

# UNE SUPPLEMENTATION EN POLYPHENOLS MODULE LA MATURATION DU MICROBIOTE ET DE L'EPITHELIUM INTESTINAL LORS DE L'INTRODUCTION DE L'ALIMENTATION SOLIDE CHEZ LE LAPIN

Martin Beaumont<sup>1\*</sup>, Chloé Bredon<sup>1</sup>, Céline Barilly<sup>1</sup>, Corinne Lencina<sup>1</sup>, Lise Gallo<sup>1</sup>, Patrick Aymard<sup>1</sup>, Christelle Knudsen<sup>1</sup>, Sylvie Combes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, Castanet-Tolosan, France..

\*Auteur correspondant : [martin.beaumont@inrae.fr](mailto:martin.beaumont@inrae.fr)

**Résumé** – Le but de cette étude était d'étudier si la composition des premiers aliments solides ingérés par les lapereaux pouvait influencer la maturation de l'épithélium intestinal ainsi que la composition et l'activité métabolique du microbiote digestif. Pour cela, nous avons testé les effets d'une supplémentation en polyphénols (PP), connus pour agir conjointement sur le microbiote et sur l'épithélium. Trois groupes de lapereaux ont été comparés. Le premier groupe était exclusivement allaité de 18 à 25 jours. Les deux autres groupes étaient allaités et avaient accès entre 18 et 25 jours à un aliment solide supplémenté ou non avec 50 ppm d'un extrait de raisins riche en PP (concentration >80%). A 25 jours, le caecum a été prélevé pour analyser la composition du microbiote et pour étudier le métabolome. Une analyse histologique du tissu caecal a été réalisée et les cellules épithéliales ont été isolées pour analyser l'expression de gènes impliqués dans la fonction barrière. Le poids du caecum était deux fois plus élevé chez les animaux consommant des aliments solides supplémentés ou non en PP comparativement à ceux exclusivement allaités. L'analyse de la  $\beta$ -diversité a montré que l'introduction de l'alimentation solide et la supplémentation en PP ont modifié la structure du microbiote. L'introduction de l'alimentation solide a augmenté l'abondance relative des genres *Roseburia* et *Ruminococcus* mais ce résultat n'était pas observé lorsque l'aliment était supplémenté en PP. A l'inverse, l'augmentation d'un genre de *Lachnospiraceae* n'était observée que dans le cas de la supplémentation en PP. L'introduction de l'alimentation solide a réduit le pH du contenu du caecum mais cet effet n'était pas observé dans le cas de la supplémentation en PP. En effet, l'introduction de l'alimentation solide a augmenté la concentration du butyrate uniquement en l'absence de supplémentation en PP. L'ingestion d'aliments solides supplémentés ou non en PP a fortement augmenté la concentration de certains métabolites bactériens aromatiques tels que le 2,4,6-trihydroxybenzoate. Cependant, la concentration de certains métabolites aromatiques augmentait uniquement avec l'aliment témoin (ex : 3-phenylpropionate) ou l'aliment supplémenté en PP (ex : 3,5-dihydroxyphenylpropionate). La hauteur des cellules épithéliales du caecum et l'expression du gène *NOS2* étaient plus élevées chez les animaux ingérant des aliments solides non supplémentés en PP, indiquant une maturation épithéliale plus importante. En conclusion, une supplémentation en PP module la co-maturation du microbiote et de l'épithélium induite par l'introduction de l'alimentation solide.

