Core gut microbiota in rabbit: Opportunities to strengthen the intestinal barrier

Sylvie Combes, Laurent Cauquil, Mathilde Rumeau, Charlotte Paës, Géraldine Pascal, Cláudia Vicente, Martin Beaumont, Christelle Knudsen

INRAE: French National Institute for Agriculture and Environnement

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

INRAE

GenPhySE
Génétique Physiologie et Systèmes d'Elevage

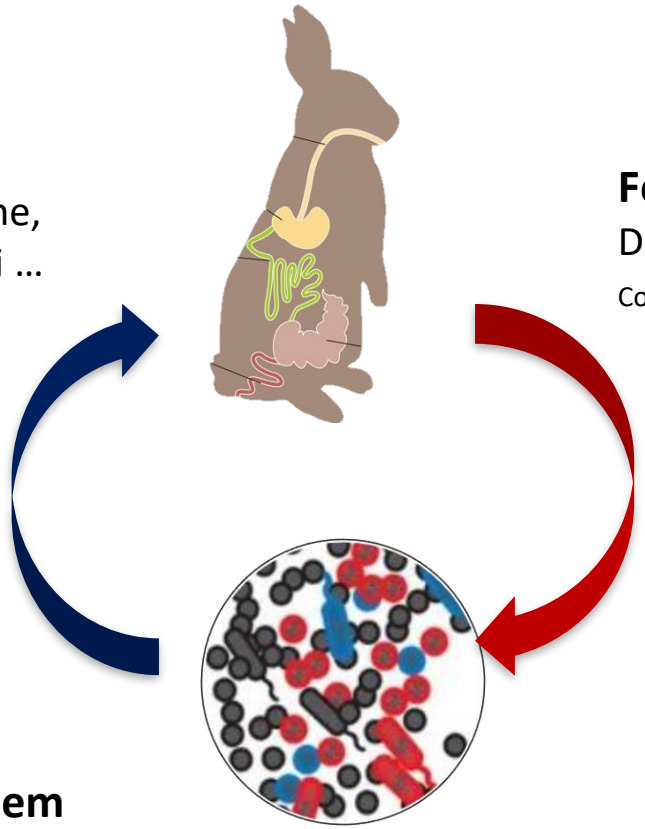
Microbiota role and shaping - Ruolo e composizione del microbiota

Nutrition
fibre -> VFA, proteine batteriche, vitamine, acidi biliari secondari …
(Carabaño et al., 2010; García et al., 2002; Kasbo et al., 2002)

Health
Barriera intestinale, immunità

Storage of lipids
Obesità

Central nervous system
Comportamento



Feed
Da Latte ad alimenti solidi, fibre (Zhu et al., 2015; Li et al., 2023b,Gómez-Conde et al., 2009; Yang et al., 2020; Liu et al., 2022; Ma et al., 2022; Paës et al., 2022)

Physiological state, stress (età, gravidanza, etc..)
(Abecia et al., 2007; Savietto et al., 2020, Beaumont et al., 2022

Genetics
muco, secrezione digestiva, peristaltismo, immunità, tolleranza (Velasco-Galilea et al., 2022)

Environment
Fratelli di cucciolata, comati, alloggi (Abecia et al., 2007; Fang et al., 2019, Velasco-Galilea et al., 2022)

Quali sono le caratteristiche che definiscono un microbiota intestinale ottimale del coniglio?

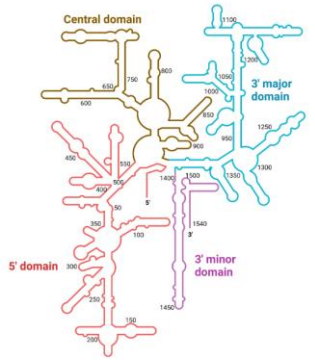
Definition of the core rabbit gut microbiota - Definizione del microbiota intestinale del coniglio

Definition of the core rabbit gut microbiota

20 to 30%

(Suau et al., 1999)

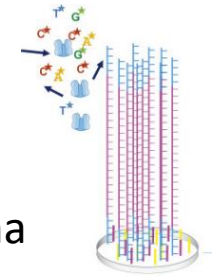
Gene della subunità ribosomiale 16S RNA

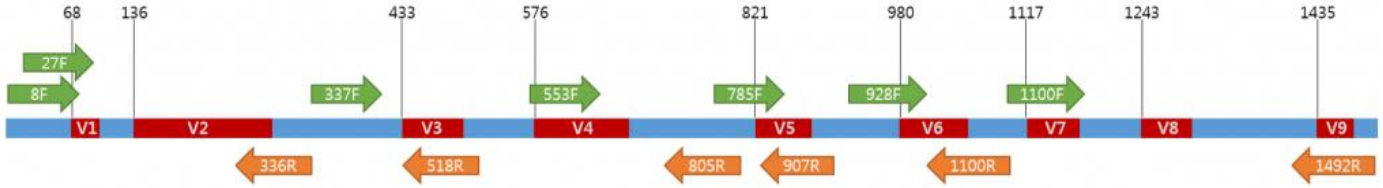


- Ubiquitous
- Contiene informazioni sufficienti per l'analisi filogenetica dal phylum alla specie.
- Database disponibile per l'identificazione tassonomica.

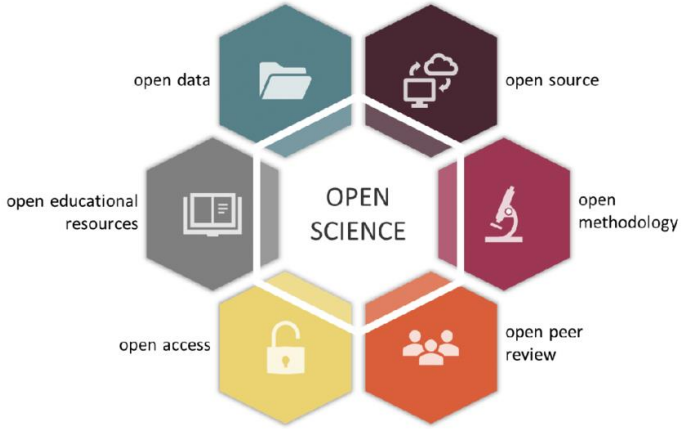
Ultimi 10 anni: Tecnologia di sequenziamento ad alto rendimento

MiSeq
Illumina





16S RNA gene



https://train.eutopia-university.eu

2014-2024: 70 pubblicazioni con tecnologie di sequenziamento degli ampliconi genici 16S RNA

.fasta + metadata

15 studi, **13** analisi del microbiota cecale incluse

FROGS

silva
high quality ribosomal RNA databases

R

> 49 giorni di età

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio

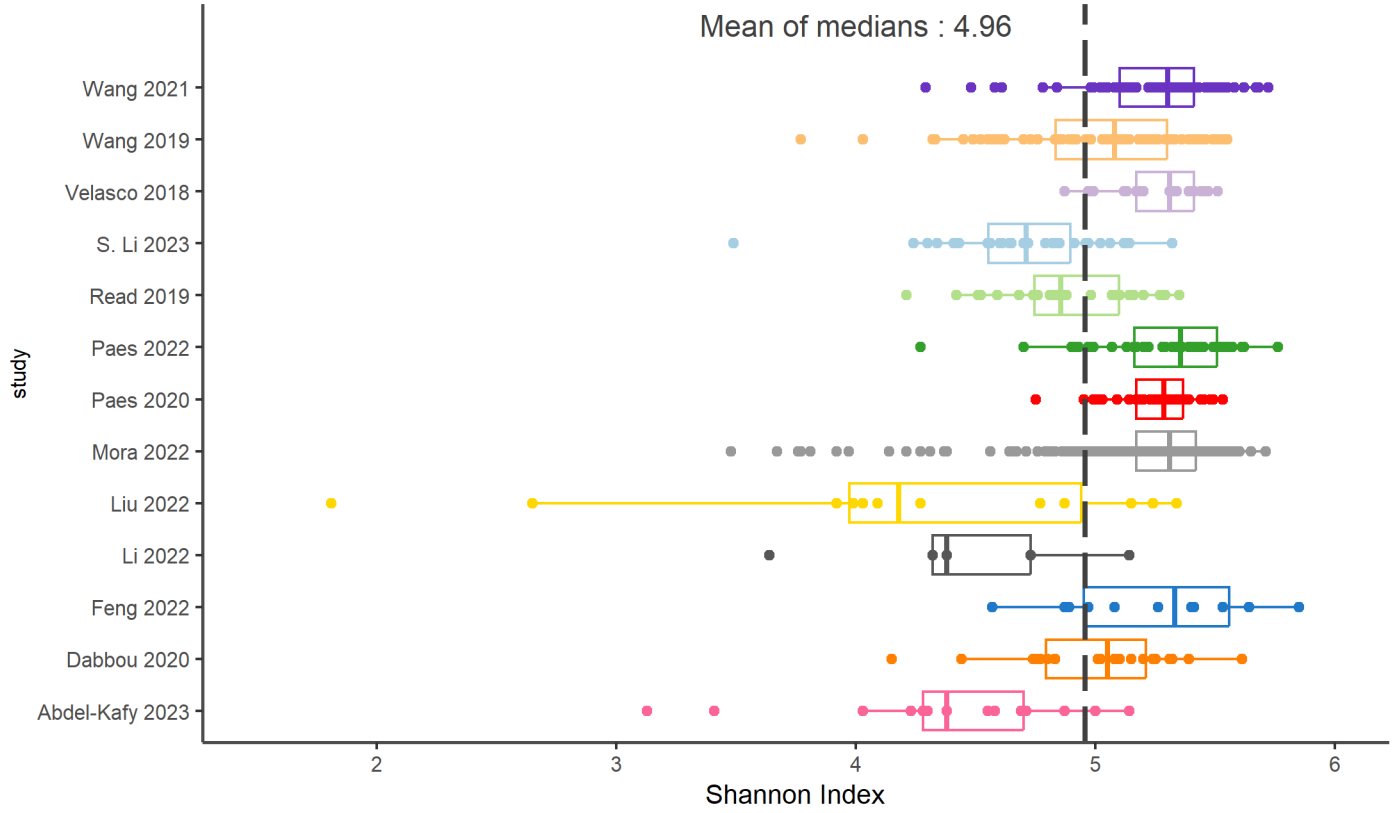
Study	Data accession	16S rRNA gene hypervariable regions	Age (days)	Experimental conditions	Number of samples
Velasco *et al.* 2018	PRJNA473064	V4-V5	66	Digestive segment	21
Read *et al.* 2019	PRJNA315608	V3-V4	49	Preweaning diet modulation	30
Wang *et al.* 2019	PRJNA512067	V3-V4	58, 70, 82	Water drinking temperature	82
Paës *et al.* 2020	PRJNA589727	V3-V4	57	Early access to diet in the nest	40
Dabbou *et al.* 2021	PRJNA645756	V3-V4	77	Insect fats dietary supplementation	24
Wang *et al.* 2021	PRJNA632844	V3-V4	84	Feeding rhythm	12
Feng *et al.* 2022	PEERJ_13068	V3-V4	76	Environmental enrichment	12
Li et al 2022	PRJNA774036	V3-V4	80	Segment characterization	6
Liu *et al.* 2022	PRJNA781070	V3-V4	87	Dietary fibre modulation	12
Mora *et al.* 2022	PRJNA524130	V4-V5	66	Microbiota and growth causal relationship modelling	407
Paës *et al.* 2022	PRJNA615661	V3-V4	58	Early access to diet in the nest	29
S. Li *et al.* 2023	CPN0003860	V3-V4	73	Dietary non-fibrous carbohydrate to neutral detergent fibre ratio	30
Abdel-Kafy 2023	PRJNA992887	V3-V4	73	Rabbit breeds	20

n = 771 campioni cecali
Età = [49-87 d]
13 diverse condizioni sperimentali

https://lcauquil.pages.mia.inra.fr/review_wrc2024/

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio

Shannon index median [4.2 – 5.5]

