



HAL
open science

**ETUDE DE LA RESILIENCE DE L'HOLOBIONTE
SUITE A UNE RUPTURE DE TRANSMISSION
SYMBIOTIQUE DANS 2 LIGNEES DE LAPINS
SELECTIONNEES SUR L'EFFICACITE
ALIMENTAIRE**

Marie Renevey, Sylvie Combes, Laurent Cauquil, Patrick Aymard, Virginie Helies, Catherine Larzul, Julien Ruesche, Maryse Poli, Olivier Zemb, Hervé Garreau

► **To cite this version:**

Marie Renevey, Sylvie Combes, Laurent Cauquil, Patrick Aymard, Virginie Helies, et al.. ETUDE DE LA RESILIENCE DE L'HOLOBIONTE SUITE A UNE RUPTURE DE TRANSMISSION SYMBIOTIQUE DANS 2 LIGNEES DE LAPINS SELECTIONNEES SUR L'EFFICACITE ALIMENTAIRE. Journées de la Recherche Cunicole, ITAVI; INRAE, Mar 2023, Le Mans (72000), France. pp.137-140, 10.15454/1.5572370921303193E12) . hal-04646246

HAL Id: hal-04646246

<https://hal.inrae.fr/hal-04646246v1>

Submitted on 12 Jul 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ETUDE DE LA RESILIENCE DE L'HOLOBIONTE SUITE A UNE RUPTURE DE TRANSMISSION SYMBIOTIQUE DANS 2 LIGNEES DE LAPINS SELECTIONNEES SUR L'EFFICACITE ALIMENTAIRE

Renevey M.¹, Combes S.¹, Cauquil L.¹, Aymard P.¹, Helies V.¹, Larzul C.¹, Ruesche J.¹, Poli M.¹, Zemb O.¹, Garreau H.¹

¹ GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, 31326 Castanet-Tolosan, France

*Auteur correspondant : renevey.marie@gmail.com

Résumé – Cette étude porte sur deux lignées sélectionnées chacune pour un critère d'efficacité alimentaire (croissance en alimentation restreinte pour la lignée AlimR ou consommation résiduelle en régime *ad libitum* pour la lignée ConsR) introduites dans un bâtiment par adoption des lapereaux nouveaux nés par des femelles EOPS. A la suite de cette rupture de transmission symbiotique, la collecte de fèces des animaux a permis d'étudier la composition du microbiote des deux lignées au cours de 7 générations (17 femelles par lignée et par génération). La proportion de *Firmicutes* était significativement plus élevée dans la lignée AlimR que dans la lignée ConsR (82.22% vs 78.21% respectivement, $p < 0,0001$). Réciproquement, la proportion de *Bacteroidota* était significativement plus élevée dans la lignée ConsR que dans la lignée AlimR (20.38% vs 16.50% respectivement, $p < 0,0001$). L'effet de la génération était également significatif pour l'abondance des *Firmicutes* et des *Bacteroidota* ($p=0,0009$ et $p < 0,0001$, respectivement). Les valeurs des indices d'alpha-diversité de la lignée AlimR étaient plus élevées que dans la lignée ConsR, (5,23 vs 5,14 respectivement pour l'indice de Shannon, $p=0,02$). L'effet de la génération était également significatif pour l'indice de Shannon ($p=0,003$). Enfin une analyse discriminante en composantes principales de la composition du microbiote a permis de distinguer d'une part les deux lignées, d'autre part les générations, notamment la 11^{ème} génération de sélection correspondant aux animaux adoptés par des femelles EOPS et la 18^{ème} génération.

Abstract – This study was carried out on two lines, each selected for a feed efficiency criterion (growth on restricted feed for the AlimR line or residual consumption on *ad libitum* diet for the ConsR line), introduced in a building by adoption of newborn rabbits by SPF females. Following this break in symbiotic transmission, females feces samples was used to study the composition of the microbiota of the two lines over 7 generations (17 females per line and per generation). The proportion of *Firmicutes* was significantly higher in the AlimR line than in the ConsR line (82.22% vs 78.21% respectively, $p < 0.0001$). Conversely, the proportion of *Bacteroidota* was significantly higher in the ConsR line than in the AlimR line (20.38% vs 16.50% respectively, $p < 0.0001$). The effect of generation was also significant for *Firmicutes* and *Bacteroidota* abundance ($p=0.0009$ and $p < 0.0001$, respectively). The Shannon diversity index was significantly higher in the AlimR line than in the ConsR line, (5.23 vs. 5.14 respectively, $p=0.02$). The effect of generation was also significant for the Shannon index ($p=0.003$). Finally, a discriminant principal component analysis of the composition of the microbiota allowed to distinguish between the two lines and between generations, in particular the 11th generation of selection corresponding to animals adopted by EOPS females and the 18th generation.