**Abstract** – Polyphenols modulate the maturation of the gut microbiota and intestinal epithelium at the onset of solid food ingestion in rabbits. The aim of this study was to investigate whether the composition of the first solid feeds ingested by rabbits could influence the maturation of the intestinal epithelium and the composition and metabolic activity of the gut microbiota. To this end, we tested the effects of polyphenol (PP) supplementation, known to act jointly on the microbiota and the epithelium. The first group was exclusively suckling from 18 to 25 days. The other two groups were suckling and had access between 18 and 25 days to a solid feed supplemented or not with 50 ppm of a grape extract rich in PP (concentration >80%). At 25 days of age, the cecum was collected to analyze the composition of the microbiota and to study the metabolome. Histological analysis of the cecal wall was performed and epithelial cells were isolated for expression analysis of genes involved in the barrier function. Caecum weight was twice as high in animals consuming solid food supplemented or not with PP compared with those exclusively suckling. The  $\beta$ -diversity analysis showed that the introduction of solid feed and PP supplementation altered the structure of the microbiota. The introduction of solid food increased the relative abundance of the genera *Roseburia* and *Ruminococcus* but this result was not observed when the feed was supplemented with PP. Conversely, the increase in one genus of *Lachnospiraceae* was only observed with PP supplementation. The introduction of solid feed reduced the pH of the cecal contents but this effect was not observed in the case of PP supplementation. Indeed, the introduction of solid feed increased the butyrate concentration only in the absence of PP. The ingestion of solid feed supplemented or not with PP strongly increased the concentration of some aromatic bacterial metabolites such as 2,4,6-trihydroxybenzoate. However, the concentration of other aromatic metabolites increased only with the control feed (3-phenylpropionate) or the PP-supplemented feed (3,5-dihydroxyphenylpropionate). Cecal epithelial cell height and gene expression of *NOS2* were higher in animals ingesting solid feed not supplemented with PP, indicating a higher maturation level. In conclusion, PP supplementation modulates the co-maturation of the microbiota and epithelium induced by the introduction of solid feed.

## Introduction

Les lapereaux allaités commencent à ingérer des quantités significatives d'aliments solides au cours de la troisième semaine de vie. Cette modification nutritionnelle majeure coïncide avec une maturation du microbiote intestinal, caractérisé par une augmentation de l'abondance des bactéries spécialisées dans la dégradation des glucides végétaux complexes (Read et al., 2019; Beaumont et al., 2020, 2022; Paës et al., 2022). Cette modification de la composition du microbiote est associée à une adaptation de son activité métabolique en lien avec la disponibilité de nouveaux substrats dérivés des plantes (Beaumont et al., 2020). L'adaptation du microbiote à l'ingestion d'aliments solides s'accompagne d'une maturation de la barrière épithéliale intestinale avec par exemple une diminution de la perméabilité (Beaumont et al., 2020, 2022). Nos expérimentations menées *in vitro* suggèrent que les métabolites produits par le microbiote lors de l'introduction de l'alimentation solide pourraient jouer un rôle dans la maturation de l'épithélium digestif (Beaumont et al., 2020).

La co-maturation du microbiote et de la barrière intestinale au début de la vie joue un rôle déterminant dans la susceptibilité future à des pathologies infectieuses, inflammatoires et métaboliques (Al Nabhani and Eberl, 2020). Le développement de stratégies nutritionnelles visant à piloter la co-maturation du microbiote et de la barrière intestinale au début de la vie pourrait donc permettre de programmer la santé du lapin à long terme.

Les polyphénols (PP) sont des composés présents dans les plantes, généralement peu digestibles, et connus pour leurs effets sur les bactéries du microbiote intestinal ainsi que sur les cellules de l'hôte animal (Brenes et al., 2016; Rodríguez-Daza et al., 2021). Les PP peuvent avoir une action à la fois antibactérienne contre certaines bactéries tout en favorisant la prolifération d'autres bactéries, via la libération de niches écologiques ou en raison de la capacité de bactéries à métaboliser les PP (Rodríguez-Daza et al., 2021). De plus, la métabolisation des PP par les bactéries du microbiote entraîne la production de nombreux métabolites bioactifs (Rodríguez-Daza et al., 2021). Enfin, les PP sont connus pour leurs effets généralement bénéfiques sur le stress oxydant, l'inflammation et la fonction de barrière de l'intestin.

