feeding *L. sakei* did not have a noticeable effect in the ceca. Perhaps, the complex anaerobic environment is very refractory to changes in the microbial community. Overall, the real-time PCR data were in agreement with the sequencing results; however, for samples from the mid-OF and end OF periods, pyrosequencing showed an increase whereas real-time PCR revealed a slight decrease in *Firmicutes* numbers. The reason(s) for the discrepancy are not known. To conclude, this work, using both real-time PCR and high-throughput pyrosequencing based on 16S rRNA genes in ileal and cecal samples, gives a first report on the microbial community in ducks and the effect of administering probiotics during overfeeding on the abundance of major groups. The microbial diversity of mule ducks is dominated by *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria*, and OF modifies bacterial communities of ceca samples, whereas probiotics show an important effect on ileal samples. The increase in lactobacilli through the OF process when adding *L. sakei* as a probiotic could potentially

improve the birds' health and could be of great interest to the poultry industry.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Conseil Général des Landes and the Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras (CIFOGR) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for the ducks. We thank Julien Arroyo for his constructive comments on the manuscript. We are grateful to Jérôme Lluch and Clémence Genthon and Béatrice Gabinaud for their excellent technical assistance **[AU14: Provide affiliations and locations for all individuals mentioned. Add city and country for institutions.]**.

REFERENCES

- Andersson, A. F., M. Lindberg, H. Jakobson, F. Bäckhed, P. Nyrén, and L. Engstrand. 2008. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 3:e2836. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002836>.
- Angelakis, E., and D. Raoult. 2010. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. *PLoS ONE* 5 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010463>.
- Bacchetti De Gregoris, T., N. Aldred, A. S. Clare, and J. G. Burgess. 2011. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J. Microbiol. Methods* 86:351–356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2011.06.010>.
- Bartosch, S., A. Fite, G. T. Macfarlane, and M. E. T. McMurdo. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3575–3581. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.6.3575-3581.2004>.
- Brown, M. S., C. H. Ponce, and R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 84:E25–E33.
- Chaucheyras-Durand, F., J. Madic, F. Doudin, and C. Martin. 2006. Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4136–4142. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02600-05>.
- Czerucka, D., and P. Rampal. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infect.* 4:733–739.
- Davall, S., N. Rideau, G. Guy, J. M. André, and R. Hoo-Paris. 2003. Pancreatic hormonal and metabolic responses in overfed ducks. *Horm. Metab. Res.* 35:439–443.
- Francis, C., D. M. Janky, A. S. Arafa, and R. H. Harms. 1978. Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in the diets of turkey poults. *Poult. Sci.* 57:1687–1689.
- Fuller, R. 1977. The importance of *Lactobacilli* in maintaining normal microbial balance in the crop. *Br. Poult. Sci.* 18:85–94.
- Fuller, R. 1984. Microbial activity in the alimentary tract of birds. *Proc. Nutr. Soc.* 43:55–61.
- Fuller, R. 1995. Probiotics. *The Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, UK.
- Godoy-Vitorino, F., K. C. Goldfarb, E. L. Brodie, M. A. Garcia-Amado, F. Michelangeli, and M. G. Domínguez-Bello. 2010. Developmental microbial ecology of the crop of the folivorous hoatzin. *ISME J.* 4:611–620. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.147>.
- Hammons, S., P. L. Oh, I. Martínez, K. Clark, V. L. Schlegel, E. Sitorius, S. E. Scheidele, and J. Walter. 2010. A small variation in diet influences the *Lactobacillus* strain composition in the crop of broiler chickens. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:275–281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2010.04.003>.
- Hayek, L. C., and M. A. Buzas. 1996. *Surveying Natural Populations*. Columbia University Press, New York, NY.
- Johansen, C. H., L. Bjerrum, and K. Pedersen. 2007. Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Vet. Scand.* 49:30. <http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-49-30>.
- Knarreborg, A., M. A. Simon, R. M. Engberg, B. B. Jensen, and G. W. Tannock. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5918–5924. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.12.5918-5924.2002>.
- Kohl, K. D. 2012. Diversity and function of the avian gut microbiota. *J. Comp. Physiol. B.* 182:591–602. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-012-0645-z>.
- La Ragione, R. 2003. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet. Microbiol.* 94:245–256. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135\(03\)00077-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00077-4).
- Layton, A., L. McKay, D. Williams, V. Garrett, R. Gentry, and G. Saylor. 2006. Development of Bacteroides 16S rRNA gene Taq-Man-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4214–4224. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01036-05>.
- Leser, T. D., and L. Mølbak. 2009. Better living through microbial action: The benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.* 11:2194–2206. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01941.x>.
- Ley, R. E., M. Hamady, C. Lozupone, P. J. Turnbaugh, R. R. Ramey, J. S. Bircher, M. L. Schlegel, T. A. Tucker, M. D. Schrenzel, R. Knight, and J. I. Gordon. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320:1647–1651. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1155725>.
- Liu, Z., C. Lozupone, M. Hamady, F. D. Bushman, and R. Knight. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35:e120. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm541>.
- Lodemann, U., K. Hübener, and H. Martens. 2006. Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 60:35–48.
- Lu, J., C. Hofacre, F. Smith, and M. D. Lee. 2008. Effects of feed additives on the development of the ileal bacterial community of the broiler chicken. *animal* 2. 10.1017/s1751731108001894.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon, C. Hofacre, J. J. Maurer, and M. D. Lee. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6816–6824. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.11.6816-6824.2003>.
- Lu, J., J. W. Santo Domingo, S. Hill, and T. A. Edge. 2009. Microbial diversity and host-specific sequences of Canada goose feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5919–5926. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00462-09>.
- Mead, G. 1989. Microbes of the avian cecum: Types present and substrates utilized. *J. Exp. Zool. Suppl.* 3:48–54.
- Moreau, M., P. Raibaud, and M. C. Muller. 1982. Relation entre le développement du système immunitaire intestinal à IgA et l'établissement de la flore microbienne dans le tube digestif du souriceau holoxénique. *Ann. Immunol.* 133D:29–39.
- Mountzouris, K. C., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poult. Sci.* 86:309–317.
- Nava, G. M., L. R. Bielke, T. R. Callaway, and M. P. Castañeda. 2005. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: The poultry experience. *Anim. Health Res. Rev.* 6:105–118.
- Netherwood, T., H. J. Gilbert, D. S. Parker, and A. G. O'Donnell. 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5134–5138.
- Oksanen, J., F. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, R. O'Hara, G. Simpson, P. Solymos, M. Stevens, and H. Wagner. 2010. Veg-

- an: Community Ecology Package. R package version 1.17-1, 2010[**AU15: Provide name and location of publisher.**]
- Pruesse, E., C. Quast, K. Knittel, B. M. Fuchs, W. Ludwig, J. Peplies, and F. O. Glockner. 2007. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35:7188–7196. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm864>.
- Rappé, M. S., and S. J. Giovannoni. 2003. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369–394. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>. [**AU16: Please add an in-text citation or delete the reference.**]
- Regni, P. R., B. U. Metzler-Zebeli, M. G. Ganzle, T. A. T. G. van Kempen, and R. T. Zijlstra. 2011. Starch with high amylose content and low in vitro digestibility increases intestinal nutrient flow and microbial fermentation and selectively promotes *Bifidobacteria* in pigs. *J. Nutr.* 141:1273–1280. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.111.140509>.
- Ridsdale, J. A., and J. E. L. Corry. 1999. Study of the caecal microflora of broiler ducks: A comparison with published data for chickens. *Anaerobe* 5:321–323.
- Rinttilä, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krognus, and A. Palva. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 97:1166–1177. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x>.
- Saengkerdsut, S., P. Herrera, C. L. Woodward, R. C. Anderson, D. J. Nisbet, and S. C. Rieke. 2007. Detection of methane and quantification of methanogenic archaea in faeces from young broiler chickens using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:629–634. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02243.x>.
- Salyers, A. A., J. R. Vercellotti, S. E. H. West, and T. D. Wilkins. 1977. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:319–322.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7537–7541. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01541-09>.
- Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:405–440. <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.003>.
- Servin, A. L., and M.-H. Cocomier. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17:741–754. [http://dx.doi.org/10.1016/s1521-6918\(03\)00052-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1521-6918(03)00052-0).
- Tichopad, A., M. Dilger, G. Schwarz, and M. W. Pfaffl. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* 31:e122.
- Van Dyke, M. L., and A. J. McCarthy. 2002. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2049–2053. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.4.2049-2053.2002>.
- van Winsen, R. L., B. A. P. Urlings, L. J. A. Lipman, J. M. A. Snijders, D. Keuzenkamp, J. H. M. Verheijden, and F. van Knapen. 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3071–3076. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.7.3071-3076.2001>.
- Vasai, F., K. Brugirard Ricaud, M. D. Bernadet, L. Cauquil, O. Bouchez, S. Combes, and S. Davail. 2013. Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina moschata* (Muscovy) ducks. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12 <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12217>.
- Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro, and W. P. Hammes. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2578–2585.
- Wang, X., I. L. Brown, D. Khaled, M. C. Mahoney, A. J. Evans, and P. L. Conway. 2002. Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylo-maize) starch granules. *J. Appl. Microbiol.* 93:390–397.
- Watkins, B. A., and F. H. Kratzer. 1983. Effect of oral dosing of *Lactobacillus* strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poult. Sci.* 62:2088–2094.
- Watkins, B. A., B. F. Miller, and D. H. Neil. 1982. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poult. Sci.* 61:1298–1308.
- Wright, A.-D. G., K. S. Northwood, and N. E. Obispo. 2009. Rumen-like methanogens identified from the crop of the folivorous South American bird, the hoatzin (*Opisthocomus hoazin*). *ISME J.* 3:1120–1126. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.41>.

Résultats complémentaires :

Les résultats complémentaires présentés ci-dessous représentent les changements observés au niveau de l'abondance relative des genres majoritaires composant le microbiote des canards mulards. Ces changements prennent en compte l'effet du gavage ainsi que l'impact de l'ajout du probiotique *Lactobacillus sakei*.

Iléon Mulard (Abondance relative %)	Avant gavage	Mi gavage		Fin gavage	
		Sans probiotiques	Avec probiotiques	Sans probiotiques	Avec probiotiques
Firmicutes					
Bacilli					
<i>Lactobacillales</i>					
<i>Lactobacillaceae; Lactobacillus</i>	5,55	3,13	43,03	51,92	59,69
<i>Streptococcaceae; Lactococcus</i>	0,47	10,65	0,18	1,03	0,13
Clostridia					
Clostridiales					
<i>Clostridiaceae; Clostridium</i>	41,07	13,10	5,52	30,89	1,22
<i>Lachnospiraceae; Incertae_Sedis</i>	-	0,15	14,78	0,03	0,89
Fusobacteria					
Fusobacteria					
<i>Fusobacteriales</i>					
<i>Fusobacteriaceae; Fusobacterium</i>	0,31	13,55	1,35	0,20	11,59
Proteobacteria					
Gammaproteobacteria					
<i>Enterobacteriales</i>					
<i>Enterobacteriaceae; Enteric_Bacteria_cluster</i>	8,43	39,45	14,59	3,00	0,30
<i>Pseudomonadales</i>					
<i>Pseudomonadaceae; Pseudomonas</i>	1,47	1,70	0,25	2,98	6,99
Non apparentées	1,27	0,56	0,09	0,11	0,09

Tableau 16 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote chez le canard mulard lors du gavage avec ou sans ajout de probiotiques dans l'iléon (n=3).

Avant gavage le microbiote iléal des canards mulards présente une majorité de *Clostridium* (environ 40 %) ainsi que d'*Enterobacteriaceae* (8,46%) et de *Lactobacillus* (5,55%) (Tableau 16). A mi-gavage on peut observer différents changements au niveau de la composition du microbiote. Le genre *Lactococcus* ainsi que les *Fusobacterium* augmentent d'environ 10% et les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* augmentent d'environ 30% tandis que les *Clostridium* diminuent fortement (-28%). En fin de gavage une augmentation des *Lactobacillus* (environ 50%) ainsi que des *Clostridium* est détectée (environ 15%).

L'ajout de probiotiques permet de modifier la composition de la communauté bactérienne au niveau genre. A mi-gavage on observe une forte augmentation des *Lactobacillus* ainsi que des *Lachnospiraceae* tandis que les abondances des *Clostridium*, *Lactococcus* et *Enterobacteriaceae* diminuent par rapport au gavage sans ajout de probiotiques. A fin gavage une forte diminution des *Clostridium* (environ 30%) est observée tandis que les *Fusobacterium* augmentent par rapport aux abondances en absence de probiotiques. Malgré l'ajout de probiotiques l'abondance du genre *Lactobacillus* ne change pas et représente environ 60% de la population suggérant que l'effet du substrat est aussi important voire plus que l'ajout de probiotique.

Caeca Mulard (b) (abondance relative %)	Avant gavage	Mi gavage		Fin gavage	
		Sans probiotiques	Avec probiotiques	Sans probiotiques	Avec probiotiques
Bacteroidetes					
Bacteroidia					
<i>Bacteroidales</i>					
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	36,64	18,96	22,92	14,38	14,39
<i>Porphyromonadaceae;Barnesiella</i>	1,98	5,63	2,22	1,73	2,06
<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	4,39	2,14	3,98	0,94	0,91
<i>Prevotellaceae;uncultured</i>	2,84	1,22	1,90	0,36	0,23
<i>Rikenellaceae;Alistipes</i>	2,59	4,45	4,73	4,9	7,17
<i>unclassified;unclassified</i>	3,97	2,26	2,82	1,71	2,22
Firmicutes					
Clostridia					
<i>Clostridiales</i>					
<i>Lachnospiraceae;Incertaine_Sedis</i>	2,34	1,62	2,96	3,79	1,55
<i>Lachnospiraceae;unclassified</i>	1,95	1,04	1,54	2,04	1,00
<i>Ruminococcaceae;Faecalibacterium</i>	4,75	1,09	4,11	3,54	0,81
<i>Ruminococcaceae;Incertaine_Sedis</i>	6,17	6,00	4,98	8,26	8,36
<i>Ruminococcaceae;Oscillibacter</i>	1,62	2,55	1,78	1,66	1,62
<i>Ruminococcaceae;Subdoligranulum</i>	1,79	0,63	0,62	3,89	3,23
<i>Ruminococcaceae;unclassified</i>	4,29	2,95	3,12	2,25	2,29
<i>Ruminococcaceae;uncultured</i>	4,02	3,05	4,16	0,98	1,48
<i>unclassified;unclassified</i>	1,09	2,30	2,45	3,12	2,96
Proteobacteria					
Deltaproteobacteria					
<i>Desulfovibrionales</i>					
<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	3,12	20,14	13,0	9,52	7,88
Non apparentées	0,82	6,44	2,34	0,93	1,81

Tableau 17 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote chez le canard mulard lors du gavage avec ou sans ajout de probiotiques dans les caeca (n=3).

Comme chez les canards Pékin et Barbarie, le microbiote des caeca est très peu touché par le gavage et ici par l'ajout de probiotiques. (Tableau 17). Les principaux changements

observés concernent les *Bacteroides*, le gavage a tendance à diminuer l'abondance de ce genre (environ – 20%) tandis que l'ajout de probiotiques semble n'avoir que très peu d'effet sur ce genre au niveau des caeca. On observe également une augmentation des *Desulfovibrio* à mi-gavage sans ajout de probiotiques. Ce sont des bactéries sulfato-réductrices productrices d'acétate (Devereux, 1990). A mi-gavage avec ajout de probiotiques ou en fin gavage on observe une baisse de l'abondance de ce genre restant cependant plus importante qu'avant gavage.

Les différents résultats montrent l'effet du gavage ainsi que l'ajout de probiotiques sur le microbiote intestinal des canards mulards. Comme vu chez les deux types génétiques parentaux (Pékin et Barbarie) le gavage entraîne des modifications de la composition du microbiote notamment dans l'iléon ainsi que dans les caeca mais avec un impact plus faible (Vasaï *et al.*, 2013). Ici nous avons pu observer que le gavage modifie également la composition du microbiote des canards mulards dans les deux segments étudiés. Ajouté à ce phénomène l'effet de l'ajout de probiotiques a également été étudié et montre un impact important au niveau de l'iléon caractérisé par une forte augmentation du genre *Lactobacillus* qui devient largement majoritaire au sein de ce segment tandis que les caeca ne semblent pas affectés par cet ajout. Ce genre bactérien de par ses différentes activités (activités amylolytiques, production de bactériocines, acide lactique,...) pourrait permettre une amélioration du bien-être de l'hôte durant le gavage. Cependant, durant cette étude, les performances zootechniques des animaux n'ont pas été modifiées.

Article 3 :

La première étude réalisée au cours de la thèse nous a permis de faire l'inventaire de la composition du microbiote des canards Pékin et des canards de Barbarie avant gavage ainsi que voir l'effet du gavage sur celui-ci. Dans cette étude nous nous proposons de voir quel est l'effet de l'addition de cadmium sur le microbiote intestinal lors de la phase de gavage. En effet le cadmium qui est un métal lourd est retrouvé en tant que contaminant des eaux dans le sud-ouest de la France. Nous avons montré ici que la bioaccumulation au niveau des reins est influencée par le niveau de contamination. Quelle que soit la période, les canards témoins présentaient des niveaux plus bas que les animaux ayant reçu des contaminations de 1 mg/kg d'aliment qui sont eux-mêmes plus bas que ceux ayant reçu des contaminations de 10 mg/kg le cadmium s'accumulant de façon plus importante selon le temps d'exposition. Nous avons ainsi pu détecter une interaction entre la période de gavage et le niveau de contamination en cadmium ainsi qu'une interaction entre le type génétique (Pékin ou Barbarie) et la présence de cadmium. Nous avons également remarqué que les canards de Barbarie accumulaient plus que les canards Pékin. Cette étude nous a montré que la présence de cadmium modifiait les communautés bactériennes du microbiote lors du gavage. Une contamination aigüe au cadmium permet ainsi l'augmentation des *Bacilli* (+35%) en fin gavage tandis que les *Clostridia* et les *Bacteroidia* diminuent chez les Barbarie, tandis que chez les canards Pékin, le microbiote n'est que très peu modifié et les classes majoritaires restent les mêmes. Cependant quel que soit le type génétique les animaux contaminés (1 ou 10 mg/kg) présentent des flores différentes. Dans les caeca, la contamination au cadmium induit également des changements du microbiote notamment au sein des *Bacteroidetes* et plus précisément les *Bacteroidia* qui diminuent à mi-gavage puis augmentent en fin gavage chez les canards de Barbarie en présence de cadmium tandis que les *Bacteroidia* diminuent seulement en fin de

gavage chez les canards Pékin. Les différences de composition du microbiote dans l'iléon comme dans les caeca ont montré un effet de la dose de cadmium ainsi qu'une interaction entre le type génétique et la présence de cadmium de même qu'une interaction entre la période et la présence de cadmium.

Mots clés : microbiote, Pékin, Barbarie, cadmium, bioaccumulation, diversité, pyroséquençage 454

Cadmium affects the composition of intestinal microbiota in Pekin (*Anas platyrhynchos*) and Muscovy (*Cairina Moschata*) ducks.

F. Vasai¹., K. Brugirard Ricaud^{1*}., M.D Bernadet²., S. Combes^{3,4,5}., L. Cauquil^{3,4,5}., O.Bouchez⁶., and S. Davail¹

¹ IPREM-EEM, Université de Pau, IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan, France

² INRA Artiguères, 40280 Benquet, France

³ INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁴ Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁵ Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

⁶ Plateforme Génomique Bâtiment CRGS-CNRCV, INRA Auzeville, Chemin de Borderouge-BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

- *Corresponding author: Karine Brugirard Ricaud
- IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan

Phone: +33 558 513 707

Fax: +33 558 513 703

Email adress: karine.bugirardricaud@univ-pau.fr

Abstract

The study was realized to investigate the effect cadmium addition during overfeeding on the ileal and cecal microbiota of two genetic types of ducks (Pekin and Muscovy) by using high-throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing. The ducks were overfed during 12 days with 58% maize flour and 42% grain of maize with or without cadmium. Samples were collected before the overfeeding period (at 12 weeks), at 13 weeks and at 14 weeks, 3 h post feeding. Whatever the digestive segment, the genetic type and the level of contamination, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* were the dominant phyla in the bacterial community of ducks (at least 80%). In both Pekin and Muscovy ducks the richness and diversity was increased in ileum and decreased in ceca with Cd contamination and overfeeding regarding the overfeeding period. Cadmium triggered changes in ileum in comparison to ceca which was less modified. Cadmium modifies the relative abundance of *Fusobacteriaceae* and *Carnobacteriaceae* families in ileum where it affected particularly four families: *Streptococcaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Porphyromanadaceae*, and *Alcaligenaceae* in ceca.

Keywords: duck microbiota; ileum; ceca; diversity; Cd contamination; genetic type; 454 pyrosequencing

Running title: Effect of cadmium and genetic type on duck microbiota

Introduction

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal currently present in the environment especially in regions with a rich human activity as agriculture or industry. For example, it is well known that industry producing battery, paint or fertilizers can be an important source of water pollution (Jones & Cherian, 1990, Bokori *et al.*, 1996, Fazeli *et al.*, 2010). In the Southwest of France and especially in the Gironde estuary, the ecosystem is contaminated by Cadmium in sediments and water. It is now well known that the Cd contamination is originated from one treatment in the industrial basin of Decazeville located 400 km upstream from the Gironde estuary on the Lot river (Jouanneau *et al.*, 1990). In this French region, the important number of ducks farms can be contaminated by water with significant levels of cadmium. A study realized on birds sampled in this region, have shown that the Cd contamination is detected around 1 mg/kg from 2 species of wild ducks. Furthermore, the level of Cd accumulation identified in ducks, are in accordance with a study realized on mollusk in the same location (Bendell, 2010). Cd affects host physiology and especially the expression of detoxifications genes e.g métallothioneins (Lucia *et al.*, 2009b). In ducks, It has been shown that ingested cadmium accumulates in the liver and kidneys, the kidneys are their final target. This accumulation is the cause of lesions in these organs and also disrupts the lipid metabolism of the host (Lucia *et al.*, 2009a). The intestinal microbiota is the first barrier against Cd accumulation and also the first “organ” which can be affected. A recent study realized on germ-free mice showed that an increased lead absorption of cadmium and dissemination in blood and target organs suggesting the barrier role of microbiota against heavy metals (Breton *et al.*, 2013). This suggests a possible action of cadmium on the bacterial communities. Very few studies have addressed the effect of the contaminant on the microbiota. In mice it

has been shown by cultural methods that the addition of cadmium in drinking water resulted in a decrease of the desired groups with a higher impact importance of Gram-positive bacteria (Fazeli *et al.*, 2010). A first molecular inventory realized in the two genetic types Pekin and Muscovy have shown that *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the two major phyla in intestinal microbiota (Vasaï *et al.*, 2013). It has been shown that overfeeding has an effect on the ileal microbiota by increasing the relative abundance of *Clostridiaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae* and *Enterococcaceae* while in the ceca there is a genetic effect (Vasaï *et al.*, 2013). This study attempted to investigate the effect of cadmium during the overfeeding (OF) period on the intestinal microbiota of ileum and ceca on the two genetic types of ducks, *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina Moschata* (Muscovy) during overfeeding process using a FLX amplicon pyrosequencing. We then analyzed the Cd bioaccumulation in kidney.

