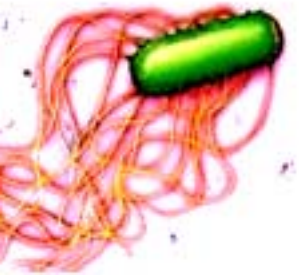


# Analyses des communautés microbiennes : approches expérimentales, métagénomiques et cultivables

*Pascal Mirleau & Philipp Heeb*



**& Evolution**  
Diversité Biologique  
**EDB**

**UMR 5174 CNRS / Université Paul Sabatier, Toulouse**

UNIVERSITE  
PAUL  
SABATIER



TOULOUSE III

# Relations oiseaux – bactéries :

un modèle d'interactions vertébrés-microorganismes,  
dans une approche d'écologie évolutive.

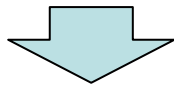


**Les oiseaux en tant  
qu'hôtes**

Habitat

Maintien de microbes bénéfiques

Comportements sanitaire



**Effets sur la fitness**

**(survie / reproduction / sélection sexuelle)**

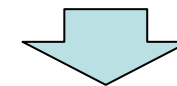


**Les microbes en tant que  
pression de sélection**

île, métapopulations

Commensalisme

Parasitisme, pathogénie



**Effets sur la transmission**

**horizontale de microorganismes**

# Comportement sanitaire : transmission horizontale de bactéries ?

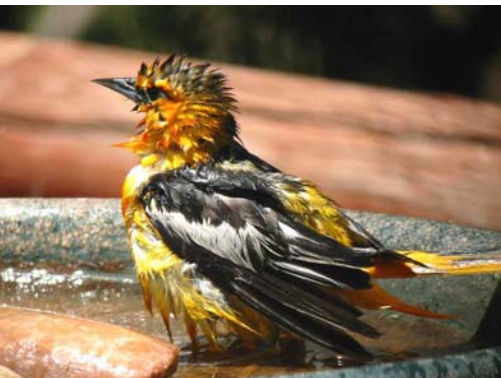
(Le bain des oiseaux et la microflore de l'eau)

**Questions:** les oiseaux sont ils vecteurs de bactéries lors de la prise de bains ?

→ Quelles espèces bactériennes au sein de la communautés saprophytes de l'eau ?

→ Effets sur l'activité kératinolytique de l'eau ?

→ Bactéries commensales ou pathogènes ?



# Bain d'eau : approche expérimentale

J10

J7

J5

J3

J1

J0

Pertes en eau, T°, pH, Conductivité



O

F

O

F

O

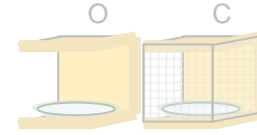
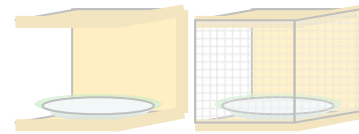
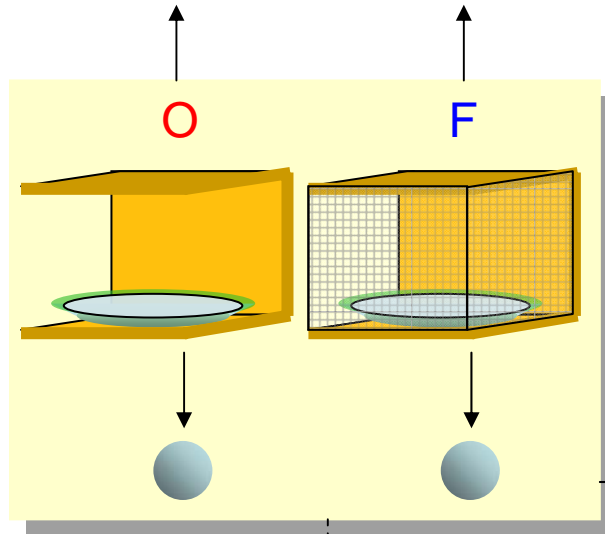
C

O

B

A/B

n = 6



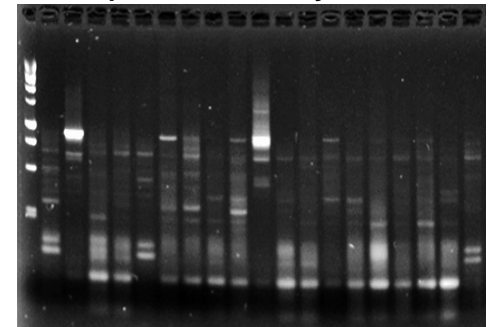
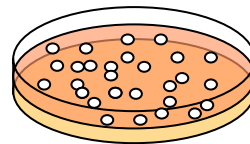
Filtration

extraction ADN

Kératinolyse

UFC  
dénombrement

Ribosomal Intergenic  
Spacer Analysis



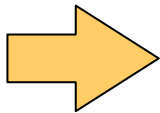
# Bains d'eau : résultats

J 10

|                                       | J 0              | O   | F    | t-test |
|---------------------------------------|------------------|-----|------|--------|
| Temperature (°C)                      | 27 **            | 22  | 21.7 | NS     |
| pH                                    | 7.0 **           | 7.5 | 7.5  | NS     |
| Conductivité (μS.cm <sup>-2</sup> )   | 177 <sup>t</sup> | 168 | 123  | NS     |
| Perte en eau (ml.jour <sup>-1</sup> ) | -                | 167 | 93   | 0.02 * |