Dans ce travail, nous avons formulé l'hypothèse qu'une supplémentation en PP dans les premiers aliments solides ingérés par les lapereaux allaités pourrait modifier la co-maturation du microbiote et de la barrière épithéliale. Nous avons choisi d'étudier les effets d'un extrait de pépin et peau de raisin riche en PP. L'objectif de notre étude était de caractériser les effets de l'introduction d'un aliment solide supplémenté ou non en PP sur la composition et

l'activité métabolique du microbiote ainsi que sur l'épithélium intestinal chez des lapereaux allaités.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Protocole expérimental

Le protocole a été mis en place dans l'installation expérimentale PECTOUL (GenPhySE, INRAE, Toulouse). Les animaux ont été manipulés selon la réglementation européenne (2010/60/EU) et en accord avec la législation française (NOR : AGRG1238753A 2013). Ce protocole a reçu un avis favorable du comité d'éthique « Science et santé animales » N°115 (SSA\_2021\_007).

Les portées de 12 lapines primipares (INRAE 1777, seconde parité) ont été égalisées à 10 lapereaux. De la naissance au jour 18 tous les lapereaux étaient exclusivement allaités (Figure 1). De 18 à 25 jours, les portées ont été réparties en trois groupes (4 portées par groupe). Dans le premier groupe (**Lait**), la taille de portée a été réduite à 5 lapereaux afin de maintenir un allaitement exclusif jusqu'à 25 jours. Le second groupe (**Lait+Solide**) était allaité et avait accès à un aliment solide témoin (composition présentée dans le tableau 1). Le troisième groupe (**Lait+PP**) était allaité et avait accès à l'aliment solide témoin supplémenté avec 50 ppm de Nor Grape 80 (Nor-Feed ; aliment PP). Il s'agit d'un mélange d'extraits de pépins et de peau de raisin contenant plus de 80% de polyphénols, principalement des proanthocyanidines (>60%). La taille des portées n'a pas été réduite dans les deux groupes consommant des aliments solides (n=10 lapereaux par portée).

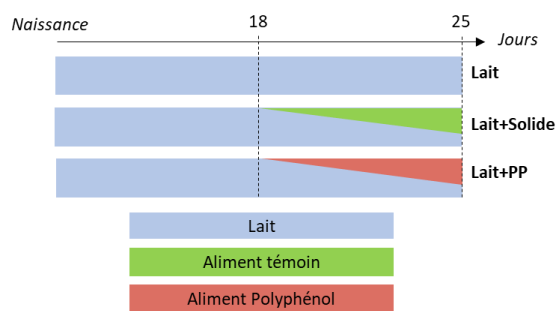


Figure 1 : Représentation du schéma expérimental.

L'allaitement a été contrôlé pendant toute la durée de l'expérience en plaçant la femelle dans le nid des lapereaux une fois par jour pendant environ 5 minutes. Les fèces déposées par la lapine dans le nid ont été retirées après l'allaitement pour éviter l'ingestion solide. L'ingestion d'aliments solides a été déterminée par pesée des mangeoires des lapereaux à laquelle la femelle n'avait pas accès.

A 25 jours, 3 lapereaux par portée ont été abattus par électroanesthésie suivis d'une exsanguination (12 lapereaux par groupe). Le caecum a été isolé, pesé et le pH du contenu a été mesuré. Le contenu a été

congelé à -80°C pour l'analyse du microbiote et du métabolome. Un échantillon de tissu caecal été prélevé pour isoler les cryptes épithéliales qui ont été congelées à -80°C dans du TriReagent selon un protocole décrit précédemment (Beaumont et al., 2022). Des sections transversales de caecum ont été fixées dans une solution de Carnoy pour l'analyse histologique.