Introduction

L'appareil digestif du lapin héberge une communauté microbienne complexe et diversifiée qui joue un rôle clé dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la digestion ou l'immunité (Combes et al., 2011). Le pilotage du microbiote semble une voie prometteuse d'amélioration de la durabilité de l'élevage cunicole, notamment en termes de réduction des intrants

médicamenteux et d'amélioration de l'efficacité alimentaire. Les études conduites dans d'autres espèces ont démontré l'influence de nombreux facteurs sur la composition du microbiote intestinal : environnement d'élevage (composition et quantité d'aliment, humidité et chaleur), transmission maternelle, âge et état physiologique, génétique, traitements antibiotiques (Gilbert et al., 2018). Chez le lapin, la transmission

maternelle du microbiote au jeune est bien connue, pour lequel l'ingestion de crottes maternelles dans le nid a été démontrée (Combes et al., 2014). Le contrôle génétique de la composition du microbiote a été mis en évidence par les différences observées entre des lignées divergentes sélectionnées sur l'efficacité alimentaire chez le porc (Aliakbari et al., 2021) ou sur l'efficacité digestive chez le poulet (Mignon-Grasteau et al., 2015). Afin de mieux comprendre la construction de l'holobionte et les mécanismes d'interaction hôte-microbiote, il est indispensable de mettre en place des dispositifs expérimentaux qui évitent la confusion des facteurs génétiques et environnementaux, en contrôlant ou maîtrisant chacune de ces composantes. Deux lignées expérimentales sélectionnées chacune pour un critère d'efficacité alimentaire ont été introduites dans un bâtiment rénové de l'installation expérimentale INRAE de l'UMR GenPhySE en adoptant des lapereaux nouveaux nés par des femelles EOPS. Partant d'une rupture de transmission symbiotique et avec un environnement d'élevage commun aux 2 lignées, l'objectif de cette expérience est d'étudier, à partir d'échantillons de fèces de femelles reproductrices, les interactions entre l'hôte et le microbiote (effet du génotype sur le microbiote) et la résilience de l'holobionte aux cours des générations.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

Les animaux étaient issus de la lignée INRA 1001 (Larzul et De Rochambeau, 2005) et ont été élevés dans l'installation expérimentale INRAE de l'UMR GenPhySE (Castanet-Tolosan, France), conformément à la réglementation relative à l'expérimentation animale (agrément APAFiS numéro #18416). Deux lignées ont été utilisées dans cette étude : la lignée AlimR, sélectionnée pour la vitesse de croissance en alimentation restreinte (80 % du niveau *ad libitum*) et la lignée ConsR, sélectionnée sur la consommation résiduelle, c'est-à-dire sur la consommation totale d'aliment distribuée *ad libitum*, corrigée (par régression linéaire) pour le poids moyen (poids métabolique) et pour le gain de poids de 30 à 63 jours. Les lignées sont élevées en même temps, dans les mêmes cellules de maternité et de croissance. Pour chaque génération, les femelles des 2 lignées sont inséminées 4 fois avec un intervalle de 42 jours. A chaque génération et pour chaque lignée, 300 animaux issus des inséminations 3 et 4 sont contrôlés en cage individuelle depuis le sevrage à 30 jours jusqu'à l'âge de 63 jours. Pour les deux lignées, la mesure du poids au sevrage (30 jours) et à 63 jours d'âge a permis de calculer le gain moyen quotidien (GMQ). Les consommations individuelles d'aliments de 30 jours à 63 jours d'âge ont permis de calculer la consommation résiduelle. Les animaux contrôlés pendant la croissance sont sélectionnés selon leur valeur génétique Blup estimée par le logiciel Asreml (Gilmour et al., 2019). Les mâles et femelles futurs reproducteurs sont retenus selon les valeurs génétiques

de GMQ les plus élevées pour la lignée AlimR et selon les valeurs génétiques de consommation résiduelle les plus faibles pour la lignée ConsR. Le détail du protocole est décrit par Drouilhet et al. (2013). De la 1^{ère} à la 10^{ème} génération les deux lignées sélectionnées sont composées chacune de 54 femelles et de 27 mâles (un titulaire et 2 remplaçants), répartis en 9 groupes de reproduction.

