

EVOLUTION DE LA COMPOSITION EN OLIGOSACCHARIDES DU LAIT DE LAPINE AU COURS DE LA LACTATION ET ASSOCIATION AVEC LA MISE EN PLACE DU MICROBIOTE CAECAL DES LAPEREUX

Combes S.^{1*}, Knudsen C.¹, Beaumont M.¹, Rumeau M.¹, Pascal G.¹, Cauquil L.¹, Helies V.¹, Ruesche J.¹, Poli M.¹, Jones E.¹, Lencina C.¹, Annonay G.², Venot E.³, Cholet S.³, Fenaille F.³

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, ENVT, INRAE, 31326 Castanet Tolosan, France.

² Get-PLAGE, 31326 Castanet Tolosan, France

³ Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), France

*Auteur correspondant : sylvie.combes@inrae.fr

Résumé – Premier prébiotique à disposition des nouveaux nés, les oligosaccharides du lait (OL) interviennent dans le développement du microbiote du nouveau-né mais aucune donnée n'est disponible chez le lapin. Nous avons précédemment décrit la diversité des profils d'OL chez la lapine et les liens avec la survie des lapereaux. Dans cette étude nous formulons l'hypothèse que la composition en oligosaccharides du lait des lapines au cours de la lactation pourrait contribuer à la maturation du microbiote des lapereaux allaités. Pour cela, nous avons décrit la variabilité des profils en oligosaccharide des laits en fonction du stade de lactation (n = 10 lapines, prélèvements à 2-3 jours, 7 jours, 17 jours, et 25 jours post-partum), puis déterminé l'association de ces OL à la composition du microbiote caecal des lapereaux âgés de 8 et 26 jours (n=20 lapereaux / date, 2 lapereaux / femelle) par corrélation de Spearman. Sur les 46 OL détectés, l'abondances relatives de 12 OL évoluent significativement avec le stade de lactation. En fin de lactation, l'abondance relative du sialyllactose diminue au profit du lacto-N-fucopentaose (LNFP : Hex3_HexNAc1_Fuc1) (de 72 ± 13 % à 30 ± 11 % et de 12 ± 6 % à 45 ± 12% entre les jours 2-3 et le 25^{ème} jour de lactation, respectivement). À l'âge de 8 jours, une corrélation de Spearman de 0,6 a été observée entre le fucosyllactose (Hex2_Fuc1) dans le lait et l'abondance relative du genre *Fusicatenibacter* dans le contenu caecal des lapereaux. À 26 jours, l'abondance relative du groupe Oscillospiraceae NK4A214 dans le contenu caecal des lapereaux était positivement associée au Hex4_HexNAc1_Fuc1 dans le lait, tandis que les genres *Ruminococcus*, *Alistipes* et *Coproccoccus* étaient négativement associés au sialyllacto-N-fucopentaose (F-LST : Hex3_HexNAc1_Fuc1_NeuAc1), Hex3_HexNAc2_Fuc1 et sialyllacto-N-tetraose (LST : Hex3_HexNAc1_NeuAc1). Les liens entre la composition en OL chez les lapines et la composition du microbiote des lapereaux laissent entrevoir la possibilité de développement d'aliments enrichis en oligosaccharides pour optimiser la santé des lapereaux.