Material and Methods

Experimental Design

All experimental procedures involving ducks were in accordance with the French national Guidelines for the care of animal for research purposes. Male ducks were raised in a breeding structure belonging to the French National Research Institute for Agronomy (INRA) at the « domaine d'Artiguères », Benquet, France. From the first day of life to 4 weeks of age, they were fed *ad libitum* with 2mm granules on a diet providing 2850 kcal/kg and 17,5 % CP of feed. From 5 to 12 weeks of age, the birds were fed with 4 mm granules on a restricted diet providing 2800 kcal/kg and 15.5 % CP of feed. At 12 weeks of age, all animals were weighed and 42 ducks were

selected. Among ducks selected, 3 of each genetic type were killed before overfeeding and addition of Cd. The remaining 36 animals (overfed ducks) were fed in collective cages of four ducks per box. They were hydraulically fed with food constituted of 58% maize flour and 42% grain of maize. Three conditions were studied over OF process: uncontaminated ducks which constituted control animals (C0 group), and two levels of contamination of Cd: 1 mg/kg (C1 group) and 10 mg/kg (C10 group) of food. To contaminate animals during experimental design, capsules of Cd were made by adding Cd to maize flour under its CdCl_2 form. One capsule per meal was given to ducks. The lowest level of contamination was chosen according to Cd concentrations encountered in the Gironde estuary (C1: 1 mg/kg of Cd). The upper level was chosen to compare effects of environmental level to acute metal concentrations (C10: 10 mg /kg of Cd). The ducks were killed by exsanguination after electric stunning, 3 h following the last meal to homogenize the filling level of the ducks' digestive tract. Ducks of each genetic type with similar weight were selected at 3 points and their digestive contents were removed at 13 weeks (meal 12) and at 14 weeks (meal 24), 3 h post feeding. Ileum and ceca were immediately collected and kept on ice. The digestive contents of the ileum and ceca were collected by gently pressing along the organ. Samples were stored at -20°C for further molecular analysis. Kidney samples were sampled and stored at -20°C for Cd determination.

DNA extraction and High-throughput sequencing and analysis of 16S rRNA gene amplicons

Total DNA from ileal and cecal samples were extracted employing the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the instructions of the

manufacturer with 220 mg as starting material. An additional lysis step is done using lysozyme (Sigma, Saint-Louis, USA) to improve the DNA extraction of the gram-positive bacteria present within the samples (Johansen *et al.*, 2007). The extracted DNA (from culture or digestive contents) was eluted in 200 µl of elution buffer and stored at -20°C until real-time PCR analysis. Amplicons from the V3 to V4 regions of 16S rRNA genes (460 bp on *Escherichia coli*, GenBank number J01695) of samples were amplified using bacterial forward 343F (TACGGRAGGCAGCAG; (Liu *et al.*, 2007) and reverse 784R (TACCAGGGTATCTAATCCT; (Andersson, 2008) primers. Each primer had a barcode sequence of ten nucleotides at the 5' end which was unique for each sample. The preparation of amplicons was performed in a total volume of 100 µL containing 1X PCR buffer, 200 µM of dNTP, 1U Isis DNA polymerase (MP Biomedicals), 0.5 µM of each primers and 1-5 ng of DNA template. The amplification program consisted of an initial denaturation step at 94°C for 2 min; 32 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and elongation at 72°C for 30 s; and a final extension step at 72°C for 7 min. The PCR of the products were purified with the QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) followed by DNA yield quantification and quality estimation using a Nano-Drop ND-100 spectrophotometer. The size of the PCR products were confirmed by gel electrophoresis and then, the purified PCR products were quantified using the Quant-iT picrogreen ds DNA Assay Kit (Invitrogen, Saint Aubin, France) on a ABI prism 7900 HT sequence detection system (Life technology, Invitrogen, A-BIOSYSTEM, Villebon-sur-Yvette, France). The sequencing of the 16S rRNA genes was performed by 454 GS FLX (454 Life Sciences - Roche) and Titanium chemistry according to the manufacturer's instructions. Amplicons of 450 bp were pooled using equal amounts of each PCR products. For the analysis, samples were recognized by couples of tag

sequence which had been fixed on the universal primers provided by Roche during the amplification.

Pyrotag handling and analysis

A total of 1 074 979 rRNA gene sequences (also referred to as 16S pyrotags) were obtained from 454 Titanium pyrosequencing run for the 84 samples. The 16S pyrotags were sorted based on their respective barcodes to form a total of 84 pyrotag library representing the 84 ileal and cecal samples. Sequences were sequentially filtered using a Python script developed by the bioinformatic platform of Toulouse, first removing those sequences with a short sequencing length (less than 150 nt; 116 358 sequences removed); those with at least one ambiguous base (30427 sequences removed) or with a long homopolymer (> 8; 345 sequences); those that did not match the proximal PCR primer sequences (with two mismatches allowed; 2916 sequences removed) and finally those having both primers but with a length shorter than 350 pb (1569 sequences removed). A total of 923 925 sequences were retained corresponding to 6821 ± 744 sequences per samples.

Taxonomical classification and statistical analysis

Filtered sequences were analyzed using MOTHUR software v 1.24; (Schloss *et al.*, 2009). Readings were aligned over SILVA alignment database provided by MOTHUR software (14 956 sequences corresponding to the unique sequences in the SSU REF database v102) (Pruesse *et al.*, 2007) and an alignment quality was calculated using the SILVA secondary structure map file (1072 sequences were removed). After

calculating a pairwise distance between aligned sequences, they were clustered into Operational Taxonomic Unit (OTU, cutoff 0.05 using a furthest neighbor clustering). Rarefaction curves, Abundance-based coverage estimator (ACE) and Chao1 richness were calculated including Rarefaction and Chao1 Estimator. Shannon α -diversity index was calculated according to (Hayek & Buzas, 1996). The sequences were analyzed under R (<http://www.r-project.org/>) to get the results of the composition of the microbiota according to our treatment conditions. Statistical analysis of similarity (ANOSIM) between band patterns was done using 10,000 permutations. 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). These proximity values were also graphically explored by nonmetric multidimensional scaling. When values are given in the text, they are expressed as mean $\pm$ SEM.

Cd determination

Cd determination was realized on three replicates per experimental condition (genetic type and contamination level). Kidneys were dried (45°C, 48h) and digested with 3 ml of pure nitric acid (Fluka; Buchs; Switzerland) added in tubes and incubated at 100°C for 3h. After a six-fold dilution of the digestates with ultrapure water (MilliQ, Bedford, MA, USA), Cd concentrations were measured by electrothermal atomic absorption spectrophotometry with Zeeman correction, using a graphite tube atomizer (EAAS Thermoptec M6Solaar). Samples of 20 μ l were mixed before atomization with 4 μ l of Pd (analyte modifier) and 3 μ g of $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (matrix modifier). The analytic method simultaneously validated for each sample series by the analysis of standard

biological reference materials (Tort-2: lobster hepatopancreas and Dolt-2: dogfish liver from NRC-NCRC; Ottawa, Canada). Values were consistently within the certified ranges.

Results

Cadmium concentration

No contradictions were observed between control and contaminated ducks for kidneys through the experiment. In kidney, Cd bioaccumulation was influenced by the contamination level (Figure 1). At each point of the experiment (before, mid- and end of OF), control ducks showed significantly lower concentrations than ducks of C1 groups (1 mg/kg) which themselves showed lower concentration than C10 (10 mg/kg).

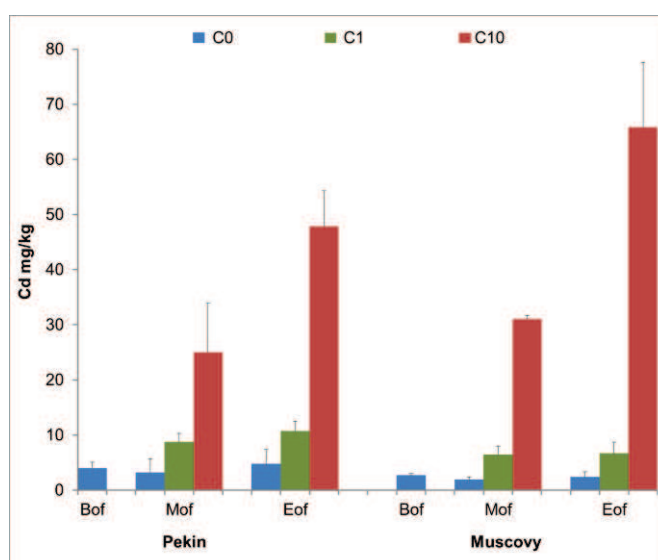


Figure 1: Accumulation of cadmium in kidneys of Pekin and Muscovy ducks during overfeeding (n=3).

Furthermore, the Cd accumulation was in accordance with the time of exposure: in Pekin ducks, the Cd accumulation was 25 mg/kg at mid-OF and 48 mg/kg at the end of OF (C10 group). Then, there was an interaction between Cd concentrations and genetic type: Muscovy ducks tends accumulated more than Pekin ducks ($p\text{-value} = 2,67 \times 10^{-9}$). An interaction between the period and the level of contamination was also detected ($p\text{-value} = 1,54 \times 10^{-15}$).

Effect of Cd accumulation on the ileal and cecal microbial community in Pekin and Muscovy

Cadmium increased the number of OTU, Chao1 richness, the ACE and the Shannon index in ileal samples at the end of OF in Pekin and at mid-OF for Muscovy ducks. These different richness or diversity estimators decreased in cecal samples at the end of OF for both Pekin and Muscovy which is only reduced for the C10 group (Table 1).

Ileum								
Pekin	Bof	Mof C0	Mof C1	Mof C10	Eof C0	Eof C1	Eof C10	SEM
OTU	1147,7	480,0	554,3	447,7	279,3	591,3	512,7	103,0
Chao	2167,9	951,8	928,6	850,2	453,6	983,6	844,6	201,9
Ace	3114,0	1313,7	1119,9	1222,0	601,2	1305,3	1058,1	301,5
Shannon	4,0	2,9	3,0	3,3	2,3	2,6	2,7	0,2
Muscovy	Bof	Mof C0	Mof C1	Mof C10	Eof C0	Eof C1	Eof C10	SEM
OTU	1022,7	345,7	304,3	454,7	444,0	511,7	246,3	97,7
Chao	1816,8	576,4	543,9	734,3	778,2	854,7	401,3	176,9
Ace	2420,6	807,1	768,2	876,8	989,3	1051,1	555,3	233,7
Shannon	5,2	2,7	2,7	2,5	2,6	2,2	2,1	0,4
Ceca								
Pekin	Bof	Mof C0	Mof C1	Mof C10	Eof C0	Eof C1	Eof C10	SEM
Sobs	901	1216	967	2018	1594	987	872	163,1
Chao	1782,5	2407,3	1869,6	3831,9	3133,2	1914,9	1596,5	313,3
Ace	2631,0	3651,1	2564,1	5338,5	4326,3	2859,5	2252,4	424,6
Shannon	5,2	5,2	5,2	5,8	5,6	5,2	5,1	0,1
Muscovy	Bof	Mof C0	Mof C1	Mof C10	Eof C0	Eof C1	Eof C10	SEM
Sobs	1251	1972	2075	1241	1430	1622	1082	144,2
Chao	2512,4	4014,4	3945,4	2651,0	2722,8	3135,8	2050,5	279,4
Ace	3765,9	6032,6	5671,9	3851,9	4096,2	4404,3	2974,1	411,5
Shannon	5,8	5,6	5,8	5,8	5,2	5,0	5,0	0,1

Table 1: ACE, abundance-based coverage estimator; Bof, before overfeeding (12 weeks); Mof, mid-overfeeding (13 weeks); Eof, end overfeeding (n=3).

Effect on ileum

Independently the level of contamination and the period of OF, *Firmicutes* was the major phylum both in Pekin and Muscovy ducks (Figure 2a). To evaluate the microbiota composition at finer taxonomic levels, class distributions were analyzed.

In Muscovy ducks, Cd contamination increased *Bacilli* classes from 61.59 % (end of OF no contamination) to 97.55% (end of OF C10 groups) (Figure 2b) when *Clostridia* and *Bacteroidia* decreased. Regarding pekín samples, Cd did not modify the major

bacterial classes which still stay the same (*Bacilli*, *Clostridia*).

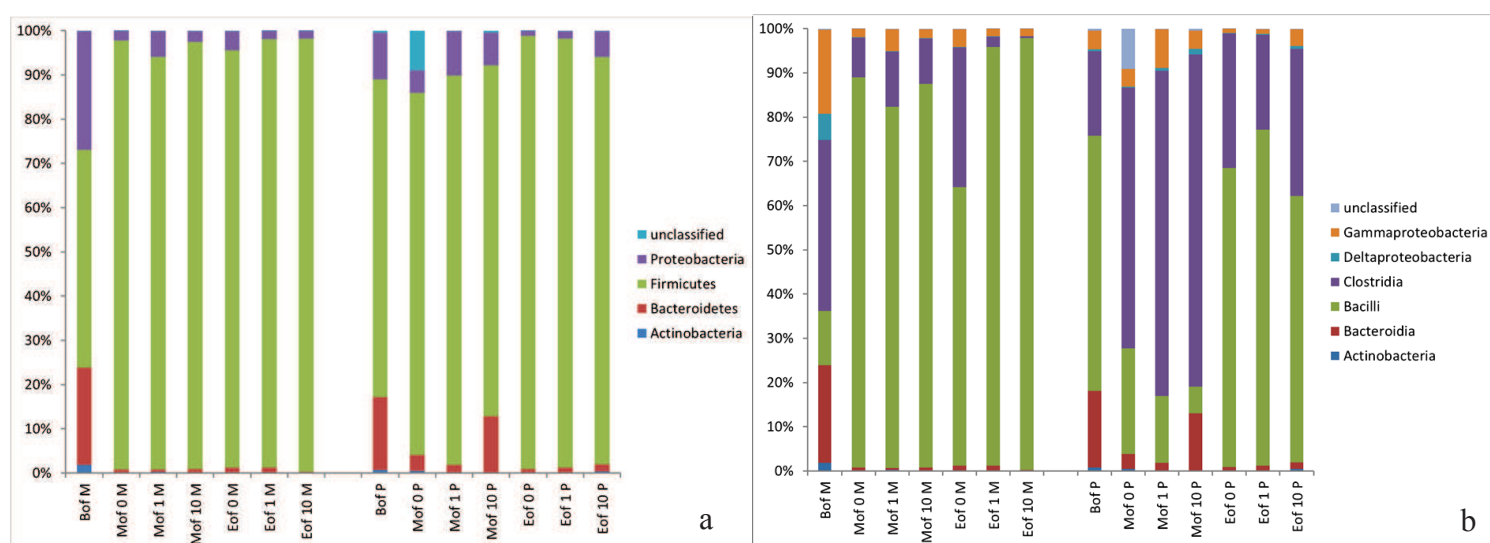


Figure 2: Percentage distribution of sequences (%) evaluated at the phylum (a) and class (b) levels to the total number of sequences in the ileum of Muscovy (M) and Pekin (P) ducks during overfeeding: Bof, before overfeeding (12 weeks); Mof, mid-overfeeding (13 weeks); Eof, end of overfeeding (14 weeks) and contaminated or not with cadmium (0, 1, 10 mg/kg of food). (n=3).

Regarding the Cd contamination independently the length of the overfeeding period (1 or 2 weeks) and the level of Cd contamination, the comparison of bacterial communities were analyzed by nMDS profiles (representing the distribution of different families). Ileal sampling distinguished two separate clusters: contaminated ducks were found in one cluster and the not-contaminated ones in Muscovy ducks (Fig. 3a). The ANOSIM R-value indicated the extent to which the groups differed. For ileal Muscovy samples two separate but overlapping groups were observed; R ANOSIM was 0,231 ($P < 0.0014$) which indicates an effect of Cd on the bacterial community. Interestingly, nMDS profiles regarding both the period of OF, the Cd contamination, separated two clusters more than Cd contamination (Fig. 3b). But there is also a statistical effect which can separate contaminated samples regarding the genetic type with a R-ANOSIM of 0.394 ($P < 3e^{-14}$).

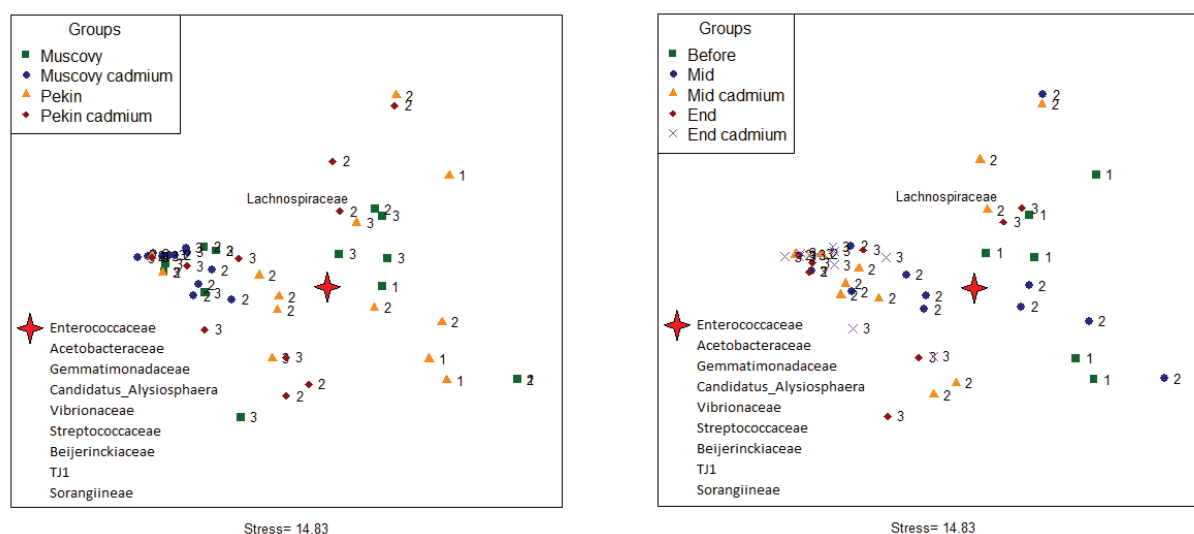


Figure 3: nMDS profile showing the distribution of different families of the different samples studied overfed () or not-overfed () in three periods of overfeeding in the ileum. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding. Ducks were contaminated or not with cadmium (n=3).

The separation of samples by the level of Cd was confirmed using the Heatmap method (Fig.4). The different effects observed were especially due to changes in two families like *Fusobacteriaceae* for the Cadmium effect and *Carnobacteriaceae* for the combined effect. All the changes for these families were significant and were listed in Table 2.

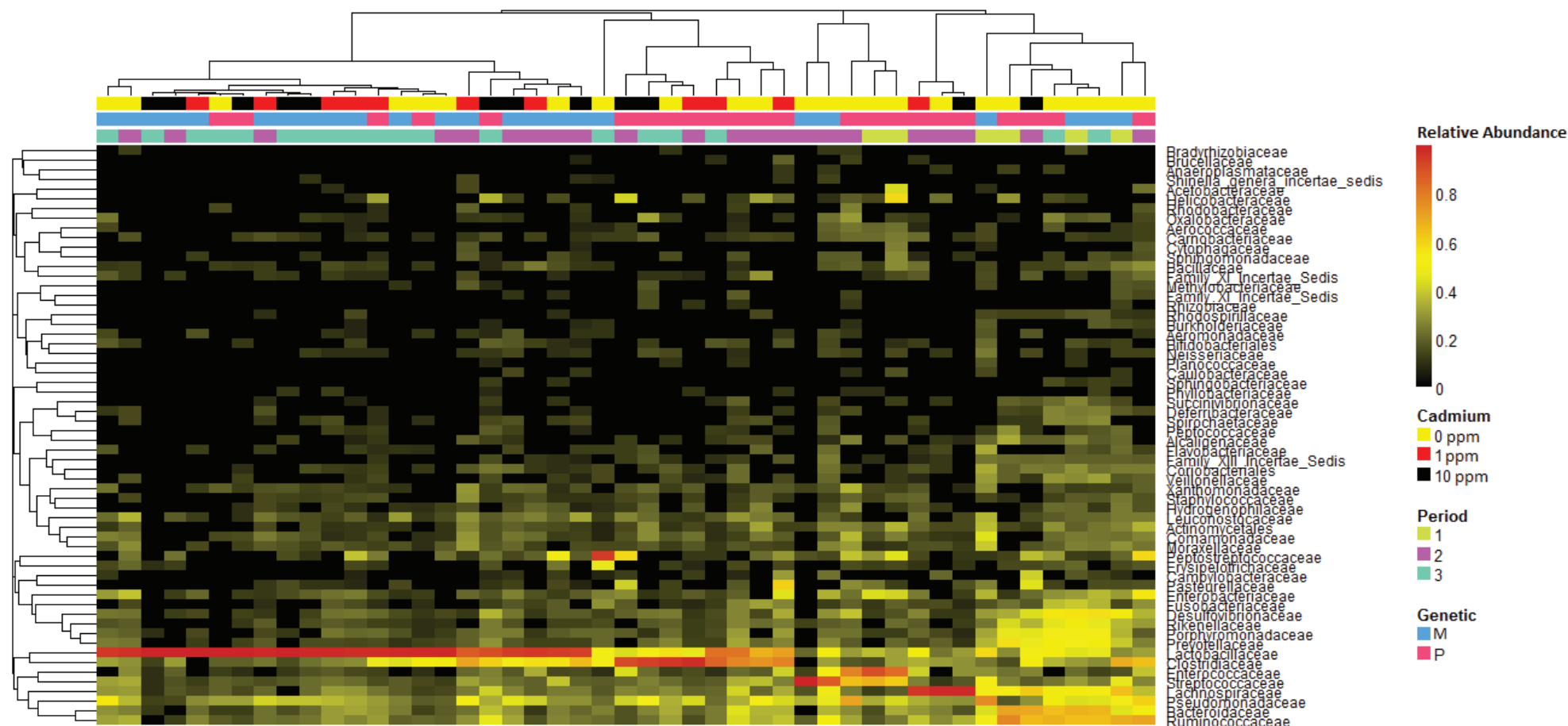


Figure 4 : Heatmap of the bacterial community at the family levels of Muscovy (M) and Pekin (P) in the ileum. Samples and taxa were clustered according to Ward algorithm based on a Manhattan distance matrix. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding. Ducks were contaminated (1 or 10 ppm) or not with cadmium (n=3).