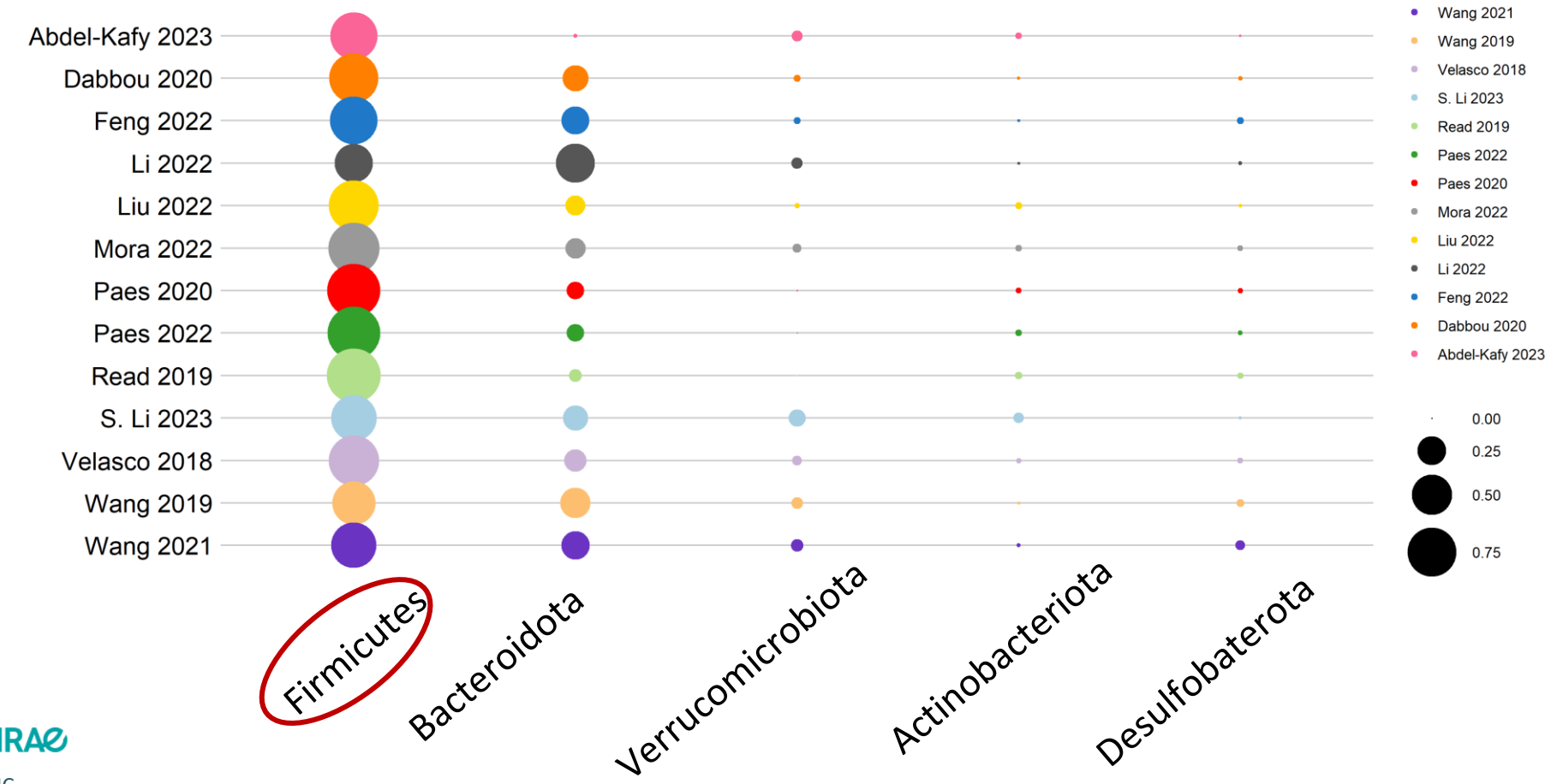


Buona sovrapposizione tra gli studi
→ **la diversità è stata valutata in modo simile tra gli studi** nonostante le differenze nelle condizioni sperimentali o nella preparazione del campione

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio

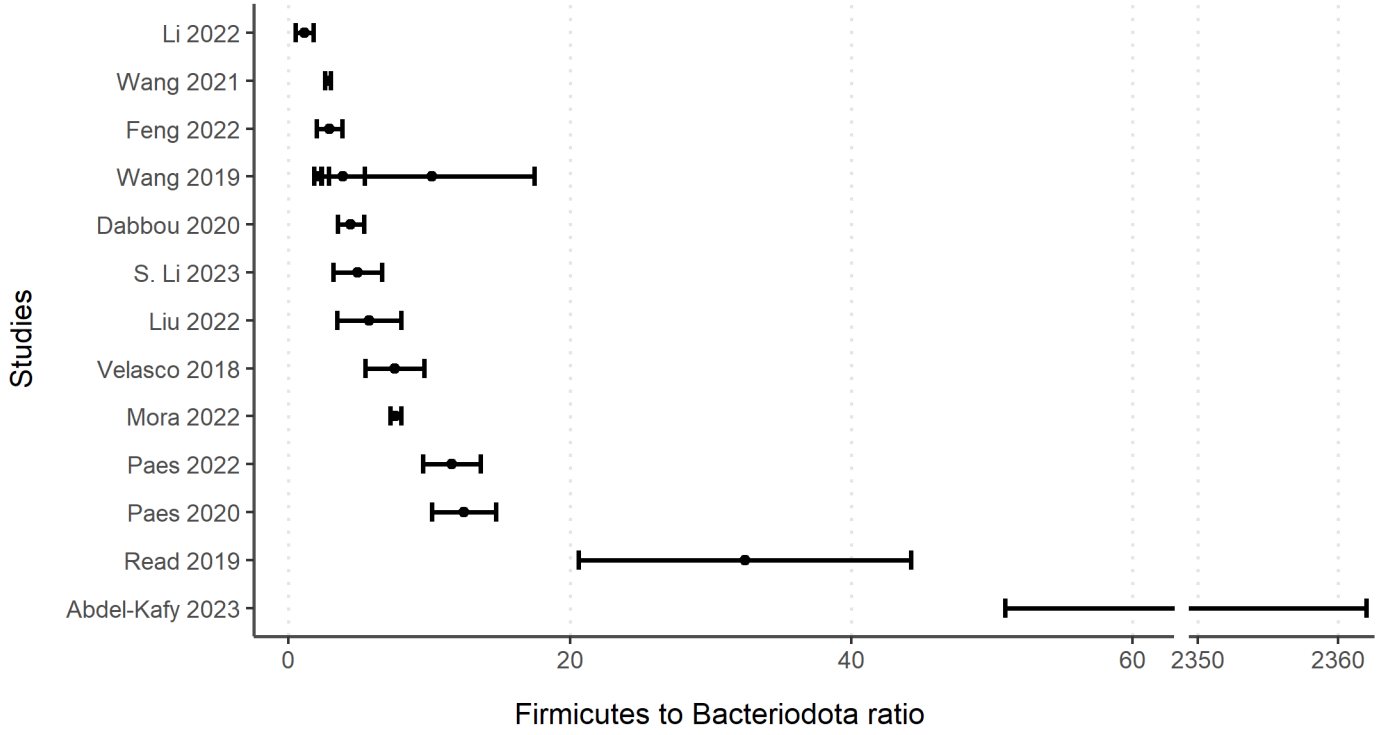
L’ opprimente **dominanza del phylum Firmicutes** è una caratteristica notevole del coniglio

Specificità della sua strategia digestiva: fermentatori dell'intestino posteriore, erbivori e specie ciecotrofi



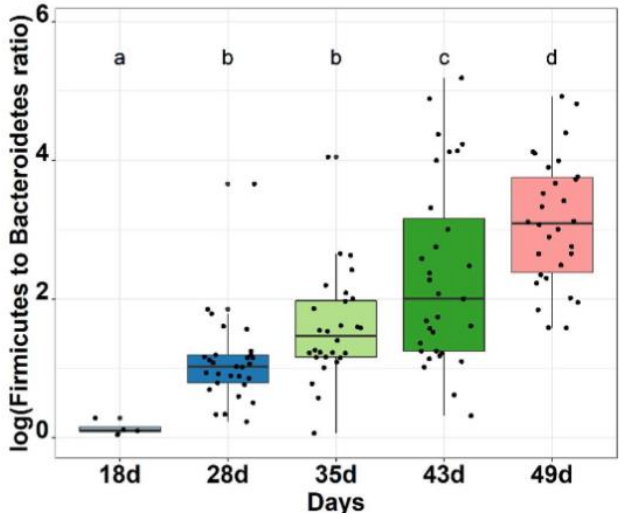
Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio

Firmicutes / Bacteroidota

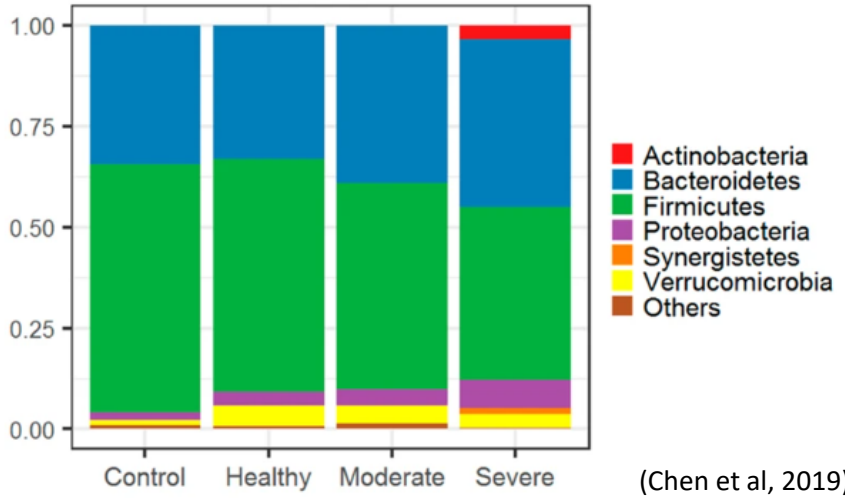


Elevata variabilità tra gli studi

→ **una bassa robustezza del valore assoluto**

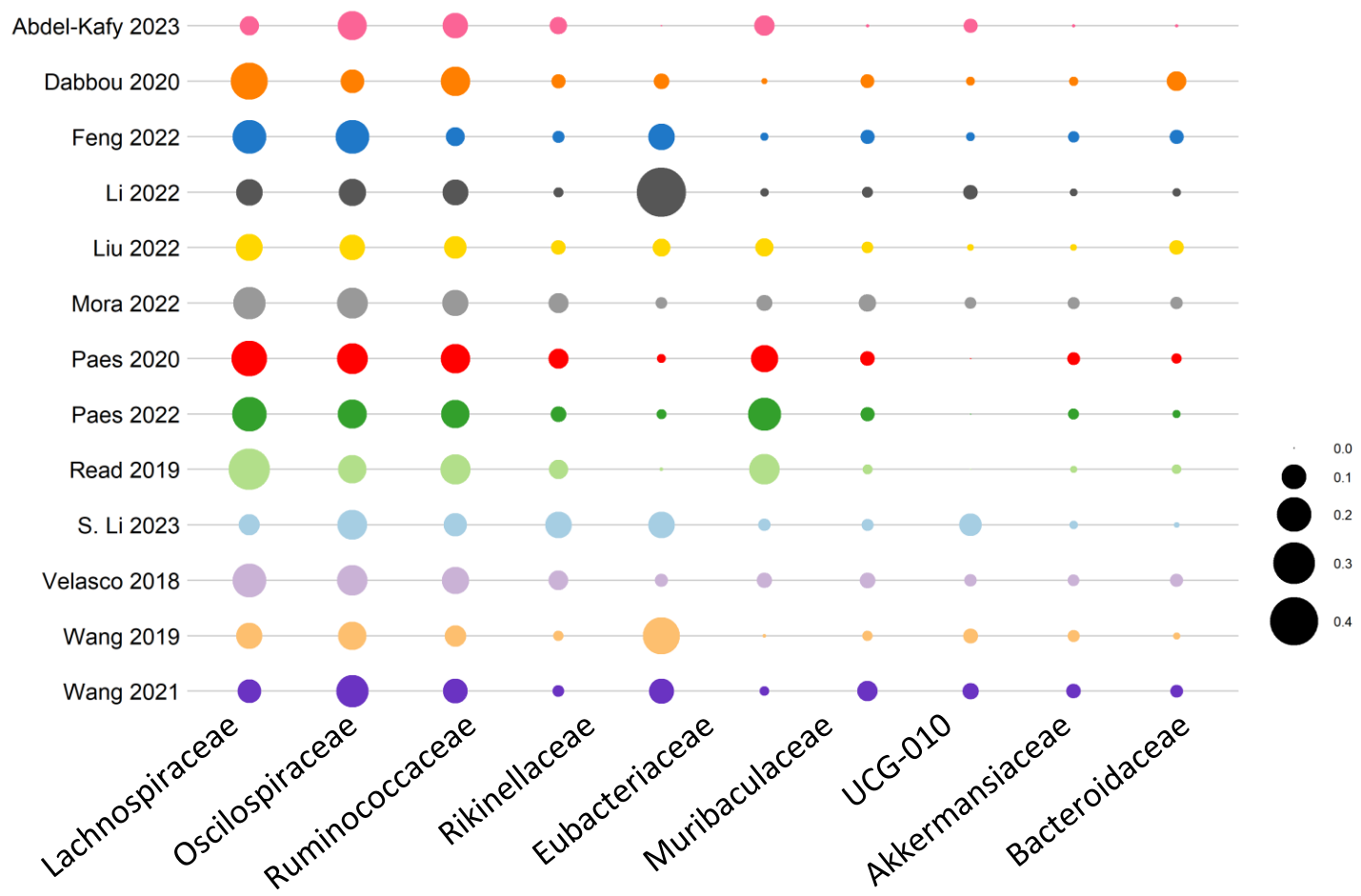


(Read et al, 2019)



(Chen et al, 2019)

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio

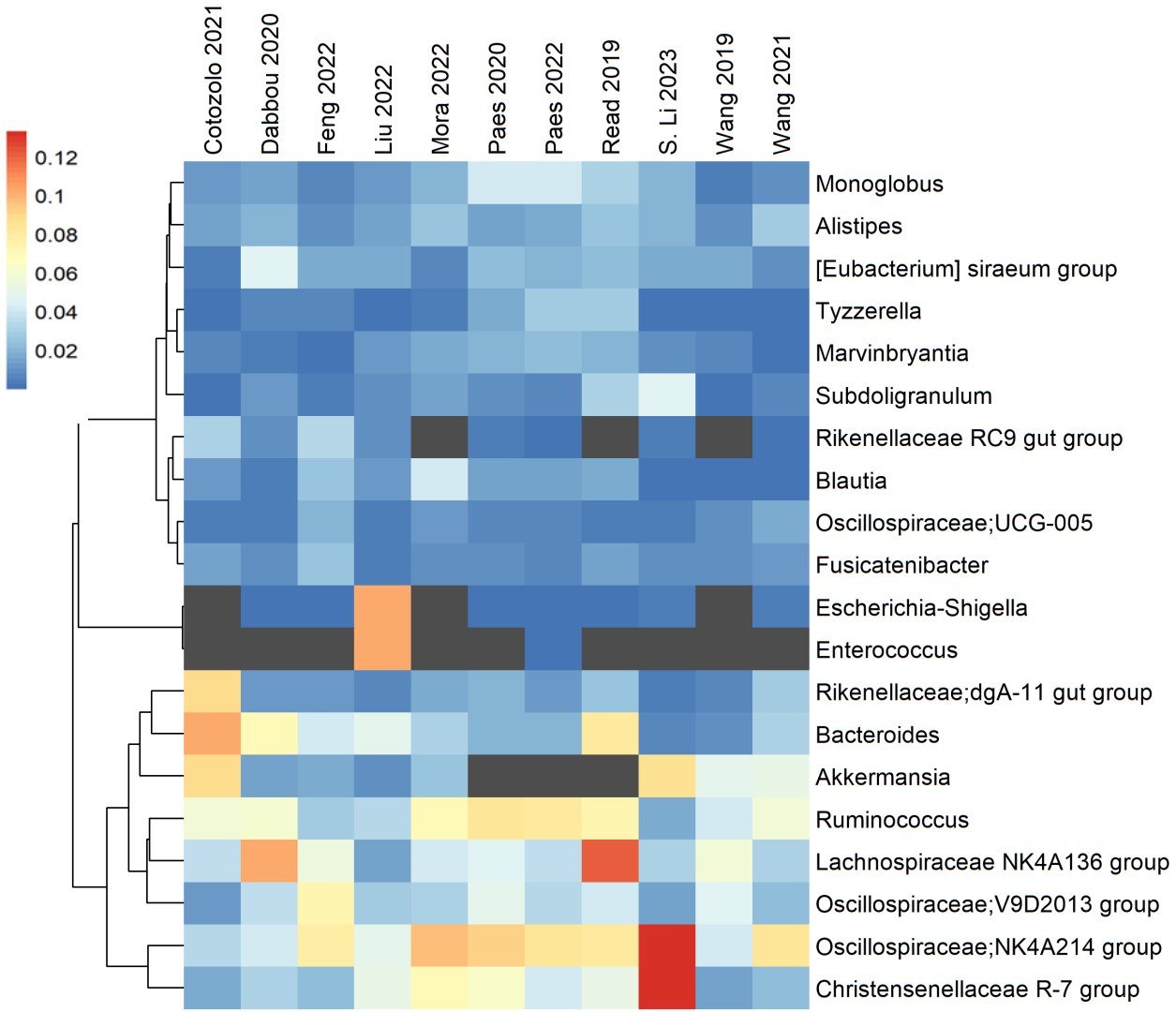


Family top 5 :

- Lachnospiraceae (19.6%),
- Oscillospiraceae (17.9%)
- Ruminococcaceae (13.3%)
- Muribaculaceae (7.2%)
- Christensenellaceae (6.7 %)

Presente in tutti gli studi ma non necessariamente nello stesso ordine di abbondanza

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio



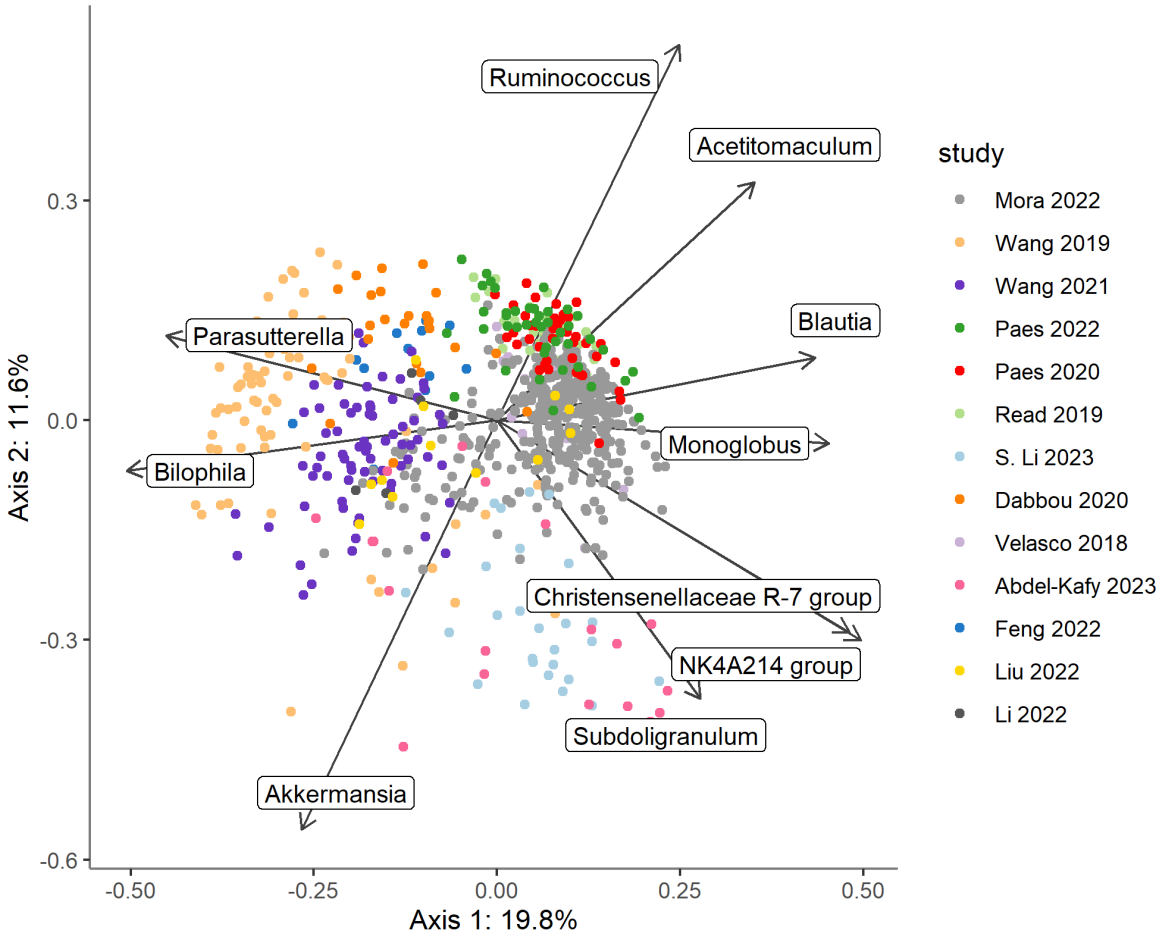
top 5 generi:

- Oscillospiraceae NK4A214 (13.8%),
- Ruminococcus (10.4%),
- Christensenellaceae R-7 (9.2%),
- Lachnospiraceae NK4A136 (7.6%),
- Ruminococcaceae V9D2013 (5%)

4 dei top 5 sono generi non descritti

Elevate discrepanze tra gli studi
- Nel genere rilevato (37 comune fuori da 288)
- Nell'abbondanza relativa

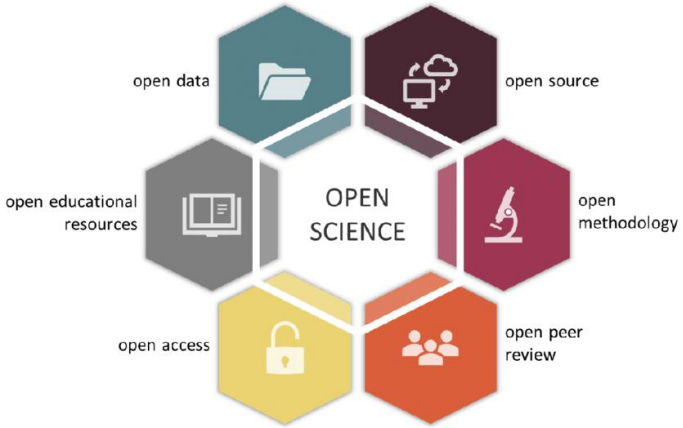
Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio



- Cluster di comunità batterica secondo il gruppo di ricerca
- Nessuna forte opposizione o campioni anomali
- Variabilità attribuita all'abbondanza di *Akkermensia*,
  - Ruminococcus
  - Ruminococcaceae NK4A214 gruppi

Differenza di sequenza dei primer?

Composizione del microbiota cecale centrale del coniglio



Disponibilità dei dati e dei metadati associati

- Consentire la ri-analisi alla luce del database tassonomico più recentemente aggiornato
- Benefici per la comunità → aumentare la nostra conoscenza del microbiota del coniglio
- Il numero di studi è ancora troppo piccolo per effettuare analisi statistiche

Da una prospettiva biologica

- L'esplorazione della tassonomia è ancora **un lavoro in corso** per noi
- La variabilità tassonomica osservata a livello di genere suggerisce una **significativa plasticità nel microbiota del coniglio**

Esistono taxa batterici chiave che sono benefici per la salute e la crescita?

Esistono taxa batterici chiave che sono benefici per la salute e la crescita?

2014-2024

n = 93

n = 29

Associazioni Positive o negative con la composizione del microbiota

Ampia gamma di condizioni sperimentali:

Età, sfida alimentare, studio dell'acqua potabile, prebiotici o antibiotici, condizioni ambientali, conigli sani vs. conigli ERE

https://www.needpix.com/photo/90970/

(-) negativo

(+) positivo

Taxa[1]	Associazioni Positive o negative , Autore, Scopo dello studio, (segment se non ceco) (numero dei conigli coinvolti)
Akkermansia	(+) Huang 2021, Clostridium butyricum supplementation & health (n=9) (-) Li et al 2023 Ammonia exposure (n=6) (-) Li et al 2023, NFC/NDF growth & health (n=5) (-) Puón-Peláez et al 2022, ERE vs healthy rabbit (n = 12) (-) Chen et al 2019, Deficient fiber diet & health (n = 43) (-) Baüerl et al 2014, ERE (n=30)
Alistipes	(+) Chen et al 2021, Bacitracin supplementation & health (n=8) (-) Li et al 2023, Ammonia exposure (n=6) (-) Wang et al 2021, feeding rhythm & health (n=72); (-) Drouilhet et al 2016, Genetic selection & growth (n=18); (-) Baüerl et al 2014, ERE (n=30)
Bacteroides	(-) Liu 2022, Dietary Fiber & growth (n=6); (-) Velasco-Galilea et al 2021, growth and feeding regime (n=201) (-) Puón-Peláez et al 2022, ERE vs healthy rabbit (n = 12); (-) Chen et al 2019, deficient fiber diet & health (n = 43) (-) Baüerl et al 2014, ERE (n=30)
[……]	[……]
Rikenella	(+) Du et al 2023, Copper supplementation & health (n=4) (+) Wang et al 2021, Feeding rhythm & health (n=72) (+) Luo et al 2021, Bacillus subtilis HH2 supplementation induced colitis model & health (colon) (n=16) (-) Baüerl et al 2014 ERE (n=30)
Ruminococcus	(+) Wu et al 2023, Carvacrol supplementation & health (n=4); (+) Li et al 2023 Ammonia exposure (n=6) (+) Ye et al 2022, Clostridium butyricum supplementatin & growth (n=6) (+) Baüerl et al 2014, ERE (n=30)

Perché è difficile identificare potenziali taxa chiave?

Un problema di conoscenza tassonomica

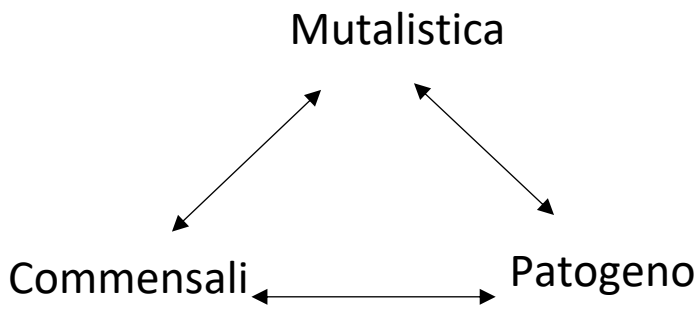
- A seconda degli studi da 20 a 49 % di affiliazioni « geni sconosciuti »
- 16S RNA gene 500 pb ampliconi → risoluzione del genere ma eterogeneità funzionale e tassonomica

  → Abbiamo bisogno di conoscenze sulla composizione del ceppo

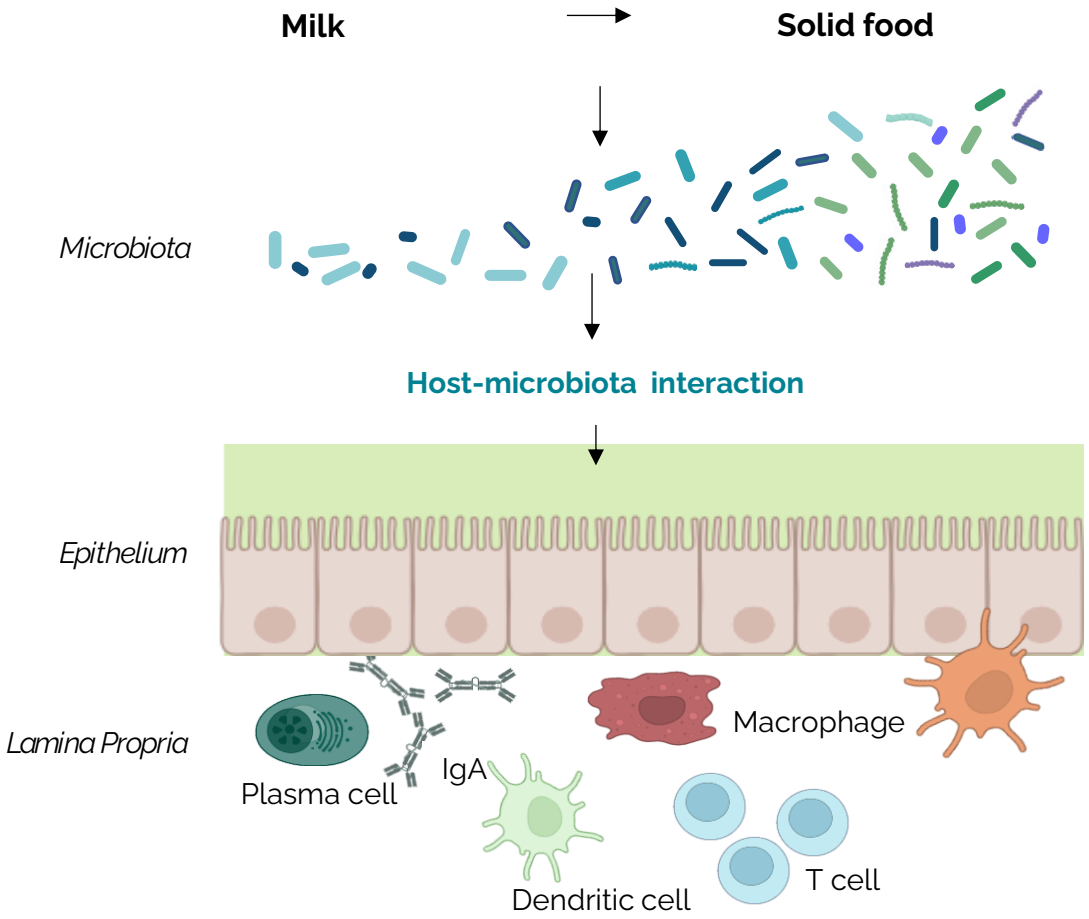
Motivi sperimentali e tecnici

- Dimensione del campione troppo piccola per quanto riguarda l'effetto delle dimensioni
- Soglia quantitativa → intorno 0.5 % a seconda della profondità di sequenziamento

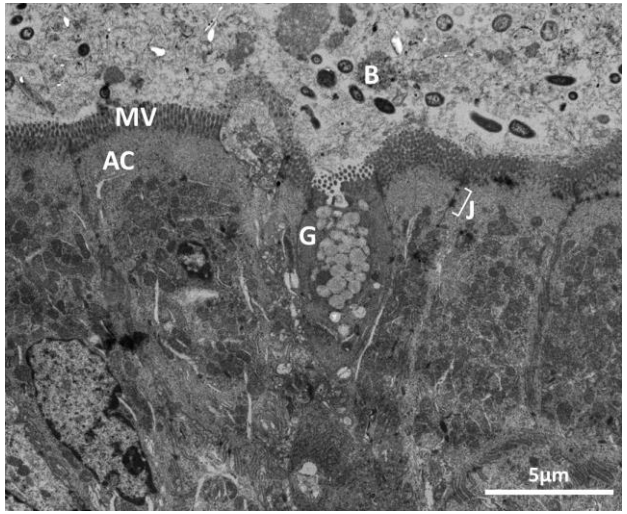
Esperienza di vita dell'ospite e fattori ambientali