Abstract – Oligosaccharide composition in rabbit milk and its association with the development of the caecal microbiota of rabbit pups. As the first prebiotic available to newborns, milk oligosaccharides (MO) are involved in the development of the newborn's microbiota, but no data is available for rabbits. We have previously described the diversity of oligosaccharide profiles in rabbit milk and the associations with the survival of young rabbits. In this study, we hypothesize that the MO composition of rabbit milks during lactation could contribute to the maturation of the microbiota of suckling rabbits. To this end, we described the variability of milk oligosaccharide profiles according to the stage of lactation (n = 10 does, milk samples taken at 2-3 days, 7 days, 17 days and 25 days post-partum), and then determined the associations between these molecules and the caecal microbiota composition of 8- and 26-days old rabbits (n = 2 rabbits per female). Out of the 46 MO detected, the relative abundances of 12 MO changed significantly with the lactation stage. At the end of lactation, the relative abundance of milk sialyllactose decreased in favour of lacto-N-fucopentaose (LNFP: Hex3_HexNAc1_Fuc1) (from 72 ± 13% to 30 ± 11% and from 12 ± 6% to 45 ± 12% between days 2-3 and 25 of lactation respectively). At 8 days of age, a Spearman correlation of 0.6 was observed between the fucosyllactose (Hex2_Fuc1) in milk and the relative abundance of the genus *Fusicatenibacter* in the caecal contents of the rabbit pups. At 26 days, the relative abundance of the Oscillospiraceae group NK4A214 in the caecal content was positively associated with milk Hex4_HexNAc1_Fuc1, while the genera *Ruminococcus*, *Alistipes* and *Coproccoccus* were negatively associated with sialyllacto-N-fucopentaose (F-LST: Hex3_HexNAc1_Fuc1_NeuAc1), Hex3_HexNAc2_Fuc1 and sialyllacto-N-tetraose (LST: Hex3_HexNAc1_NeuAc1). The links between the oligosaccharide composition of rabbit milk and the composition of the microbiota of the young rabbits point to the possibility of developing oligosaccharide-enriched feeds to optimize the health of the young rabbits.

Introduction

Les oligosaccharides du lait (OL) sont des constituants bioactifs essentiels des laits de mammifères. Ces oligosaccharides sont généralement composés de trois à dix monosaccharides, avec principalement cinq éléments constitutifs : le glucose, le galactose, le N-acetyl-glucosamine, le fucose et l'acide N-acétylneuraminique, un acide sialique. En fonction de leur composition en monosaccharides les OL sont classés en 2 types : neutres ou acides si ils possèdent un ou plusieurs acides sialiques. Les OL neutres ou acides sont dit fucosylés lorsque leur composition inclut un ou plusieurs monomères de fucose. Non digestibles par les enzymes de l'hôte, les OL agissent comme des prébiotiques et jouent un rôle crucial dans la colonisation bactérienne du tractus intestinal. Les OL modulent également la composition du microbiote en limitant l'adhésion des pathogènes chez le nouveau-né (Zhang et al., 2021). Toutefois aucune donnée n'est disponible chez le lapin. Les lapereaux sont particulièrement immatures à la naissance, leur survie dépend d'une seule prise quotidienne de lait. Etant donné les effets des OL sur la colonisation du microbiote et sur la santé des nouveau-nés chez l'homme, nous avons émis l'hypothèse que la composition des OL chez la lapine pourrait contribuer à la mise en place du microbiote intestinal chez les lapereaux.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les relations entre la composition en OL de la lapine et l'établissement du microbiote caecal chez les lapereaux en fonction du stade de lactation. Les immunoglobulines A (IgA) du lait ont également été quantifiées pour prendre en compte leur rôle majeur dans la structuration du microbiote des jeunes animaux (Huus et al., 2021).

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

Le protocole a porté sur un total de 10 femelles de souche INRAE 1777 élevées dans l'Installation Expérimentale INRAE de GenPhySE (site PECTOUL de Langlade) et conduites avec un intervalle entre inséminations artificielles (IA) de 42 jours. Les lapines ont été alimentées à volonté avec un aliment commercial (STABIMAT INRA, Terrya, Rignac, France) et n'ont reçu aucun traitement antibiotique.

1.2. Prélèvements de lait

Les prélèvements de lait ont été effectués aux 2 ou 3ème, 7ème, 17ème et 25ème jour de la lactation lors du 7ème cycle de production. Les boîtes à nid ont été fermées la veille du prélèvement pour éviter l'allaitement spontané des lapereaux. Les prélèvements de lait ont été réalisés selon une adaptation de la procédure décrite par Lebas (Lebas, 1970), sans injection d'ocytocine, avec une machine à traire (dispositif avec tétérille dimensionnée pour la mamelle

de lapine et utilisant une pompe à vide pour tirer le lait). Le matin des prélèvements, les femelles ont été mises en contact avec leurs lapereaux pendant 30 secondes pour amorcer la lactation, puis retirées. Après collecte de 2 à 3 ml de lait, la lapine a été replacée immédiatement avec ses lapereaux dans la boîte à nid pour la poursuite de l'allaitement.