## Microbiologie

|                         |        |     |     |                   |
|-------------------------|--------|-----|-----|-------------------|
| Bactéries + Champignons | 0.9 ** | 5.4 | 3.2 | 0.001 **          |
| Bactéries totales       | 0.8 ** | 5.4 | 3.2 | 0.001 **          |
| Entérobactéries         | 0.0 ** | 3.3 | 1.6 | 0.05 <sup>t</sup> |
| [ADN]                   | 0.2 ** | 1.3 | 0.4 | 0.01 *            |

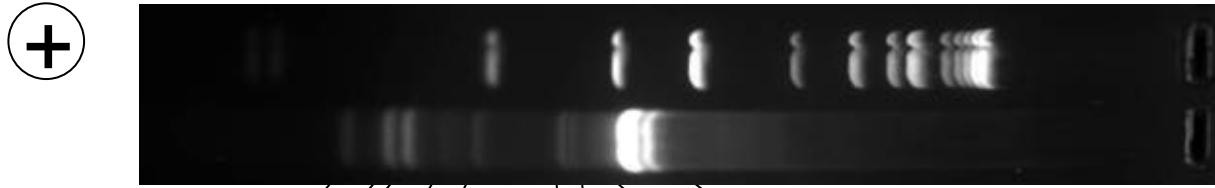


✓ Augmente les **pertes en eau** et l'**abondance bactérienne** de l'eau

# Bain d'eau : analyse des communautés bactériennes

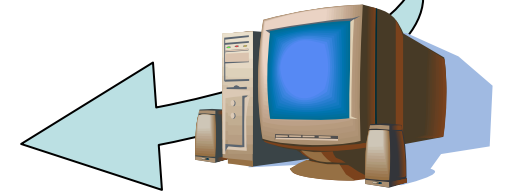
## Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA):

FAM-labelled PCR primers +  
ROX-labelled MWM

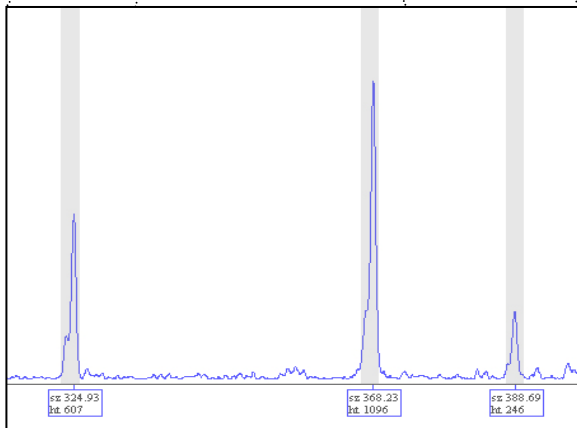
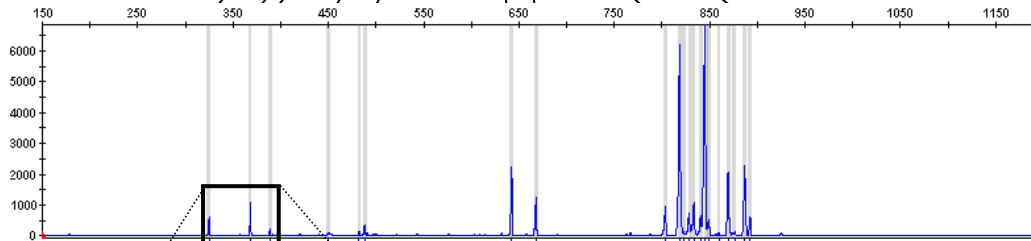


-

Séquenceur capillaire



GeneMapper©

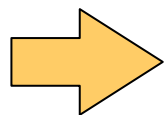


>> échelle de taille (OTU) : 150-1200 pb

>> discrimination des tailles : 2 à 5 pb

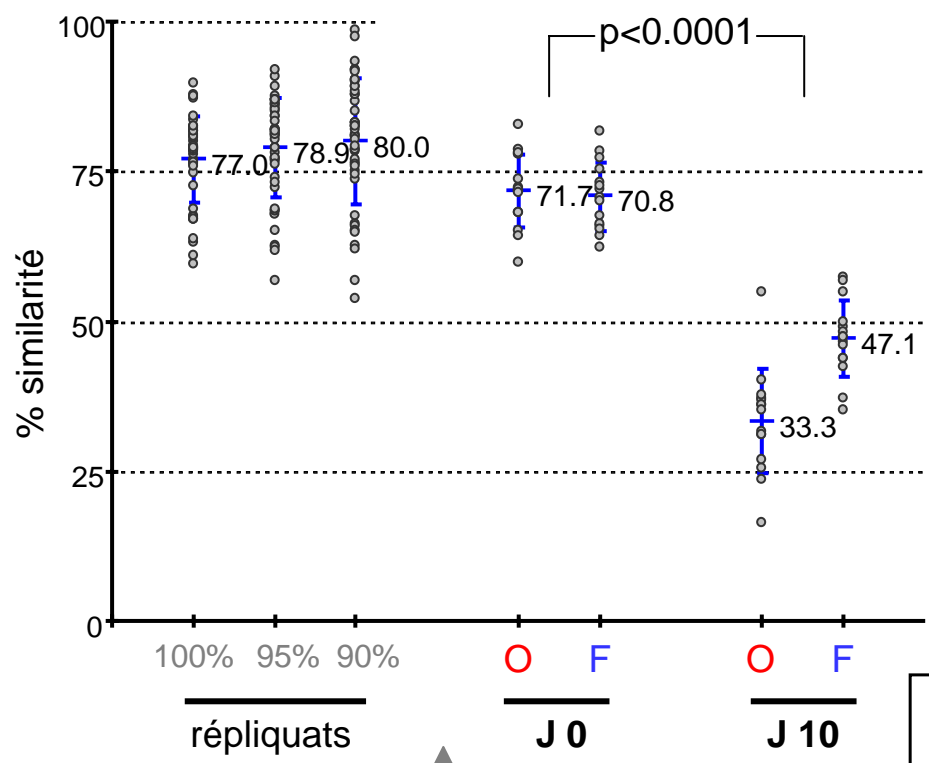
>> échelle d'intensités : 10 à  $4 \cdot 10^4$  RFU