Il microbiota fa parte della barriera intestinale

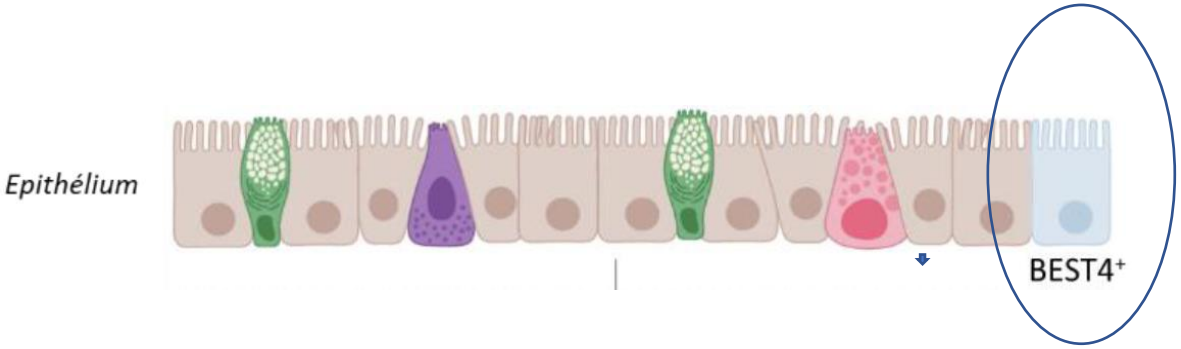


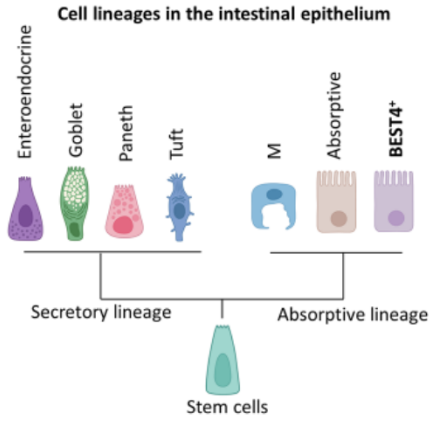
Icon used from https://www.biorender.com

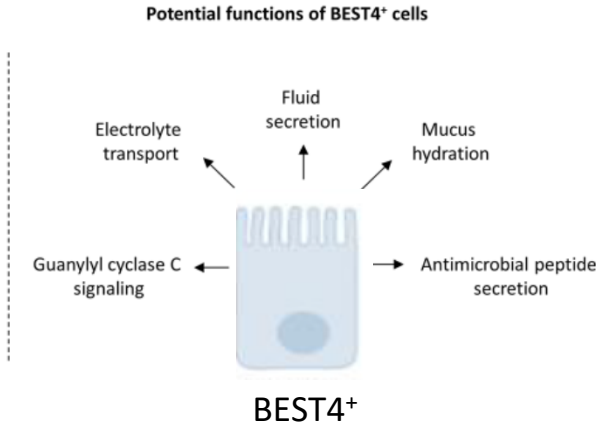


Rabbit cecal epithelium.
AC: absorptive epithelial cell, B: bacteria in the luminal content, G: goblet cell filled with mucin granules, J: cell junctions, MV: microvilli

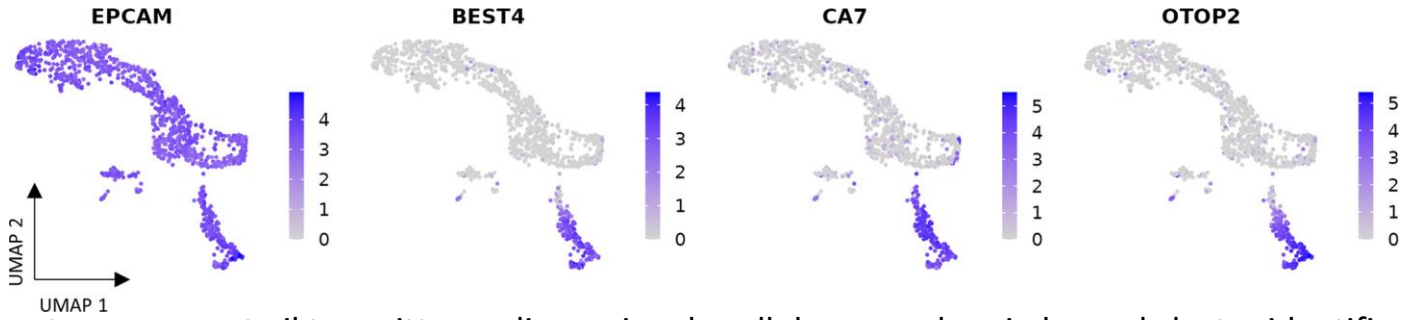
Single-cell RNA-sequencing reveals the presence of BEST4+ cells







Un sottolignaggio di cellule assorbenti mature



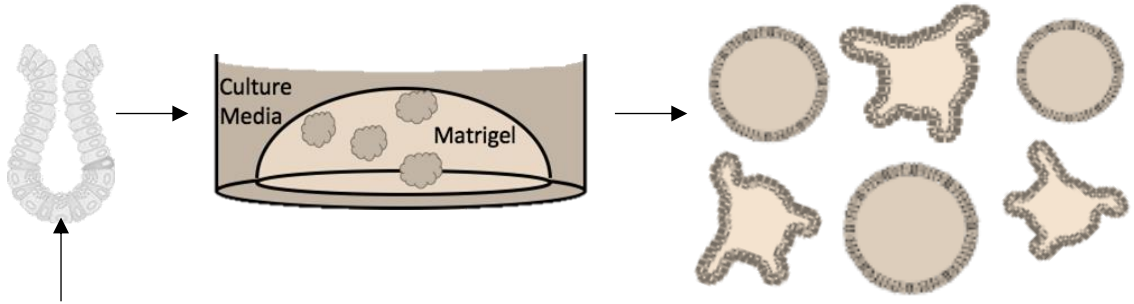
Ogni punto rappresenta il trascrittoma di una singola cellula, con colore in base al cluster identificato

EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule, *BEST4* (Bestrophin 4), *CA7* (Carbonic Anhydrase 7), *OTOP2* (Otopetrin 2)

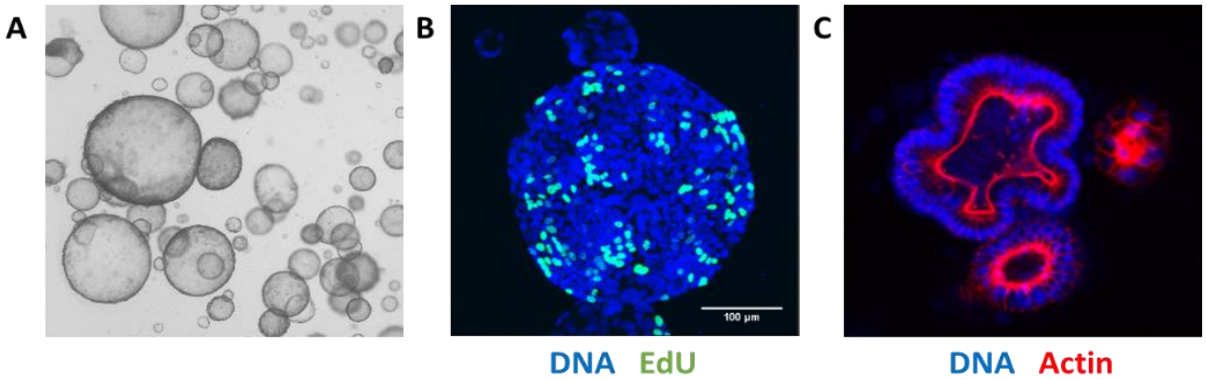
Malonga *et al.* 2024

Nuovo strumento in vitro: organoidi intestinali di coniglio

Le cellule staminali isolate dall'intestino del coniglio **producono strutture 3D** formate da un singolo strato di cellule epiteliali polarizzate



Strumenti utili per testare:
- Nutrienti
- Metaboliti batterici

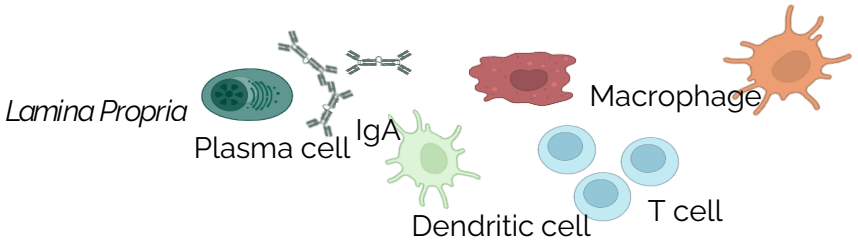


(Mussard et al., 2020).

Microscopic observations of rabbit cecal organoids.
Rabbit cecal organoids were cultured in 3 dimensions (A-C). A) Light microscopy, B-C) Confocal microscopy. B) Proliferating cells are labelled green (EdU) and nuclei blue. C) Actin is marked in red and nuclei in blue

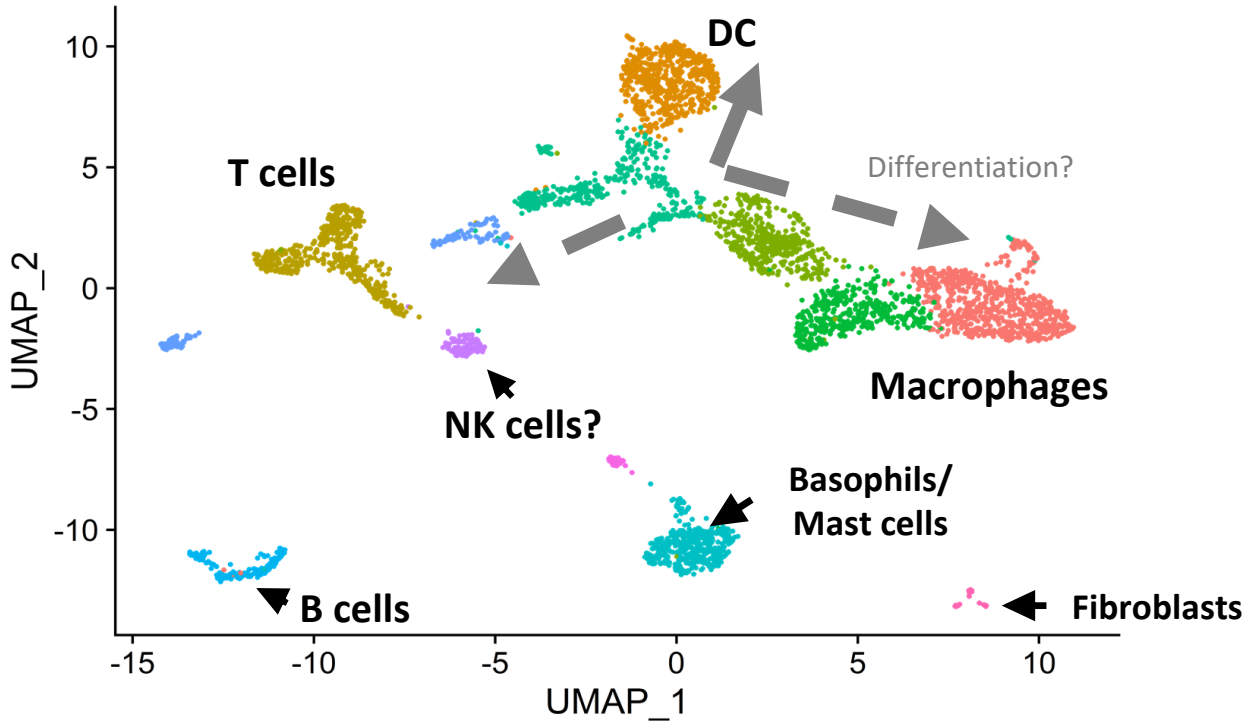
SC-RNAseq per esplorare la diversità delle cellule CD45+ della lamina propria

Sistema immunitario intestinale



Identificare e coltivare le cellule immunitarie intestinali

Strumenti utili per testare:
- Nutrienti
- Metaboliti batterici



Ogni punto rappresenta il trascrittoma di una singola cellula, con colore in base al cluster identificato

(Knudsen et al, 2022)

How to use nutritional lever to strengthen the rabbit intestinal barrier?