1.3. Analyses du profil d'oligosaccharides du lait

Les OL ont été extraits après une étape de délipidation à froid puis par extraction sur phase solide selon un protocole décrit précédemment (Oursel et al., 2017). Les OL extraits et purifiés ont été perméthylés puis analysés par spectrométrie de masse Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) (Bruneel et al., 2018). La mesure de la masse précise des oligosaccharides (<10ppm) a permis d'accéder à leurs compositions en monosaccharides. Les proportions des différents oligosaccharides ont été obtenues en divisant l'intensité d'un oligosaccharide par la somme des intensités de tous les oligosaccharides détectés dans le même échantillon. Les résidus galactose et glucose sont deux hexoses isomères non distinguables par leurs masses et sont donc abrégés en Hex. De la même façon la N-acétyl-glucosamine sera appelée HexNAC.

1.4. Mesure de la concentration en IgA du lait

La concentration en IgA dans les échantillons de surnageants de laits écrémés a été déterminée par ELISA sandwich en utilisant des anticorps polyclonaux spécifiques IgA de chèvre anti-lapin (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA). La concentration en IgA après centrifugation a été exprimée relativement à la concentration en protéines dans les mêmes surnageants.

1.5. Analyses du microbiote caecal

A 8 et 26 j d'âge, 2 lapereaux par femelle ont été abattus (n=20/âge). La composition du microbiote caecal a été déterminée par séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr16S et traitement bioinformatique FROGS (Escudé et al., 2018).

1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (version 4.3.0.). Les variations du nombre et de l'abondance relative des OL et de la concentration en IgA en fonction du stade de lactation ont été analysées à l'aide d'un modèle linéaire mixte incluant la femelle en effet aléatoire. Des tests de comparaison de moyennes de Tukey ont été réalisés. Des corrélations de Spearman ont été calculées à 8 et 26 jours d'âge séparément pour étudier les relations entre le nombre et la composition en OL et les concentrations en IgA du lait des lapines et la composition du microbiote de leurs lapereaux, (10 femelles, 2 lapereaux par femelle).

2. Résultats et discussion

2.1. Effets du stade de lactation sur les oligosaccharides et la concentration en IgA du lait

Nous n'avons pas observé de différence de richesse en OL en fonction du stade de lactation ($17,32 \pm 0,52$ oligosaccharides). Cependant, 12 oligosaccharides évoluent significativement avec le stade de lactation (Figure 1A). Parmi ces 12 oligosaccharides, seule l'abondance relative de LNFP (lacto-N-fucopentaose : Hex3_HexNAc1_Fuc1) a diminué entre les deux premiers stades de la lactation. À la fin de la lactation, on observe une réduction d'un facteur 2,5 de l'abondance relative du sialyllactose (SL, Hex2_NeuAc1, de 72 ± 13 % entre J2 et J17 à 30 ± 11 % à J25). À l'inverse, les abondances relatives de 9 OL

augmentent significativement et atteignent leur valeur maximale à 25 jours de lactation et notamment parmi les OL fucosylés : le fucosyllactose (FL : Hex2_Fuc1), le Hex2_HexNAc1_Fuc1, le LNFP, et le LNDFH (lacto-N-difucohexaose : Hex3_HexNAc1_Fuc2). L'abondance relative de 2 OL neutres non fucosylés augmente également en fin de lactation (le lacto-N-tetraose/lacto-N-neo-tetraose, LNT/LNnT : Hex3_HexNAc1 et le H4_HexNAc1). Par conséquent, la distribution des différents types d'oligosaccharides subit une modification significative au cours de la lactation, montrant une forte réduction des formes sialylées en faveur des formes neutres et neutres-fucosylées, ces dernières devenant le type prédominant à la fin de la lactation (Figure 1B).