|  |  | J 10              |      |      |        |
|--|--|-------------------|------|------|--------|
|  |  | J 0               | O    | C    | t-test |
| <b>Nombre total d'individus</b><br>Log N = $\sum$ intensités |  | 4.2 *             | 4.8  | 4.8  | NS     |
| <b>diversité</b><br>$\alpha$                                 | <b>Nombre d'espèces</b><br>S = nombre d'OTUs               | 30                | 33   | 33   | NS     |
|  | <b>Shannon</b><br>H = $-\sum (P_i \times \text{Log } P_i)$ | 1.12 <sup>t</sup> | 1.07 | 1.00 | NS     |
|  | <b>Simpson</b><br>$1-\lambda = 1-\sum P_i^2$               | 0.88 <sup>t</sup> | 0.86 | 0.83 | NS     |
|  | <b>Pielou</b><br>J = H / Log S                             | 0.76 *            | 0.72 | 0.67 | NS     |



☒ N'affecte pas le nombre d'espèces bactériennes total de l'eau

# Bain d'eau : analyse des communautés bactériennes



**diversité  $\beta$**   
similarité entre communautés

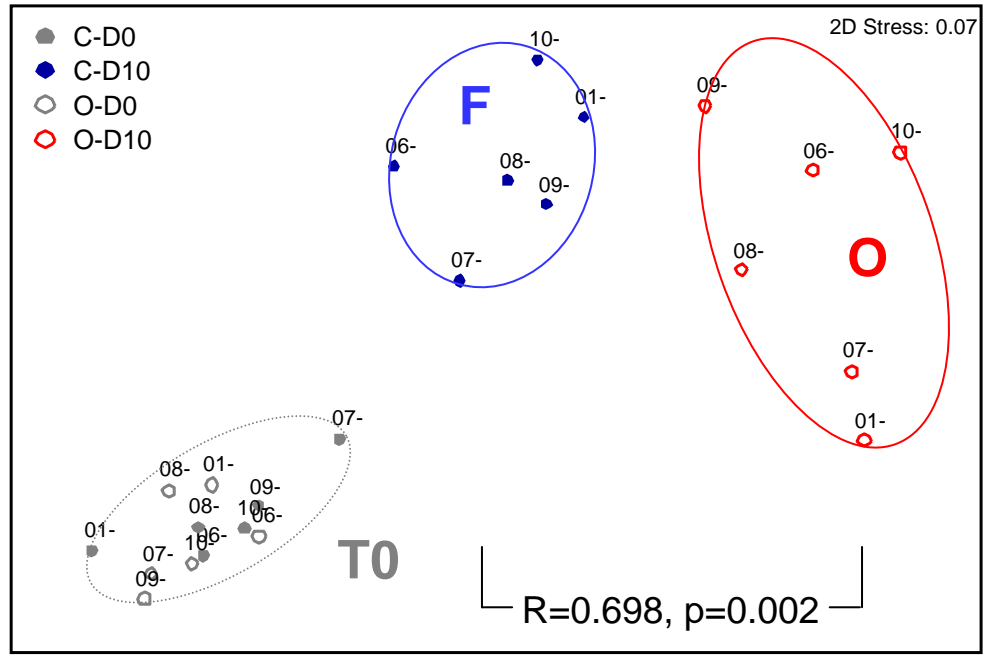
$$\text{Bray-Curtis } S_{jk} = 100 \left\{ 1 - \frac{\sum_i |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_i (y_{ij} + y_{ik})} \right\}$$

