



18èmes Journées de la Recherche Cunicole

Nantes 27-28 mai 2019

BLASCO A., MARTÍNEZ-ALVARO M., ZUBIRI-GAITÁN A., HERNÁNDEZ P., 2019.
Réponse métagénomique à la sélection de la teneur en lipides intramusculaire
chez le lapin. 18^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 27 – 28 mai 2019, Nantes,
France, **65-68**

Texte complet

+

Fichier de présentation orale

Réponse métagénomique à la sélection de la teneur en lipides intramusculaire chez le lapin

Blasco A.*, Martínez-Alvaro M., Zubiri-Gaitán A., Hernández P.

ICTA. Universitat Politècnica de València. Valencia 46022. Espagne

* correspondant: ablasco@dca.upv.es

Résumé – Une analyse métagénomique de 2 lignées de lapins sélectionnés de façon divergente sur 10 générations pour le caractère lipides intramusculaire (GA et GB) a été réalisée. Des échantillons du contenu caecal de 40 lapins appartenant à chaque lignée ont été analysés. Après l'analyse de la qualité des séquences obtenues, 6 230 gènes ont été identifiés à partir des échantillons du microbiote. Les gènes non détectés dans 25% des échantillons ont été éliminés, laissant finalement 4, 540 gènes. Considérant qu'il s'agit de données de composition, elles ont été transformées à l'aide de la méthode du log-quotient centré. On a effectué une analyse PLS-DA (Projection sur structures latentes, analyse discriminant) afin d'identifier les gènes liés à la discrimination des lignées à teneur haute et basse en lipides intramusculaire. Après la première analyse PLS-DA, les gènes avec un VIP > 1 ont été sélectionnés, laissant 105 gènes capables de discriminer les individus appartenant à chaque lignée, avec $Q^2=0,92$ de validation croisée. Ces gènes microbiens codent pour des protéines impliquées dans différentes voies métaboliques, les voies les plus importantes étant celles du métabolisme énergétique (18 gènes). L'analyse a été répétée pour ces 18 gènes, obtenant une validation croisée avec $Q^2 = 0.52$. Deux gènes impliqués dans le métabolisme du méthane, sous-unité bêta de malate-CoA ligase (K14067) et dihydroxyacétone kinase (K00863), avaient la valeur VIP la plus élevée, montrant une relation pertinente avec les lipides intramusculaire. La lignée haute GA a montré une plus grande abondance de gènes impliqués dans des voies glucidiques spécifiques telles que le mannose et le fructose (L-rhamnose isomérase (K01813), $P = 0,99$, et la dihydroxyacétone kinase (K00863), $P = 0,82$). Dans la ligne de lipides intramusculaires faibles (GB), d'autres gènes tels que la D-sedoheptulose 7-phosphate isomérase (K03271) et la O-antigène ligase (K02847), impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides, étaient plus abondants ($P = 0,98$ et $P = 0,99$, respectivement).

Abstract – Metagenomic answer to selection of intramuscular lipids in the rabbit. A metagenomic analysis of 2 rabbit lines divergently selected for intramuscular fat (GA and GB) was performed. Caecal content samples from 40 rabbits belonging to each line were analysed. After analysing the quality of the sequences obtained, 6,230 genes were identified from the metagenomic samples. The undetected genes in 25% of the samples were removed, eventually leaving 4,540 genes. Considering that they are composition data, they were transformed using the log-quotient centred method. PLS-DA (Latent Projection, Discriminant Analysis) analysis was performed to identify genes related to the discrimination of high and low intramuscular fat lines. After the first PLS-DA analysis, "VIP" genes with a VIP > 1 were selected, leaving 105 genes capable of discriminating individuals belonging to each line, with cross-validation $Q^2 = 0.92$. These microbial genes encode proteins involved in different metabolic pathways, the most important pathways being related to energy metabolism (18 genes). The analysis was repeated for these 18 genes, obtaining cross-validation with $Q^2 = 0.52$. Two genes involved in methane metabolism, beta subunit of malate-CoA ligase (K14067) and dihydroxyacetone kinase (K00863), had the highest VIP value, showing a relevant relation with intramuscular fat. The GA line showed a greater abundance of genes involved in specific carbohydrate pathways such as mannose and fructose, L-rhamnose isomerase (K01813), $P = 0.99$, and dihydroxyacetone kinase (K00863), $P = 0.82$. In the low intramuscular fat line (GB), other genes such as D-sedoheptulose 7-phosphate isomerase (K03271) and O-antigen ligase (K02847), involved in lipopolysaccharide biosynthesis, were more abundant ($P = 0.98$ and $P = 0.99$, respectively).