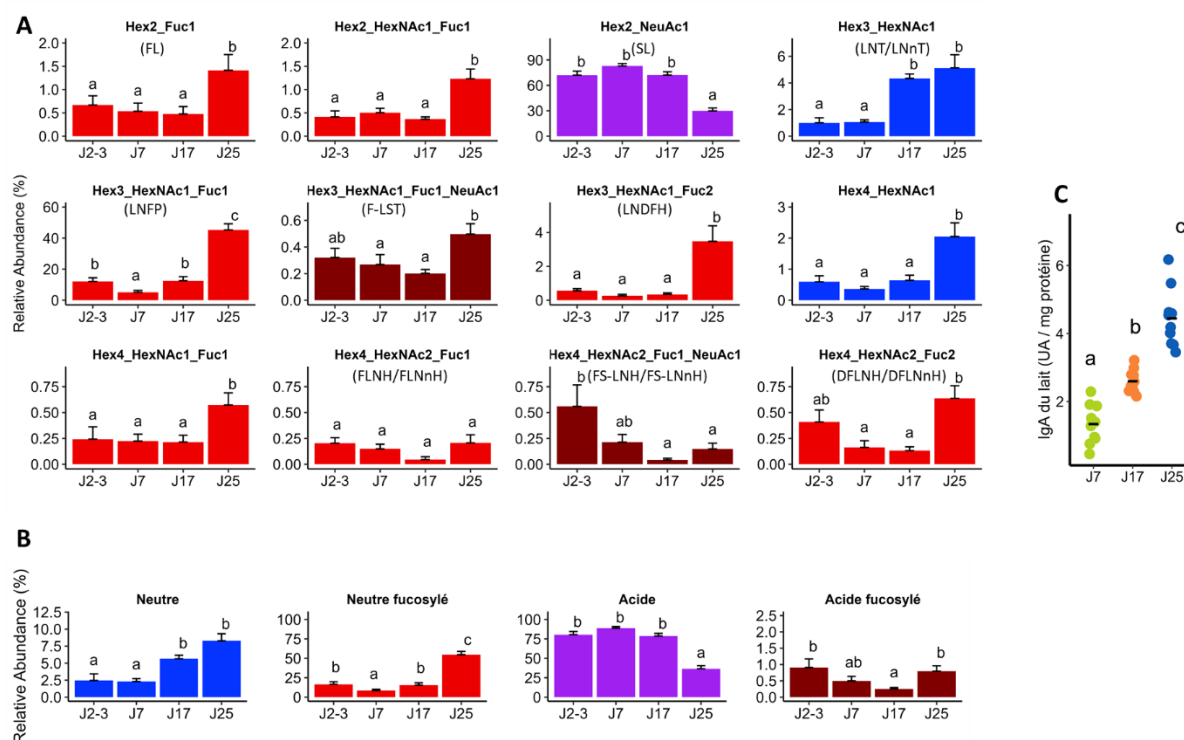


Figure 1 : Abondance relative des oligosaccharides (A), des types d'oligosaccharides (B) et des IgA (C) du lait de lapine évoluant significativement au cours de la lactation. Hex : glucose ou galactose, HexNAc : N-acétylhexosamine; Fuc : fucose ; NeuAc : acide N-acétylneuraminique. Les couleurs indiquent le type neutre, neutre fucosylé, acide, et acide fucosylé (bleu, rouge violet et bordeaux, respectivement). a,b,c : Les moyennes affectées de lettres différentes indiquent une différence entre elles au seuil de $p < 0,05$.

D'après la littérature, chez les animaux domestiques et les humains, les évolutions des nombres et les concentrations d'OL au cours de la lactation semblent dépendre de l'espèce. Dans le lait de lapine comme dans le lait de truie, de chèvre et de vache, la concentration d'OL sialylés diminue pendant la lactation (Martín-Sosa et al., 2003; Claps et al., 2014; Mudd et al., 2016), mais pas dans le lait humain (Thurl et al., 2017). Selon les résultats de la méta-analyse de Thurl et al. (2017), dans le lait humain, la concentration de 3-fucosyllactose double, tandis que la concentration de LNFP I est réduite de deux fois au cours de la lactation. De même, dans le lait de truie, la concentration de LNFP I diminue également au début de la lactation (Mudd et al., 2016). À l'inverse, chez la