		Muscovy		Pekin		
Cadmium effect	P-value	mean	SEM	Mean	SEM	
Fusobacteriaceae	0,02	0,219	0,117	0,241	0,096	Table 2:
Interaction (Period*Cd)	P-value	mean	SEM	Mean	SEM	
Carnobacteriaceae	0,014	0,022	0,006	0,064	0,02	

Effect of the cadmium and Period*Cd on different families with a significant P-value (< 0.05) in the ileum of Muscovy and Pekin ducks.

Effect on ceca

Independently the level of contamination and the period of OF, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria* were the major phyla in cecal samples for both Pekin and Muscovy ducks (Figure 5a). Regarding Muscovy ducks, under Cd contamination, *Bacteroidetes* increased at mid-OF and decreased at the end of OF in comparison to not contaminated ones. In Pekin ducks, there was a decrease of *Bacteroidetes* under Cd contamination only at the end of OF and for the C1 group. At finer taxonomic levels, class distributions were analyzed and *Bacteroidia* showed the same results as previously described for *Bacteroidetes* (Figure 5b).

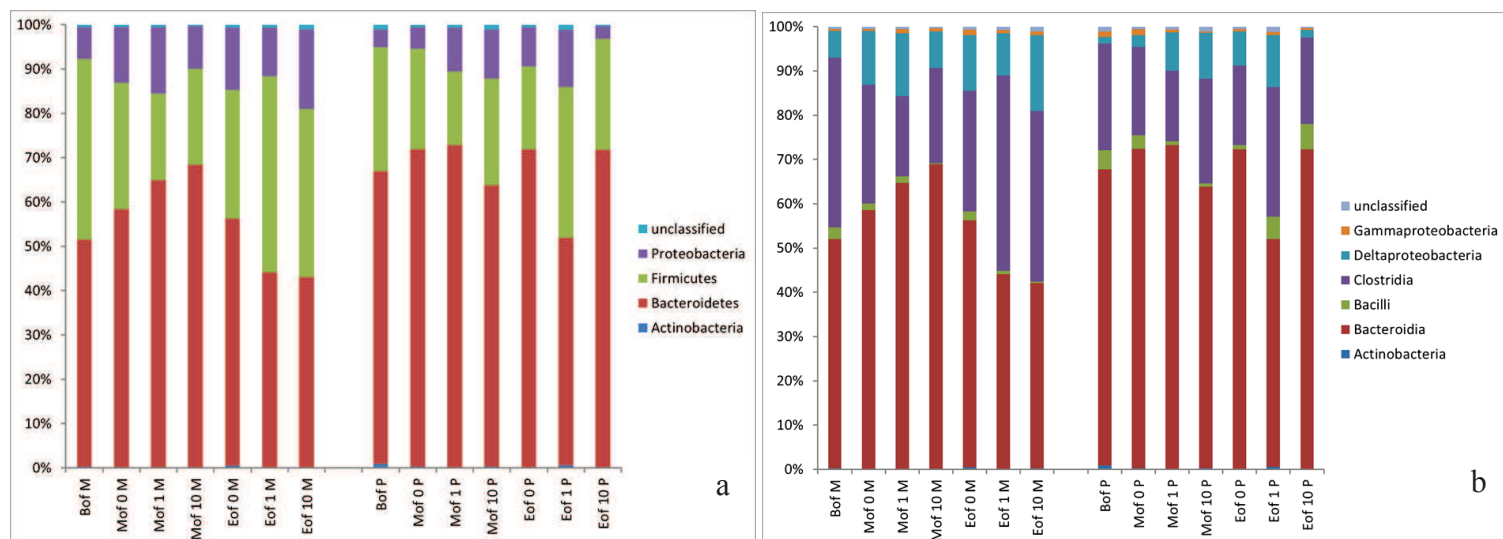


Figure 5: Percentage distribution of sequences (%) evaluated at the phylum (a) and class (b) levels to the total number of sequences in the ileum of Muscovy (M) and Pekin (P) ducks during overfeeding: Bof, before overfeeding (12 weeks); Mof, mid-overfeeding (13 weeks); Eof, end of overfeeding (14 weeks). Ducks were contaminated (1 or 10 ppm) or not with cadmium (n=3).

Regarding the level of Cd contamination regardless the length of the overfeeding period (1 or 2 weeks) and the genetic type, the comparison of bacterial communities was analyzed by nMDS profiles (representing the distribution of different families). Cadmium contamination showed overlapping clusters (Fig 6a) but we detected two statistical effect with an R ANOSIM = 0.167 and a P = 0.0316 between C0 and C1 group and then between C0 and C10 group with a R ANOSIM = 0.128 and a P = 0.0713. Regarding the period and the contamination (but independently the contamination level), we detected a statistical effect, between before OF and mid-OF with contamination with an R-ANOSIM of 0.231 and a p-value 0.0338 (Fig 6b).

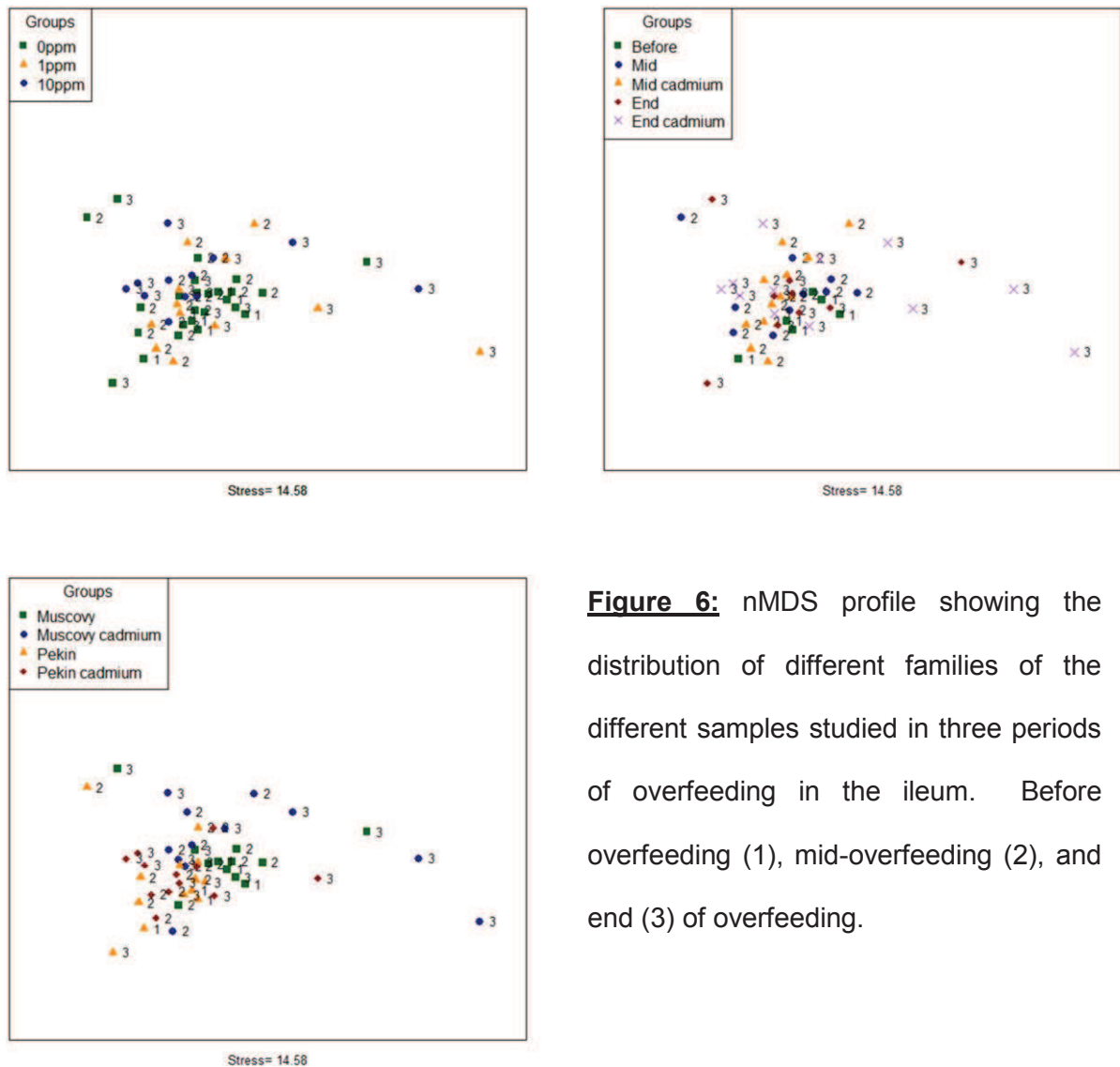


Figure 6: nMDS profile showing the distribution of different families of the different samples studied in three periods of overfeeding in the ileum. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding.

Finally, when we analyzed using genetic type and Cd contamination but independently the level of Cd contamination, the groups overlapped but different statistical effects were detected between contaminated samples and not contaminated ones only in Muscovy ducks with R-ANOSIM = 0.162 (p-value 0.0028). We also observed an effect of the genetic type (R-ANOSIM= 0.195 and p-value=0.011) on the samples contaminated (R-ANOSIM= 0.129 and p-value= 8e-3 (Figure 6c). Several families were responsible for these effects especially

Porphyromonadaceae, *Streptococcaceae* for the cadmium effect and *Streptococcaceae* and *Spirochetaceae* which plays a role with clustering (Table 3 & Figure 7).

Cadmium effect	P-value	Muscovy		Pekin	
		mean	SEM	mean	SEM
Streptococcaceae	0,018	0,94	0,425	0,306	0,152
Peptostreptococcaceae	0,018	0,03	0,008	0,061	0,024
Porphyromonadaceae	0,04	9,97	1,465	7,047	0,718
Alcaligenaceae	0,045	0,118	0,027	0,348	0,062

Table 3: Effect of the cadmium and Period*Cd on different bacterial families with a significant P-value (< 0.05) in the ceca of Muscovy and Pekin ducks.

Discussion

Ducks of this study accumulated high amounts of Cd according to the level and the length of Cd contamination. The high Cd bioaccumulation in kidneys in our study confirmed his main role in detoxification and storage of non-essential elements (Lucia *et al.*, 2009b).

In previous works, high concentrations level were reported in bird kidneys, which represent most of the time the major organ regarding the Cd bioaccumulation (Barjaktarovic *et al.*, 2002, Nam *et al.*, 2005). However, these studies have been realized with very high contamination levels, far from the natural contamination found in the environment. Lucia *et al.* (2009b) and Lucia *et al.* (2009a) also showed that Pekin and Muscovy ducks accumulated more Cd in the kidney using a natural and an acute level of contamination. They, then showed that Pekin ducks accumulated more

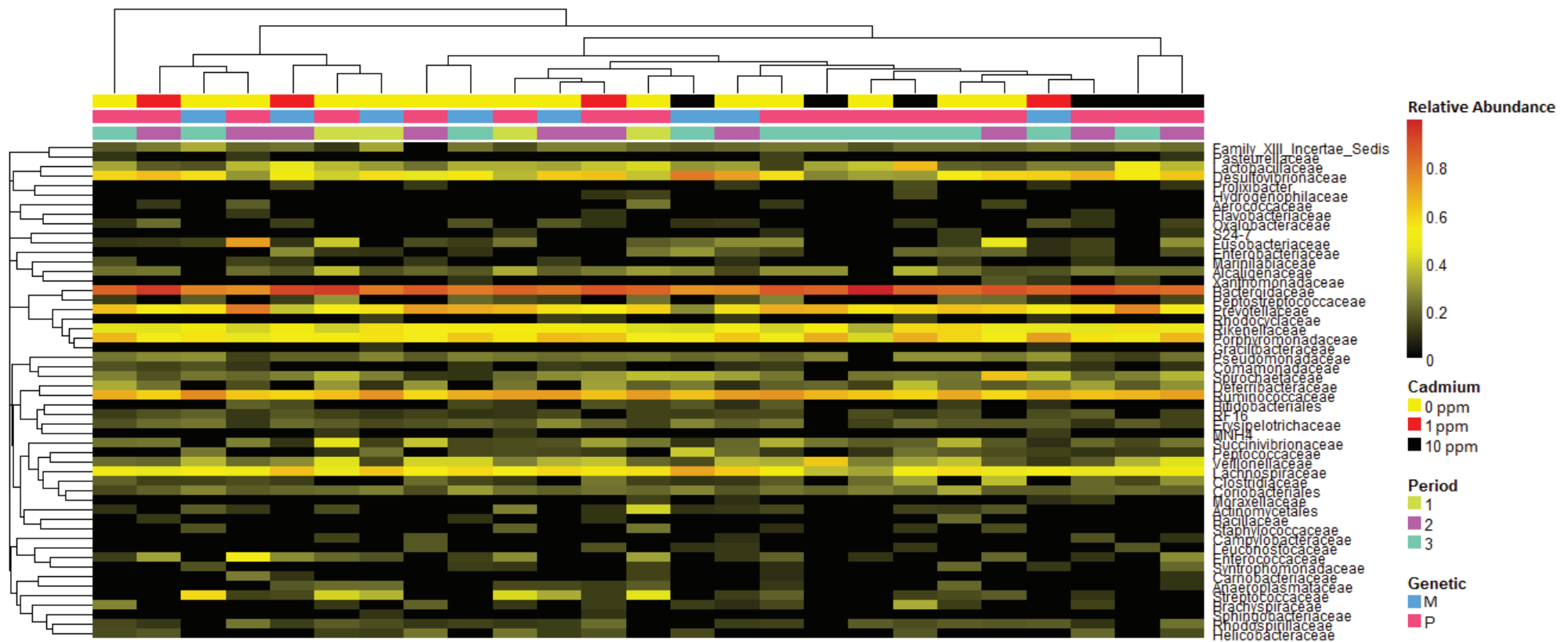


Figure 7 : Heatmap of the bacterial community at the family levels of Muscovy (M) and Pekin (P) in the ceca. Samples and taxa were clustered according to Ward algorithm based on a Manhattan distance matrix. Before overfeeding (1), mid-overfeeding (2), and end (3) of overfeeding. Ducks were contaminated (1 or 10 ppm) or not with cadmium (n=3).

Cd in kidneys than Muscovy ducks on a time exposure until 40 days. Otherwise, in our study when the Cd contamination occurred during overfeeding process, the accumulation levels were more important in Muscovy ducks than in Pekin ducks. These two genetic types of duck showed a different pattern of accumulation. It is well known that overfed Pekin ducks have a higher lipid content in peripheral tissues (muscle and adipose tissues) while liver storage is lower than in other species (Davail *et al.*, 2003, Chartrin *et al.*, 2006). Could these differences in liver or peripheral fat storage in ducks explain the difference in the Cd bioaccumulation?

The intestinal is the first barrier against heavy metals and the response to bacteria is dependent to their adaptation to the different metals. (Berzina *et al.*, 2007) showed that exposure to Cd from hatch to day 30 in cocks triggers enteropathy characterized by an increase of goblet cells and granular lymphocytes in the intestinal microbiota. Cadmium could affect cell physiology of *Escherichia coli* especially in the formation of septum and the oxidative balance (Hossain *et al.*, 2012, Hossain & Mukherjee, 2013). The change described in host immunity cells and bacterial cells under Cd exposure could globally affect the equilibrium of bacterial community. Little is known about the effect of Cadmium on intestinal microbial community Using 454 pyrosequencing, we found change in bacterial community regarding the level of Cd contamination, the time of exposure (mid or end of OF) and the genetic type. A study realized in mouse showed a toxic effect on bacterial microbiota more important on Gram Positive cells under higher contamination and time of exposure but this study was realized with culture dependent method (Fazeli *et al.*, 2010). The diversity of bacterial community is reduced by Cd contamination in soil and can be partly explained by metal availability (Zhang *et al.*, 2008, Caliz *et al.*, 2012). In our study, nMDS profiles showed change in bacterial community. As we described for Cd bioaccumulation in

kidneys, bacterial community was more affected in Muscovy ducks in comparison to Pekin ducks. Otherwise the responses of Cd contamination are different between the two genetic types. A previous study showed that the bacterial communities of these two strains are different: when bacilli are dominant in Pekin ducks, Clostridia is the major class in Muscovy ducks. Could the differences identified in the bacterial community between the two genetic types partly explain the difference in cadmium bioaccumulation?

Acknowledgements

We thank the “Conseil Général des Landes” and the “Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras” (CIFOG) for financing this work. We also thank the technical staff of INRA Artiguères for ducks. We are grateful to Béatrice Gabinaud (INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France) for their excellent technical assistance. We would also like to thank Jérôme Lluch and Clémence Genthon (INRA, Plateforme Génomique, Génopole Toulouse/Midi-pyrénées, Castanet-Tolosan, France).

References

- Andersson AF, Lindberg, M., Jakobson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., Engstrand, L. (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *Plos One* **3**: e2836.
- Barjaktarovic L, Elliott J & Scheuhammer A (2002) Metal and metallothionein concentrations in Scoter (*Melanitta* spp.) from the Pacific northwest of Canada, 1989-1994. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 486-491.
- Bendell LI (2010) Sea ducks and aquaculture: the cadmium connection. *Ecotoxicology* **20**: 474-478.
- Berzina N, Markows J, Isajevs S, Apsite M & Smirnova G (2007) Cadmium-Induced Enteropathy in Domestic Cocks: A Biochemical and Histological Study after Subchronic Exposure. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101**: 29-34.
- Bokori J, Fekete S, Glávits R, Kadar I, Koncz J & Kövari L (1996) Complex study of the physiological role of cadmium. IV. Effects of prolonged dietary exposure of broiler chickens to cadmium. *Acta Veterinaria Hungarica* **44**: 57-74.
- Breton J, Daniel C, Dewulf J, *et al.* (2013) Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicol. Lett.* **222**: 132-138.
- Caliz J, Montserrat G, Martí E, *et al.* (2012) The exposition of a calcareous Mediterranean soil to toxic concentrations of Cr, Cd and Pb produces changes in the microbiota mainly related to differential metal bioavailability. *Chemosphere* **89**: 494-504.

Chartrin P, Bernadet M-D, Guy G, *et al.* (2006) Does overfeeding enhance genotype effects on energy metabolism and lipid deposition in breast muscle of ducks? *Comp.Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integrative Physiol.* **145**: 413-418.

Davail S, Rideau N, Guy G, André J-M, Hermier D & Hoo-Paris R (2003) Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **134**: 707-715.

Fazeli M, Hassanzadeh P & Alaei S (2010) Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum. Exp. Toxicol.* **30**: 152-159.

Hayek LC & Buzas MA (1996) *Surveying Natural Populations*, Columbia University Press, New York, NY.

Hossain S & Mukherjee S (2013) Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells. *J. Hazard. Mater.* **260**: 1073-1082.

Hossain S, Mallick I & Mukherjee S (2012) Cadmium toxicity in *Escherichia coli*: Cell morphology, Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **86**: 54-59.

Johansen CH, Bjerrum L & Pedersen K (2007) Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica* **49**: 30.

Jones M & Cherian M (1990) The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. *Toxicology* **62**: 1-25.

Jouanneau J, Boutier B, Chiffolleau J, Latouche C & Philipps I (1990) Cadmium in the gironde fluvioestuarine system: Behaviour and flow. *Sci. Total Environ.* **97-98**.

- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* **35**: e120-e120.
- Lucia M, Andre J-M, Gonzalez P, Baudrimont M, Gontier K, Maury-Brachet R & Davail S (2009a) Impact of cadmium on aquatic bird *Cairina moschata*. *BioMetals* **22**: 843-853.
- Lucia M, André J-M, Gonzalez P, *et al.* (2009b) Effect of dietary cadmium on lipid metabolism and storage of aquatic bird *Cairina moschata*. *Ecotoxicology* **19**: 163-170.
- Nam D, Anan Y & Ikemoto T, Tanabe, S. (2005) Multielemental accumulation and its intracellular distribution in tissues of some aquatic birds. *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 1347-1362.
- 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 Res.* **35**: 7188-7196.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, *et al.* (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7537-7541.
- Vasaï F, Brugirard Ricaud K, Bernadet MD, Cauquil L, Bouchez O, Combes S & Davail S (2013) Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina Moschata* (Muscovy) ducks. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Zhang Y, Zhang X, Zhang H, He Q, Zhou Q, Su Z & Zhang C (2008) Responses of Soil Bacteria to Long-Term and Short-Term Cadmium Stress as Revealed by Microbial Community Analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **82**: 367-372.

Résultats complémentaires :

Iléon Pékin (Abondance relative %)	Avant gavage	Mi gavage			Fin gavage		
		0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm
Bacteroidetes							
Bacteroidia							
<i>Bacteroidales</i>							
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	8,63	2,00	0,82	7,78	0,45	0,55	0,81
<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	2,70	0,18	0,06	1,18	0,05	0,01	0,05
Firmicutes							
Bacilli							
Lactobacillales							
<i>Enterococcaceae;Enterococcus</i>	38,42	0,11	1,78	1,52	0,02	0,02	0,21
<i>Lactobacillaceae;Lactobacillus</i>	1,15	21,36	12,09	3,83	66,53	66,30	57,55
<i>Streptococcaceae;Streptococcus</i>	11,78	0,48	0,06	0,05	0,08	0,04	0,23
Clostridia							
Clostridiales							
<i>Clostridiaceae;Clostridium</i>	0,32	22,74	43,19	25,30	29,60	28,90	29,82
<i>Lachnospiraceae;Incertaine_Sedis</i>	2,02	32,16	27,02	35,44	0,13	0,18	0,61
<i>Ruminococcaceae;Incertaine_Sedis</i>	5,64	0,50	0,31	0,04	0,11	0,21	0,32
Proteobacteria							
Epsilonproteobacteria							
<i>Campylobacteriales</i>							
<i>Helicobacteraceae;Helicobacter</i>	4,04	0,41	0,09	0,96	0,00	0,49	0,53
Gammaproteobacteria							
<i>Pseudomonadales</i>							
<i>Pseudomonadaceae;Pseudomonas</i>	1,45	3,67	2,52	1,28	0,78	0,53	3,41
Non apparentées	0,46	8,91	0,08	0,45	0,04	0,21	0,09

Tableau 18 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote contaminés ou non avec du cadmium dans l'iléon de canards Pékin en phase de gavage (n=3).