Introduction

Augmenter le contenu en lipides intramusculaires (LIM) de la viande présente un grand intérêt économique car la viande est plus tendre, plus juteuse et cela améliore sa saveur. Certaines études établissent, chez l'homme et la souris, un lien entre les dépôts lipidiques et le profil

microbien du tube digestif (Krajmalnik-Brown et al. 2012), et d'autres processus tels que le métabolisme des glucides (Yang et al., 2016). Des études récentes montrent que la composition du microbiote peut également être déterminée par le génome de l'individu où le microbiote est hébergé (Blekhman et al., 2015; Bonder et al., 2016).

Néanmoins, le lien de cause à conséquence entre le profil génétique de l'hôte et la composition du microbiote est encore limité.

Deux lignées de lapins de même origine génétique ont été développées et sélectionnées en fonction de la teneur en lipides intramusculaires, haute (lignée GA) et basse (lignée GB) pendant dix générations (Martínez-Álvaro et al. 2016). Ces lignées constituent un matériel exceptionnel pour l'étude des bases génétiques du dépôt gras et des LIM, car ils sont modifiés après la sélection à partir d'une origine génétique commune, contrairement à la comparaison de deux races différentes, qui peuvent différer par de nombreux autres gènes. Dans cette étude, nous allons à étudier la réponse corrélée à la sélection pour les LIM et le métagénome du contenu caecal, et nous allons essayer d'identifier les voies métaboliques modifiées après la sélection.

1. Matériel et méthodes

1.1. Protocole expérimental

La procédure de sélection pour le développement des lignes GA et GB a été décrite dans Martínez-Álvaro et al. (2016) pour les sept premières générations, et la même procédure de sélection a été utilisée pour les générations suivantes. Seize et dix-sept lapins des lignées GA et GB de la génération 10 ont été élevés en même temps, consommant le même aliment commercial sans antibiotiques, et ils ont été sacrifiés à l'âge de 9 semaines, après un jeûne de 4 heures. Immédiatement après le sacrifice, des échantillons de contenu caecal ont été recueillis, homogénéisés et stockés à -80°C. L'extraction de l'ADN a été faite avec le kit DNeasy PowerSoil (Qiagen). Les échantillons ont été séquencés avec Illumina NextSeq dans un kit de 100 échantillons. Le couverture moyenne a été de 4 394 519 lectures par échantillon. La couverture moyenne par contig a été de 2,49 lectures par contig. La longueur moyenne des lectures appariées était de 2 x 150 pb. Les lectures ont été alignées sur la base de données KEGG (<http://www.kegg.jp>) et 6 230 gènes microbiens ont été identifiés. Après avoir éliminé ces gènes à zéro chez plus de 8 animaux, il nous est resté 4540 gènes.

1.2. Analyses statistiques

Les données métagénomiques ont été prétraitées en utilisant la transformation du rapport du logarithme centré (clr) en raison de sa nature compositionnelle, comme suggéré par Gloor et al. (2017). Les gènes microbiens qui diffèrent dans les deux lignées ont été identifiés par une analyse

discriminante basée sur les projections sur les structures latentes (DA-PLS, SIMCA, P + 15.0.1, Umetrics, Umea, Suède) avec un vecteur de classification GA vs GB comme variable dépendante et les 4 540 gènes microbiens en tant que variables indépendantes. Les variables ont été sélectionnées sur la base du critère d'importance de chaque variable dans la projection (VIP). En considérant que les gènes microbiens avec un VIP <1.0 contribuent peu à la prédiction, ils ont été éliminés jusqu'à ce que le modèle DA-PLS perde de la capacité prédictive, mesurée par le Q^2 de validation croisée. Le modèle final a été construit avec 3 composants latents et comprenait 105 gènes. Ensuite, les voies métaboliques correspondant à ces 105 gènes ont été identifiées.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique (18 gènes au total). Ces 18 gènes ont été analysés avec un modèle DA-PLS les incluant comme variables indépendantes et le vecteur de classification GA vs GB en tant que variable dépendante. Ce modèle a été construit avec un seul composant latent. L'abondance relative des gènes ont été estimée par animal, en se référant à la somme des décomptes des 105 gènes modifiés après sélection que nous avons considéré importants. Par la suite, les distributions marginales des différences entre les lignées GA et GB ont été estimées pour l'abondance relative des 18 gènes impliqués dans métabolisme énergétique, à l'aide du programme Rabbit (ICTA, Universitat Politècnica de València). Sur ces distributions marginales, on a estimées la probabilité pour la différence d'être positive lorsque la médiane est positive, ou négative lorsque la médiane est négative.