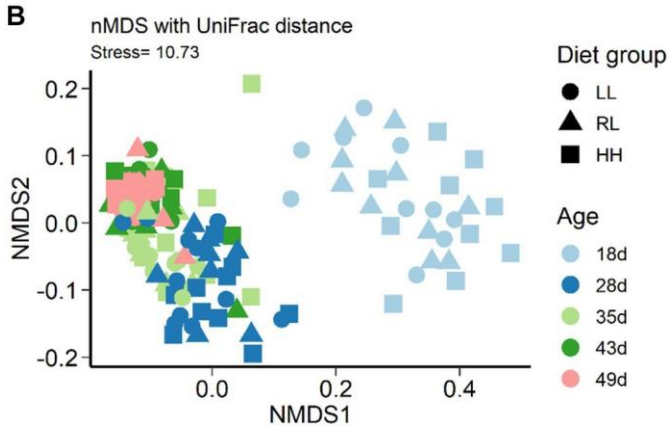
Come utilizzare la leva nutrizionale per rafforzare la barriera intestinale del coniglio?

Come utilizzare la leva nutrizionale per rafforzare la barriera intestinale del coniglio?

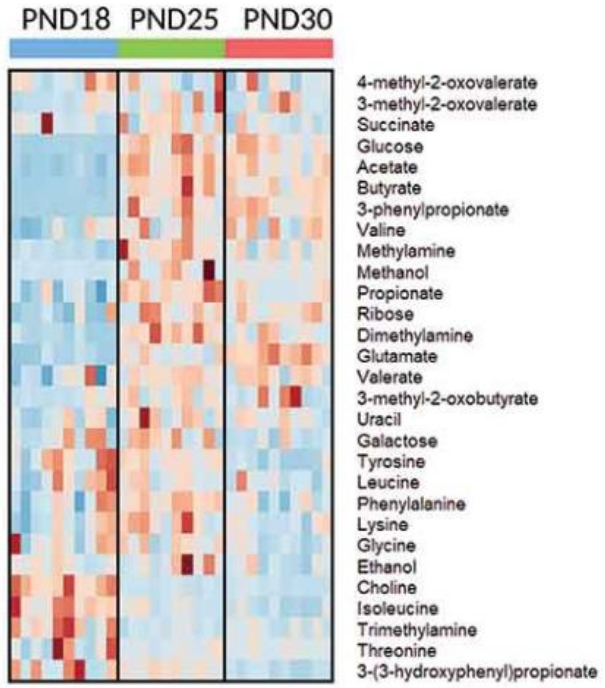
Quando? → Dal periodo di allattamento allo svezzamento : Una finestra di opportunità

- La colonizzazione del microbiota è in corso
- Maturazione della barriera intestinale

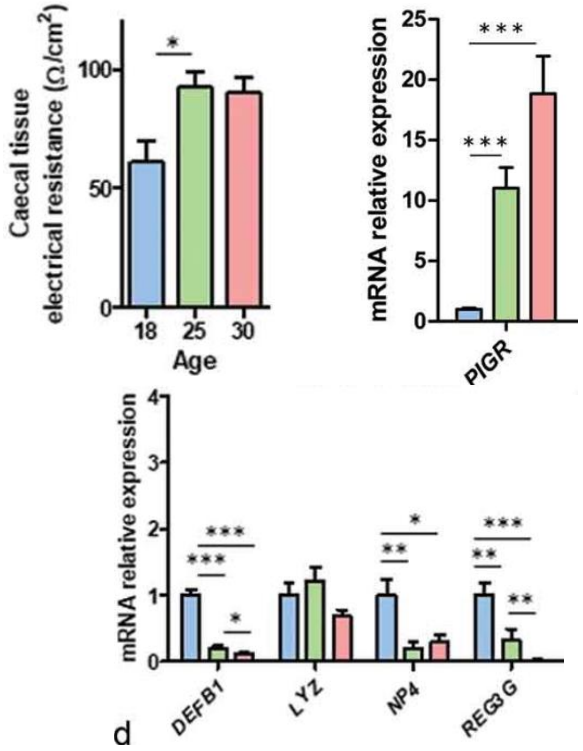
→ permissivo alla modulazione del microbiota



(Read et al. 2019)



(Beaumont et al. 2020)

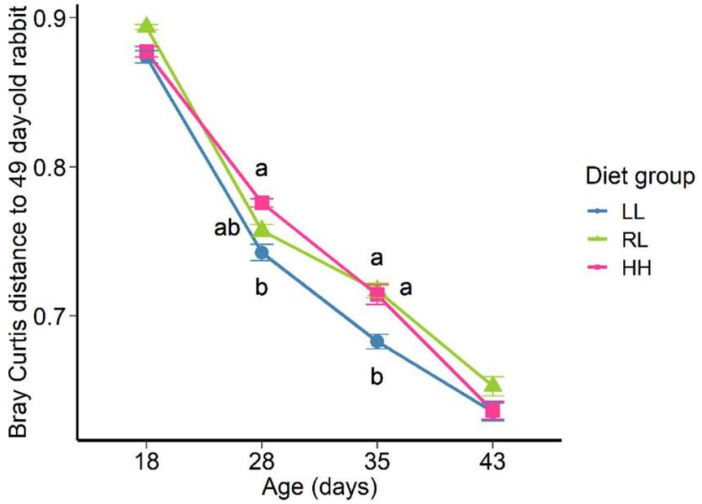


(Beaumont et al. 2020)

Come utilizzare la leva nutrizionale per rafforzare la barriera intestinale del coniglio?

Assunzione di cibo solido: primo fattore di formazione del microbiota

Valutazione della maturità del microbiota



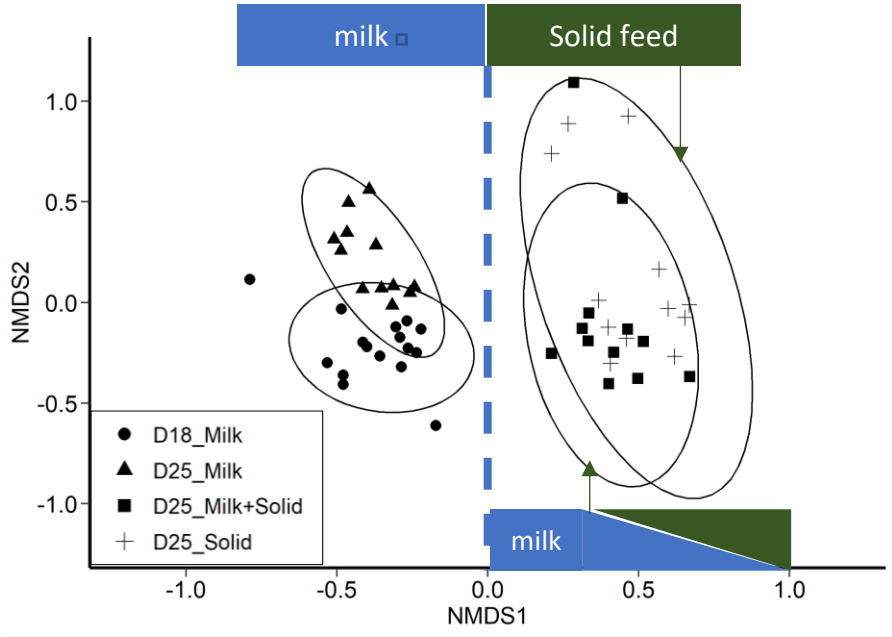
(Read et al. 2019)

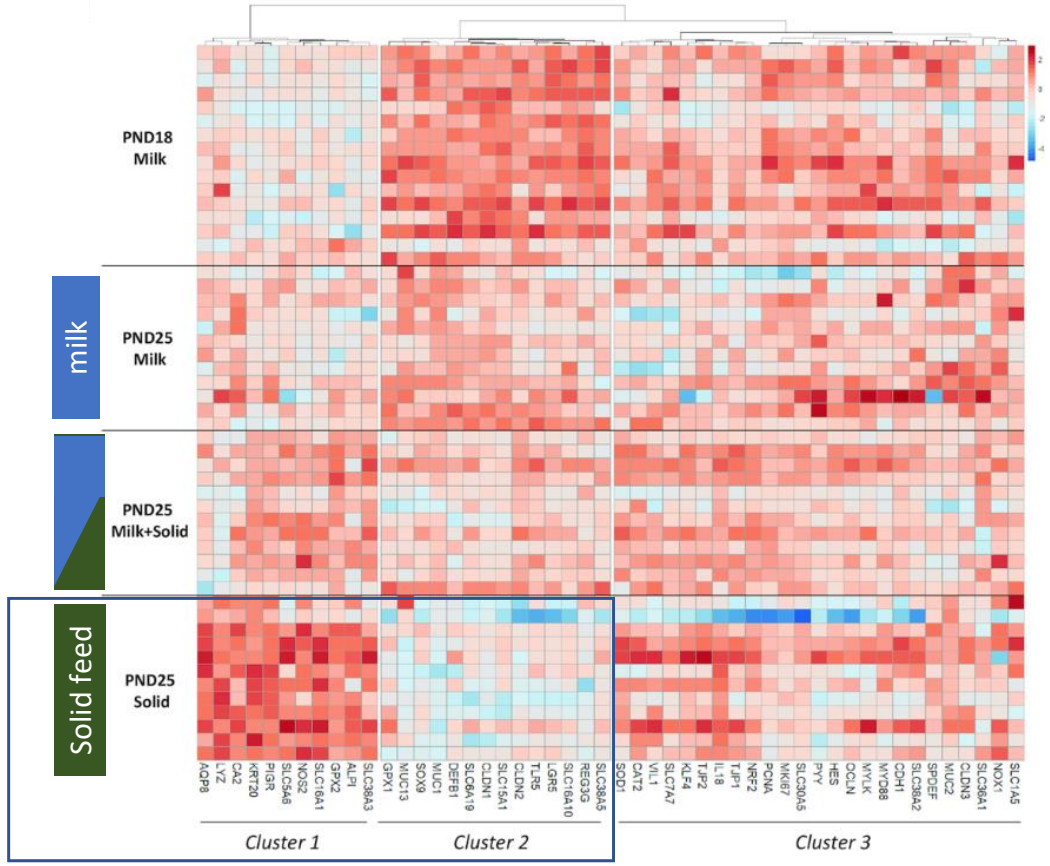
Phyla	Experimental Groups [1]						CV [2]	p [3]	
	30 Days			45 Days					
	C	A	G	C	A	G		Age	Feed
Firmicutes	65.78 ^{c}	72.07 ^{ab}	62.38 ^{c}	78.87 ^{b}	83.64 ^{a}	79.98 ^{b}	6.65	***	*
Bacteroidetes	28.15 ^{a}	24.83 ^{a}	30.41 ^{a}	14.15 ^{b}	12.75 ^{b}	13.26 ^{b}	4.32	***	ns
Proteobacteria	4.50 ^{a}	1.59 ^{b}	1.92 ^{b}	3.02 ^{ab}	2.30 ^{ab}	3.48 ^{ab}	1.04	*	*
Tenericutes	0.76 ^{b}	1.19 ^{b}	4.22 ^{a}	3.02 ^{a}	1.10 ^{b}	2.28 ^{ab}	0.82	*	ns
Actinobacteria	0.78 ^{ab}	0.29 ^{b}	1.05 ^{a}	0.85 ^{ab}	0.17 ^{b}	0.96 ^{ab}	0.63	*	ns
Spirochaetae	0.03	0.03	0.02	0.09	0.04	0.04	0.05	ns	ns
Firmicutes/Bacteroidetes	2.34 ^{d}	2.90 ^{c}	2.05 ^{d}	5.57 ^{b}	6.56 ^{a}	6.03 ^{ab}	1.02	**	*
Ruminococcaceae/Lachnospiraceae	<0.001 ^{d}	1.58 ^{b}	0.03 ^{d}	0.77 ^{c}	24.32 ^{a}	0.07 ^{d}	3.12	**	*