1.2. Rupture de transmission symbiotique

Pour réaliser la rénovation du bâtiment de sélection de l'installation expérimentale, la 9^{ème} génération de chaque lignée a été transférée dans un bâtiment annexe. Les 9^{ème} et 10^{ème} générations ont été élevées dans ce bâtiment selon le même mode de conduite et le même processus de sélection que celui appliqué dans le bâtiment de sélection. Afin d'améliorer le statut sanitaire des lignées, un troupeau de 150 femelles EOPS gestantes du laboratoire Charles River a été mis en place dans le bâtiment de sélection après sa rénovation pour accueillir les lapereaux de la 11^{ème} génération. Les lapereaux issus de la 5^{ème} insémination artificielle des femelles de la 10^{ème} génération ont été saupoudrés de talc antibiotique puis transférés dès leur naissance du bâtiment annexe vers le bâtiment de sélection rénové: 62 lapereaux mâle et 96 lapereaux femelles de la lignée AlimR ont été adoptés par 31 femelles EOPS tandis 93 lapereaux mâles et 119 lapereaux femelles ont été adoptés par 39 femelles EOPS. Après mesure de leurs performances individuelles et calcul des index de sélection, 84 femelles et 27 mâles sont retenus pour chaque lignée afin de procréer la 12^{ème} génération. Les générations 12 à 18 sont conduites et sélectionnées selon le même processus que celui décrit en 1.1. Le plan expérimental est décrit dans la figure 1.

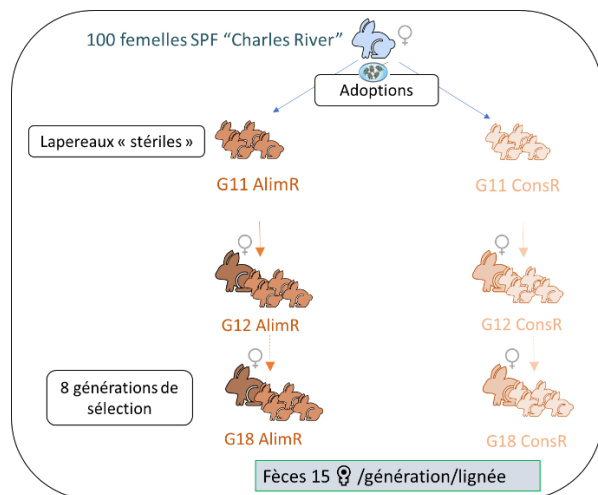


Figure 1 : Dispositif expérimental

1.3. Détermination de la composition du microbiote

Dans chaque lignée et à chaque génération, de la génération 11 à la génération 18, les fèces de 17 femelles (1 à 2 par famille) ont été prélevés 2 jours

avant la mise-bas de la 3^{ème} IA et stockées à -80°C. En raison d'un problème de stockage, les échantillons de la génération 17 n'ont pas été retenus pour cette analyse. Au total, 232 échantillons ont été traités. Le kit ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ (ZymoResearch, Freiburg, Allemagne) a été utilisé pour l'extraction de l'ADN microbien. Le gène de l'ARNr 16S microbien a été caractérisé par séquençage des régions hypervariables V3-V4 codant le gène de l'ARNr 16S à l'aide d'un à l'aide d'un séquenceur illumina MiSeq (Plateforme Get-PlaGe Toulouse Occitanie, doi: 10.15454/1.5572370921303193E12). Les régions V3-V4 ont été retenues parce qu'elles contribuent à l'affiliation taxonomique la plus précise (Yang et al., 2016). Les séquences ont été traitées avec le logiciel FROGS (Escudié et al., 2018), qui utilise l'algorithme Swarm pour regrouper les séquences en cluster (Mahé et al., 2014). Les séquences chimériques ont été exclues en utilisant la package VSEARCH (Rognes et al, 2016). Nous avons ensuite supprimé les clusters dont la proportion minimale était inférieure à 0,005 % par rapport au nombre total de séquences (4, 288, 674 séquences). Leur assignation taxonomique a été réalisée en utilisant l'algorithme BLAST et les données SILVA SSU Ref NR 132 (Quast et al., 2013). Nous avons généré un objet à l'aide du paquetage R phyloseq (McMurdie et Holmes 2013) et avons calculé les indices d'alpha-diversité après raréfaction à 5980 lectures (nombre d'OTUs observées et indice de Shannon).