$p < 0.0001$

$R = 0.938, p = 0.001$

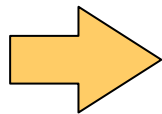
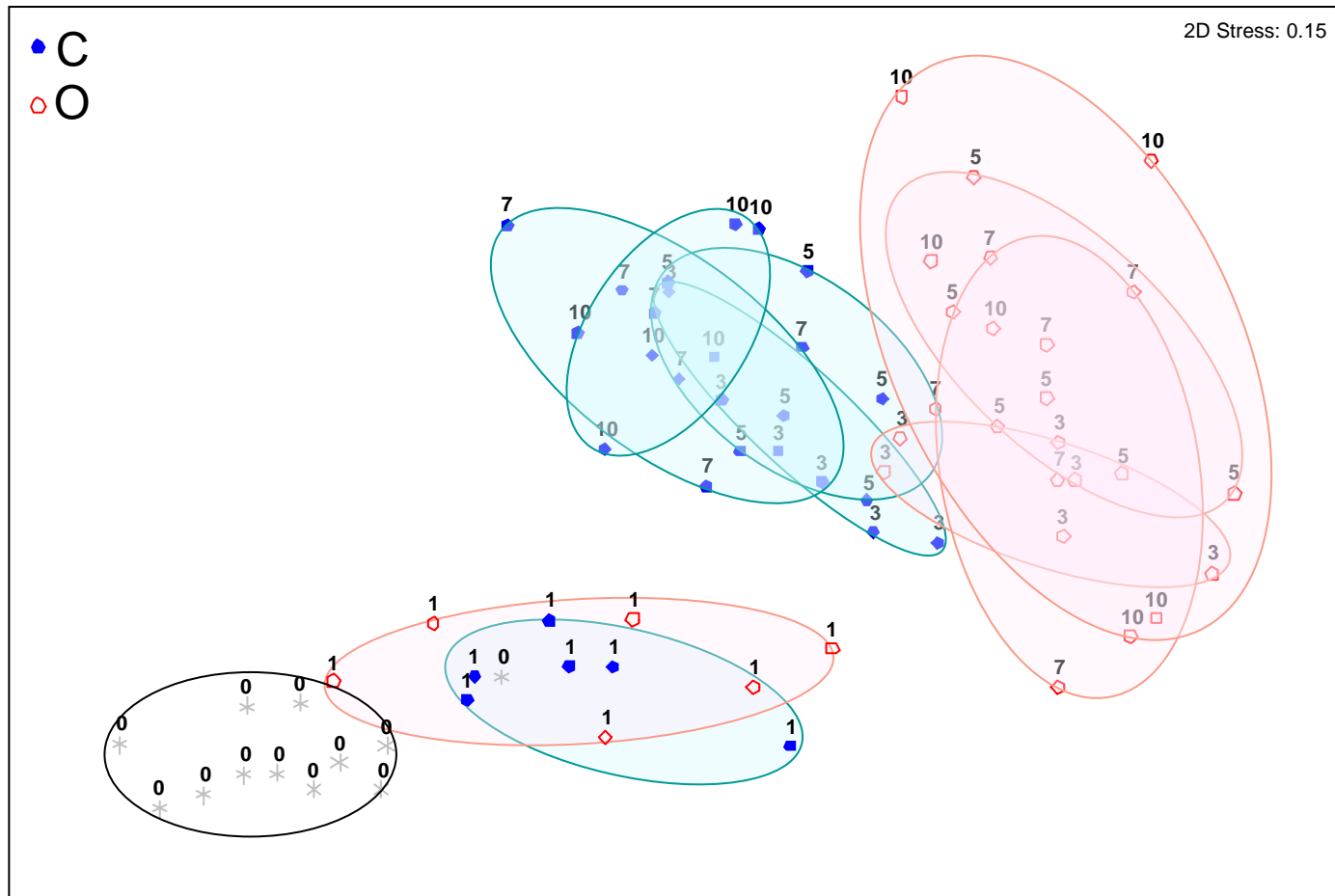
Statistiques descriptives  
Analyse de variance (ANOVA)

NMDS  
Analyse de similarité (ANOSIM)





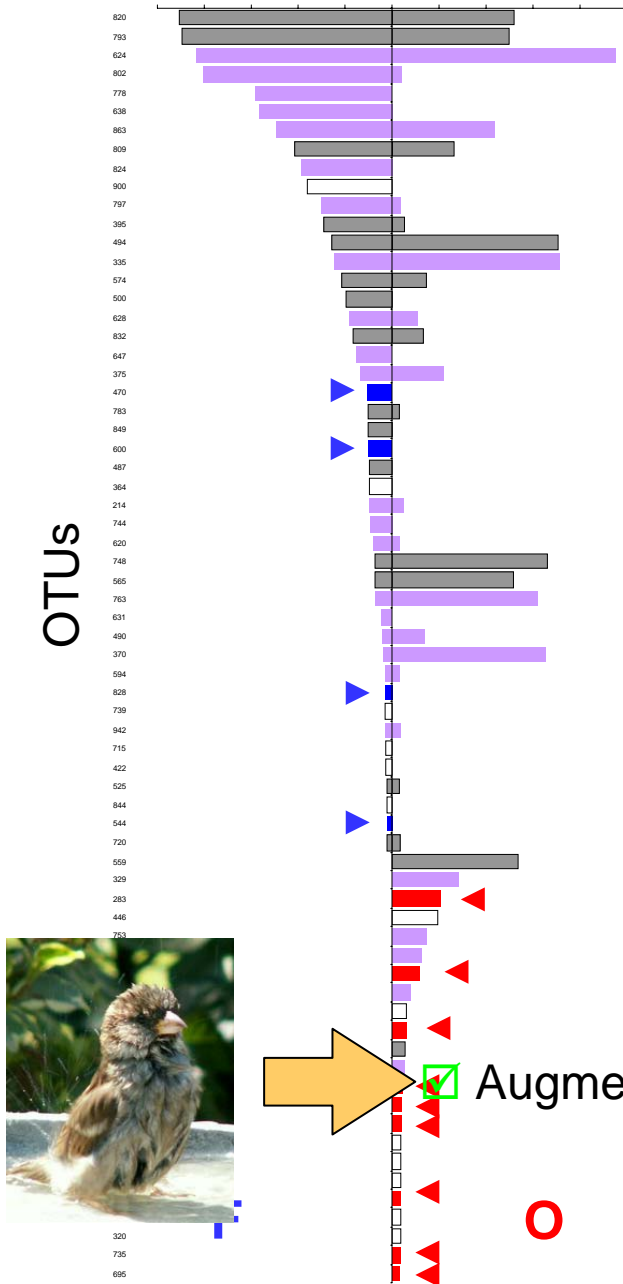
# Bain d'eau : analyse des communautés bactériennes