**Tableau 1 : Composition de l'aliment**

|                                 | Témoin | Polyphénols |
|---------------------------------|--------|-------------|
| <i>Ingrédients (g/Kg)</i>       |        |             |
| Blé                             | 232    | 232         |
| Tourteau de tournesol           | 103    | 103         |
| Tourteau de soja                | 103    | 103         |
| Pulpe de betterave              | 164    | 164         |
| Luzerne déshydratée 15          | 344    | 344         |
| Huile de tournesol              | 25     | 25          |
| Prémix Témoin                   | 30     | 0           |
| Prémix Nor-Grape 80*            | 0      | 30          |
| <i>Composition (g/100 g MS)</i> |        |             |
| Protéines                       | 16,9   | 16,9        |
| Lipides                         | 4,5    | 4,6         |
| Cellulose brute                 | 10,8   | 10,8        |
| ADL                             | 3,9    | 3,9         |
| ADF                             | 14,6   | 14,6        |
| NDF                             | 29,7   | 29,9        |
| Cendres                         | 8,1    | 8,2         |
| Amidon                          | 14,3   | 13,9        |

\* Concentration finale de Nor-Grape dans l'aliment : 50 ppm.

### 1.2. Caractérisation du microbiote et du métabolome

La composition du microbiote caecal a été analysée par séquençage d'amplicons de l'ARNr 16S comme décrit précédemment (Beaumont et al., 2022). Le métabolome a été analysé par deux techniques complémentaires, la résonance magnétique nucléaire (Beaumont et al., 2022) et la spectrométrie de masse (réalisé par la société Metabolon, Inc., Etats-Unis).

### 1.3. Caractérisation de l'épithélium intestinal

L'analyse de l'expression de gènes dans les cellules épithéliales isolées a été réalisée par RT-qPCR comme décrit précédemment (Beaumont et al., 2022). Des coupes des sections transversales de caecum fixées dans la solution de Carnoy ont été colorées bleu alcian et acide periodique de Schiff (permettant de marquer les mucines) par la plateforme d'histologie ANEXPLO (GenoToul, Toulouse). Les lames ont été numérisées et les mesures suivantes ont été effectuées : taille des cryptes (indicateur de prolifération), nombre de cellules en gobelet par crypte (production de mucus) et hauteur des cellules épithéliales (marqueur de différenciation).

### 1.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Les effets de l'ingestion d'aliments solides ou de la supplémentation PP sur la structure de la communauté microbienne caecale (beta diversité) ont été testés par PERMANOVA après calcul d'une matrice de distance de Bray Crutis. Les analyses univariées ont été réalisées avec des modèles mixtes incluant le groupe en effet fixe (Lait ou Lait+Solide ou Lait+PP) et la portée en effet aléatoire. Les moyennes ajustées ont été comparées deux à deux. Les P-values ont été ajustées pour les tests multiples (procédure de Benjamini-Hochberg).

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Ingestion d'aliment solide et poids des lapereaux

Un niveau d'ingestion supérieur d'aliment solide a été observé pour l'aliment témoin comparativement à l'aliment PP entre 24 et 25 jours d'âge (Figure 2A). La présence des PP pourrait réduire l'appétence pour l'aliment ou exercer des effets antinutritionnels mais cette observation doit être nuancée en raison de la variabilité observée et du faible nombre de portées par groupe (n=4). Le niveau d'ingestion d'aliment solide plus faible dans le groupe Lait+PP était associé à une croissance ralentie par rapport aux deux autres groupes (Figure 2B).

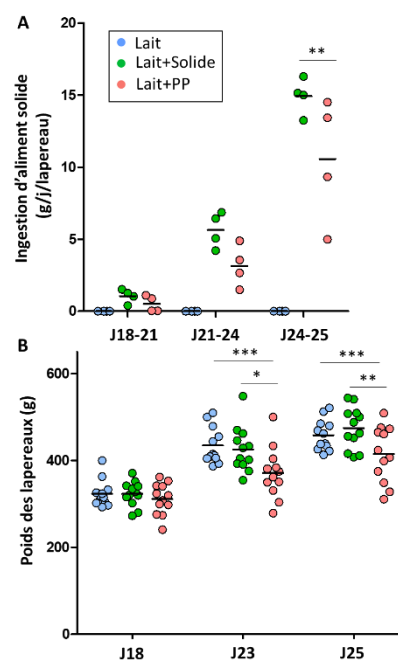


**Figure 2 : Ingestion d'aliment solide (A) et évolution du poids des lapereaux abattus (B).**

### 2.2. Composition du microbiote caecal

Le poids du caecum était deux fois plus élevé dans les deux groupes consommant des aliments solides que dans le groupe exclusivement allaité (Figure 3A). Ce résultat s'accompagne d'une modification de l'écosystème caecal induit par l'introduction de

l'alimentation solide. En effet, chaque groupe avait une la structure du microbiote caecal distincte des autres groupes, indiquant un effet de l'introduction de l'alimentation solide et des PP (Figure 3B, variance expliquée : 26%). La richesse du microbiote (nombre d'espèces observée) n'était pas significativement différente entre les groupes (données non présentées).