lapine, en plus de l'augmentation du fucosyllactose observée chez l'humain, une forte augmentation du LNFP a été observée à la fin de la lactation. Cette augmentation de LNFP, constitué d'au moins 6 isomères (LNFP I à LNFP VI) (Rumeau et al., 2024), semble être une caractéristique du lait de lapine. La structure des isomères du LNFP varie en fonction de la position du fucose sur la molécule, de la nature de la liaison fucosidique (α 1-2, 1-3 ou 1-4) et de la présence du disaccharide lacto-N-biose (Gal β 1-3GlcNAc) ou N-acétyllactosamine (Gal β 1-4GlcNAc). Ces isomères exercent des effets biologiques différents en fonction de leur structure, par exemple sur l'infectiosité des pathogènes en raison de leur propriété antiadhésive, ou sur leur capacité à stimuler les cellules

avec la littérature montrant qu'avec l'avancée de la lactation la teneur en matière sèche, protéines, lipides ainsi qu'en Ig totales s'accroît (Maertens, L. et al., 2010). Toutefois nous n'avons trouvé aucune donnée relative à l'évolution en fonction du stade de lactation spécifique des IgA chez la lapine.

spécifique des IgA chez la lapine.



0,6 à 26 jours avec *Bacteroides* et *Lachnospiraceae* NK4A136 group (Figure 2B). En comparaison avec les IgA du lait qui sont connues pour moduler la composition du microbiote (Huus et al., 2021) nous nous sommes focalisés sur les corrélations supérieures à 0,6 en valeur absolue pour les associations entre le microbiote et les OL.

A l'âge de 8 jours, une corrélation supérieure à 0,6 a été observée uniquement entre le fucosyllactose (FL : Hex2 Fuc1) et le genre *Fusicatenibacter* (Figure 2A).

À 26 jours, le groupe Oscillospiraceae NK4A214 était positivement associé au Hex4_HexNAc1_Fuc1, tandis que *Ruminococcus*, *Alistipes* et *Coprococcus* étaient négativement associés au F-LST (Hex3_HexNAc1_Fuc1_NeuAc1), Hex3_HexNAc2_Fuc1 et sialyllacto-N-tetraose (LST : Hex3_HexNAc1_NeuAc1), respectivement (Figure 2B).

Ces corrélations soutiennent l'hypothèse d'un rôle structurant des OL au cours de la lactation dans le développement du microbiote des jeunes lapereaux. Les corrélations positives de *Fusicatenibacter* et Oscillospiraceae NK4A214, avec le fucosyllactose et Hex4_HexNAc1_Fuc1 respectivement, suggèrent que ces OL contribueraient à la définition de conditions favorables à ces deux genres en étant un substrat direct ou indirect pour promouvoir leur croissance. En outre, des corrélations négatives de *Ruminococcus*, *Alistipes* et *Coprococcus* avec certains OL, suggèrent que ces genres bactériens ne sont peut-être pas en mesure d'utiliser efficacement ces OL pour leur croissance ou que ces OL favoriseraient d'autres membres de la communauté microbiennes à leur détriment. Des études antérieures explorant l'utilisation des OL comme seule source de carbone disponible ont montré que les espèces *Enterococcus*, *Lactobacillus* et *Enterobacterium* ne présentent que peu ou pas d'activité de consommation des OL, alors que certaines espèces *Bifidobacterium* et *Bacteroides* se développent efficacement lorsque les OL sont le seul substrat disponible (Marcobal et al., 2010). Cependant, *Bifidobacterium* est absent du microbiote du lapin (Paës et al., 2022) et nous n'avons pas mis en évidence de corrélation avec le genre *Bacteroides* dans notre étude.

Conclusions

La composition en OL montre une forte variabilité avec le stade de la lactation. L'abondance en fin de lactation des structures fucosylées, dont le LNFP, semble être une caractéristique particulière du lait de lapine. Nous confirmons que ces oligosaccharides sont associés à la structure du microbiote chez le lapereau, comme chez d'autres espèces. En l'absence de *Bifidobacterium*, la capacité des bactéries du microbiote du lapin à consommer des oligosaccharides doit être confirmée par des techniques de culture bactérienne appropriées (en anaérobiose cf. communication Rumeau et al. JRC2025). Enfin, il conviendra dans une seconde étape, de valider les effets des OL sur le microbiote et la santé des lapereaux en proposant une supplémentation en OL dans l'alimentation des lapereaux avant le sevrage.