✓ Change la structure des communautés bactériennes

# Bain d'eau : analyse des communautés bactériennes

## Contribution à la similarité

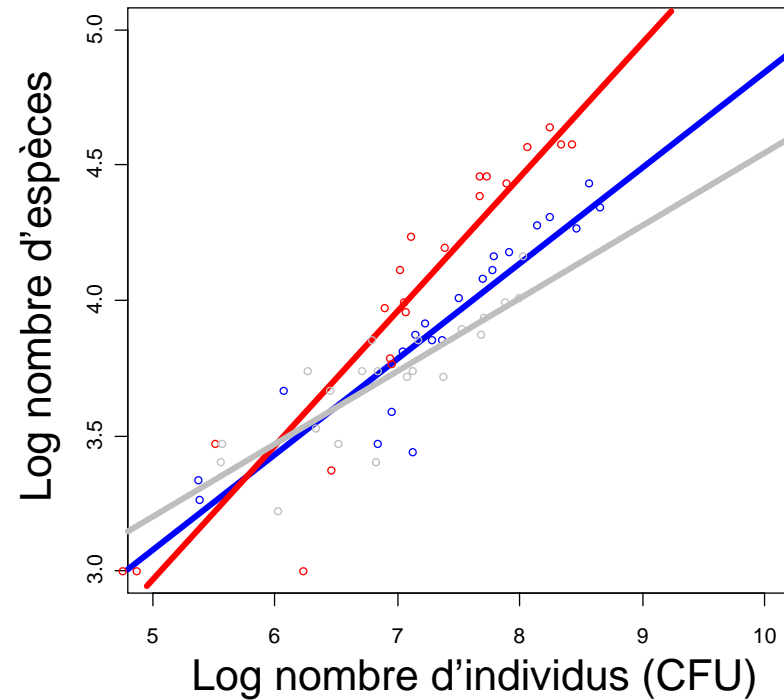


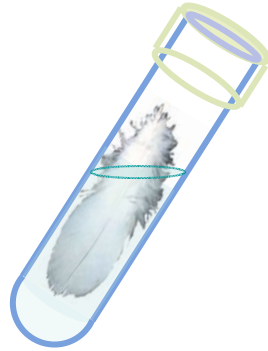
Relation aire - nombre d'espèces (SAR)

$$\text{Arrhenius : } \log S = z \log N$$

$$z_O = 0.50 \quad (p = 0.014)$$

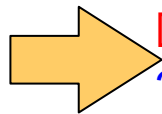
$$z_C = 0.35$$





test non-paramétrique Wilcoxon / Kruskal-Wallis

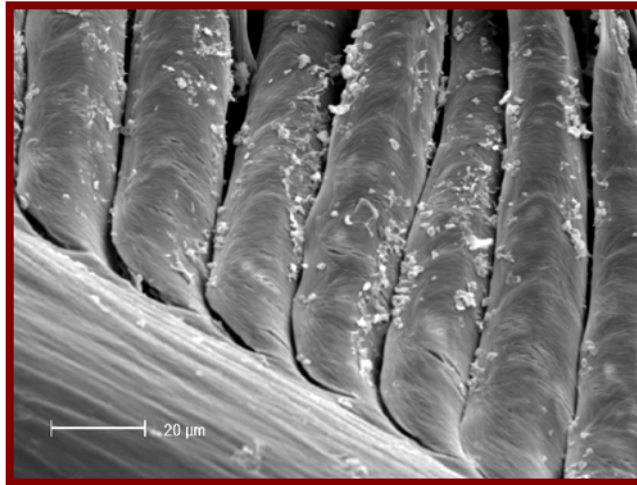
|                              | J0     | J10-O | J10-C |       |
|------------------------------|--------|-------|-------|-------|
| Indice de Dégradation visuel | 1.00 * | 4.00  | 3.11  | 0.171 |



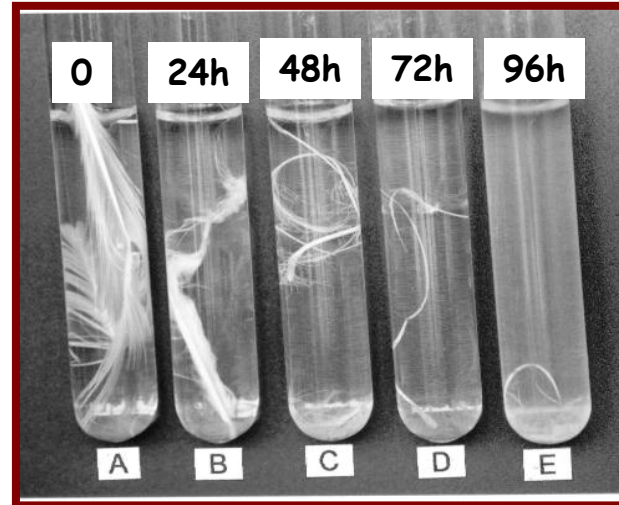
⊗ N'augmente pas significativement l'activité kératinolytique de l'eau  
? Bain = compromis entre soin et contamination du plumage ?