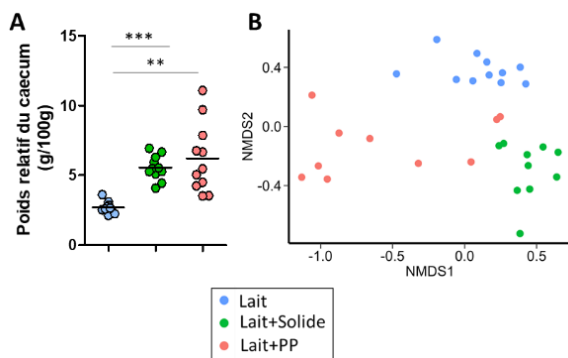


**Figure 3 : Poids du caecum exprimé relativement au poids du lapin (A) et structure du microbiote représenté par une analyse NMDS avec la distance de Bray-Curtis (B).**

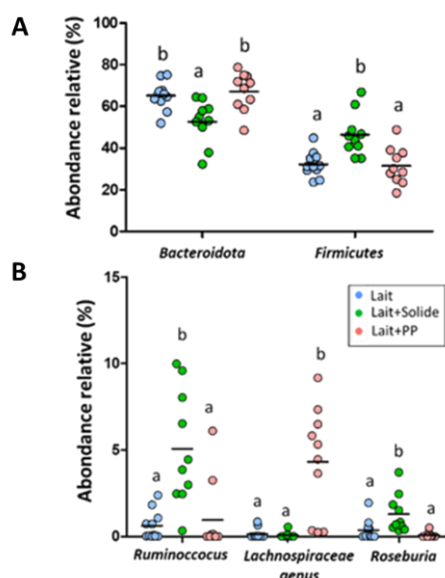


**Figure 4 : Abondance relative de phyla (A) et de genres (B) bactériens dans le caecum.**

L'ingestion de l'aliment solide témoin a réduit l'abondance des Bacteroidota et augmenté l'abondance des Firmicutes mais cet effet n'a pas été observé avec la supplémentation en PP (Figure 4A). L'absence d'inversion du ratio Bacteroidota/Firmicutes classiquement observé lors de l'introduction de l'alimentation solide (Read et al., 2019; Paës et al., 2022) pourrait indiquer une inhibition de la maturation du microbiote dans le groupe supplémentation en PP. De même, l'abondance de genres bactériens spécialisés dans la dégradation des glucides végétaux (*Ruminococcus* et *Roseburia*) a augmenté uniquement dans le groupe ingérant de

l'aliment solide témoin (Figure 4B). A l'inverse, la supplémentation en PP a induit une augmentation de l'abondance d'un genre de *Lachnospiraceae* (Figure 4B). Cet effet pourrait s'expliquer par la capacité de ces bactéries à métaboliser les polyphénols (Rodríguez-Daza et al., 2021).

### 2.3. Activité métabolique du microbiote caecal

L'ingestion de l'aliment solide témoin a réduit le pH du contenu du caecum et cet effet n'était pas observé lorsque l'aliment était supplémentation en PP (Figure 5A). Ce résultat suggère une réduction par les PP des réactions de fermentations classiquement mises en place lors de l'introduction de l'alimentation solide (Beaumont et al., 2020, 2022). En effet, l'augmentation de la concentration d'acétate induite par l'ingestion d'aliment solide était réduite par la supplémentation en PP et l'augmentation de la concentration de butyrate était observée uniquement avec l'aliment témoin (Figure 5B). Ce résultat pourrait s'expliquer par la moindre abondance des bactéries butyrogènes observée chez les animaux supplémentés en PP (Figure 4B).