1.4. Analyses statistiques

Une analyse de variance a été réalisée pour analyser la proportion des différents phyla et les index d'alpha diversité à l'aide du logiciel R version 4.1.2. Les effets fixes du modèle étaient la lignée (n=2) et la génération (n=7). Les effets de la lignée et de la génération sur la composition du microbiote ont été analysés par une analyse discriminante en composante principale (DAPC) (Jombart et al., 2010).

2. Résultats et discussion

2.1. Composition taxonomique du microbiote

La proportion de *Firmicutes*, le phylum le plus abondant chez le lapin, était significativement plus élevée dans la lignée AlimR que dans la lignée ConsR (82,22% vs 78,21% respectivement, $p < 0,0001$) (Figure 2). Réciproquement, la proportion de *Bacteroidota*, le second phylum le plus abondant, était significativement plus élevée dans la lignée ConsR que dans la lignée AlimR (20,38% vs 16,50% respectivement, $p < 0,0001$). Il n'y avait pas d'effet de la lignée pour l'abondance des autres phyla *Actinobacteriota*, *Desulfobacterota*, *Proteobacteria*

(respectivement 0,66%, 0,11%, 0,60% pour la lignée AlimR et 0,66%, 0,12%, 0,73% pour la lignée ConsR). L'effet de la génération était également significatif seulement sur l'abondance des *Firmicutes* et des *Bacteroidota* ($p=0,0009$ et $p < 0,0001$, respectivement). De la génération 11 à la génération 18, la proportion des *Firmicutes* a globalement augmenté (de 79,7 % à 86,3 % dans la lignée AlimR et de 80,0 % à 83,2 % dans la lignée ConsR) tandis que la proportion des *Bacteroidota* a globalement diminué (de 19,0 % à 11,4 % dans la lignée AlimR et de 18,9 % à 14,6 % dans la lignée ConsR). L'interaction lignée*génération n'était pas significative. Indépendamment de l'effet lignée ou génération, la prédominance de ces deux phyla chez le lapin a été précédemment rapportée (Combes et al., 2011; Velasco-Galilea et al., 2018).

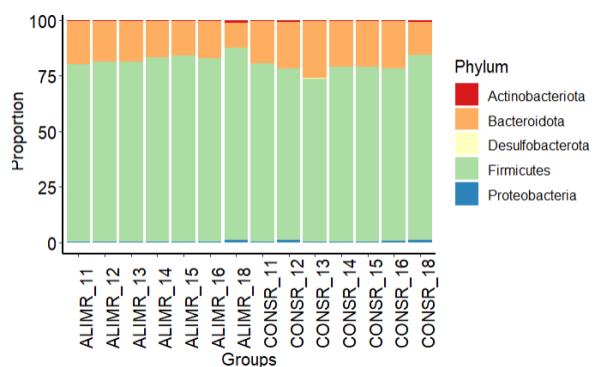


Figure 2 : Proportion de chaque phylum pour les lignées AlimR et ConsR et pour les générations 11 à 18