2. Résultats et discussion

La sélection selon les LIM a eu une réponse corrélée à l'abondance relative de 105 gènes microbiens du contenu caecal des lapins, identifiés par DA-PLS. Ces 105 gènes classent de manière appropriée des animaux en GA ou GB, comme on peut le voir avec les résultats de la validation croisée ($Q^2=92\%$). Ces 105 gènes microbiens codent pour des protéines impliquées dans différentes voies métaboliques, les plus importantes étant celles du métabolisme énergétique (18 gènes), de la transduction du signal (10), du métabolisme des nucléotides (8) et métabolisme des acides aminés (5), du transport membranaire (5), de la réplication et la réparation des acides nucléiques (3), la traduction (3) et le métabolisme des cofacteurs et des vitamines (3).

Tableau 1. Gènes microbiens impliqués dans le métabolisme énergétique avec des différences dans leur abondance relative dans les lignées de graisse intramusculaire haute (GA) et basse (GB).

KEGG	Moyenne	GA-GB	Proba.
K14067 malato-CoA ligase, sous-unité bêta	315	147	0,98
K00863 dihydroxyacétone quinase	81	44	0,82
K01813 L-ramnose isomérase	5 489	773	0,99
K15987 stimulation de la pompe à sodium à pyrophosphate énergisé	14 138	1 437	0,98
K18697 phosphatidil-glycero-phosphatase C	1 637	714	0,98
K01183 chitinase	1 799	661	0,95
K12339 cystéine synthétase B	1 379	377	0,92
K07248 lactaldehydo déshydrogénase /glycolaldéhyde déshydrogénase	811	304	0,84
K01208 cyclomaltodextrinase	7 914	-989	1,00
K03079 L-ribulose-5-phosphate 3-épipérase	535	-264	1,00
K16951 sulfite réductase anaérobie, sous-unité B	415	-124	1,00
K00362 nitrite réductase (NADH), grande sous-unité	1 766	-490	1,00
K02847 O-antigène ligase	5 571	-2 708	0,99
K13015 UDP-N-acetyl-D-glucosamine déshydrogénase	848	-182	1,00
K01040 glutaconate CoA-transférase sous-unité B	121	-62	1,00
K03271 D-sedoheptulos 7-phosphato isomérase	5 145	-473	0,98
K00374 nitrate réductase, sous-unité gamma	177	-110	0,98

Moyenne = abondance relative des 105 gènes sélectionnés ($\times 10^{-6}$)

GA-GB = différence d'abondance relative entre lignées pour les 105 gènes sélectionnés ($\times 10^{-6}$)

Proba. = probabilité pour que la différence GA-GB soit différente de 0 (positive ou négative)

Ce travail s'est concentré sur les gènes microbiens impliqués dans les voies du métabolisme énergétique. Le tableau 1 montre les gènes microbiens impliqués dans les voies énergétiques avec une abondance relative différente entre les lignées GA et GB. Deux gènes impliqués dans le métabolisme du méthane, sous-unité bêta de la malate-CoA ligase (K14067), et dihydroxyacétone kinase (K00863), avait la valeur VIP la plus élevée, montrant une relation pertinente avec la graisse intramusculaire.

La méthanogénèse est un processus qui consomme de l'hydrogène (H_2). Celui-ci est un produit final de la fermentation des glucides, et il agit également en tant que régulateur de celle-ci. Une étude chez l'homme et la souris suggère qu'il existe un enrichissement en méthanogènes oxydant H_2 chez les individus obèses, consommant plus efficacement H_2 et entraînant ainsi un taux de fermentation plus élevé (Krajmalnik-Brown et al., 2012). En outre, la lignée GA a montré une plus grande abondance de gènes impliqués dans des voies glucidiques spécifiques telles que le mannose et le fructose, L-ramnose isomérase (K01813), $P=0,99$, et la dihydroxyacétone kinase (K00863), $P=0,82$. Dans

la lignée GB, d'autres gènes tels que la D-sedoheptulose 7-phosphate isomérase (K03271) et la O-antigène ligase (K02847), impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides, étaient plus abondants ($P=0,98$ et $P=0,99$, respectivement). Finalement, lorsque nous avons analysé ces 18 gènes microbiens dans un modèle DA-PLS, le Q^2 obtenu après validation croisée était de 56%, ce qui montre un haut pouvoir de classification pour ces gènes.