A mi-gavage lors de l'ajout de cadmium, on peut observer des changements au niveau de la composition du microbiote iléal des canards Pékin (Tableau 18). Pour une contamination de 1 ppm, plusieurs genres bactériens diminuent notamment les *Bacteroides*, les *Lactobacillus*, les *Lachnospiraceae ;incertae_sedis* tandis que les *Clostridium* augmentent. Ces changements ne sont, pour la plupart, pas retrouvés pour des contaminations de 10 ppm où l'on observe une augmentation des *Bacteroides* ainsi qu'une diminution des *Lactobacillus*. Le cadmium ne semble pas avoir le même effet sur les différents genres composant le microbiote selon le niveau de contamination. Moins de genres semblent affectés par cette contamination aiguë mais le genre *Lactobacillus*, lui, semble plus touché à 10 ppm.

A la fin du gavage, l'ajout de cadmium n'a que très peu d'effet sur la composition du microbiote. Seule une faible diminution (9%) des *Lactobacillus* ainsi qu'une augmentation des *Pseudomonas* (3%) est à noter pour une contamination de 10 ppm.

Iléon Barbarie (Abondance relative %)	Avant gavage	Mi gavage			Fin gavage		
		0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm
Bacteroidetes							
Bacteroidia							
<i>Bacteroidales</i>							
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	9,38	0,32	0,18	0,32	0,50	0,72	0,09
Firmicutes							
Bacilli							
<i>Lactobacillales</i>							
<i>Lactobacillaceae;Lactobacillus</i>	5,33	84,75	77,97	84,65	59,92	93,03	95,67
<i>Streptococcaceae;Lactococcus</i>	2,70	0,43	0,20	0,11	0,29	0,16	0,07
Clostridia							
<i>Clostridiales</i>							
<i>Clostridiaceae;Clostridium</i>	7,91	5,64	11,64	9,11	3,83	0,33	0,12
<i>Ruminococcaceae;Incertae_Sedis</i>	5,00	0,13	0,16	0,13	0,06	0,19	0,06
Proteobacteria							
Deltaproteobacteria							
<i>Desulfovibrionales</i>							
<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	5,00	0,14	0	0	0,11	0	0
Gammaproteobacteria							
<i>Pseudomonadales</i>							
<i>Pseudomonadaceae;Pseudomonas</i>	14,51	0,84	4,00	1,60	3,25	1,17	1,41
Non apparentées	0,18	0,06	0,10	0,08	0,08	0,03	0,02

Tableau 19 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote contaminés ou non avec du cadmium dans l'iléon de canards de Barbarie en phase de gavage (n=3).

L'ajout de cadmium entraîne également des modifications de communautés au sein de l'iléon des canards de Barbarie mais de façon plus drastique (Tableau 19). Pour une contamination de 1 ppm le genre des *Lactobacillus* diminue (6%) tandis qu'en parallèle on observe une augmentation des *Clostridium* (6%) ainsi que des *Pseudomonas* (3,2%). Ces changements ne sont pas observés pour une contamination à 10 ppm, seule une légère augmentation des *Clostridium* est observée par rapport au microbiote des animaux témoins

non contaminés (0ppm). En fin de gavage comparé au canard Pékin, on observe cette fois-ci une forte augmentation des *Lactobacillus* (environ 30%) représentant ainsi environ 95% de la population totale quel que soit le niveau de contamination administré. Les autres genres bactériens se retrouvent très peu affectés par la contamination.

Caeca Pékin (Abondance relative %)	Avant gavage	Mi gavage			Fin gavage		
		0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm
Bacteroidetes							
Bacteroidia							
Bacteroidales							
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	40,88	26,96	46,11	31,20	44,07	26,55	34,41
<i>Porphyromonadaceae;Parabacteroides</i>	3,54	2,35	3,23	4,88	3,07	2,69	2,99
<i>Porphyromonadaceae;unclassified</i>	0,82	2,15	3,46	3,09	2,47	2,34	1,14
<i>Prevotellaceae;Prevotella</i>	1,06	5,17	2,18	2,34	2,06	2,34	5,84
<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	5,22	11,88	3,35	5,28	4,17	3,88	6,78
<i>Rikenellaceae;RC9</i>	0,79	2,10	1,19	2,80	0,19	0,12	3,17
unclassified;unclassified	6,61	7,83	6,66	7,76	9,42	7,02	4,09
Firmicutes							
Clostridia							
Clostridiales							
<i>Lachnospiraceae;Incertaine_Sedis</i>	3,43	4,29	2,25	4,37	1,73	2,81	1,84
<i>Ruminococcaceae;Incertaine_Sedis</i>	3,97	2,65	2,88	3,20	3,48	4,18	2,56
<i>Ruminococcaceae;unclassified</i>	3,51	1,97	1,51	2,61	2,51	2,79	1,68
Proteobacteria							
Deltaproteobacteria							
Desulfovibrionales							
<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	0,84	2,17	4,77	9,25	6,94	10,93	1,38
Non apparentées	1,07	0,52	0,69	1,06	0,51	1,20	0,29

Tableau 20 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote contaminés ou non avec du cadmium dans les caeca de canards Pékin en phase de gavage (n=3).

Au sein du microbiote caecal des canards Pékin seulement quelques genres bactériens semblent affectés par l'ajout de cadmium. A mi-gavage, les *Bacteroides* augmentent sensiblement (20%) pour une contamination de 1 ppm tandis que l'on observe une faible augmentation des *Desulfovibrio* et en parallèle une augmentation des *Prevotellaceae ;unclassified*. Pour une contamination de 10 ppm ces changements ne sont pas observés, seule la diminution des *Prevotellaceae* (6%) et l'augmentation des *Desulfovibrio* sont observées (7%). En fin de gavage, ces mêmes genres sont affectés par l'ajout de cadmium, la cinétique des changements est identique à celle à mi gavage avec cependant une différence. Pour une contamination de 10 ppm contrairement à ce qui a été observé à mi-gavage, l'abondance relative des *Desulfovibrio* se retrouve diminuée.

Caeca Barbarie (Abondance relative %)	Avant gavage	Mi gavage			Fin gavage		
		0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm
Bacteroidetes							
Bacteroidia							
<i>Bacteroidiales</i>							
<i>Bacteroidaceae;Bacteroides</i>	25,29	33,21	28,16	30,12	18,18	20,59	16,56
<i>Porphyromonadaceae;Barnesiella</i>	2,85	4,99	5,05	11,47	4,17	6,02	9,22
<i>Porphyromonadaceae;Parabacteroides</i>	1,76	2,50	2,10	2,01	2,70	2,13	2,27
<i>Prevotellaceae;unclassified</i>	4,18	3,11	6,55	4,83	4,87	1,45	0,31
<i>Rikenellaceae;Alistipes</i>	3,27	3,00	2,75	1,66	3,33	2,12	3,41
unclassified;unclassified	4,66	4,07	11,03	8,62	5,76	6,15	5,46
Firmicutes							
Clostridia							
Clostridiales							
<i>Lachnospiraceae;Incertae_Sedis</i>	3,22	3,23	3,65	1,68	5,03	20,31	9,06
<i>Ruminococcaceae;Incertae_Sedis</i>	6,89	4,31	2,26	3,58	6,38	9,66	10,10
<i>Ruminococcaceae;Oscillibacter</i>	2,35	2,51	1,63	1,97	1,17	1,82	1,22
<i>Ruminococcaceae;unclassified</i>	5,12	3,47	1,91	2,46	1,61	1,94	1,66
<i>Ruminococcaceae;uncultured</i>	5,57	4,10	1,93	3,26	2,02	1,48	1,14
unclassified;unclassified	3,81	1,33	0,91	1,77	1,49	2,04	3,17
Proteobacteria							
Deltaproteobacteria							
<i>Desulfovibrionales</i>							
<i>Desulfovibrionaceae;Desulfovibrio</i>	4,88	10,99	12,57	6,87	11,14	7,99	13,31
Non apparentées	0,55	0,58	0,56	0,37	0,61	0,70	1,05

Tableau 21 : Abondance relative des genres bactériens majoritaires du microbiote contaminés ou non avec du cadmium dans les caeca de canards de Barbarie en phase de gavage (n=3).

Les *Porphyromonadaceae* et plus particulièrement les *Barnesiella* (genre bactérien isolé de caeca de poulet ainsi que chez l'Homme ; anaérobie strict, producteur d'acide acétique et succinique (Sakamoto *et al.*, 2007; Wylie *et al.*, 2012) sont affectés par l'ajout de cadmium notamment pour une contamination à 10 ppm où nous observons alors une augmentation de ce genre que ce soit à mi ou à fin gavage. A mi-gavage pour une contamination de 10 ppm on

observe une diminution de l'abondance des *Desulfovibrio* tandis que l'autre changement notable observé concerne les *Lachnospiraceae* (+ 15%) pour une contamination de 1 ppm. La modification de ce genre bactérien n'est pas retrouvée pour le niveau de contamination aiguë étudié.

Iléon Pékin								
Période	Mi gavage			Fin gavage			SEM	Significativité
	0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm		
Flore totale	10,17	9,49	9,69	9,93	9,71	9,61	0,10	-
Bacteroidetes	7,25	6,54	7,98	6,93	7,13	7,15	0,19	1***, 6*
<i>Bacteroides</i>	7,28	6,55	8,04	6,76	7,02	6,97	0,21	1**, 4**
Firmicutes	10,11	10,22	10,00	10,67	10,37	9,74	0,13	-
<i>Clostridium</i>	7,37	7,17	7,36	7,33	7,77	7,95	0,12	4*, 6*
<i>Lactobacillus</i>	9,20	9,14	8,75	9,76	9,71	9,49	0,16	-
Proteobacteria								
Enterobacteria	8,70	7,64	8,37	0,00	6,59	6,71	1,31	1**, 3***, 4**, 5***

Iléon Barbarie								
Période	Mi gavage			Fin gavage			SEM	Significativité
	0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm		
Flore totale	9,63	9,25	9,22	9,80	9,40	9,89	0,12	2*
Bacteroidetes	7,02	6,75	6,66	7,14	6,91	6,54	0,09	5***, 6***
<i>Bacteroides</i>	7,14	6,66	6,53	7,14	6,89	6,38	0,13	1*, 2**
Firmicutes	10,06	10,32	9,72	10,69	10,18	9,79	0,15	3**, 5**, 6**
<i>Clostridium</i>	7,61	7,11	7,48	7,61	7,89	6,97	0,14	1*, 6*
<i>Lactobacillus</i>	9,56	9,36	9,61	9,63	9,60	9,65	0,04	-
Proteobacteria								
Enterobacteria	8,07	0 ?	6,03	7,55	6,33	6,53	1,19	1***, 2***, 3**

*p<0,05

**p<0,02

***p<0,01

1 : Mi gavage 0ppm vs 1ppm

2 : Mi gavage 0ppm vs 10ppm

3 : Mi gavage 1ppm vs 10ppm

4 : Fin gavage 0ppm vs 1ppm

5 : Fin gavage 0ppm vs 10ppm

6 : Fin gavage 1ppm vs 10ppm

Tableau 22 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans l'iléon de canards Pékin et Barbarie. Test deWilcoxon - Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais (n=10).

Les résultats de PCR quantitative nous ont permis de mettre en lumière plusieurs effets de l'ajout de cadmium sur plusieurs des groupes ou genres bactériens étudiés. Au niveau du microbiote iléal des canards Pékin, l'ajout de cadmium entraîne des modifications significatives des *Bacteroidetes* ainsi que des *Bacteroides* et des *Enterobacteria* à mi-gavage tandis qu'en plus de ces différents groupes les *Clostridium*, eux, sont affectés par l'ajout de cadmium en fin de gavage. Il n'a toutefois été noté aucun changement au niveau de la flore totale.

Chez le canard de Barbarie, à mi-gavage, il y a une diminution de la flore totale pour les conditions 0 ppm et 10 ppm (Tableau 22). Les *Bacteroides* diminuent, ainsi que les *Clostridium* (mais uniquement entre 0 et 1 ppm), les *Firmicutes* et les *Enterobacteria* suite à l'ajout de cadmium à mi gavage. En fin gavage on observe encore une fois une diminution significative au niveau des *Firmicutes* s'expliquant par une diminution des *Clostridium*, ainsi que les *Bacteroidetes* quel que soit le taux de contamination administré aux animaux.

Caeca Pékin								
Période	Mi gavage			Fin gavage			SEM	Significativité
	0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm		
Flore totale	12,83	12,34	12,68	12,57	12,44	12,77	0,08	1**, 3***, 6**
Bacteroidetes	11,56	11,45	11,49	11,55	11,78	12,31	0,13	5***, 6***
<i>Bacteroides</i>	11,42	11,80	12,47	12,27	12,15	12,39	0,16	2***, 3***
Firmicutes	12,88	12,95	10,00	12,99	12,61	12,88	0,48	3**, 4***
<i>Clostridium</i>	12,62	12,34	12,73	12,53	12,19	12,29	0,09	-
<i>Lactobacillus</i>	10,08	11,05	11,17	10,56	10,84	11,04	0,17	-
Proteobacteria								
Enterobacteria	9,06	9,52	9,59	8,89	9,53	9,24	0,12	-

Caeca Barbarie								
Période	Mi gavage			Fin gavage			SEM	Significativité
	0 ppm	1 ppm	10 ppm	0 ppm	1 ppm	10 ppm		
Flore totale	12,53	12,18	12,65	12,19	12,29	12,52	0,08	3**, 5*
Bacteroidetes	11,30	11,05	11,21	11,40	11,55	12,00	0,14	5*, 6*
<i>Bacteroides</i>	11,34	12,00	12,25	11,83	11,91	13,64	0,32	2***
Firmicutes	12,68	12,49	12,50	12,42	12,72	12,63	0,05	-
<i>Clostridium</i>	12,81	12,58	12,71	12,54	12,53	12,20	0,08	1***
<i>Lactobacillus</i>	10,39	9,72	9,72	10,11	9,20	10,32	0,18	-
Proteobacteria								
Enterobacteria	9,89	9,84	9,92	9,70	9,83	10,22	0,07	-

*p<0,05

**p<0,02

***p<0,01

1 : Mi gavage 0ppm vs 1ppm

2 : Mi gavage 0ppm vs 10ppm

3 : Mi gavage 1ppm vs 10ppm

4 : Fin gavage 0ppm vs 1ppm

5 : Fin gavage 0ppm vs 10ppm

6 : Fin gavage 1ppm vs 10ppm

Tableau 23 : Effet du gavage et de l'ajout de cadmium sur différents phyla, genres ou groupes dans les caeca de canards Pékin et Barbarie. Test de Wilcoxon -Mann Whitney. Moyennes exprimées en Log₁₀ du nombre de copies d'ADNr 16S par gramme de contenu frais (n=10).

A mi-gavage, l'ajout de cadmium provoque des changements au niveau de la communauté microbienne notamment au sein de la flore totale dans les caeca des canards Pékin et Barbarie ainsi que le genre *Bacteroides* dans les deux types génétiques étudiés (Tableau 23). Le genre *Clostridium* est affecté par l'ajout de cadmium à mi-gavage seulement chez les canards de Barbarie à 1ppm. En fin gavage, les *Bacteroidetes* augmentent chez les Pékin et Barbarie suite à l'ajout de cadmium. Chez les canards Pékin une modification significative de la composition en *Firmicutes* est également observée ce qui n'est pas le cas chez les canards de Barbarie. Cependant chez les deux types génétiques la concentration en microorganismes composant la flore totale est affectée lors de l'ajout de cadmium.

Les différents résultats présentés montrent un effet du cadmium sur les communautés bactériennes composant le microbiote des canards durant la phase de gavage. En plus de ce simple effet cadmium des effets combinatoires ont été observés notamment un effet combiné de la période de gavage et de l'administration de cadmium sur les animaux ainsi qu'un effet combiné entre l'ajout de cadmium et le type génétique ce qui montre une réponse spécifique du microbiote selon la période de gavage étudiée ainsi qu'une réponse spécifique et différentielle selon le type génétique. Cette différence génétique a également été retrouvée lors de l'étude de l'accumulation du cadmium au niveau de sa cible principale, à savoir les reins. En effet, les canards de Barbarie ont tendance à accumuler plus de cadmium que les canards Pékin en fin de gavage. Les différents tests statistiques montrent ici encore la présence d'effets combinatoires sur l'accumulation du cadmium comme c'est le cas pour le microbiote.

Discussion Générale

Ce travail de thèse a permis d'établir une base de connaissances concernant la composition du microbiote intestinal des canards Pékin, Barbarie et leur hybride le canard mulard ainsi que l'effet de différents facteurs influençant la composition du microbiote. En utilisant des approches de biologie moléculaire notamment de la PCR quantitative et du pyroséquençage en 454 nous avons pu faire un état des lieux de la composition du microbiote des canards Pékin, Barbarie et mulard au niveau de l'iléon et des caeca et voir l'impact du gavage sur ces mêmes types génétiques. De plus l'ajout d'un probiotique au cours du gavage a été évalué sur le microbiote des canards mulards. Finalement, l'effet de l'ajout de cadmium, contaminant environnemental retrouvé dans le bassin aquitain, sur le microbiote intestinal des canards Pékin et Barbarie a été réalisé.

1. Composition du microbiote des différents types génétiques

étudiés (Articles 1 et 2) :

Les résultats obtenus lors des différentes études ont montrés des compositions du microbiote différentes selon le type génétique. Dans l'iléon au niveau des phyla, les trois les plus représentés sont les *Firmicutes* (71,50% ; 69,85% ; 48,69%), les *Bacteroidetes* (16,43% ; 13,27% ; 21,75%) et les *Proteobacteria* (10,55% ; 14,97% ; 26,42%) pour les canards Pékin, mulards et Barbarie respectivement. Ces différents phyla sont composés de plusieurs classes dont les *Bacteroidia* (*Bacteroidetes*), les *Clostridia* et *Bacilli* (*Firmicutes*) ainsi que les *Gammaproteobacteria* (*Proteobacteria*). Leurs abondances sont également différentes selon le type génétique. Les canards Pékin sont essentiellement composés de *Clostridia* (22,93%), de *Bacilli* (53,6%) et de *Bacteroidia* (16,13%). Le microbiote des canards de Barbarie quant à lui est constitué de *Clostridia* (36,72%), de *Bacilli* (11,67%) et de *Bacteroidia* (20,99%) et les

mulards, eux, sont composés de 60,57% de *Clostridia*, de *Bacilli* (8,63%), de *Bacteroidia* (13,14%) et des *Gammaproteobacteria* (10,73%).

Au niveau des caeca ce sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* qui prédominent. Les abondances de ces deux phyla changent encore une fois selon le type génétique ainsi les *Firmicutes* représentent (27,51% ; 33,94% ; 40,52%) tandis que les *Bacteroidetes* représentent (64,84% ; 57,03% ; 50,91%) chez les canards Pékin, mulards et Barbarie respectivement. Au niveau des classes la quasi-totalité des *Bacteroidetes* sont représentés par des *Bacteroidia* et de même pour les *Firmicutes* essentiellement composés par des *Clostridia*.

Nous avons ainsi pu voir que les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les composants majoritaires du microbiote comme énoncé par Costello (2010) et suggérant un rôle conservé au niveau métabolique (Ley *et al.*, 2008, Kohl, 2012). Au niveau de l'iléon très peu d'études ont été réalisées chez le canard et ne permettent pas de comparer nos résultats à d'autres travaux. Cependant au niveau de la composition du microbiote entre les trois types génétiques on observe une différence entre les espèces. La composition de l'iléon des canards mulards semble se rapprocher de celle des canards Pékin tandis que celle des canards de Barbarie est plus éloignée seulement si l'on s'intéresse aux phyla. En descendant jusqu'à la classe on peut s'apercevoir que le mulard présente une flore plus proche du Barbarie avec notamment une prédominance de bactéries anaérobies strictes (*Clostridia*). L'effet du type génétique sur la composition du microbiote a déjà été montré chez la souris (Friswell *et al.*, 2010, Kovacs *et al.*, 2010) et a été confirmé ici notamment entre les canards Pékin et Barbarie (Vasaï *et al.*, 2013). Au niveau des caeca on retrouve également les même phyla majoritaires ce qui est en accord avec l'étude réalisée en méthode culturale sur les caeca des canards (Ridsdale & Corry, 1999). De plus ces travaux ont permis de montrer que la composition du microbiote des canards mulards est intermédiaire entre les canards Pékin plus riches en *Bacteroidetes* et les canards de Barbarie qui le sont moins. Cet état intermédiaire au niveau des caeca et

proche des canards de Barbarie au niveau de l'iléon est également retrouvé au niveau physiologique où la capacité d'engraissement des canards mulards est située entre celle du Barbarie (stockage hépatique) et celle du Pékin (stockage périphérique) (Davail *et al.*, 2003b, Baéza *et al.*, 2005). De plus, l'activité de la LPL (lipoprotéine lipase) est corrélée positivement avec un stockage plus important dans les tissus périphériques plutôt que dans le foie. On peut ainsi se demander si la composition basale du microbiote pourrait conditionner ou du moins avoir un impact sur les capacités zootechniques des animaux et leur réponse à l'engraissement ? En effet, chez l'homme, il a été montré que le microbiote était différent chez les personnes obèses entraînant une modification du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. Cette différence modifie l'expression d'un facteur appelé le facteur FIAF (Fasting-induced adipocyte factor) qui est un anti-LPL qui entraîne donc l'augmentation de l'expression de la LPL et favorise le stockage de triglycérides dans les tissus périphériques (Backhed *et al.*, 2004). Au cours de notre étude, nous avons pu observer que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* évoluait dans ce même sens lors de la mise en place de la stéatose hépatique.