2.2. Diversité du microbiote

Les valeurs des indices d'alpha-diversité par lignée et génération sont données dans la figure 3. Le nombre d'OTU observé n'était pas significativement différent entre les lignées (641 dans la lignée AlimR contre 631 dans la lignée ConsR). L'indice de Shannon, qui prend en compte l'abondance proportionnelle des espèces, était cependant significativement plus élevé dans la lignée AlimR, sélectionnée sur la croissance en régime restreint que dans la lignée ConsR, sélectionnée pour les valeurs de consommation résiduelle les plus faibles (5,23 vs 5,14 respectivement, $p=0,02$). Chez le porc, dans une étude comparant la diversité microbienne de deux lignées divergentes sélectionnées pour la consommation résiduelle, l'indice de Shannon était cependant significativement plus élevé dans la lignée à faible consommation résiduelle (Aliakbari et al., 2021). L'effet de la génération était également significatif seulement sur l'indice de Shannon ($p=0,003$): la génération 18, en particulier, se distingue par les valeurs les plus élevées (5,40 dans la lignée AlimR et 5,35 dans la lignée ConsR) tandis que les générations 13 et 14 présentent les valeurs les plus faibles (5,21 et 5,19, respectivement, dans les lignées AlimR et ConsR).

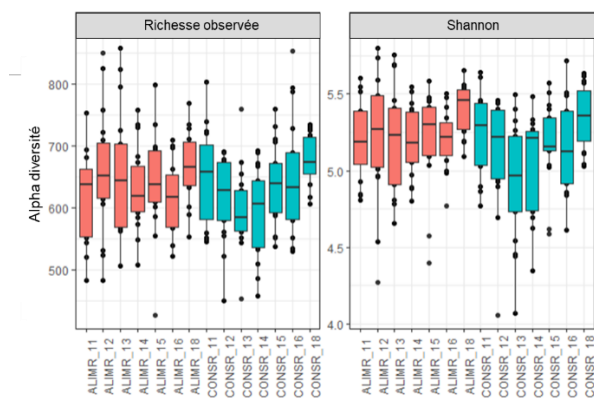


Figure 3 : Richesse observée et indice de Shannon pour les lignées AlimR et ConsR et pour les générations 11 à 18

2.3 Analyse discriminante en composantes principales de la composition du microbiote

L'analyse discriminante en composantes principales de la composition du microbiote permet de distinguer les deux lignées (Figure 4). Des différences de composition du microbiote ont déjà été rapportées entre des lignées divergentes sélectionnées sur l'efficacité alimentaire chez le porc (Aliakbari et al., 2021) ou sur l'efficacité digestive chez le poulet (Mignon-Grasteau et al., 2015). Cette spécificité des microbiotes associée à la lignée qui persiste au-delà de la rupture de transmission par contact, souligne un effet direct de la génétique de l'hôte sur le contrôle de son microbiote. Chez l'homme des études mGWAS (metagenome-Wide Association Studies) sur de larges cohortes, montrent des associations privilégiées entre une poignée de taxon et de SNP (Turpin et al., 2016). Toutefois les mécanismes physiologiques qui régissent cette sélection par l'hôte restent à élucider.

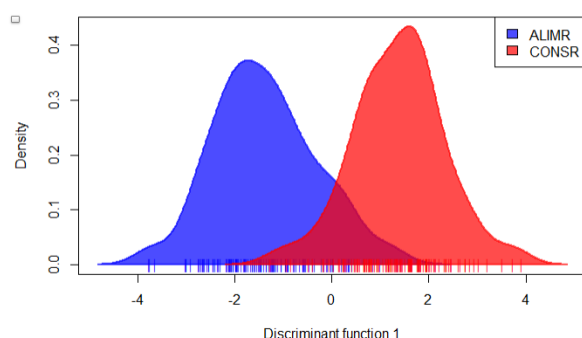


Figure 4 : Estimation de densité de noyaux Kernel de l'analyse discriminante en composantes principales des données du microbiote des lignées AlimR et ConsR

La figure 5 donne les résultats de l'analyse discriminante en composantes principales de la

composition du microbiote selon la génération des animaux. La génération 11, correspondant aux animaux adoptés par les femelles EOPS, se distingue des générations 12 à 16, qui présentent des profils de composition microbienne similaires. La génération 18 se distingue des autres générations. Nous n'avons pas identifié de changement dans la conduite des animaux qui pourrait expliquer le profil particulier du microbiote pour cette génération.