Micro-organismes sur les plumes  
> 90 % kératine



## La kératinolyse...



*Microbacterium spp* dégrade les plumes *in vitro*

Riffel, Lucas, Heeb & Brandelli, *Arch. Microbiol.*, 2003  
Thys, Lucas, Riffel, Heeb & Brandelli, *Let. Appl. Microbiol.* 2004

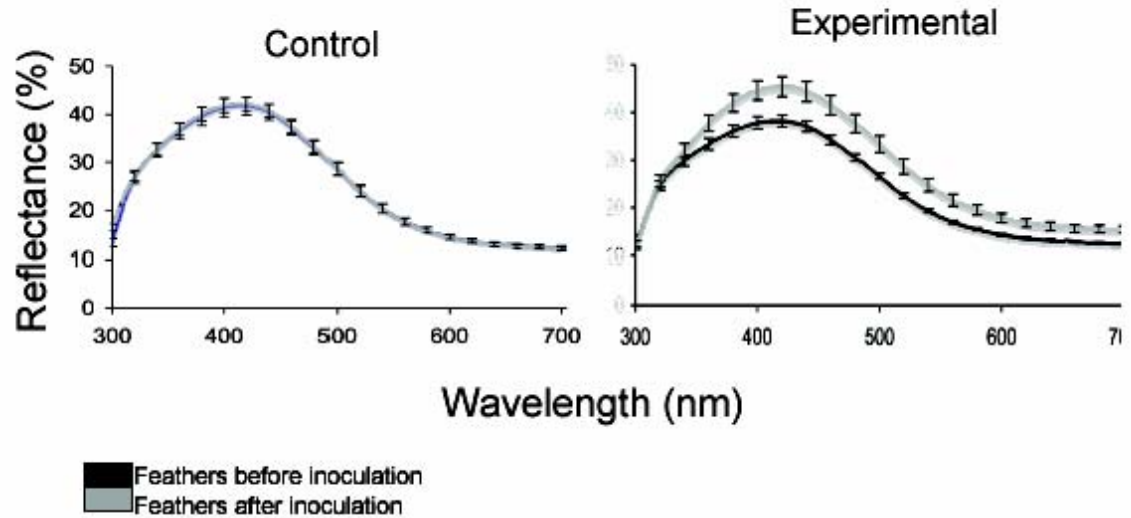
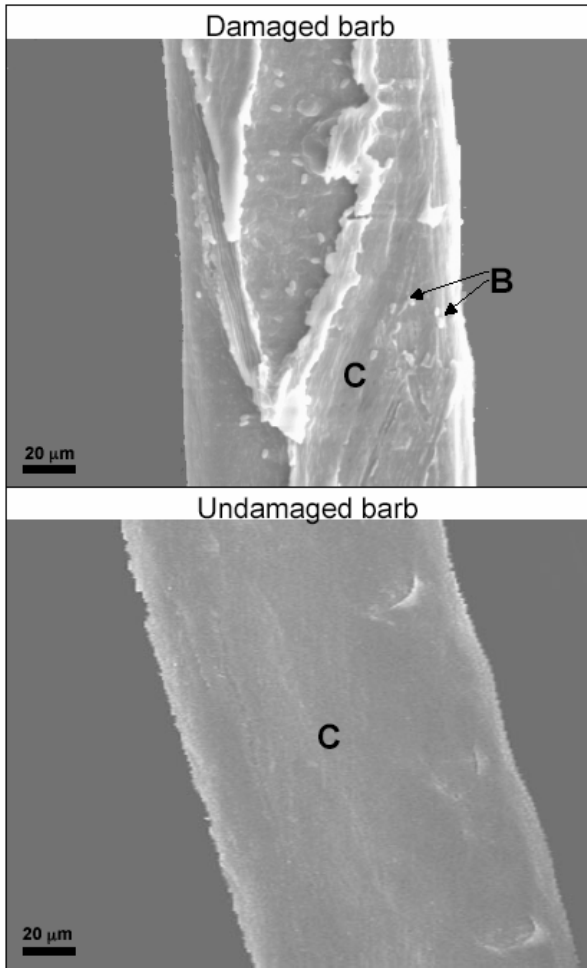
... est ubiquiste dans le sol

Lucas, Broenniman, Febbraro & Heeb, *Microbial Ecol.* 2003

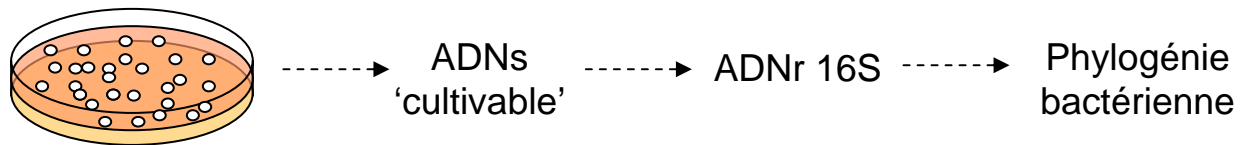
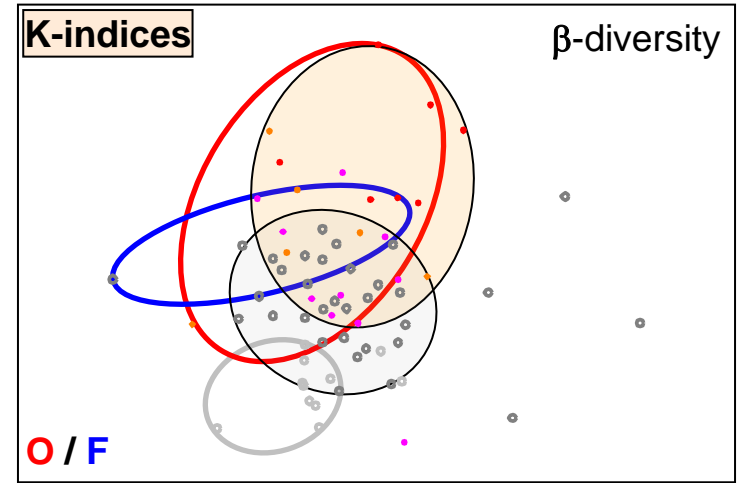
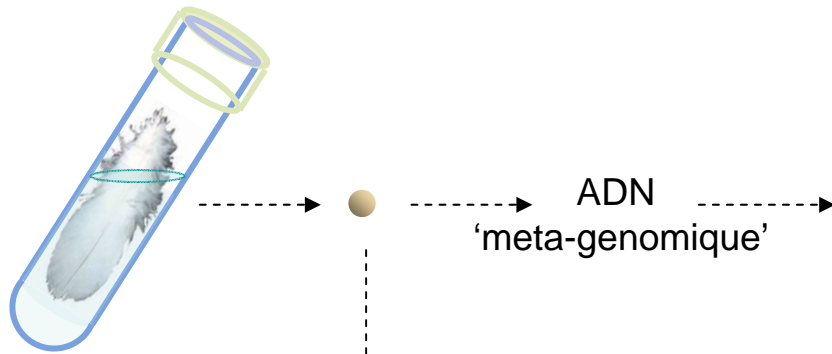
# ... et dans le plumage des oiseaux sauvages ?