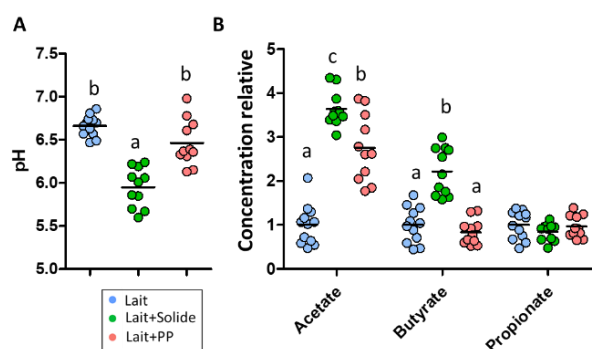


**Figure 5 : pH (A) et concentrations relatives des acides gras à courtes chaînes (B) dans le contenu caecal.**

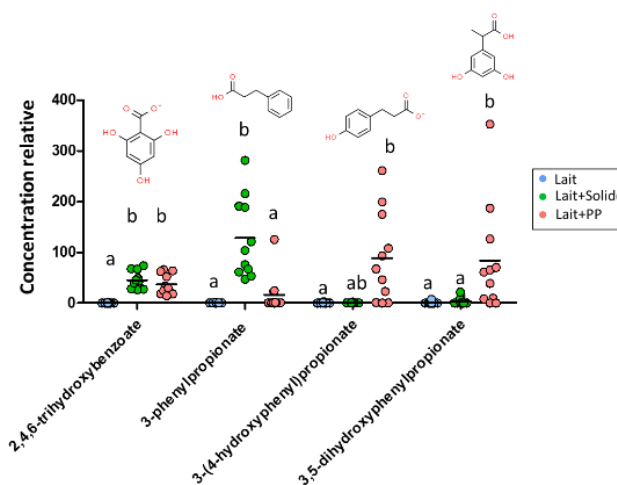


**Figure 6 : Concentrations relatives de métabolites aromatiques dans le contenu caecal.**

L'ingestion d'aliments solides a augmenté la concentration relative de métabolites aromatiques dans le contenu du caecum (Figure 6). Certains de ces

métabolites étaient augmentés quelque soit l'aliment alors que d'autres étaient augmentés soit avec l'aliment témoin soit avec l'aliment supplémenté en PP. Ces différences pourraient s'expliquer par la présence d'une bactérie capable de produire ces métabolites ou par la nécessité d'apporter les PP précurseurs au microbiote.

### 2.3. Maturation de l'épithélium

La profondeur des cryptes épithéliales n'était pas différente entre les groupes (Figures 7A et B), indiquant un niveau similaire de prolifération. Le nombre de cellules à mucus était réduit lorsque les lapereaux ingéraient des aliments solides supplémentés ou non en PP (Figures 7A et C). La hauteur des cellules épithéliales était augmentée lors de l'ingestion de l'alimentation solide témoin mais pas lorsque l'aliment était supplémenté en PP (Figures 7A et D). Ce résultat suggère que la différenciation de l'épithélium induite par l'introduction de l'alimentation solide est réduite par la supplémentation en PP. Cet effet pourrait être lié à la réduction par les PP de la production de butyrate, car ce métabolite est connu pour induire la différenciation épithéliale (Beaumont et al., 2020).