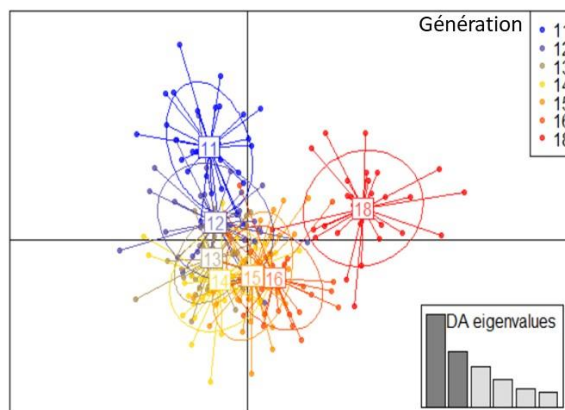


Figure 5 : Analyse discriminante en composantes principales des données du microbiote pour chaque génération de l'ensemble des animaux

Conclusions

Après une rupture de transmission symbiotique consécutive à l'adoption de lapereaux par des femelles EOPS, nous avons mis en évidence des différences de profils taxonomiques, de diversité et de composition du microbiote fécal entre deux lignées sélectionnées pour des critères d'efficacité alimentaires différents. L'effet de la génération sur la composition du microbiote était également significatif pour la proportion des différents phyla, la diversité et la composition du microbiote avec, notamment des différences marquées pour la 11^{ème} génération de sélection, dont les animaux ont été adoptés par des femelles EOPS et pour la 18^{ème} génération.

Remerciements

Nous remercions le personnel de l'installation expérimentale de GenPhySE pour leur soin apporté dans l'élevage des animaux et l'enregistrement des données ainsi que la plateforme bioinformatique Genotoul Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, doi : 10.15454/) et le groupe Sigene pour l'aide ainsi que les ressources de calcul et de stockage.

Références

Aliakbari, A., Zemb, O., Billon, Y., Barilly, C., Ahn, I., Riquet, J., Gilbert, H. 2021. Genetic relationships between feed efficiency and gut microbiome in pig lines selected for residual feed intake. *J Anim Breed Genet.* Jul;138(4):491-507.

Combes, S., Fortun Lamothe, L., Cauquil, L., Gidenne, T. 2011, Piloter l'écosystème digestif du lapin : pourquoi,

- quand et comment ? 14èmes Journées de la recherche Cunicole (2011-11-22-2011-11-23) Le Mans (FRA)
- Combes, S., Gidenne, T., Cauquil, L., Bouchez, O., Fortun-Lamothe, L. 2014. Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status, *Journal of Animal Science*, Volume 92, Issue 2, February, Pages 652–665.
- Drouilhet, L., Gilbert, H., Balmisse, E., Ruesche, j., Tircazes, A., Larzul, C., Garreau, H. (2013). Genetic parameters for two selection criteria for feed efficiency in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 91, 3121-3128. doi: 10.2527/jas.2012-6176
- Escudie, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., and Pascal, G. 2018. FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294.
- Gilbert, H., Lagarrigue, S., Verschuren, L.M.G., Zemb, O., Velasco, M., et al. 2018. Effect of gut microbiota on production traits, interaction with genetics. *69. Annual Meeting of the European Association of Animal Production*, Aug 2018, Dubrovnik, Croatia. 705 p.
- Gilmour, A. R., Gogel, B. J., Cullis B. R., Thompson R. 2009. ASReml user guide. VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK.
- Jombart, T., S., Devillard, S. and Balloux, F. 2010. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet.* 11:94. doi:10.1186/1471-2156-11-94.
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C. and Dunthorn, M. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593.
- Mignon-Grasteau, S., Narcy, A., Rideau, N., Chantry-Darmon, C., Boscher, M.Y., Sellier, N., Chabault, M., Konsak-Ilievski, B., Le Bihan-Duval, E., Gabriel, I. 2015 Impact of Selection for Digestive Efficiency on Microbiota Composition in the Chicken. *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0135488.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J. and Glöckner, F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* 41, D590–D596.
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. 2016. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584.
- Turpin, W., Espin-Garcia, O., Xu, W., Silverberg, M.S., Kevans, D, Smith MI, Guttman DS, Griffiths A, Panaccione R., Otley, A., et al. 2016. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nat Genet.* 48(11) 1413–7.
- Yang, B., Wang, Y. & Qian, PY. 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 17, 135.