2. Comparaison avec les autres espèces :

Plusieurs études ont fait l'inventaire de la composition du microbiote de différentes espèces d'oiseaux principalement au niveau des caeca et nous permettent d'avoir une vue d'ensemble de la composition du microbiote des canards par rapport à d'autres espèces (Kohl, 2012). L'espèce la plus étudiée est le poulet et montre des différences notables par rapport au canard. Au niveau des caeca il a été montré que le microbiote du poulet est dominé par des *Firmicutes* (Zhu *et al.*, 2002, Lu *et al.*, 2003) tandis que chez les canards ce sont les *Bacteroidetes* qui sont dominants. D'autres études ont montrées que l'oie, l'autruche et la

Espèces	Pingouin d'Adélie <i>Pygoscelis adeliae</i>	Mouette <i>Larus spp.</i>	Oie du Canada <i>Branta canadensis</i>	Autruche <i>Struthio camelus</i>	Dinde <i>Meleagris gallopavo</i>	Poulet <i>Gallus Gallus</i>	Hoatzin <i>Opisthocomus Hoazin</i>	Canard Pékin <i>Anas Platyrhynchos</i>	Canard de Barbarie <i>Cairina Moschata</i>	Canard Mulard
Source	Fèces	Fèces	Fèces	Caecum	Caecum	Caecum	Proventricule	Caeca	Caeca	Caeca
Phyla	% communauté									
Firmicutes	39,2	54,6	71,6	50,9	32,3	70	66,3	27,51	40,52	33,94
Bacteroidetes	14,7	1,1	10,1	39,4	54,2	1,9	29,9	64,84	50,91	57,03
Actinobacteria	32,3	6,4	7,0	-	< 0,1	4,9	0,8	0,90	0,24	0,15
Proteobacteria	9,8	23	10,4	-	3,4	21,5	1,6	3,92	7,14	7,26
Tenericutes	3,9	8,9	0,2	-	-	< 0,1	0,2	-	-	-
Fibrobacteres	-	-	-	6,5	-	-	-	-	-	-
Spirochaetes	-	1,1	-	1	-	-	0,2	-	-	-
Fusobacteria	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Planctomycetes	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyanobacteria	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
Verrucomicrobia	-	-	-	0,3	-	-	< 0,1	-	-	-
Synergistetes	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
TM7	-	-	0,1	-	-	-	< 0,1	-	-	-
Lentisphaerae	-	-	-	-	-	-	< 0,1	-	-	-
Archae	-	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-
Inconnu	-	3,4	0,5	-	7,3	1,7	0,6	-	-	-
Source	(Banks <i>et al.</i> , 2009)	(Lu <i>et al.</i> , 2008b)	(Lu <i>et al.</i> , 2009)	(Matsui <i>et al.</i> , 2010)	(Scupham <i>et al.</i> , 2008)	(Zhu <i>et al.</i> , 2002)	(Godoy-Vitorino <i>et al.</i> , 2008)	(Vasäi <i>et al.</i> , 2013)	(Vasäi <i>et al.</i> , 2013)	(Vasäi <i>et al.</i> , 2013, Soumis)

Tableau 24 : Abondance relative des différents taxons composant le microbiote de différentes espèces aviaires d'après Kohl (2012) et Vasäi *et al* (2013).

mouette ont un microbiote proche de celui du poulet (Lu *et al.*, 2008b, Lu *et al.*, 2009, Matsui *et al.*, 2010) tandis que la dinde possède un microbiote plus proche de celui des canards qui sont pourtant assez éloignés sur le plan génétique avec 54,2% de *Bacteroidetes* et 32,3% de *Firmicutes* (Scupham *et al.*, 2008) suggérant que l'environnement de croissance ainsi que le régime alimentaire pourraient jouer un rôle assez important dans l'implantation et la diversité du microbiote. Au niveau de l'iléon, les *Bacilli* sont majoritaires chez le canard Pékin comme chez le poulet cependant si on se penche sur des niveaux taxonomiques plus fins on retrouve une distribution différente. En effet les poulets présentent environ 70% des séquences affectées au genre *Lactobacillus* (Lu *et al.*, 2008a) tandis que ce sont les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* qui sont les plus représentés chez le canard Pékin. Chez les canards de Barbarie et les canards mulards la différence est encore plus flagrante car ici ce ne sont plus des bactéries anaérobies facultatives qui sont dominantes mais bien des anaérobies strictes et notamment des *Clostridium*, bactéries majoritaires chez le poulet uniquement dans les caeca suggérant une forte différence de potentiel métabolique entre les différents segments entre le canard et le poulet.

3. Impact du gavage sur le microbiote intestinal des canards

(Articles 1 et 2) :

L'alimentation est un facteur important influençant le microbiote du tractus digestif (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007c, Hammons *et al.*, 2010, Karasov *et al.*, 2011). Dans le cas des canards pour la production de foie gras les animaux sont mis en gavage et sont nourris exclusivement avec du maïs riche en carbohydrates et permettant un apport important en énergie. Ce changement de régime alimentaire (riche en amidon) et de quantité d'aliment

ingéré pourraient entraîner potentiellement des changements au niveau de la composition du microbiote intestinal des canards. C'est dans cette optique que nous avons voulu étudier l'impact de la mise en gavage sur le microbiote iléal et caecal des trois types génétiques étudiés.

Le changement d'alimentation qu'est le gavage a induit des modifications au sein du microbiote des canards. En effet, tout d'abord, nous avons pu voir que l'iléon est plus fortement touché par le gavage que les caeca. Cependant les espèces étudiées montrent des réponses différentes durant le gavage. A mi-gavage chez les canards Pékin nous avons pu observer une augmentation des *Clostridia* (+35%) ainsi qu'une diminution des *Bacilli* (-29%) qui est transitoire. En fin de gavage les *Bacilli* représentent 70% de la communauté. En ce qui concerne les Barbarie, il y a une forte augmentation des *Bacilli* à mi-gavage représentant alors environ 85% de la population totale. En fin de gavage, les *Bacilli* diminuent tandis que les *Clostridia* augmentent, les *Bacilli* représentent tout de même environ 60% de la communauté. Chez les canards mulards ce sont les *Gammaproteobacteria* (+40%) qui augmentent à mi-gavage, cette augmentation est transitoire. Nous retrouvons ainsi environ 60% de *Bacilli* et 30% de *Clostridia* en fin de gavage. Au niveau des caeca seulement quelques changements sont à noter seulement ceux-ci n'entraînent pas de changements majeurs au sein du microbiote. Nous avons également pu voir l'évolution du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*, qui chez l'Homme est en étroite relation avec le poids, en effet ce ratio augmente chez les personnes obèses tandis qu'il tend à diminuer lors d'une perte de poids (Ley *et al.*, 2006). Dans l'iléon on peut voir que ce sont les *Firmicutes* qui augmentent tout au long du gavage entraînant donc une augmentation du ratio *Firmicutes/Bacteroidetes*. L'augmentation du ratio semble donc lié à la période de gavage et donc au niveau d'engraissement. Nous avons pu également voir que le genre *Bacilli* est celui qui est le plus influencé par le gavage, son augmentation se fait à mi-gavage chez les Barbarie tandis qu'elle ne se fait qu'en fin gavage

chez les Pékin et les mulards. Cette différence est également observée au niveau physiologique, en effet comme indiqué précédemment les canards de Barbarie ont une aptitude à l'engraissement hépatique plus importante que les canards Pékin et mulard.

Si nous nous intéressons aux genres bactériens au sein de *Bacilli* qui sont impactés par le gavage, on se rend compte que l'augmentation des *Bacilli* au sein de l'iléon est due en majeure partie à l'augmentation des *Lactobacillus* spp. Ce genre bactérien est connu comme étant composé de bactéries amylolytiques et productrices d'acide lactique et augmentent fortement pour des régimes riches en amidon comme c'est le cas lors du gavage (Medina *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2002, Regmi *et al.*, 2011, Tachon *et al.*, 2013), ces bactéries permettent la digestion des composés végétaux non assimilables par l'hôte et par son activité amylolytique permet une meilleure assimilation de l'amidon procurant ainsi de l'énergie supplémentaire qui peut alors être utilisée par l'hôte (Lodemann *et al.*, 2006).

On peut donc se demander si les changements engendrés pendant le gavage au niveau des *Bacilli* et notamment les *Lactobacillus* pourraient être impliqués dans une prédisposition au niveau du stockage lipidique ?

4. Impact de l'ajout d'un probiotique sur le microbiote intestinal des canards mulards (Article 2):

Nous avons pu voir ici que le gavage entraînait des changements majeurs au sein du microbiote notamment au sein des *Lactobacillus* spp. De nombreuses bactéries de ce genre sont largement utilisées en tant que probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante ont un effet

bénéfique sur l'hôte (Fuller, 1995). Ces bactéries ont plusieurs caractéristiques notamment une action sur l'environnement de l'hôte, la lutte contre les bactéries pathogènes (effet de barrière, compétition, changement des paramètres physico-chimiques,...) (Netherwood *et al.*, 1999, Van Winsen *et al.*, 2001, La Ragione *et al.*, 2004, Servin, 2004).

C'est dans cette optique que nous avons voulu étudier l'effet d'un probiotique en particulier une souche de *Lactobacillus sakei* sur le microbiote intestinal des canards mulards en phase de gavage.

Lors de l'ajout de probiotiques, on observe une augmentation importante des *Bacilli* (dont fait partie notre probiotique) à mi-gavage passant ainsi de 15% à 63% de la population totale. En parallèle de cette augmentation, les *Gammaproteobacteria* diminuent largement (-37%). En fin de gavage, on observe une diminution des *Clostridia* de 26% et une légère augmentation des *Bacteroidia* d'environ 6,5%. En fin de gavage, les *Bacilli* dont majoritairement des *Lactobacillus* représentent 60% de la population totale. Au niveau des caeca très peu de changements sont observés au niveau de la diversité du microbiote, nous avons pu voir qu'il n'y a pas d'effet statistique du probiotique qui peut être expliqué par l'action en amont au niveau de l'iléon. De plus, les conditions rencontrées au niveau des caeca notamment les conditions anaérobies strictes ainsi que la structure des caeca ne sont pas en faveur d'une action des *Lactobacillus*. Au niveau de l'iléon par contre on retrouve un effet significatif de l'ajout de probiotiques sur le microbiote intestinal. Durant cet ajout on observe l'augmentation des *Lactobacillus* spp. et en parallèle une diminution de l'abondance relative d'autres familles bactériennes comme les *Enterobacteriaceae* qui sont potentiellement pathogènes. L'augmentation des *Lactobacillus* peut également empêcher la croissance ou l'implantation d'autres bactéries (La Ragione *et al.*, 2004). Cette action des lactobacilli a été montrée dans des espèces aviaires en réduisant le nombre des coliformes ou des *Clostridium perfringens* par exemple (Watkins & Kratzer, 1983, Mountzouris *et al.*, 2007). L'action des

Lactobacillus permet également comme cité plus haut une meilleure digestion des aliments par leur action amylolytique (Champ *et al.*, 1983, Giraud *et al.*, 1994), l'aliment de gavage étant exclusivement composé d'amidon ce genre bactérien permettrait alors un apport d'énergie important (Lodemann *et al.*, 2006) nécessaire pour la mise en place de la stéatose hépatique durant la production de foie gras. Cependant malgré ce qui a été montré chez les canetons et les poussins, l'ajout de probiotiques n'a pas entraîné dans notre étude une augmentation des performances zootechniques notamment la prise de poids vif ou le poids de foie (Angelakis & Raoult, 2010). Cette différence peut être due à différents paramètres dont notamment le mode d'administration du probiotique : intragastrique (Angelakis & Raoult, 2010) ou alors dans la pâtée de gavage (notre étude). De plus lors de l'étude citée précédemment les probiotiques sont ajoutés lors des premiers jours de la vie soit au moment de la mise en place du microbiote intestinal.

Donc malgré les changements engendrés par l'ajout du probiotique notamment la forte augmentation des lactobacilles, aucun changement au niveau zootechnique n'a été observé. Cependant, au vu des caractéristiques des probiotiques on peut penser que cette addition de probiotiques pourrait avoir un effet sur le métabolisme lipidique de l'hôte et également permettre une augmentation du bien-être des animaux lors du gavage.

5. Impact de l'ajout de cadmium sur le microbiote intestinal des canards Pékin et Barbarie pendant le gavage (Article 3) :

Comme montré dans d'autres études le cadmium s'accumule dans les reins (Barjaktarovic *et al.*, 2002, Nam *et al.*, 2005, Lucia *et al.*, 2009b), et nous avons montré ici que cette bioaccumulation est influencée par le niveau de contamination. En effet quelle que soit la

période, les canards témoins présentaient des niveaux plus bas que les animaux ayant reçu des contaminations de 1 mg/kg d'aliment qui sont eux-mêmes plus bas que ceux ayant reçu des contaminations de 10 mg/kg. De plus le cadmium s'accumule de façon importante selon le temps d'exposition. Nous avons ainsi pu détecter une interaction entre la période de gavage et le niveau de contamination en cadmium ainsi qu'une interaction entre le type génétique (Pékin ou Barbarie) et la présence de cadmium. Nous avons également remarqué que les canards de Barbarie accumulaient plus que les canards Pékin, ce qui n'est pas en accord avec les travaux précédents qui ont montré que les Pékin accumulaient plus, cependant pour ces études le temps d'exposition était plus long et surtout la contamination n'avait pas lieu au cours du gavage (Lucia *et al.*, 2009b, Lucia *et al.*, 2009a). Les canards Pékin montrent une capacité de stockage lipidique périphérique importante alors que chez les canards de Barbarie ce stockage est hépatique (Davail *et al.*, 2003b), le foie étant une des cibles intermédiaire de l'accumulation du cadmium (Lucia, 2009) on peut se demander si les capacités de stockage lipidique peuvent expliquer le différentiel d'accumulation du cadmium ainsi que les résultats contradictoires par rapport aux travaux antérieurs au sein du laboratoire ?

Nous avons également pu observer que la présence de cadmium modifiait les communautés bactériennes du microbiote lors du gavage. Il a ainsi été montré qu'une contamination aigüe au cadmium permettait l'augmentation des *Bacilli* (+35%) en fin gavage tandis que les *Clostridia* et les *Bacteroidia* diminuaient chez les Barbarie, tandis que chez les canards Pékin, le microbiote n'était que très peu modifié et les classes majoritaires restaient les mêmes. Cependant quel que soit le type génétique les animaux contaminés (1 ou 10 mg/kg d'aliment) présentaient des flores statistiquement différentes. Une interaction période/cadmium ainsi que type génétique/cadmium a également été montrée.

Dans les caeca, la contamination au cadmium induit également des changements du microbiote notamment au sein des *Bacteroidetes* et plus précisément les *Bacteroidia* qui

diminuent à mi-gavage puis augmentent en fin de gavage chez les canards de Barbarie en présence de cadmium tandis que les *Bacteroidia* diminuent seulement en fin de gavage dans les Pékin. Les différences de composition du microbiote ont montré un effet de la dose de cadmium ainsi qu'une interaction entre le type génétique et la présence de cadmium de même qu'une interaction entre la période et la présence de cadmium.

Le microbiote intestinal est le premier « organe » rencontré lors de l'ingestion de métaux lourds. Berzina *et al* (2007) ont montré une réponse intestinale lors de la contamination par du cadmium en augmentant les cellules caliciformes et les lymphocytes granulaires. La réponse à une telle contamination dépend de la faculté d'adaptation des bactéries au métal lourd incriminé, ainsi il a été montré que le cadmium affecte la physiologie et la capacité de division des *Escherichia coli* (Hossain *et al.*, 2012, Hossain & Mukherjee, 2013). L'effet du cadmium sur le microbiote a été montré chez la souris montrant que lors de fortes contaminations (de 23 à 50 mg/kg) et sur une durée plus longue que notre expérience (40 jours) la diversité bactérienne est diminuée avec comme cible principale les bactéries Gram positives (Fazeli *et al.*, 2010). Nous pouvons ainsi se demander si les changements de communautés observés lors de l'ajout de cadmium notamment les *Lactobacillus* (*Bacilli*) peuvent expliquer en partie l'accumulation différentielle chez les deux types génétiques étudiés ?

Conclusions et Perspectives

Les objectifs de ces travaux étaient d'apporter une connaissance sur la composition du microbiote de l'iléon et des caeca de deux types génétiques parentaux : le canard Pékin (*Anas Platyrhynchos*), le canard de Barbarie (*Cairina Moschata*) et également leur hybride le canard mulard ainsi que l'effet du gavage et de différents composés sur le microbiote. Pour cela des techniques de biologie moléculaire notamment de la PCR quantitative et du pyroséquençage ont été utilisées.

De nombreuses études ont été réalisées chez le poulet mais très peu d'études s'intéressent au canard. Nous nous sommes donc proposé ici dans un premier temps de faire pour la première fois l'inventaire de la composition du microbiote des trois espèces étudiées.

Nous avons pu ainsi remarquer que la composition générale des différents types génétiques est la même à savoir une prédominance des *Firmicutes* dans l'iléon et des *Bacteroidetes* dans les caeca. Cependant en regardant à un autre niveau taxonomique on peut se rendre compte de la différence de composition du microbiote selon le type génétique. Il est toutefois intéressant de noter que le canard mulard présente un microbiote avant gavage plus proche de celui du canard de Barbarie (*Clostridia* puis *Bacilli* sont les classes majoritaires). Ceci est donc en corrélation avec l'engraissement périphérique plus important du canard Pékin. Il serait donc intéressant d'identifier et d'utiliser par méthode culturale des bactéries (probablement des *Lactobacillus*) qui pourraient une fois réimplantées dans un autre type génétique modifier la physiologie de l'animal. En effet, que se passerait-il si le canard Pékin possédait un microbiote type Barbarie avant gavage ? Est-ce que cela modifierait les performances zootechniques du canard Pékin ? Pourrait-on pré-adapter le canard au gavage ?

Il est bien connu que des modifications du régime alimentaire peuvent modifier le microbiote intestinal. Nous avons donc évalué l'impact du gavage sur le microbiote intestinal des canards Pékin, Barbarie et mulards.

Il a été montré que le gavage qui consiste en un apport exclusif en maïs riche en carbohydrates dans l'alimentation induisait des modifications au sein du microbiote. L'iléon était plus touché par le gavage que les caeca. Cependant les espèces étudiées montrent des réponses différentes durant le gavage. Dans tous les cas, le genre *Lactobacillus* est favorisé par le substrat carbohydrates dans l'iléon avec néanmoins une augmentation très élevée de ce genre à mi gavage uniquement pour le canard de Barbarie appuyant encore les différences physiologiques observées. Cela soulève à nouveau l'idée de préadapter le microbiote au gavage en favorisant avant gavage la flore lactique qui se développe bien avec ce type de substrat. En effet, favoriser la croissance d'une microflore bénéfique a été en partie réalisé au cours de notre travail concernant l'effet de l'ajout d'un probiotique (*Lactobacillus sakei*) sur le microbiote intestinal des canards mulard lors de la période de gavage. Nous avons ainsi montré une augmentation du genre *Lactobacillus* accompagné d'une diminution des entérobactéries confirmant l'effet de certains probiotiques qui en occupant les niches écologiques empêchent la croissance de bactéries potentiellement pathogènes. Ce genre est bien connu pour ses activités amylolytiques et pourrait nous permettre de réaliser une sélection de souches ayant une forte activité enzymatique et en pré-adaptant la composition du microbiote intestinal, de réduire potentiellement la durée du gavage et/ou la quantité de maïs ingérée.

Finalement, lors de l'ajout du probiotique aucun changement des performances zootechniques n'a été mis en évidence (poids vif, poids de foie) par rapport aux animaux sans probiotiques. L'absence d'effet sur les performances zootechniques est certes décevante mais suite au gavage la mise en place de la stéatose hépatique étant un processus multifactoriel, il

est peut être difficile de voir des effets détectables. On peut néanmoins se demander si des effets n'auraient pas pu être observés, si d'une part, le probiotique avait été donné en phase de démarrage ou en début de croissance lors de la mise en place du microbiote intestinal et d'autre part, voir si la supplémentation avec des *Lactobacillus* endogènes isolés en fin de gavage pourrait avoir un effet sur le microbiote et les animaux. Pour finir, cette étude menée dans une station expérimentale aux très bonnes conditions sanitaires n'a peut être pas permis de voir le possible effet de la souche sur le plan sanitaire dans des conditions d'élevages plus drastiques.

Enfin, les contaminations naturelles retrouvées notamment dans les eaux du bassin aquitain nous ont amené à nous interroger sur l'effet d'une contamination au cadmium sur le microbiote intestinal des canards Pékin et Barbarie lors du gavage. Ces travaux nous ont montré que l'ajout de cadmium induisait des modifications au sein du microbiote, malgré ces modifications, celles-ci ne sont pas très importantes et ne changent pas radicalement les abondances des différentes classes observées. Néanmoins, une fois de plus, les *Lactobacillus* représentent le genre qui varie le plus, suggérant le rôle essentiel de celui-ci au sein de la communauté bactérienne du canard. L'accumulation du cadmium au niveau des reins a montré un effet de la dose ainsi que de la période sur cette accumulation. Nous avons pu également observer une tendance à une accumulation différente selon le type génétique étudié confirmant le rôle essentiel de la génétique dans notre étude quelles que soient les approches menées. Des effets combinés entre l'effet du cadmium et l'effet de la durée ainsi que l'effet du cadmium combiné à l'effet du type génétique sur le microbiote ont été également révélés.

Ces différents travaux nous ont permis de mieux appréhender la composition du microbiote des canards Pékin, Barbarie et mulard ainsi que voir l'impact du gavage et de différents composés sur celui-ci. Ces études ne sont que la première étape dans la compréhension et la connaissance du microbiote ainsi que son importance au niveau de l'hôte.

Pour permettre d'améliorer les connaissances du microbiote et favoriser certains microorganismes, différentes études peuvent être réalisées pour poursuivre ces travaux. Tout d'abord l'étude de la mise en place du microbiote dès l'éclosion puis son suivi tout au long de la croissance doit être fait ainsi que la comparaison de celui-ci chez les canards Pékin, Barbarie et mulard.

Au vu des différentes études réalisées chez les poussins et les canetons qui ont montrées que l'ajout d'un probiotique dès le plus jeune âge permettait une augmentation des performances zootechniques des animaux notamment au niveau de leur poids vif et leur poids de foie, une étude de l'impact d'un probiotique sur le microbiote des canards dès le plus jeune âge et son suivi jusqu'à la fin du gavage est à prévoir.

Une étude des activités enzymatiques lors des différentes périodes étudiées permettrait potentiellement de voir au niveau de quelles activités se produisent les changements majeurs suivant les groupes bactériens mis en jeu (amylase, cellulase, hémicellulase, ...).