Conclusions

Nôtres résultats préliminaires soulignent l'importance du microbiote intestinal sur le dépôt de lipides dans le muscle chez le lapin, et montrent que la sélection par les LIM conduit à une réponse corrélée dans le profil métagénomique. Dans cette étude, centrée sur les voies du métabolisme énergétique, nous avons observé un enrichissement de différentes voies en GA et en GB suite à la sélection. De plus, ces résultats impliquent une connexion entre les gènes de l'individu et les gènes microbiens de leur contenu caecal.

Remerciements

Cette expérience a été subventionnée par le projet AGL2017-86083-C2-1 du Plan Nacional de Investigación. Marina Martínez-Álvaro a été subventionnée par le contrat APOSTD / 2017 / 060 de la Generalitat Valenciana.

Références

- Blekhman R., Goodrich J.K., Huang K., Sun Q., Bukowski R., Bell J.T., Spector T.D., Keinan A., Ley R.E., Gevers D., Clark A.G. 2015. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology* 16: 191
- Bonder M.J., Kurilshikov A., Tigchelaar E. F., Mujagic Z., Imhann F., Vila A.V., Deelen P., Vatanen T., Schirmer M., Smeekens S.P., Zhernakova D.V., Jankipersadsing S.A., Jaeger M., Oosting M., Cenit M.C., Masclee A.A., Swertz M.A., Li Y., Kumar V., Joosten L., Harmsen H., Weersma R.K., Franke L., Hofker M.H., Xavier R.J., Jonkers D., Netea M.G., Wijmenga C., Fu J., Zhernakova D.V. 2016. The effect of host genetics on the gut microbiome. *Nature genetics* 48: 1407-1412.
- Gloor G.B., Macklaim J.M., Pawlowsky-Glahn V., Egozcue J.J. 2017. Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Front Microbiol* 8: 2224.
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z.E., Kang, D.W. & DiBase, J.K. 2012. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr Clin Prac* 27: 201-214.
- Martínez-Álvaro, M., Hernández, P. & Blasco, A. 2016. Divergent selection on intramuscular fat in rabbits: Responses to selection and genetic parameters. *J Anim Sci.*, 94: 4993-5003.
- Yang H., Huang X., Fang S., Xin W., Huang L., Chena C. 2016. Uncovering the composition of microbial community structure and metagenomics among three gut locations in pigs with distinct fatness. *Sci Rep.* 6: 27427
-

Réponse métagénomique à la sélection de la teneur en gras intramusculaire chez le lapin

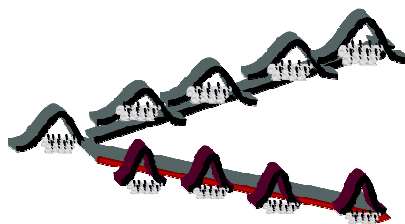


**A. Blasco,
M. Martínez, A. Zubiri, P. Hernández**

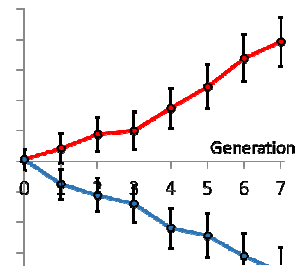
Institute of Animal Science and Technology
Universitat Politècnica de València.
Espagne