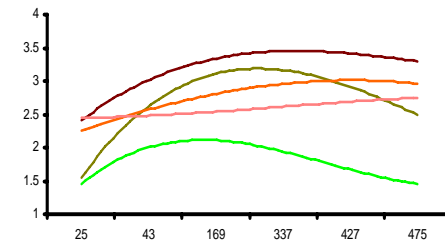
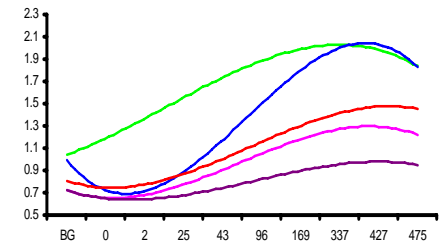
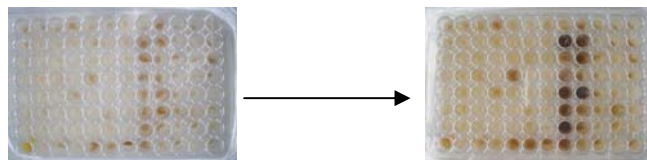
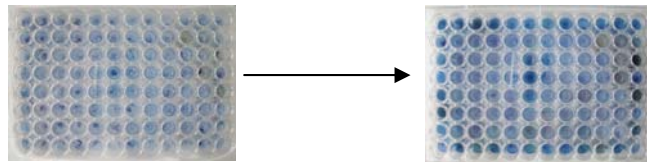
*Bacillus pumilis* dégrade les plumes  
et modifie leur couleur



# Activité keratinolytique : diversité taxonomique et diversité fonctionnelle



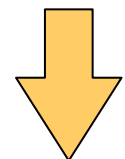
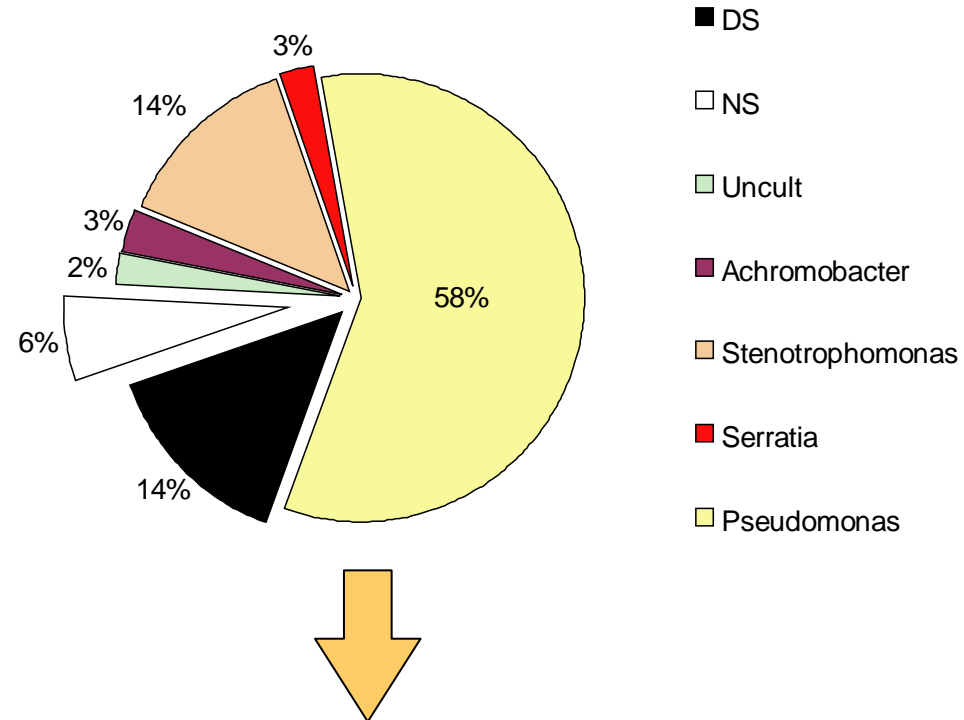
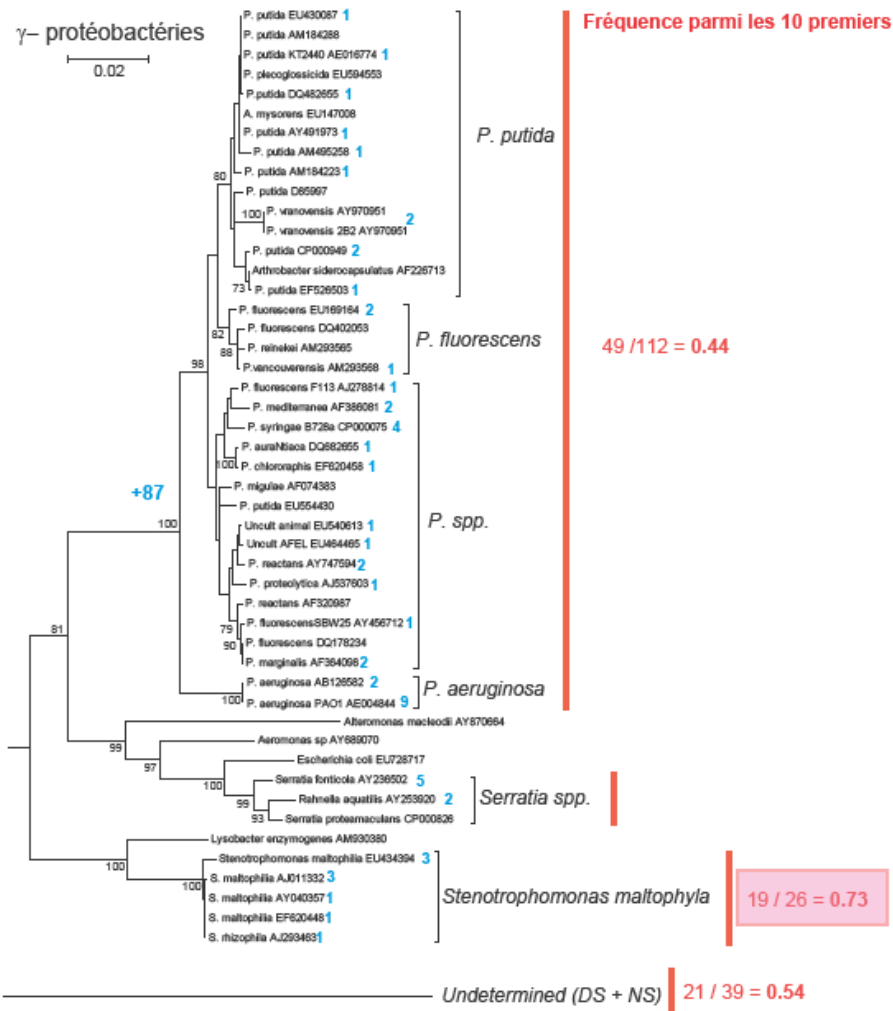
Phénotypage