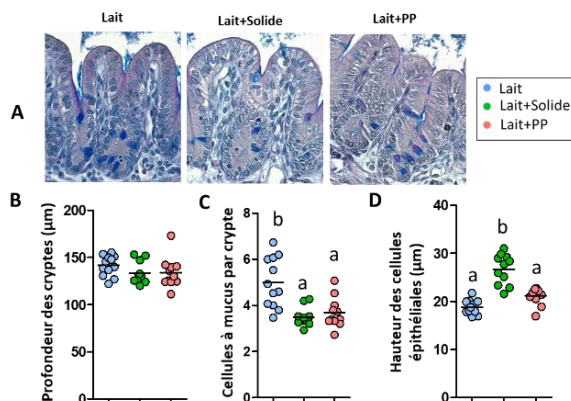


**Figure 7 : Coupes histologiques de la muqueuse caecale (A). Profondeur des cryptes (B), nombre de cellules à mucus par crypte (C), hauteur des cellules épithéliales (D).**

L'ingestion de l'aliment solide témoin a augmenté l'expression du gène de l'enzyme pro-oxydante NOS2 et a réduit l'expression du gène du peptide antimicrobien LYZ (Figure 8), comme observé dans une étude précédente (Beaumont et al., 2022). Ces effets n'étaient pas observés lorsque l'aliment était supplémenté en PP (Figure 8). L'inhibition de la maturation du microbiote induite par les PP pourrait expliquer l'absence d'adaptation des mécanismes de défense de l'épithélium lors de l'introduction de l'alimentation solide. Des effets directs des PP sur les cellules épithéliales (antioxydants ou

antiinflammatoire) pourrait également expliquer ces résultats.

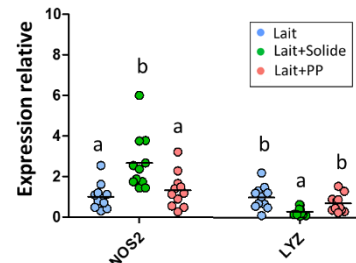


**Figure 8 : Expression relative des gènes « nitric oxide synthase inducible » (NOS2) et « lysozyme » (LYZ) dans les cellules épithéliales caecales.**

### Conclusions

La supplémentation en PP des premiers aliments solides ingérés par des lapereaux allaités modifie le processus de co-maturation du microbiote et de l'épithélium dans le caecum. Les mécanismes sous-jacents et les conséquences à long terme pour la santé des lapereaux restent à déterminer.

### Remerciements

Les auteurs remercient : les animaliers de l'installation expérimentale PECTOUL (GenPhySE, INRAE) ; Carole Bannelier (GenhySE, INRAE) pour l'analyse de la composition chimique des aliments ; Gwénaél Rebours pour la formulation du Prémix (TECHNA) ; les plateformes technologiques du réseau GenoToul. Ce travail a été financé par le projet ANR JCJC MetaboWean (ANR-21-CE20-0048).

### Références

- Al Nabhani, Z., and Eberl, G. (2020). Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol* 13, 183–189. doi: 10.1038/s41385-020-0257-y.
- Beaumont, M., Mussard, E., Barilly, C., Lencina, C., Gress, L., Panteaux, L., et al. (2022). Developmental Stage, Solid Food Introduction, and Suckling Cessation Differentially Influence the Comaturation of the Gut Microbiota and Intestinal Epithelium in Rabbits. *J Nutr* 152, 723–736. doi: 10.1093/jn/nxab411.
- Beaumont, M., Paës, C., Mussard, E., Knudsen, C., Cauquil, L., Aymard, P., et al. (2020). Gut microbiota derived metabolites contribute to intestinal barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes* 11, 1268–1286. doi: 10.1080/19490976.2020.1747335.
- Brenes, A., Viveros, A., Chamorro, S., and Arija, I. (2016). Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Animal Feed Science and Technology* 211, 1–17. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.09.016.
- Paës, C., Gidenne, T., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guéné-Grand, E., et al. (2022). Early Introduction of Plant Polysaccharides Drives the Establishment of Rabbit Gut Bacterial Ecosystems and the Acquisition of Microbial Functions. *mSystems*, e0024322. doi: 10.1128/mSystems.00243-22.

Read, T., Fortun-Lamothe, L., Pascal, G., Le Boulch, M., Cauquil, L., Gabinaud, B., et al. (2019). Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. *Front Microbiol* 10, 973. doi: 10.3389/fmicb.2019.00973.

Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., and Roy, D. (2021). Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Frontiers in Nutrition* 8.