Enfin, des approches métabolomiques et/ou protéomiques permettraient de comprendre les différentes fonctions mises en place selon les conditions afin de détecter les cibles potentiellement importantes et indispensables lors des changements observés pendant nos études au niveau de l'iléon puisque les caeca sont finalement assez peu touchés en terme de composition. Connaître la composition du microbiote est certes essentielle mais la caractériser par des grands groupes fonctionnels ou métaboliques est aujourd'hui primordial. En effet, des paramètres relativement simples, tels que le pH des différents segments ou le potentiel redox n'ont jamais été étudiés.

Ces différentes approches nous permettraient d'établir une relation entre la composition du microbiote et les capacités métaboliques de l'hôte notamment les relier au métabolisme lipidique lors de la phase de gavage.

Nos travaux contribuent au développement des connaissances des microbiotes intestinaux des animaux. Ils fournissent en outre, des perspectives d'études dans le but de comprendre les fonctions métaboliques ainsi que les interactions du microbiote avec son hôte.

Références Bibliographiques

- Ahmed N, Qu A, Brulc JM, *et al.* (2008) Comparative Metagenomics Reveals Host Specific Metavirulomes and Horizontal Gene Transfer Elements in the Chicken Cecum Microbiome. *PLoS ONE* **3**: e2945.
- Andersson AF, Lindberg, M., Jakobson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., Engstrand, L. (2008) Comparative Analysis of Human Gut Microbiota by Barcoded Pyrosequencing. *PLoS ONE* **3**: e2836.
- Angelakis E & Raoult D (2010) The Increase of *Lactobacillus* Species in the Gut Flora of Newborn Broiler Chicks and Ducks Is Associated with Weight Gain. *PLoS ONE* **5**.
- Apajalahti J, Kettunen A & Graham H (2004) Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult. Sci. J.* **60**: 223-232.
- Asakura H, Tajima O, Watarai M, Shirahata T, Kurazono H & Makino S (2001) Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chicks. *J. Vet. Med. Sci.* **63**: 1221-1224.
- Babilé R, Auvergne A., Andrade V., Héraut F., Bénard G., Bouillier-Oudot M. & H. M (1996) Réversibilité de la stéatose hépatique chez le canard mulard. . *2èmes Journées de la recherche sur les palmipèdes à foie gras* 107-110.
- Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS & Burgess JG (2011) Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J. Microbiol. Methods* **86**: 351-356.
- Backhed F, Ding H, Wang T, *et al.* (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc.Nat.Acad.Sci.***101**: 15718-15723.
- Baéza E, Rideau N., Chartrin P., *et al.* (2005) Canards de Barbarie, Pékin et leurs hybrides : aptitude à l'engraissement. *INRA Prod. Anim* **18**: 131-141.
- Banks JC, Cary SC & Hogg ID (2009) The phylogeography of Adelie penguin faecal flora. *Environ. Microbiol.* **11**: 577-588.

- Barjaktarovic L, Elliott J & Scheuhammer A (2002) Metal and metallothionein concentrations in Scoter (*Melanitta spp.*) from the Pacific northwest of Canada, 1989-1994. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**: 486-491.
- Barnes E, Phil D & Bact D (1972) The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1475-1479.
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT & McMurdo MET (2004) Characterization of Bacterial Communities in Feces from Healthy Elderly Volunteers and Hospitalized Elderly Patients by Using Real-Time PCR and Effects of Antibiotic Treatment on the Fecal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3575-3581.
- Bendell LI (2010) Sea ducks and aquaculture: the cadmium connection. *Ecotoxicology* **20**: 474-478.
- Berzina N, Markows J, Isajevs S, Apsite M & Smirnova G (2007) Cadmium-Induced Enteropathy in Domestic Cocks: A Biochemical and Histological Study after Subchronic Exposure. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101**: 29-34.
- Bjerrum L, Engberg R, Leser T, Jensen B, Finster K & Pedersen K (2006) Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Culture-Based Techniques. *Poult. Sci.* **85**: 1151-1164.
- Breton J, Daniel C, Dewulf J, *et al.* (2013a) Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicol. Lett.* **222**: 132-138.
- Breton J, Le Clère K, Daniel C, *et al.* (2013b) Chronic ingestion of cadmium and lead alters the bioavailability of essential and heavy metals, gene expression pathways and genotoxicity in mouse intestine. *Arch. Toxicol.*

- Brun J & Larzul C (2003) Inheritance of reproductive traits of female common ducks (*Anas platyrhynchos*) in pure breeding and in inter-genic crossbreeding with muscovy ducks (*Cairina moschata*). *Briti.Poult. Sci.* **44**: 40-45.
- Burger J (2008) Assessment and management of risk to wildlife from cadmium. *Sci. Total Environ.* **389**: 37-45.
- Champ M, Szylit O, Raibaud P & Aït-Abdelkader N (1983) Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. *J.Appl. Bact.***55**: 487-493.
- Chartrin P, Bernadet M, Sannier M & Baeza E (2013) Is ability to hepatic steatosis influenced by age at the beginning of the overfeeding period in Muscovy and Pekin ducks? *animal* **7**: 682-687.
- Chartrin P, Brodeau T, Meteau K, *et al.* (2006) Canards de Barbarie, mulard et hinny: quelles sont les particularités sensorielles de leur foie gras? *Viandes Prod. Carnés* **25**: 13-17.
- Chaucheyras-Durand., F F, G. B, G. t & M. G, P. (1998) Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.* **38**: 275-280.
- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Salmon J & Gouet P (1996) Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Can. J.Microbiol.***42**: 927-933.
- CIFOG (2013) Rapport économique de l'année 2012.
- Costello EK, Gordon JI, Secor SM & Knight R (2010) Postprandial remodeling of the gut microbiota in Burmese pythons. *The ISME Journal* **4**: 1375-1385.
- Czerucka D & Rampal P (2002) Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microb. Infect.* **4**: 733-739.
- Davail S, Rideau N, Guy G, André JM & Hoo-Paris R (2003a) Pancreatic Hormonal and Metabolic Responses in Overfed Ducks. *Hormone .Metab.Res.***35**: 439-443.

- Davail S, Rideau N, Guy G, André J-M, Hermier D & Hoo-Paris R (2003b) Hormonal and metabolic responses to overfeeding in three genotypes of ducks. *Comp.Biochem. Physiol. Part A: Mol. & Integrative Physiol.* **134**: 707-715.
- Dehority B (1997) Foregut fermentation. In: Mackie RI, White BA.. *Gastrointestinal Microbiology*, Chapman & Hall, Londres, **1**: 39-81.
- Devereux R, Shao-Hua, H., Doyle, C.L., Orkland, S., Stahl, D.A., LeFall, J., Whitman, W.B. (1990) Diversity and Origin of *Desulfovibrio* Species: Phylogenetic Definition of a Family. *J. Bacteriol.* **172**: 3609-3619.
- Ducluzeau R (1999) La flore intestinale de l'Homme: composition et rôle physiologique. *Bergogne-Bézérin E. Impact intestinal de l'antibiothérapie, Phase 5 éditions médicales, Paris* 9-24.
- Ducluzeau R & Raibaud P (1979) Ecologie Microbienne du tube digestif. *Actualités Scientifiques de l'INRA. Editions Masso, Paris.*
- Engberg RM, Hedemann M, Steenfeldt S & Jensen B (2004) Influence of Whole Wheat and Xylanase on Broiler Performance and Microbial Composition and Activity in the Digestive Tract. *Poultry Science* **83**.
- European C (2003) REGULATION (EC) No 1831/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union.*
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM & Akkermans ADL (2002) Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 219-226.
- Fazeli M, Hassanzadeh P & Alaei S (2010) Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum. Exp. Toxicol.* **30**: 152-159.

- Fonty G (1984) Implantation de la microflore et des protozoaires ciliés dans le rumen d'agneaux holoxéniques et néo-holoxéniques. Facteurs écologiques déterminant l'implantation de *Bacteroides succinogenes* (S85) et des protozoaires ciliés dans le rumen d'agneaux holoxéniques isolés, d'agneaux méroxéniques et d'agneaux gnotoxéniques; évolution des principaux paramètres digestifs. Thèse de Doctorat ès Sciences de l'université de Clermont-Ferrand.
- Fonty G & Chaucheyras-Durand F (2007a) Niches écologiques potentielles des principales espèces microbiennes, capacités métaboliques. In : Les écosystèmes digestifs (ed. by Lavoisier). 157-195.
- Fonty G & Chaucheyras-Durand F (2007b) Diversité et structure des communautés prokaryotes. In: Les écosystèmes digestifs (ed. by Lavoisier), 2007. 147-148.
- Fonty G & Chaucheyras-Durand F (2007c) Facteurs influençant la structure de l'écosystème microbien du tube digestif. In: Les écosystèmes digestifs (ed. by Lavoisier). 235-273.
- Fonty G, Gouet P & Riou Y (1979) Effect of milk composition on the gastrointestinal microflora of artificially reared young rabbits. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* **19**: 567-571.
- Friswell MK, Gika H, Stratford IJ, Theodoridis G, Telfer B, Wilson ID & McBain AJ (2010) Site and Strain-Specific Variation in Gut Microbiota Profiles and Metabolism in Experimental Mice. *PLoS ONE* **5**: e8584.
- Fuller R (1984) Microbial activity in the alimentary tract of birds. *Proceedings of the Nutrition Society* **43**: 55-61.
- Fuller R (1995) Probiotics. The scientific basis. *Chapman & Hall, London*.
- Giraud E, Champailier A & Raimbault M (1994) Degradation of Raw Starch by a Wild Amylolytic Strain of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4319-4323.
- Godoy-Vitorino F, Ley RE, Gao Z, *et al.* (2008) Bacterial Community in the Crop of the Hoatzin, a Neotropical Folivorous Flying Bird. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5905-5912.

- Gong J, Si W, Forster RJ, *et al.* (2007) 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**: 147-157.
- Halttunen T, Collado M, El-Nezami H, Meriluoto J & Salminen S (2008) Combining strains of lactic acid bacteria may reduce their toxin and heavy metal removal efficiency from aqueous solution. *Lett. Appl. Microbiol.* **46**: 160-165.
- Hammons S, Oh PL, Martínez I, *et al.* (2010) A small variation in diet influences the *Lactobacillus* strain composition in the crop of broiler chickens. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**: 275-281.
- Harms H, Bertele-Harms R & Bruer-Kleis D (1987) Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *New Engl. J. Med.* **316**: 1306-1303.
- Hayek LC & Buzas MA (1996) Surveying Natural Populations, Columbia University Press, New York, NY.
- Hermier D, Rousselot-Pailley D, Peresson R & Sellier N (1994) Influence of orotic acid and estrogen on hepatic lipid storage and secretion in the goose susceptible to liver steatosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1211**: 97-106.
- Hermier D, Salichon M, Guy G, Peresson R, Mourot J & Lagarrigue S (1999) La stéatose hépatique des palmipèdes gavés : bases métaboliques et sensibilité génétique. *INRA Prod. Anim* **12**: 265-274.
- Hermier D, Guy G, Guillaumin S, Davail S, André J-M & Hoo-Paris R (2003) Differential channelling of liver lipids in relation to susceptibility to hepatic steatosis in two species of ducks. *Comp.Biochem. Physiol. Part B: Bioch.Mol. Biol* **135**: 663-675.
- Hossain S & Mukherjee S (2013) Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells. *J. Hazard. Mater.* **260**: 1073-1082.

- Hossain S, Mallick I & Mukherjee S (2012) Cadmium toxicity in *Escherichia coli*: Cell morphology, Z-ring formation and intracellular oxidative balance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **86**: 54-59.
- Hughes M, Smits J, Elliott J & Bennett D (2000) Morphological and pathological effects of cadmium ingestion on Pekin ducks exposed to saline. *J. Toxicol. Environ. Health, A* **61**: 591-608.
- Hughes M, Bennett D, Gray D, Sharp P, Scheuhammer A & Elliott J (2003) Effects of cadmium ingestion on plasma and osmoregulatory hormone concentrations in male and female Pekin ducks. *J. Toxicol. Environ. Health, A* **66**: 565-579.
- Johansen CH, Bjerrum L & Pedersen K (2007) Impact of salinomycin on the intestinal microflora of broiler chickens. *Acta Veterinaria Scandinavica* **49**: 30.
- Jouanneau J, Boutier B, Chiffolleau J, Latouche C & Philipps I (1990) Cadmium in the gironde fluvioestuarine system: Behaviour and flow. *Sci. Total Environ.* **97-98**.
- Karasov WH, Martínez del Rio C & Caviedes-Vidal E (2011) Ecological Physiology of Diet and Digestive Systems. *Annu. Rev. Physiol.* **73**: 69-93.
- Khanal R & Nemere I (2008) Endocrine regulation of calcium transport in epithelia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**: 1277-1287.
- Klaassen C, Liu J & Choudhouri S (1999) METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**: 267-294.
- Kleessen B, Stoof G, Proll J, Schmiedl D, Noack J & Blaut M (1997) Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. *J. Anim. Sci.* **75**: 2453-2462.
- Klein G, Pack A, Bonaparte C & Reuter G (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**: 103-125.

- Kohl KD (2012) Diversity and function of the avian gut microbiota. *Journal of Comparative Physiology B* **182**: 591-602.
- Kovacs A, Ben-Jacob N, Tayem H, Halperin E, Iraqi FA & Gophna U (2010) Genotype Is a Stronger Determinant than Sex of the Mouse Gut Microbiota. *Microb. Ecol.* **61**: 423-428.
- Kubista M, Andrade J, Bengtsson M, *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medecine* **27**: 95-125.
- La Ragione R (2003) Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet. Microbiol.* **94**: 245-256.
- La Ragione RM, Narbad A, Gasson MJ & Woodward MJ (2004) In vivo characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**: 197-205.
- Lan P, Hayashi H, Sakamoto M & Benno Y (2002) Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries. *Microbiol. Immunol.* **46**: 371-382.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4214-4224.
- Leclercq B & Larbier M (1992) Nutrition et Alimentation des Volailles. *INRA*.
- Leser TD & Mølbak L (2009) Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.* **11**: 2194-2206.
- Ley RE, Tumbaugh PJ, Klein S & Gordon JI (2006) Human gut microbes associated with obesity. *Nature* **444**.
- Ley RE, Hamady M, Lozupone C, *et al.* (2008) Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science* **320**: 1647-1651.

- Liu Z, Lozupone C, Hamady M, Bushman FD & Knight R (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* **35**: e120-e120.
- Lodemann U, Hübener K & Martens H (2006) Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. *Archives of Animal Nutrition* **60**: 35-48.
- Lu J, Hofacre C, Smith F & Lee MD (2008a) Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. *animal* **2**: 669-676.
- Lu J, Santo Domingo JW, Hill S & Edge TA (2009) Microbial Diversity and Host-Specific Sequences of Canada Goose Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5919-5926.
- Lu J, Santo Domingo JW, Lamendella R, Edge T & Hill S (2008b) Phylogenetic Diversity and Molecular Detection of Bacteria in Gull Feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 3969-3976.
- Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ & Lee MD (2003) Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6816-6824.
- Lucia M (2009) Analyse de la contamination polymétallique des oiseaux aquatiques - Etude expérimentale de la bioaccumulation du cadmium, réponses adaptatives et effets toxiques associés. *Thèse de l'université de Pau et des Pays de l'Adour*.
- Lucia M, André J, Gontier K, Diot C, Veiga J & Davail S (2010a) Trace element concentrations (mercury, cadmium, copper, zinc, lead, aluminium, nickel, arsenic, and selenium) in some aquatic birds of the southwest Atlantic coast of France. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **58**: 844-853.
- Lucia M, Andre J-M, Gonzalez P, Baudrimont M, Gontier K, Maury-Brachet R & Davail S (2009a) Impact of cadmium on aquatic bird *Cairina moschata*. *BioMetals* **22**: 843-853.
- Lucia M, André J-M, Gonzalez P, *et al.* (2009b) Effect of dietary cadmium on lipid metabolism and storage of aquatic bird *Cairina moschata*. *Ecotoxicology* **19**: 163-170.

- Lucia M, André J, Gonzalez P, *et al.* (2010b) Effects of dietary cadmium contamination on bird *Anas platyrhynchos*—Comparison with species *Cairina moschata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **73**: 2010-2016.
- Lumpkins BS, Batal AB & Lee M (2008) The Effect of Gender on the Bacterial Community in the Gastrointestinal Tract of Broilers. *Poultry Science* **87**: 964-967.
- Lumpkins BS, Batal AB & Lee MD (2010) Evaluation of the bacterial community and intestinal development of different genetic lines of chickens. *Poultry Science* **89**: 1614-1621.
- Macfarlane GT & Gibson G (1994) Metabolic activities of the normal colonic flora. *Human Health* 17-52.
- Mackie I, Sghir A & Gaskins H (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**: 1035-1045.
- Marteau P, Vesa T & Rambaud J (1997) Lactose maldigestion. In: Fuller R. *Probiotics 2 : applications and practical aspects*, Chapman & Hall, Londres. 65-88.
- Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y & Rambaud J (1993) The fate and effects of transiting, nonpathogenic microorganisms in the human intestine. *Worlds review of nutrition and dietetics* **74**: 1-21.
- Matsui H, Kato Y, Chikaraishi T, Moritani M, Ban-Tokuda T & Wakita M (2010) Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. *Anaerobe* **16**: 83-93.
- Mead G (1989) Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *The Journal of Experimental Zoology* **3**: 48-54.
- Medina B, Girard ID, Jacoto E & Julliand V (2002) Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J. Anim. Sci.* **80**: 2600-2609.

- Moreau M & Gaboriau-Routhiau V (2001) Influence of Resident Intestinal Microflora on the Development and Functions of the Gut-Associated Lymphoid Tissue. *Microb. Ecol. Health Dis.* **13**: 65-86.
- Moreau M, Raibaud P & Muller M (1982) Relation entre le développement du système immunitaire intestinal à IgA et l'établissement de la flore microbienne dans le tube digestif du souriceau holoxénique. *Ann. Immunology* 29-39.
- Morozzi G, Cenci G, Scardazza F & Pitzurra M (1986) Cadmium uptake by growing cells of gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbios* **48**: 27-35.
- Mountzouris KC, Tsirtsikos P, Kalamara E, Nitsch S, Schatzmayr G & Fegeros K (2007) Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. *Poultry Science* **86**: 309-317.
- Mulder IE, Schmidt B, Stokes CR, *et al.* (2009) Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biol.* **7**: 79.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Elrich H (1986) Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 263-273.
- Nam D, Anan Y & Ikemoto T, Tanabe, S. (2005) Multielemental accumulation and its intracellular distribution in tissues of some aquatic birds. *Mar. Pollut. Bull.* **50**: 1347-1362.
- Nava GM, Bielke LR, Callaway TR & Castañeda MP (2005) Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Anim. Health Res. Rev.* **6**: 105-118.
- Netherwood T, Gilbert HJ, Parker DS & A.G. OD (1999) Probiotics Shown To Change Bacterial Community Structure in the Avian Gastrointestinal Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5134-5138.

- Oksanen J, Blanchet F, Kindt R, *et al.* (2010) vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-1. *R package version* 1.17-16.
- Oliveira M, Serafim A, Bebianno MJ, Pacheco M & Santos MA (2008) European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **70**: 20-26.
- Pingel H, Guy G & Baéza E (2012) in : Production de canards. *Savoir Faire - Editions Quae*.
- 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 Res.* **35**: 7188-7196.
- Regmi PR, Metzler-Zebeli BU, Ganzle MG, van Kempen TATG & Zijlstra RT (2011) Starch with High Amylose Content and Low In Vitro Digestibility Increases Intestinal Nutrient Flow and Microbial Fermentation and Selectively Promotes *Bifidobacteria* in Pigs. *J. Nutr.* **141**: 1273-1280.
- Rehman H, Böhm J & Zentek J (2008) Effects of differentially fermentable carbohydrates on the microbial fermentation profile of the gastrointestinal tract of broilers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **92**: 471-480.
- Ridsdale JA & Corry JEL (1999) Study of the Caecal Microflora of Broiler Ducks: A Comparison with Published Data for Chickens. *Anaerobe* **5**.
- Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L & Palva A (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 1166-1177.
- Rossmann T, Roy N & Lin W (1992) Is cadmium genotoxic ? *IARC scientific publications* **118**: 367-375.
- Saadoun A & Leclercq B (1987) In Vivo Lipogenesis of Genetically Lean and Fat Chickens: Effects of Nutritional State and Dietary Fat. *The Journal of Nutrition* **117**: 428-435.

- Saez G, Baeza E, Bernadet MD & Davail S (2010) Is there a relationship between the kinetics of lipoprotein lipase activity after a meal and the susceptibility to hepatic steatosis development in ducks? *Poultry Science* **89**: 2453-2460.
- Sakamoto M, Lan PTN & Benno Y (2007) *Barnesiella viscericola* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Porphyromonadaceae* isolated from chicken caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 342-346.
- Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Takahashi M & Michibata T (2007) Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro. *Proceedings of the Nutrition Society* **62**: 73-80.
- Salanitro J, Blake L, Miurhead P, Maglio M & Goodman J (1978) Bacteria Isolated from the Duodenum, Ileum, and Cecum of Young Chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 782-790.
- Savoini G, DiGiancamillo A, Domeneghi C, Paratte R, Bontempo V, Chevaux E & Dell'Orto V (2003) Role of *Saccharomyces cerevisiae* administration : evaluation of gut morpho-functional aspects in weaned piglets. . In : *Proceedings from Institut-Rosell - Lallemand annual scientific exchange, Québec city* 12-14.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, *et al.* (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7537-7541.
- Scupham A, Patton TG, Bent E & Bayles DO (2008) Comparison of the Cecal Microbiota of Domestic and Wild Turkeys. *Microb. Ecol.* **56**: 322-331.
- Sénat F (2013) Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. www.Sénat.fr.
- Serino M, Luche E, Gres S, *et al.* (2011) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* **61**: 543-553.
- Servin AL (2004) Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 405-440.