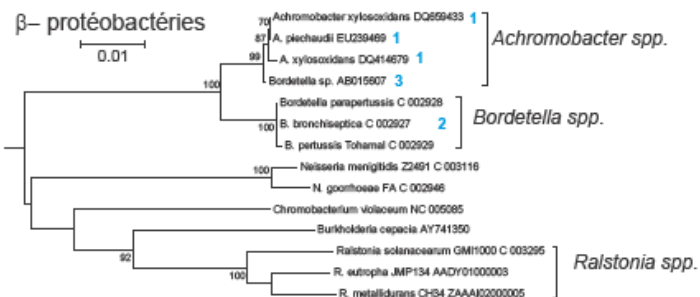
Keratine-Azur

Plume blanche

# Activité keratinolytique : diversité taxonomique et diversité fonctionnelle

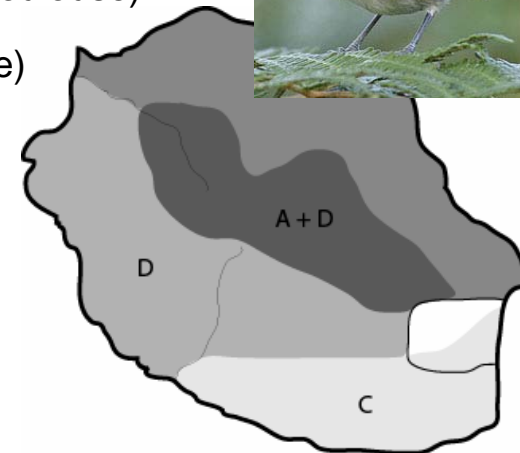


✓ nouvelles bactéries kératinolytiques ?



# Relations oiseaux – bactéries : travaux en cours...

- Phylogéographie, Kératinolyse & Plumage (C. Thébaud, UPS-Toulouse)
- Transmission sexuelle de bactéries (E. Danchin, CNRS-Toulouse)
- Radiation environnementale (A.P. Møller, CNRS-Paris)



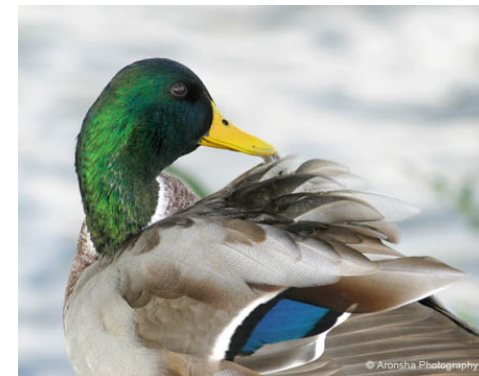
## ... et projets de recherche

### Comportements de soins du plumage

- Baignade & lissage (thèse Gabor Czirjak)  
(M.M. Lambrechts, CNRS-Montpellier)
- Glande Uropygiale (thèse Mathieu Giraudeau)  
(C. Gutierrez UPS-Toulouse, V. Bretagnolle, CNRS-Chizé)

### Pathogénie aviaire

- Microflore intestinale / *Salmonella*  
(Dr. P. Velge, INRA)





# Remerciements