C = rabbit fed pelleted feed only; **A** = rabbit fed pelleted feed + dehydrated alfalfa;
G = rabbit fed pelleted feed + fresh grass

(Mattioli et al. 2019)

Assunzione di alimenti solidi e cessazione dell'assunzione di latte





Cessazione della suzione

- No ha effetto sul microbiota
- regola l'espressione dei geni coinvolti nella differenziazione epiteliale e nel trasporto delle immunoglobuline

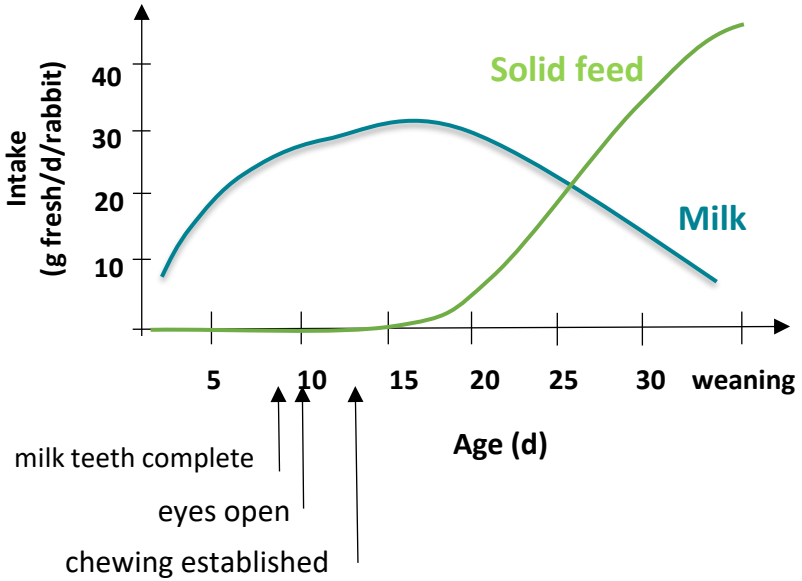
(Beaumont et al. 2022)

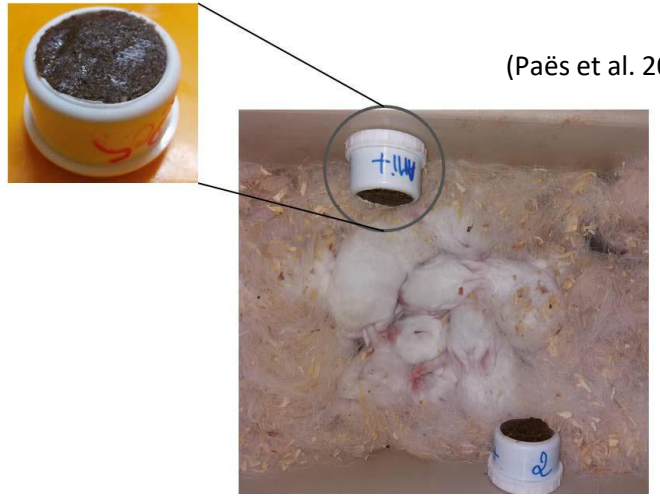
Introduzione precoce di alimenti solidi

National Wildlife Federation

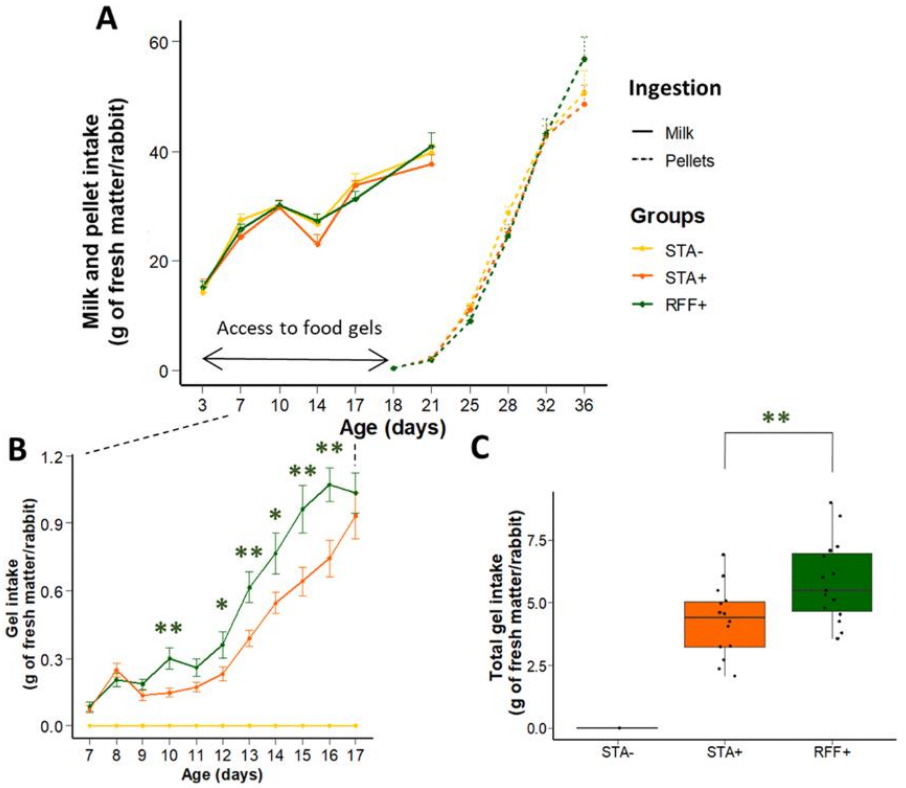
http://www.cuniculture.info

i giovani conigli hanno le capacità orali ed esplorative necessarie per afferrare il cibo subito dopo la nascita



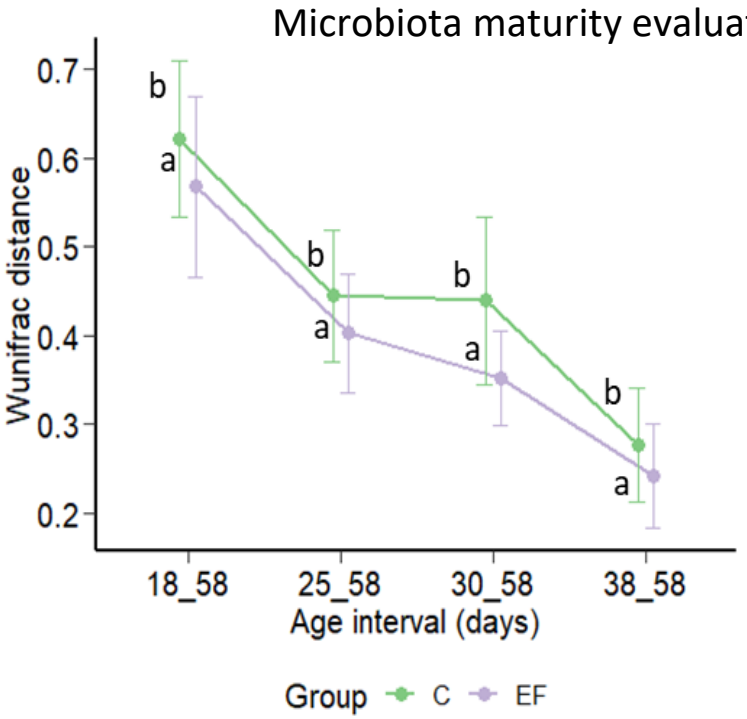


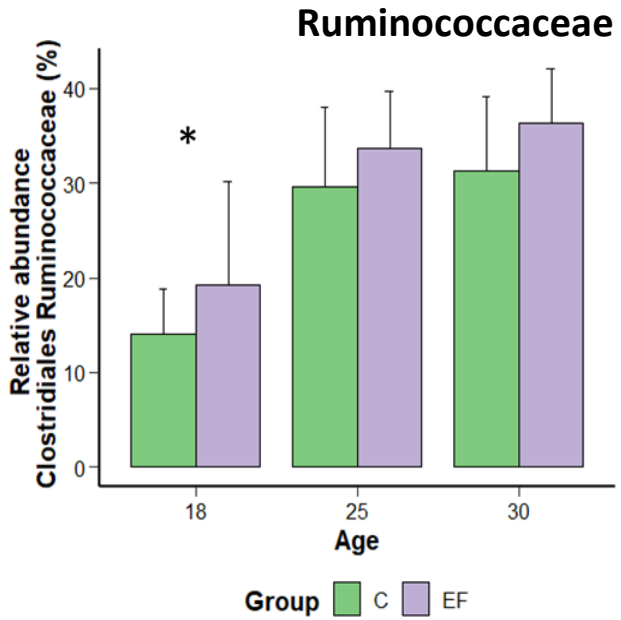
(Paës et al. 2023)

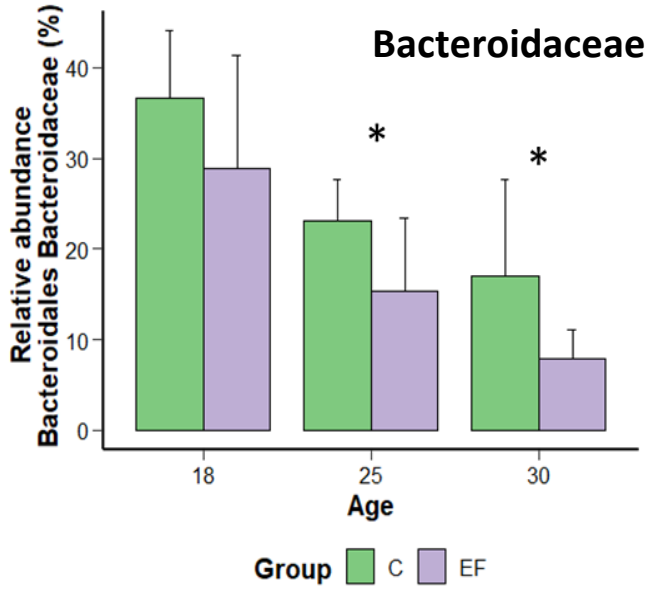


(Paës et al. 2022)