- Servin AL & Coconnier M-H (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**: 741-754.
- Shakouri M, Iji P, Mikkelsen L & Cowieson A (2009) Intestinal function and gut microflora of broiler chickens as influenced by cereal grains and microbial enzyme supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **93**: 647-658.
- Simon O, Jadamus A & Vahjen W (2001) Probiotic feed additives - effectiveness and expected modes of action. *Journal of Animal and Feed Sciences* **10**: 51-67.
- Stanley D, Denman SE, Hughes RJ, *et al.* (2012) Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**: 1361-1369.
- Stevens C & Hume I (1998) Contributions of Microbes in Vertebrate Gastrointestinal Tract to Production and Conservation of Nutrients. *Physiol. Rev.* **78**: 393-427.
- Tachon S, Zhou J, Keenan M, Martin R & Marco ML (2013) The intestinal microbiota in aged mice is modulated by dietary resistant starch and correlated with improvements in host responses. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83**: 299-309.
- Taschuk R & Griebel PJ (2012) Commensal microbiome effects on mucosal immune system development in the ruminant gastrointestinal tract. *Animal Health Research Reviews* **13**: 129-141.
- Théron L (2011) Déterminisme biologique de la variabilité de la fonte lipidique à la cuisson du foie gras de canard.
- Tichopad A, Dilger M, Schwarz G & Pfaffl MW (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* **31**.

- Van Dyke MI & McCarthy AJ (2002) Molecular Biological Detection and Characterization of *Clostridium* Populations in Municipal Landfill Sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2049-2053.
- Van Winsen RL, Urlings BAP, Lipman LJA, Snijders JMA, Keuzenkamp D, Verheijden JHM & van Knapen F (2001) Effect of Fermented Feed on the Microbial Population of the Gastrointestinal Tracts of Pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3071-3076.
- Vasaï F, Brugirard Ricaud K, Bernadet MD, Cauquil L, Bouchez O, Combes S & Davail S (2013) Overfeeding and genetics affect the composition of intestinal microbiota in *Anas platyrhynchos* (Pekin) and *Cairina Moschata* (Muscovy) ducks. *FEMS Microbiol. Ecol.*
- Vélez MP, De Keersmaecker SCJ & Vanderleyden J (2007) Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**: 140-148.
- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K & Hammes WP (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2578-2585.
- Wang X, Brown IL, Khaled D, Mahoney MC, Evans AJ & Conway PL (2002) Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 390-397.
- Watkins BA & Kratzer FH (1983) Effect of oral dosing of *Lactobacillus* strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poultry Science* **62**: 2088-2094.
- Wise MG & Siragusa GR (2006) Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J. Appl. Microbiol.* **0**: 1138-1149.
- Wolin M & Miller T (1983) Interactions of microbial populations in cellulose fermentation. *Federation Proceedings* **42**: 109-113.

Wylie K, Truty R, Sharpton T, *et al.* (2012) Novel Bacterial Taxa in the Human Microbiome. *Plos One* **7**: e35294.

Yang Y, Iji PA & Choct M (2009) Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World's Poultry Science Journal* **65**: 97.

Zened A, Combes S, Cauquil L, *et al.* (2013) Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83**: 504-514.

Zhu XY, Zhong T, Pandya Y & Joerger RD (2002) 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 124-137.

Annexes

Liste des annexes

- F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, C. Peillod, P.Daniel, S. Davail. **Effect of overfeeding on the intestinal microbial diversity in mule ducks.** INRA-ROWETT Gut Microbiology 2012 Symposium, Clermont-Ferrand, France. (Poster).

- F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, P.Daniel, C. Peillod, S. Combes, L.Cauquil, O.Bouchez, S. Davail. **Effet d'un probiotique sur le microbiote intestinal des canards mulards durant le gavage.** Dixièmes Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à Foie Gras, La Rochelle, France. (Communication orale).

- F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, S. Davail. **Effect of probiotics on the duck's gut microbiota during overfeeding.** Doctoriales transfrontalières, 2011, Anglet, France.

- F. Vasaï, K. Brugirard Ricaud, S. Davail. **Effect of overfeeding, organic and organometallic compounds on the duck's gut microbiota.** Journées de l'école doctorale 211, 2012, Pau, France.

EFFECT OF OVERFEEDING ON THE INTESTINAL MICROBIAL DIVERSITY IN MULE DUCKS

Florian Vasai*¹, Karine Brugirard-Ricaud*, Patrick Daniel†, Celine Peillod³ et Stéphane DAVAIL*

*IPREM EEM, IUT Pays de l'Adour, 371 Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan, †Laboratoire départemental des Landes, 1 rue Marcel David, BP 219, 40004 Mont de Marsan, ³Palmipôle, 40280 Benquet

¹Corresponding author : florian.vasai@etud.univ-pau.fr

INTRODUCTION

Intestinal microbiota plays a major role in physiology and forms a complex ecosystem. For example, intestinal bacteria can affect gut morphology, nutrition and is known to stimulate immune response and to protect against pathogens. In chickens, the bacterial activity is more intense in the crop, the small intestine (jejunum, duodenum, ileum) and the ceca (Fuller, 1984). Culture-dependent method have shown two bacterial populations : facultative anaerobes from the crop to the small intestine and obligate anaerobes in the ceca (Fuller, 1984, Mead, 1989).

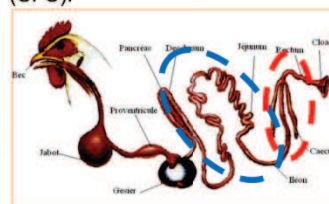
According to culture-dependent method results, molecular methods identified *Lactobacillus* as the major bacterial group in ileum (over 70% are *Lactobacillus* related) and 65% of the sequences in the ceca are Clostridiaceae related in chickens (Lu et al, 2003).

Little is known about microbial diversity in ducks. Culture-dependent method have shown that obligate anaerobes dominates the cecal segment according to studies in chickens. Interestingly, force-feeding (ff) triggers an important difference in the diet of duck, which can affect intestinal microbiota.

In this study, we used both cultural-dependent method and real-time PCR (qPCR) to quantify bacterial community in duodenum, jejunum, ileum (3 segments of the small intestine) and ceca and analyze the effect of force-feeding on bacterial population and diversity.

EXPERIMENTS

- Quantitative cultures for the genera of all aerobic bacteria, lactic bacteria, *Clostridium*, Enterobacteriaceae, coliforms, fecal *Streptococci* were performed by surface plating serially diluted specimens on various selective media, Bacterial population was estimated by counting the colony-forming units (CFU).

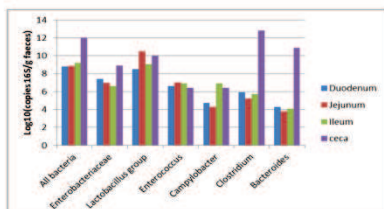


Condition	Before ff	Mid ff	End ff
Number of ducks	10	10	10
Samples	-Duodenum -Jejunum -Ileum -Ceca		

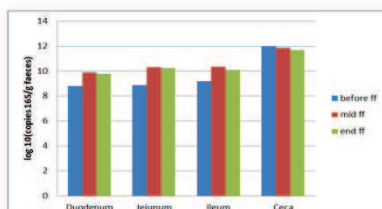
- Genomic DNA from duodenal, jejunal, ileal and cecal samples were extracted employing the QIA DNA stool kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with 220mg as starting material analysis.

- The following bacterial groups for qPCR analysis were enumerated : all bacteria, firmicutes (including *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *Clostridium* spp.), Enterobacteriaceae, *Campylobacter* and Bacteroidetes including *Bacteroides* spp..

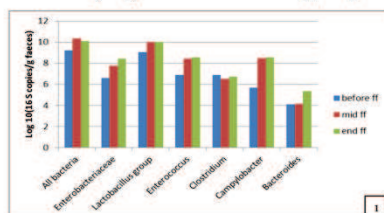
RESULTS



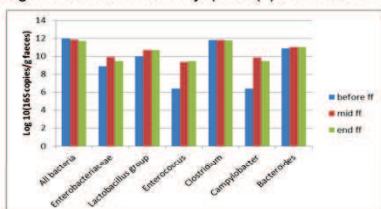
Diversity of gut microbiota before ff (qPCR)



Evolution of all bacteria during ff (qPCR)



Diversity of gut microflora in ileum by qPCR (1) and classic microbiology (2)



Diversity of gut microflora in ceca by qPCR

DISCUSSION

We confirmed that *Lactobacillus* is the major group in the small intestine whereas obligate anaerobes are predominant in ceca (*Clostridium* and *Bacteroides*).

Force-feeding triggers an increase in all bacteria, which can be explained by an increase of *Lactobacillus* group, Enterobacteriaceae and *Enterococcus*.

Force-feeding does not affect all bacteria concentration in ceca but we can see an increase of *Enterococcus* and *Campylobacter*.

Experiments are underway to study the evolution the bacterial community by GS FLX 454 pyrosequencing.

CONCLUSION

Studying the gut microbiota can contribute to a better understanding, especially to know if the increase in *Lactobacillus* group during force-feeding can induced a better healthcare for the host.

❖ Fuller R., 1984. Microbial activity in the alimentary tract of birds. Proc. Nutr. Soc., 43, 55-61.

❖ Mead GC, 1989. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. J Exp Zool Suppl. 1989;3:48-54.

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

EFFET D'UN PROBIOTIQUE SUR LE MICROBIOTE INTESTINAL DES CANARDS MULARDS DURANT LE GAVAGE

**Vasai Florian ¹., Brugirard Ricaud Karine ¹., Daniel Patrick ²., Peillod Céline ³.,
Combes Sylvie ⁴., Cauquil Laurent ⁴., Bouchez Olivier ⁵ et Davail Stéphane ¹**

¹ IPREM-EEM, Université de Pau, IUT des Pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004
Mont de Marsan

² LD40, 1 rue Marcel David, BP219, 40004 Mont de Marsan, France

³ ITAVI, 28, rue du Rocher, 75008 Paris, France

⁴ INRA, UMR 1289, Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme
(TANDEM), Castanet-Tolosan, France

⁵ Plateforme Génomique Bâtiment CRGS-CNRGV, INRA Auzeville, Chemin de Borderouge-
BP 52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

florian.vasai@etud.univ-pau.fr

RÉSUMÉ

Le microbiote tient un rôle essentiel chez les êtres vivants. Afin d'évaluer l'impact de l'incorporation d'une souche de *Lactobacillus sakei* (probiotique) sur la composition du microbiote intestinal des canards mulards mâles au cours du gavage, les contenus digestifs de l'iléon et des caeca ont été étudiés avant, en milieu (repas 12) et en fin de gavage (repas 24). Ces analyses ont été réalisées par pyroséquençage en haut débit en 454 sur le gène codant l'ARN 16S. Avant gavage, l'iléon est essentiellement composé d'une flore anaérobie facultative et plus particulièrement de Lactobacilles. Les caeca, en revanche, présentent une flore anaérobie stricte (*Bacteroides* et *Clostridium*). Les analyses ont montrées que le gavage modifie la diversité microbienne dans l'iléon tout en ayant des flores majoritaires qui restent les mêmes tout au long du processus. L'ajout de probiotique diminue par contre la diversité microbienne dans l'iléon suite à la colonisation du tube digestif par la souche probiotique. Les caeca, eux, sont moins touchés que l'iléon par ces changements. L'ajout d'un probiotique au cours du gavage modifie donc la structure de la communauté microbienne pouvant potentiellement inhiber la prolifération d'une flore pathogène.

ABSTRACT

Effects of a probiotic on the intestinal microbiota during force-feeding on mule ducks.

Microbiota plays an essential role in host health. To assess the impact of incorporating a strain of *Lactobacillus sakei* (probiotic) on the composition of the intestinal microbiota of male mule ducks during force-feeding, the ileum and ceca digestive contents were studied before, at the middle (12 meals) and at the end of feeding (meal 24). These analyzes were performed by high-throughput 454 pyrosequencing of the gene coding for the 16S rRNA. Before force-feeding, ileum is mainly composed of facultative anaerobic flora, especially *Lactobacillus*. The ceca, however, have a strict anaerobic flora (*Bacteroides* and *Clostridium*). Analyzes have shown that the force-feeding alters the microbial diversity in the ileum without affecting majority flora. The addition of probiotic decreases microbial diversity in the ileum after the colonization of the gut by the probiotic strain. Ceca are less affected than ileum by these changes. The addition of a probiotic during force-feeding therefore modifies the structure of the microbial community and potentially inhibits the growth of pathogenic flora.

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal joue un rôle majeur en participant à la stimulation du système immunitaire intestinal en influençant le nombre, la distribution et l'activation des cellules immunitaires par stimuli antigénique. Elle entraîne également des modifications anatomiques et physiologiques et permet l'utilisation des nutriments. Différents stress subis par les animaux comme une modification dans le régime alimentaire peuvent entraîner un changement dans la composition du microbiote (Serino et al. 2011) comme c'est le cas du gavage du canard pendant la production de foie gras. Des études menées chez le poulet et le canard ont permis de montrer que la flore anaérobie facultative (lactobacilles) est majoritaire du jabot à l'iléon tandis qu'une flore anaérobie stricte (*Clostridium* spp. et *Bacteroides*) prédomine dans les caeca (Lu et al. 2003, Brugirard-Ricaud et al. 2010).

De plus, les probiotiques utilisés ces dernières années comme complément alimentaire sont des organismes vivants qui exercent un effet bénéfique sur la flore intestinale de l'hôte (Fuller, 1995). Les probiotiques les plus couramment utilisés sont du genre *Lactobacillus*, il a été démontré qu'ils peuvent modifier la structure des communautés microbiennes (Netherwood et al. 1999), en réduisant le développement de certaines germes bactériens indésirables s'installant dans le tube digestif notamment par la production de bactériocines et d'acide lactique ou par un phénomène de compétition entre ces différentes souches. De plus, certaines souches de *Lactobacillus* ont une action hydrolytique importante et favoriseraient la digestion, l'absorption et rendraient disponibles certains composés non utilisables par l'hôte. Cela pourrait donc se traduire par une amélioration des performances zootechniques des animaux.

L'étude suivante vise donc à déterminer l'effet du gavage sur le microbiote intestinal des canards et l'ajout d'un probiotique (*Lactobacillus sakei*)

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expérimentation animale

Toutes les procédures expérimentales portant sur les canards étaient en conformité avec les lignes directrices nationales françaises pour le soin des animaux à des fins de recherche. Les canards mulards mâles ont été élevés à la station expérimentale INRA d'Artiguères. Jusqu'à 4 semaines les animaux ont été nourris *ad libitum* avec des granulés de 2 mm pour une alimentation fournissant 2850 kcal / kg et un taux de MAT de 17,5 MJ / kg. De 5 à 12 semaines d'âge, les oiseaux ont été nourris avec des granulés de 4mm sur un régime restreint fournissant 2800 kcal / kg pour

une MAT de 15,5 MJ / kg. À 12 semaines d'âge, tous les animaux ont été pesés et 228 canards ont été sélectionnés. Vingt canards ont été sacrifiés avant le gavage. Les 208 animaux restants ont été gavés hydrauliquement selon un plan de distribution classique avec une alimentation constituée de farine de maïs 58% et 42% des grains de maïs sous deux conditions (avec ou sans probiotiques). Les contenus digestifs de 20 canards de chaque condition ont été sacrifiés à 13 semaines (repas 12) et à 14 semaines (repas 24).

Trois heures après le dernier repas les canards ont été tués par exsanguination après éthernarcose afin d'avoir un niveau de remplissage du tube digestif des canards homogène. Vingt canards avec le même poids ont été sélectionnés en 3 points: à 12 semaines (avant le gavage), 13 semaines (à mi gavage, 12 repas) et 14 semaines (en fin de gavage, 24 repas). Les contenus digestifs de l'iléon et des caeca ont été recueillis en vidant les organes par une pression sur ceux-ci, immédiatement pesés et stockés à -20°C avant l'extraction.

1.2 Séquençage haut débit en 454

L'ADN génomique a été extrait à partir d'échantillons en utilisant le kit DNA Stool kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été élué dans 200 µL de tampon AE et conservés à -20 °C.

La préparation des échantillons a été faite dans un volume total de 100µL contenant le tampon PCR 1X, 200µM de dNTP, 1U d'ADN polymérase (MP Biomedicals), 0,5 µM de chaque amorce (amorce sens 343F: TACGGRAGGCAGCAG, amorce antisens 784R: TACCAGGGTATCTAATCCT) et 1-5 ng d'ADN. Les produits PCR ont été purifiés avec le kit QIAquick PCR (Qiagen) suivi d'une estimation de la qualité et de la quantité des ADN grâce à un Nano-Drop. Le séquençage des gènes codant l'ARN 16S a été réalisé avec la technologie 454 GS FLX (454 Life Sciences - Roche) et le kit Titanium selon les instructions du fabricant. Les amplicons de 450 pb ont été rassemblés en utilisant une quantité égale de chaque produit PCR. Les séquences ont été analysées avec le logiciel Mothur v 1.24 et ont été alignées contre la base de données SILVA (14956 séquences).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

La diversité microbienne dans les échantillons a été estimée par le calcul du nombre d'OTU's (Operational taxonomic unit). Pour tous les échantillons d'iléon le nombre d'OTU's avec un cutoff de 0.05 est de 1263 ± 697 avec un recouvrement par échantillon de $91.11\% \pm 3.33\%$. Le nombre moyen de séquences est de 10859 par échantillon d'iléon, 17 phyla différents ont été

répertoriés pour 429 taxons différents. La majorité de la diversité de l'iléon avant gavage est représentée par les *Firmicutes* avec 70% de la population. Le reste est composé à 14,98% de *Proteobacteria* et 13,27% de *Bacteroidetes*. Enfin, les autres phyla tels que les *Actinobacteria*, *Fusobacteria* représentent moins de 2% de la population (Fig. 1a).

Pour les caeca le nombre moyen d'OTU's avec un cutoff de 0.05 est le même que pour l'iléon. Le nombre moyen de séquences est de 8577 comprenant 13 phyla représentés par 281 taxons différents. Les caeca sont composés majoritairement de *Bacteroidetes* avec 57,03% d'apparition de ce phylum. Les *Firmicutes* représentent eux 33,95% de la population tandis que les *Proteobacteria* sont à 7,26%. Le reste de la diversité représente moins de 2% du total des séquences (Fig. 1b)

Effet du gavage sur la communauté microbienne

Dans un premier temps nous avons voulu comprendre quel était l'effet du gavage sur la composition du microbiote intestinal. Dans l'iléon, avant gavage la flore est composée majoritairement de *Clostridia* (60,50%), les autres flores les plus représentées étant des *Bacteroidia*, des *Bacilli* et des *Gammaproteobacteria*. A mi-gavage, les *Gammaproteobacteria* sont les plus représentées (51,57%) tandis que les *Clostridia* ne représentent plus que 16% de la population. En fin de gavage, la flore majoritaire est représentée par les *Bacilli* (58,15%) suivi par les *Clostridia* (32,3%) qui tiennent encore une part importante dans la population bactérienne (Fig. 2a). La comparaison des communautés bactériennes à partir des profils ACP (Fig. 3) nous montre que la composition du microbiote durant le gavage est assez hétérogène dans l'iléon. Avant gavage et à mi-gavage les communautés sont assez proches avec une tendance à aller vers une communauté riche en *Enterobacteriaceae* faisant partie de la classe des *Gammaproteobacteria* alors que les points en fin de gavage nous permettent de différencier une tendance communautaire distincte des deux premières se rapprochant d'une communauté riche en *Lactobacillaceae* et plus précisément en *Lactobacillus*.

En ce qui concerne les caeca, avant gavage le microbiote est essentiellement constitué de *Bacteroidia* (56,34%) et de *Clostridia* (32,85%). Ces deux classes bactériennes malgré des changements de diversité durant le gavage restent majoritaires dans les caeca tout au long du gavage. A mi-gavage, on observe une augmentation importante des *Deltaproteobacteria* (21,79%), ce qui induit une baisse du nombre de *Bacteroidia* (37,01%) et des *Clostridia* (24,85%). En fin de gavage, on retrouve la même tendance qu'à mi-gavage avec trois classes

majoritaires qui sont les *Deltaproteobacteria* (27,68%), les *Bacteroidia* (27,77%) et les *Clostridia* (35,81%) qui représentent la majorité de la population bactérienne totale (Fig. 2b). Les profils ACP des échantillons de caeca nous permettent de différencier 3 groupes bien distincts correspondant chacun à une période du gavage. Avant gavage, la diversité des échantillons est très homogène et nous montre une tendance à se rapprocher des *Bacteroides*. A mi-gavage, le groupe est un peu plus étiré mais montre une tendance à être proche d'une composition riche en *Desulfovibrio* (*Deltaproteobacteria*) et en *Bacteroides*. En fin de gavage, un troisième groupe se distingue avec des communautés assez riches en *Bilophila* (*Deltaproteobacteria*) (Fig. 4).

Effet d'un probiotique sur le microbiote

L'étude de l'ajout d'un probiotique (*Lactobacillus sakei*) tout au long du gavage a montré qu'il induisait des changements au niveau de la diversité bactérienne. Dans l'iléon à mi-gavage on observe une augmentation des *Bacilli* (dont fait partie le genre *Lactobacillus*) passant de 15,05% sans probiotiques (SP) à 62,6% avec probiotiques (AP). On observe également une forte diminution des *Gammaproteobacteria* passant de 51,57% (SP) à 14,89% (AP) tandis que les *Clostridia* eux augmentent légèrement passant de 16,34% (SP) à 20,35% (AP). En fin de gavage, les *Bacilli* représentent environ 60% de la population totale dans les deux conditions (Fig. 2a). Par contre, on observe une forte diminution du pourcentage de *Clostridia* (25,94%) ainsi qu'une augmentation de *Bacteroidia* de l'ordre de 6,5% lors de l'ajout de probiotiques. Les profils ACP montrent que le probiotique modifie la structure de la communauté bactérienne. (Fig. 5).

Dans les caeca, à mi-gavage, on observe l'apparition d'un faible pourcentage de *Bacilli* correspondant à notre probiotique (2,36%) mais également une baisse des *Deltaproteobacteria* passant de 21,79% à 14,40% tandis que les *Clostridia* et les *Bacteroidia* voient leurs pourcentages augmentés respectivement de 4,20% et 6,83%. En fin de gavage on observe une baisse des *Clostridia* (5,23%) ainsi qu'une faible augmentation des *Bacteroidia* (2,95%) et des *Gammaproteobacteria* (3,34%) (Fig. 2b). Les profils ACP nous confirment le faible impact du probiotique sur la diversité des caeca avec un léger décalage entre les échantillons des deux conditions. (Fig. 6).