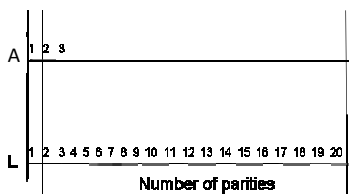
Nos lignées



SÉLECTION POUR VARIABILITÉ DE LA
TAILLE DE LA PORTÉE



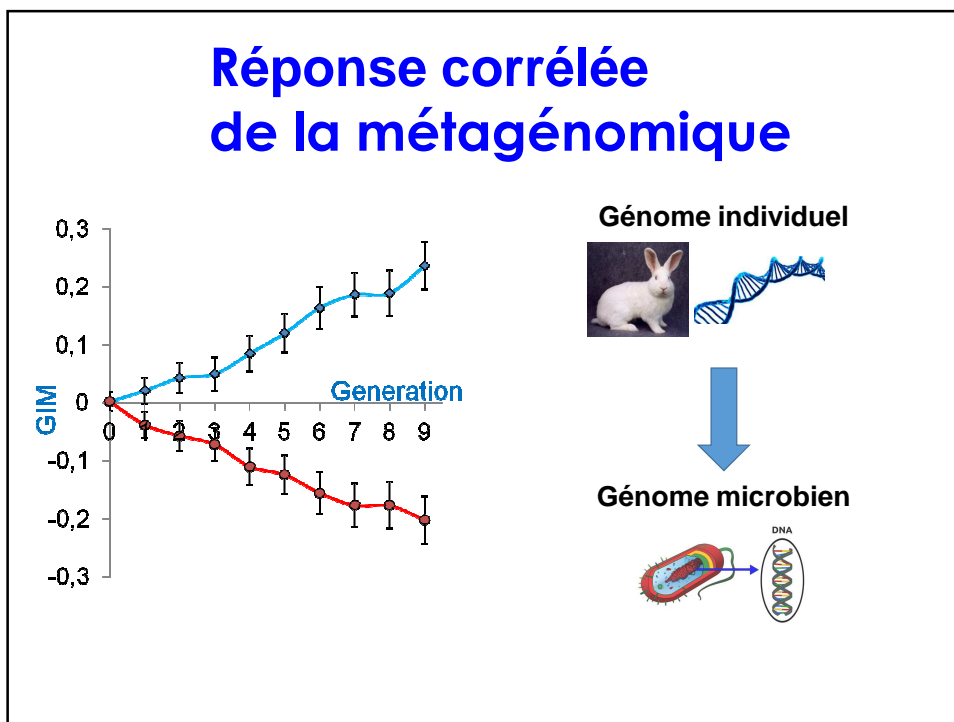
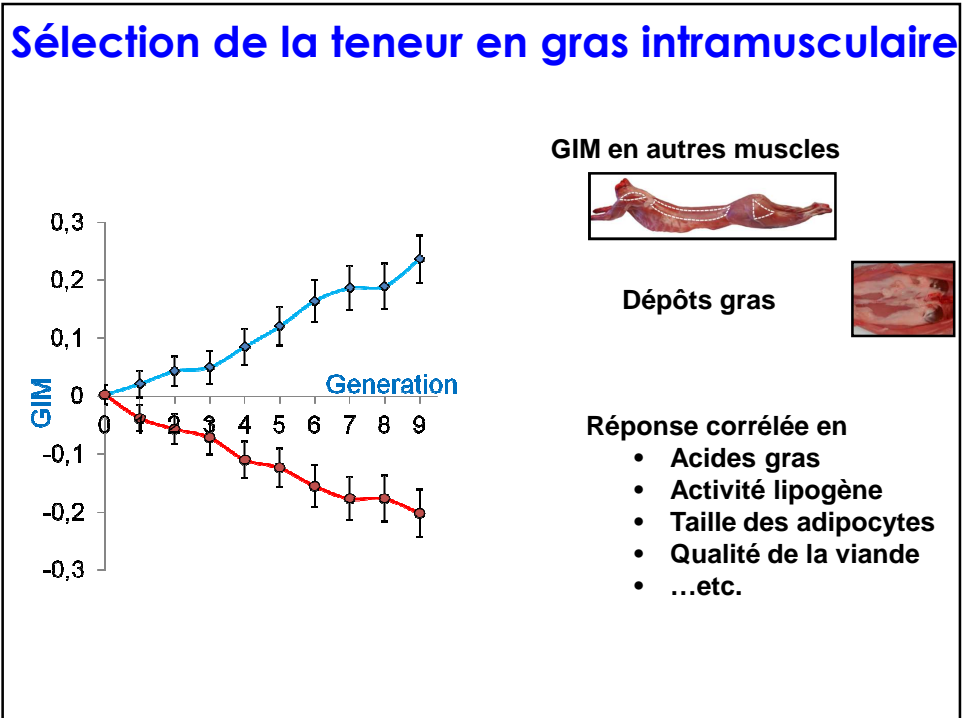
SÉLECTION POUR LA
TENEUR EN GRAS
INTRAMUSCULAIRE

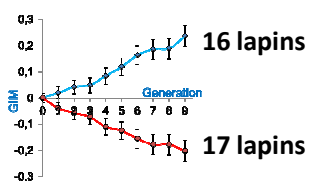


Microbiota
in faeces.
16S rRNA

COMPARAISON D'UNE LIGNE ROBUSTE ET
PRODUCTIVE AVEC UNE
LIGNE COMMERCIALE STANDARD

Microbiota
in faeces
16S rRNA

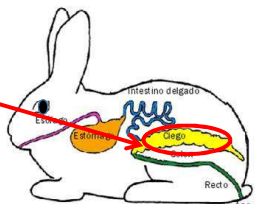




16 lapins

17 lapins

échantillon




Illumina NextSeq / reads (2 x 150 bp) / KEGG database

Traitement de données

- Estimation bayésienne pour les 0
- Estimation abondances relatives
- Transformation CLR (centred log ratio)