Introduzione precoce di alimenti solidi







L'alimentazione precoce del nido con gel ha accelerato la maturazione della comunità batterica nel cieco, con effetti persistenti dopo lo svezzamento

Comportamento coprofagico del coniglio lattante nel nido

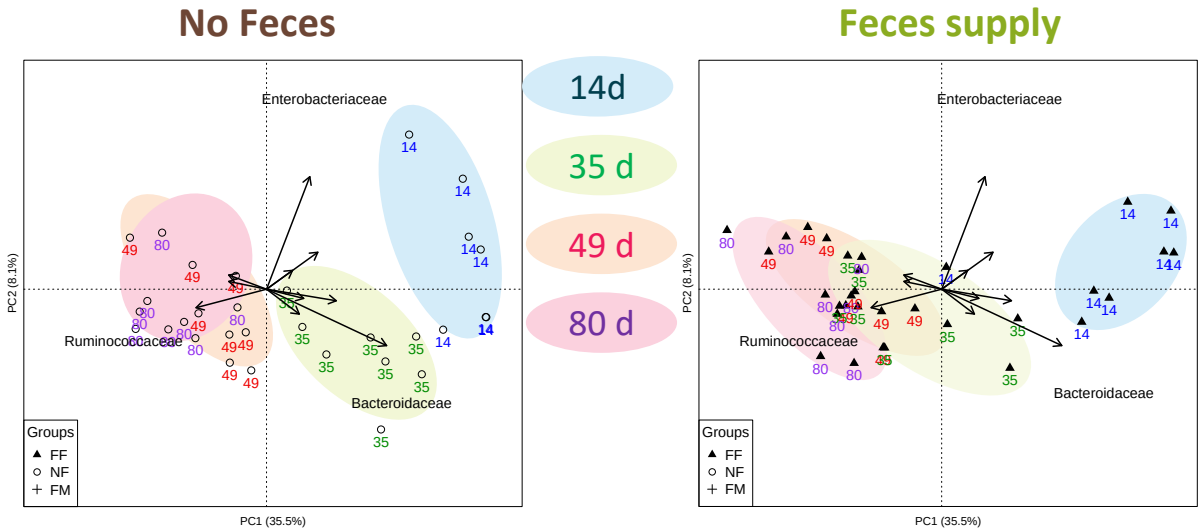
(Hudson & Distel, 1982;
Kovács et al., 2006;
Combes et al., 2014)

Reduce mortality

	No Feces	Feces supply
# feces intake	-	36
Mortality 2-70 days (%)	22.8 a	9.3 b

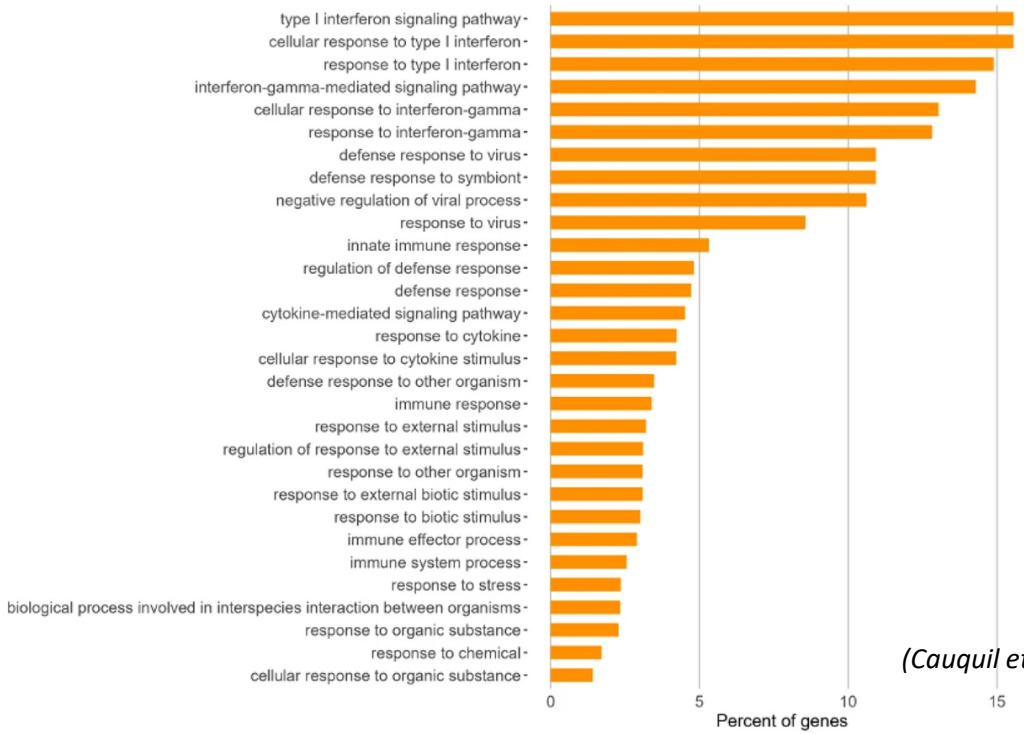
(Combes et al., 2014)

Alter microbiota maturity



(Combes et al., 2014)

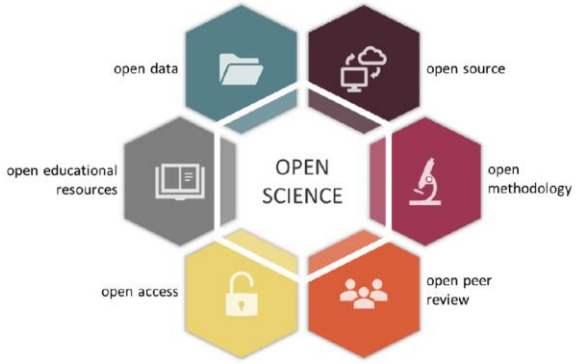
Tunes expression of immune genes after weaning in ileum



(Cauquil et al., 2024)

Conclusioni

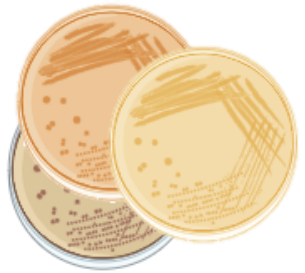
What are the characteristics that define an optimal rabbit gut microbiota?
Quali sono le caratteristiche che definiscono un microbiota intestinale ottimale nel coniglio?



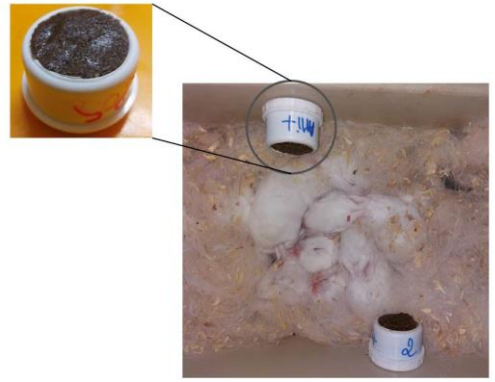
Rianalisi dei dati di sequenziamento dell'amplicone 16S→ Microbiota di base, ma ancora poca conoscenza sui microbi che popolano l'intestino del coniglio

- tecnologie del genoma intero: verso l'inferenza della funzione del microbiota
- Long read sequencing
  - → esplorazione a livello di specie (full 16S-ITS-23S sequencing)
  - → Ricostruzione genetica de novo associata allo sforzo colturale anaerobico

Analisi della letteratura dell'ultimo decennio evidenzia scarse informazioni sulle specie chiave benefiche o dannose del microbiota
→ grande variabilità nelle condizioni sperimentali sugli animali



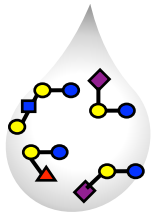
Conclusioni



How to use nutritional lever to strengthen the rabbit intestinal barrier?
Come utilizzare la leva nutrizionale per rafforzare la barriera intestinale del coniglio?

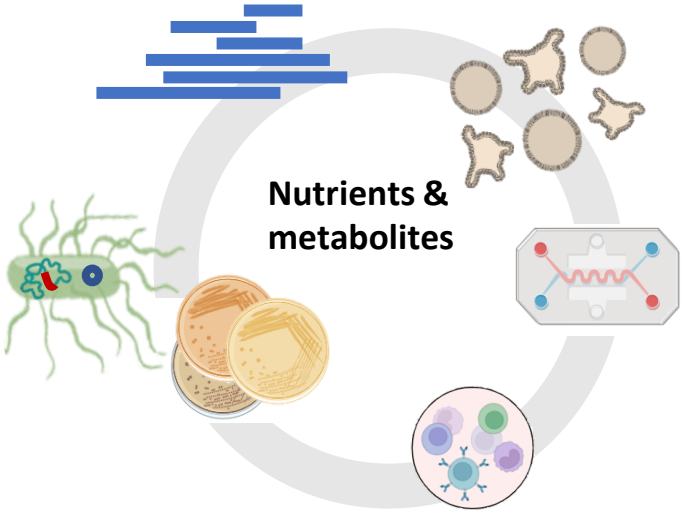
Intervento nutrizionale precoce

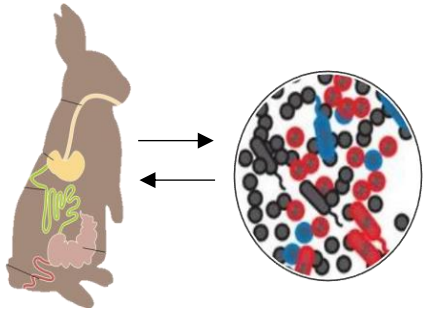
- Introdurre l'alimento prima del bisogno per adattarlo alle capacità biologiche
- Adeguare questi interventi nutrizionali: prebiotico, simbiotico, postbiotico
- Lavorare sulla composizione degli oligosaccaridi del latte

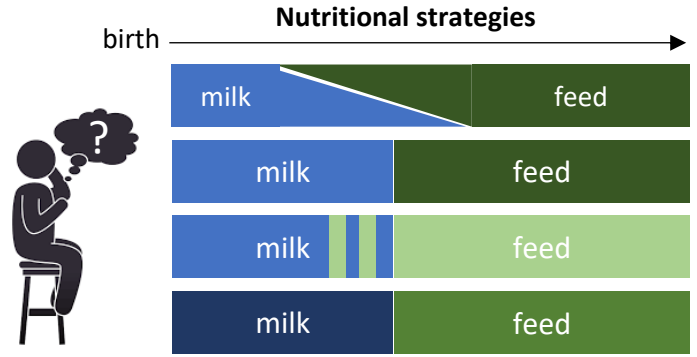


Deeper understanding of the symbiotic relationship
Una comprensione più approfondita della relazione simbiotica

- Richiede approcci multidisciplinary
- Passare dall'associazione alla relazione causale per convalidare le ipotesi osservate grazie ai dati meta-omici







Thanks for your attention

Members of the **MUSE** team

GenoToul platform teams

&

All scientists for sharing their data & using a FAIR approach

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

INRAE

GenPhySE
Génétique Physiologie et Systèmes d'Elevage