CONCLUSION

Cette étude a permis d'observer que chez le canard la flore microbienne retrouvée en majorité dans l'iléon est une flore anaérobie facultative (*Lactobacillus*) tandis que la flore caecale est anaérobie stricte (*Bacteroides* et *Clostridium*) en accord avec les données bibliographiques chez le poulet (Lu et al.,

2003). Le gavage modifie la composition du microbiote en favorisant le développement des *Bacilli* au détriment des *Clostridia* dans l'iléon et n'a que peu d'effet sur la communauté bactérienne des caeca. L'apport lors du gavage d'une souche probiotique entraîne dans l'iléon à mi-gavage l'augmentation transitoire des *Bacilli* et s'accompagne d'une diminution des *Gammaproteobacteria* (classe dont font partie certaines bactéries pathogènes). En fin de gavage, les *Clostridia* diminuent en présence du probiotique. Comme précédemment peu de modifications ont été observées dans les caeca. Au cours de notre expérience, l'ajout de probiotiques n'a pas eu d'effet sur les performances zootechniques (prise de poids, poids de foie). Cependant des études récentes viennent de montrer que l'introduction de probiotiques dans l'alimentation des jeunes animaux

en phase de démarrage permettait une augmentation significative de la prise de poids vif (Angelakis et al., 2010). Une étude sur l'ajout d'un probiotique chez les jeunes animaux est à envisager afin d'étudier l'augmentation des rendements zootechniques des animaux dès la phase de démarrage.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les agents du palmipôle pour leur investissement dans cette étude. Le travail a reçu l'appui financier du CIFOG et du Conseil Général des Landes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Angelakis E., Raoult D., 2010. The increase of *Lactobacillus* species in the gut flora of newborn broiler chicks and ducks is associated with weight gain. PLoS One., 5(5), e10463.
- Brugirard-Ricaud K., Peillod C., Daniel P., Houmaire C., Mesplède A., Davail S., 2010. Détermination des effets du gavage sur la flore intestinale des canards mulards par méthodes de microbiologie classique et moléculaire. Journées de la recherche des palmipèdes à foie gras 2010.
- Fuller RJ., 1995. In : The scientific basis. Chapman & Hall, London.
- Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer JJ., Lee MD., 2003. Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. Applied and Environmental Microbiology., 69, 6816-6824.
- Netherwood T., Gilbert HJ, Parker DS., O'Donnell AG., 1999. Probiotics Shown To Change Bacterial Community Structure in the Avian Gastrointestinal Tract. Applied and Environmental Microbiology., 65, 5134-5138.
- Serino M., Luche E., Gres S., Baylac A., Bergé M., Cenac C., Waget A., Klopp P., Iacovoni J., Klopp C., Mariette J., Bouchez O., Lluch J., Ouarné F., Monsan P., Valet P., Roques C., Amar J., Bouloumié A., Théodorou V., Burcelin R., 2012. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. Gut microbiota., 61, 543-553.

Figure 1. Répartition des différents phyla

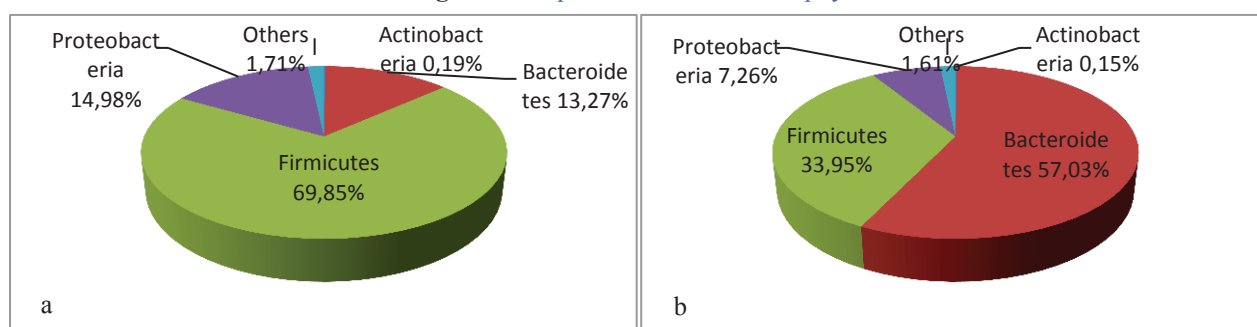


Fig.1 : Composition du microbiote avant gavage selon les différents grands phyla dans l'iléon (a) et les caeca (b)

Figure 2. Effet du gavage et de l'ajout de probiotiques sur la composition du microbiote

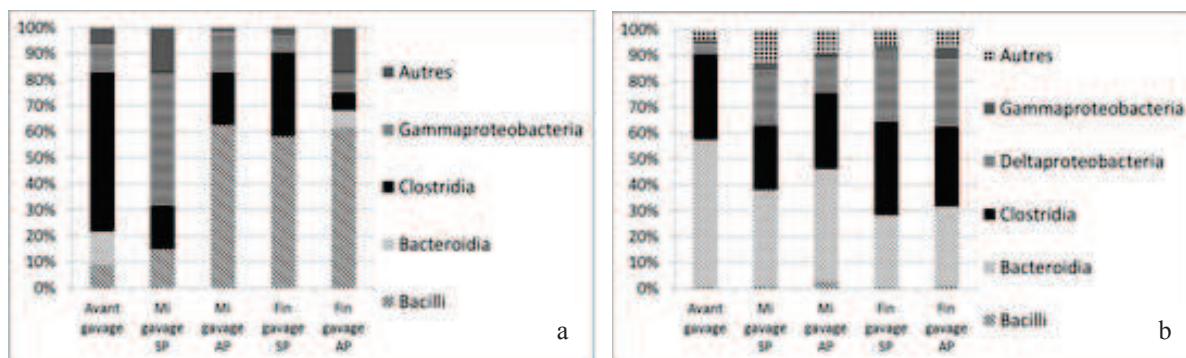


Fig 2 : Répartition des différentes classes composant le microbiote intestinal avant gavage, à mi-gavage sans probiotiques (SP), à mi-gavage avec probiotiques (AP), à fin gavage sans probiotiques (SP) et à fin gavage avec probiotiques (AP) dans l'iléon (a) et dans les caeca (b).

Figure 3. Effet du gavage dans l'iléon

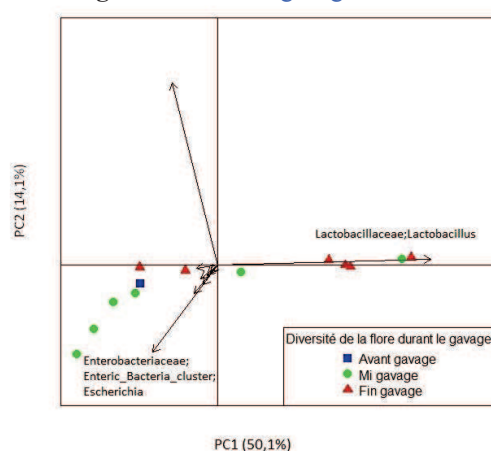


Fig.3 : Profil ACP obtenu après séquençage 454 des échantillons d'iléon sur des animaux en phase de gavage. Les points représentent les différentes phases de gavage : (■) avant gavage, (●) à mi-gavage, (▲) à fin gavage.

Figure 4. Effet du gavage dans les caeca

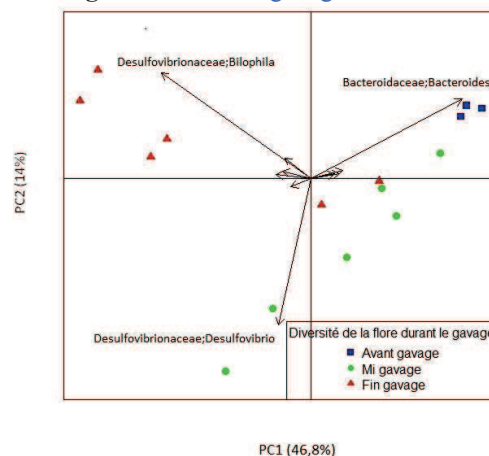


Fig.4 : Profil ACP obtenu après séquençage 454 des échantillons de caeca sur des animaux en phase de gavage. Les points représentent les différentes phases de gavage : (■) avant gavage, (●) à mi-gavage, (▲) à fin gavage.

Figure 5. Effet de l'ajout de probiotiques dans l'iléon

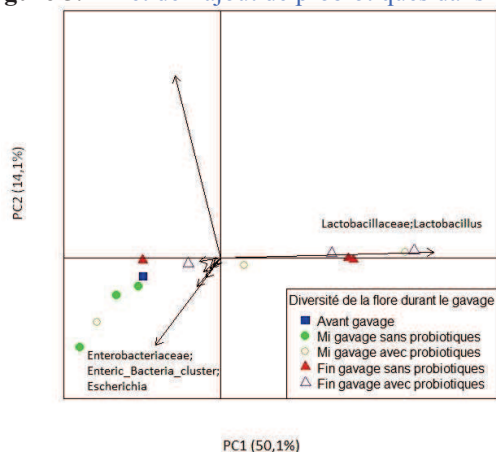


Fig.6 : Profil ACP obtenu après séquençage 454 des échantillons d'iléon sur des animaux en phase de gavage lors de l'ajout de probiotiques. Les points représentent les différentes phases de gavage : (■) avant gavage, (●) à mi-gavage sans probiotiques, (○) à mi-gavage avec probiotiques, (▲) à fin gavage sans probiotiques et (△) à fin gavage avec probiotiques.

Figure 6. Effet de l'ajout de probiotiques dans les caeca

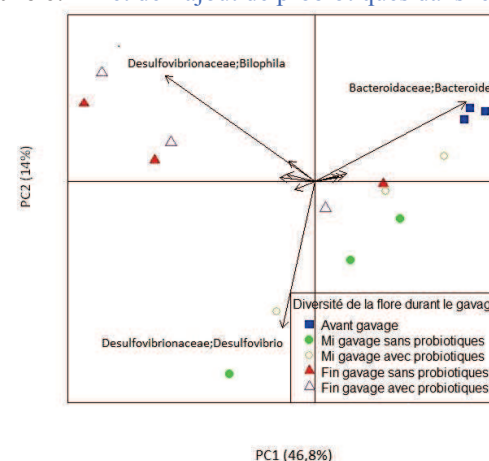


Fig.7 : Profil ACP obtenu après séquençage 454 des échantillons de caeca sur des animaux en phase de gavage lors de l'ajout de probiotiques. Les points représentent les différentes phases de gavage : (■) avant gavage, (●) à mi-gavage sans probiotiques, (○) à mi-gavage avec probiotiques, (▲) à fin gavage sans probiotiques et (△) à fin gavage avec probiotiques.

Effect of probiotics on the duck's gut microbiota during overfeeding

F. Vasai, K. Brugirard Ricaud and S. Davail

IPREM-EEM, Université de Pau, IUT des pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan

- BTS Biotechnologies
- Licence professionnelle Microbiologie dans les Industries Agro-Alimentaires
- Master Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologies
- 2nde année de thèse Sciences agronomiques, biotechnologies agro-alimentaires

Intestinal bacteria play an important role on the host health, especially through their effects on nutrition and immune responses. Actually, little is known on duck's gut microbial diversity, most of the studies have been realized in chickens.

Force-feeding can be a stress to the animal but can also induce changes in intestinal diversity which may cause disruption in the host's metabolism.

Furthermore, the use of probiotics has been generalized in animal's nutrition. Probiotics are live microorganisms which are supplemented to the feed in order to establish a beneficial gut microflora. Thus, probiotics have the potential to beneficially affect gut health by modification of the gut microflora, especially in young animals, in which a stable gut microflora is not yet established.

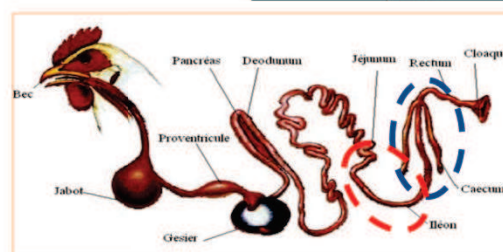
In this study, we added probiotics during force-feeding in order to see an effect on intestinal bacterial diversity.



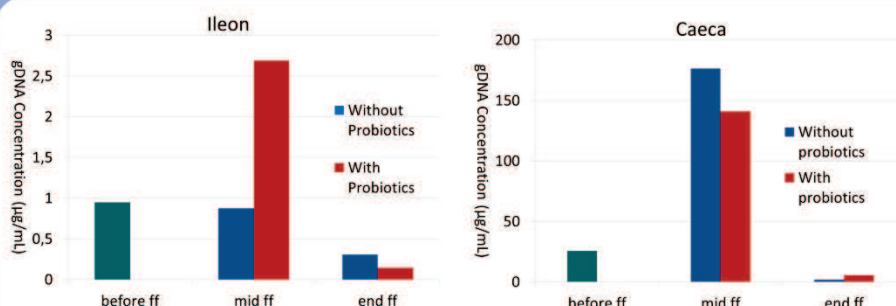
Probiotics are live microorganisms thought to be beneficial to the host organism

- Genetic type: mulard duck
- Probiotic : *Lactobacillus sakei*
- 3 points : before force feeding
mid force feeding
end force feeding

Condition	Without probiotic	With probiotic
Number of ducks	20	20
Samples	-Ileum -Caeca	

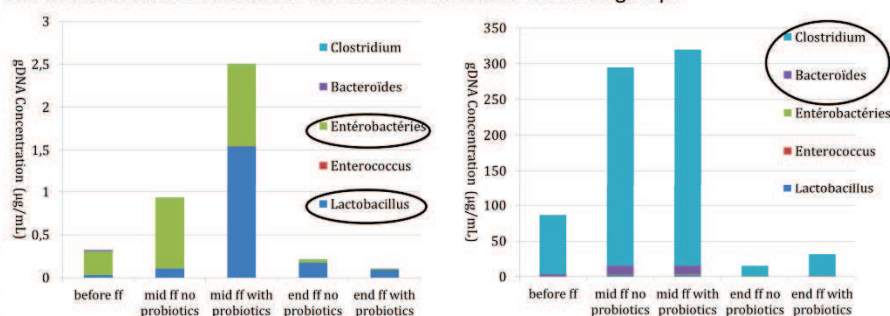


Quantification of mostly represented bacterial groups by qPCR : Total flora (eubacteria), Lactic flora (*Lactobacillus*), *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium* spp, *Bacteroides*, *Campylobacter*, *Salmonella*



An important increase in the total flora is detected in mid-force feeding (ff) point only in animals treated with probiotics in ileum but independently to the treatment in Caeca.

The increase observed is due to the increase in several bacterial groups



The addition of probiotics during force-feeding triggers an increase of several bacterial groups but only in the mid-force-feeding point :

-In ileum : increase in *Lactobacillus* and *Enterobacteriaceae*

-In caeca : increase in *Clostridium* and *Bacteroides*

However, the increase is transient and at the end of force feeding, the level of bacterial populations was back to basal level (before FF).

Furthermore, we did not detect any *Salmonella* during the experiment



Effect of overfeeding, organic and organometallic compounds on the duck's gut microflora

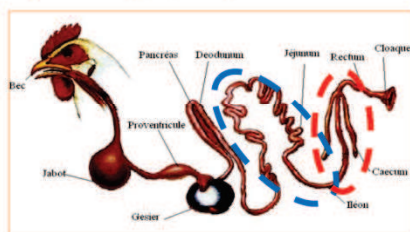
F. Vasaï., K. Brugirard Ricaud and S. Davail

IPREM-EEM, Université de Pau, IUT des pays de l'Adour, Rue du Ruisseau, BP 201, 40004 Mont de Marsan

Introduction

The intestinal microbiota (or gut microbiota) has a fundamental role in its host. Its study contributes to the understanding of various physiological processes. Many contaminants could affect the intestinal microbiota and therefore have an impact, in different ways, on the host organism. In this context, we want to know the composition, evolution and control of the digestive flora during force-feeding in ducks. In addition, we wish to assess the impact of environmental contaminants (cadmium, mycotoxins) and food additives (probiotics) on the microbiota of ducks.

An inventory of the digestive flora of two genetic types of ducks Pekin and Muscovy and their hybrid mule was realized at different periods of force-feeding (ff) by quantitative PCR to detect major bacterial groups or genus

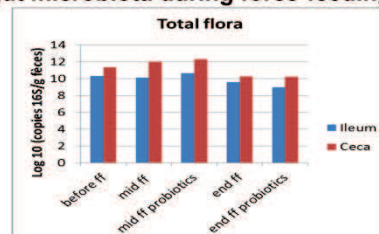


1st year

Effect of probiotics on the duck's gut microflora during force-feeding

Condition	Without probiotic	With probiotic
Number of ducks	20	20
Samples	-Ileum -Ceca	

- Genetic type: mulard duck
- Probiotic : *Lactobacillus sakei*
- 3 points : before force-feeding
mid force-feeding
end force-feeding



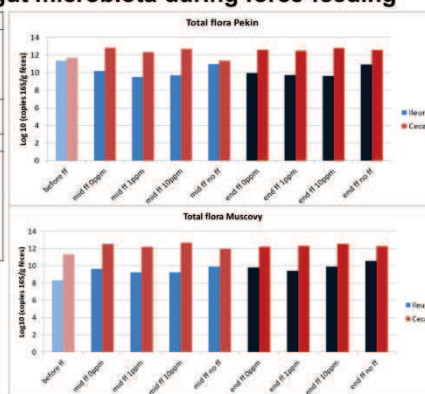
Increase on the total flora in mid-force-feeding, transient effect not found at the end of force feeding.

Effect of cadmium on the duck's gut microflora during force-feeding

	Muscovy			Pekin		
Contamination	0ppm	1ppm	10ppm	0ppm	1ppm	10ppm
Number of ducks	20	20	20	20	20	20
Samples	Flora Duodenum Jejunum Ileum Ceca	Metabolism Liver abdominal fat subcutaneous fat muscle		Flora Duodenum Jejunum Ileum Ceca	Metabolism Liver abdominal fat subcutaneous fat muscle	

Ileum : Decrease in the total flora for both mid and end force-feeding for the two genetic types Pekin and Muscovy,

No changes have been observed in the ceca segment,

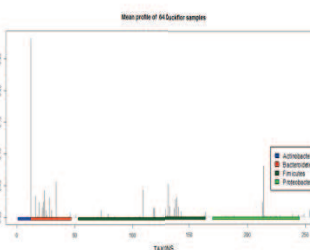
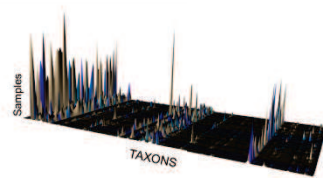
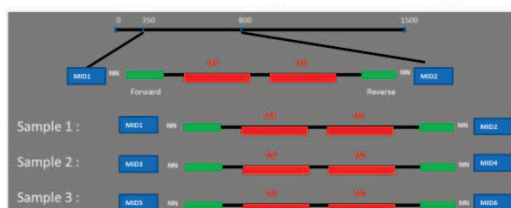


2nd year

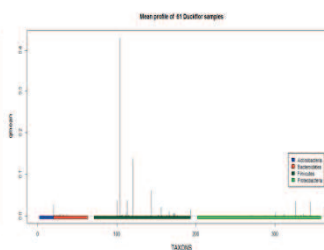
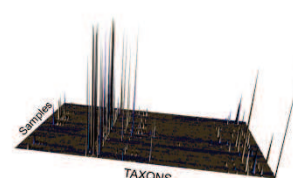
Study of the composition of the gut microbiota by 454 GS FLX Pyrosequencing

High field pyrosequencing based on amplification of variable regions V3-V4 of the ARNr 16S

- Creation of two libraries of 64 samples (454bp amplicons)
- Around 1.000.000 reads for one region



Taxonomic profile for the 64 samples of the first library



Taxonomic profile for the 61 samples of the second library

Perspectives

- Statistics analysis of the 454 sequencing results with
 - Statistics of the taxonomic profiles : ACP, taxonomic repartition of samples under different conditions
- Complete analysis of the gut microbiota community obtain by the 454 sequencing
- Determination of cadmium concentration in the liver and kidneys from the study of the impact of cadmium
- Study of lipid metabolism genes to see if microbiota can affect host metabolism

Résumé

Le **microbiote** intestinal constitue un élément important pour l'hôte. Il est impliqué notamment au niveau immunologique et physiologique. La connaissance de la composition de ce microbiote est la première étape dans la compréhension des phénomènes qui lui sont associés. Les travaux de cette thèse se sont articulés selon plusieurs objectifs. La première étape a été de faire un inventaire moléculaire de la composition du microbiote de l'**iléon** et des **caeca** de deux types génétiques parentaux : le **canard Pékin** (*Anas Platyrhynchos*), le **canard de Barbarie** (*Cairina Moschata*) ainsi que de leur hybride ; le **canard mulard**. Nous avons ainsi pu observer des compositions différentes selon le type génétique. Différentes conditions rencontrées dans l'environnement sont à même de créer un déséquilibre dans la composition du microbiote. L'effet de l'alimentation étant bien décrit la seconde étude a porté sur l'impact du **gavage** sur les communautés bactériennes composant le microbiote. Nous avons ensuite étudié l'effet de l'ajout d'un **probiotique** (*Lactobacillus sakei*) sur le microbiote des canards mulards durant la phase de gavage. Enfin, dû aux contaminations environnementales retrouvées dans le sud-ouest ainsi que ses effets toxiques montrés dans différentes études, le dernier travail a permis d'évaluer l'effet du **cadmium** sur le microbiote des canards Pékin et Barbarie.

Mots clés : microbiote, iléon, caeca, Pékin, Barbarie, mulard, gavage, probiotique, cadmium

Abstract

The intestinal **microbiota** is an important element for the host. It is particularly involved in immunological and physiological levels. Knowledge of the composition of the microbiota is the first step in understanding the phenomena associated with it. The work of this thesis was structured according to several objectives. The first step was to realize a molecular inventory of the microbiota composition in **ileum** and **ceca** of two parental genetic types: the **Pekin** duck (*Anas Platyrhynchos*), **Muscovy** duck (*Cairina moschata*) and their hybrid, the **mule** duck. We observed different compositions depending of the genetic type. Different conditions encountered in the environment are likely to create an imbalance in the composition of the microbiota. The changes in diet are well described the second step was to evaluate the effect of **overfeeding** on bacterial communities. We then studied the impact of adding a **probiotic** (*Lactobacillus sakei*) on the microbiota of mule ducks during the overfeeding period. Finally, due to levels of environmental contamination found in the southwest and its toxic effects shown in various studies, the last work allowed to evaluate the impact of **cadmium** on the microbiota of Pekin and Muscovy ducks.

Keywords: microbiota, ileum, ceca, Pekin, Muscovy, mule, overfeeding, probiotic, cadmium