Analyse statistique

- PLS
- DA-PLS
- DA-OPLS



données de composition

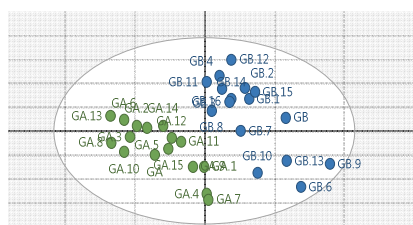
Résultats

La sélection a modifié le profil métagénomique des lignes

CP	R ²	Q ²
5	0.99	0.90

65 gènes (VIP > 1.00)

GA: Lapins lignée haute GIM
GB: Lapins lignée basse GIM

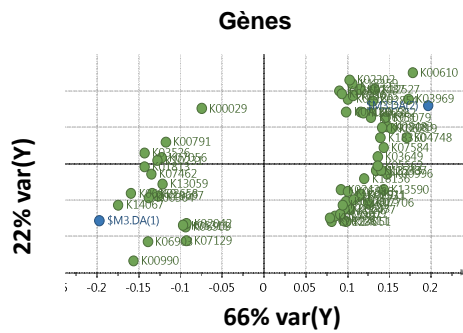


Résultats

La sélection a modifié le profil métagénomique des lignées

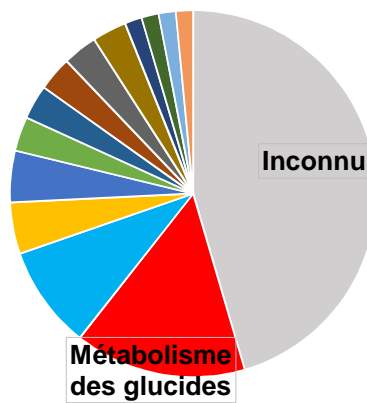
CP	R ²	Q ²
5	0.99	0.90

65 gènes (VIP > 1.00)



Résultats

CP	R ²	Q ²
1	0.55	0.51



Résultats

GA – GB en abondance relative des gènes du métabolisme des glucides

KEGG	Description	GA-GB (x10 ⁻⁵)	P ₀
K01813	L-ramnosa isomerasa	3.73	1.00
K00029	malato deshidrogenasa (oxaloacetato-decarboxílico)(NADP+)	3.21	0.92
K14067	malato-CoA ligasa subunidad beta	0.67	1.00
K01208	ciclomaltodextrinasa	-3.98	1.00
K01573	oxaloacetato decarboxilasa, subunidad gamma	-2.25	0.98
K00362	nitrito reductasa (NADH) subunidad grande	-2.05	0.99
K15897	UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-beta-L-altropiranosida hidrolasa	-2.00	0.95
K03079	L-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa	-1.12	1.00
K13015	UDP-N-acetil-D-glucosamina deshidrogenasa	-0.75	0.98
K16951	sulfito anaeróbico reductasa subunidad B	-0.52	0.99

Résultats

GA – GB en abondance relative des gènes du métabolisme des glucides

KEGG	Description	GA-GB (x10 ⁻⁵)	P ₀
K01813	L-ramnosa isomerasa	3.73	1.00
K00029	malato deshidrogenasa (oxaloacetato-decarboxílico)(NADP+)	3.21	0.92
K14067	malato-CoA ligasa subunidad beta	0.67	1.00
K01208	ciclomaltodextrinasa	-3.98	1.00
K01573	oxaloacetato decarboxilasa, subunidad gamma	-2.25	0.98
K00362	nitrito reductasa (NADH) subunidad grande	-2.05	0.99
K15897	UDP-2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxi-beta-L-altropiranosida hidrolasa	-2.00	0.95
K03079	L-ribulosa-5-fosfato 3-epimerasa	-1.12	1.00
K13015	UDP-N-acetil-D-glucosamina deshidrogenasa	-0.75	0.98
K16951	sulfito anaeróbico reductasa subunidad B	-0.52	0.99

Le Futur

PLUS –OMIQUES

**Métabolomique du contenu cecal
Métagénomique**

**Métabolomique du lapin
Génomique du lapin**

Transcriptomique du contenu cecal

UNION DES –OMIQUES