Remerciements

Ces travaux ont été soutenus par le département PHASE INRAE et l'ANR HoloOLIGO (ANR-21-CE20-0045-01). Nous remercions l'ensemble du

personnel de l'unité expérimentale de GenPhySE pour le soin apporté aux animaux.

Références

- Bruneel A., Cholet S., Drouin-Garraud V., Jacquemont M. L., Cano A., Mégarbané A., Ruel C., Cheillan D., Dupré T., Vuillaumier-Barrot S., Seta N., Fenaille F. 2018. Complementarity of electrophoretic, mass spectrometric, and gene sequencing techniques for the diagnosis and characterization of congenital disorders of glycosylation. *Electrophoresis* 39: 3123–3132.
- Claps S., Di Napoli M. A., Sepe L., Caputo A. R., Rufrano D., Di Trana A., Annicchiarico G., Fedele V. 2014. Sialyloligosaccharides content in colostrum and milk of two goat breeds. *Small Ruminant Research* 121: 116–119.
- Escudié F., Auer L., Bernard M., Mariadassou M., Cauquil L., Vidal K., Maman S., Hernandez-Raquet G., Combes S., Pascal G. 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34: 1287–1294.
- Huus K. E., Petersen C., Finlay B. B. 2021. Diversity and dynamism of IgA-microbiota interactions. *Nat Rev Immunol* 21: 514–525.
- Lebas F. 1970. Description d'une machine à traire les lapines. *Annales de zootechnie* 223–228.
- Maertens, L., Van Renterghem, R., De Groote, G. 2010. Effects of dietary inclusion of Paciflor® (bacillus cip 5832) on the milk composition and performances of does and on caecal and growth parameters of their weanlings. *World rabbit sci.* 2: 67–73.
- Marcobal A., Barboza M., Froehlich J. W., Block D. E., German J. B., Lebrilla C. B., Mills D. A. 2010. Consumption of Human Milk Oligosaccharides by Gut-Related Microbes. *J. Agric. Food Chem.* 58: 5334–5340.
- Martin-Sosa S., Martín M.-J., García-Pardo L.-A., Hueso P. 2003. Sialyloligosaccharides in Human and Bovine Milk and in Infant Formulas: Variations with the Progression of Lactation. *Journal of Dairy Science* 86: 52–59.
- Mudd A. T., Salcedo J., Alexander L. S., Johnson S. K., Getty C. M., Chichlowski M., Berg B. M., Barile D., Dilger R. N. 2016. Porcine Milk Oligosaccharides and Sialic Acid Concentrations Vary Throughout Lactation. *Frontiers in Nutrition* 3.
- Oursel S., Cholet S., Junot C., Fenaille F. 2017. Comparative analysis of native and permethylated human milk oligosaccharides by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1071: 49–57.
- Paës C., Gidenne T., Bébin K., Duperray J., Gohier C., Guené-Grand E., Rebours G., Barilly C., Gabinaud B., Cauquil L., Castinel A., Pascal G., Darbot V., Aymard P., Debrusse A.-M., Beaumont M., Combes S. 2022. Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems* 18 p.
- Rumeau M., Fenaille F., Girard A., Loux V., Ba M., Nédellec C., Deléger L., Bossy R., Aubin S., Knudsen C., Combes S. 2024. MilkOligoThesaurus, a dataset of mammalian milk oligosaccharide synonyms. *Data in Brief* 54: 110404.
- Thurl S., Munzert M., Boehm G., Matthews C., Stahl B. 2017. Systematic review of the concentrations of oligosaccharides in human milk. *Nutrition Reviews* 75: 920–933.
- Walsh C., Lane J. A., van Sinderen D., Hickey R. M. 2020. Human milk oligosaccharides: Shaping the infant gut microbiota and supporting health. *J. Funct. Foods* 72: 104074.
- Zhang S., Li T., Xie J., Zhang D., Pi C., Zhou L., Yang W. 2021. Gold standard for nutrition: a review of human milk oligosaccharide and its effects on infant gut microbiota. *Microb Cell Fact* 20: 108.