

l'abondance relative des groupes bactériens, les taxons représentant moins de 0,05% du total des séquences de tous les échantillons ont été exclus.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

La supplémentation en AA+PP pendant les deux premières semaines après le sevrage a amélioré significativement l'indice de consommation sans modifier le niveau d'ingestion par rapport au groupe témoin (CTRL) (Tableau 1). Les porcelets supplémentés avaient également un poids à 14 jours après le sevrage et un gain de poids moyen quotidien significativement plus élevés que les porcelets du groupe témoin (Tableau 1).

Tableau 1 – Performances zootechniques des porcelets.

	CTRL	AA+PP	SE	P-Value
			M	
Poids au sevrage, kg	6,92	6,92	0,07	0,979
Poids à 14 jours, kg	9,50	10,07	0,15	0,049
Gain de poids quotidien, g/j	184	225	8,02	0,010
Ingestion moyenne g/j	263	275	8,83	0,450
Indice de consommation	1,43	1,23	0,04	0,010

1 footnote pour expliquer les abréviations dans le tableau

2.2. Microbiote et métabolome dans le jéjunum

Nous avons étudié si les effets bénéfiques de la supplémentation en AA+PP sur la croissance des porcelets après le sevrage pouvaient être liés à une modification du microbiote intestinal. La supplémentation en AA+PP a fortement réduit la richesse du microbiote dans le jéjunum (188,4 et 66,8 espèces bactériennes observées en moyenne dans les groupes CTRL et AA+PP, respectivement, $P < 0,05$). L'analyse de la β -diversité utilisant la distance de Bray-Curtis a révélé un fort effet du traitement sur la structure du microbiote dans le jéjunum (PERMANOVA: $R^2=0,41$, $P < 0,05$) (Figure 1). La figure 1 illustre également la différence de composition du microbiote du jéjunum par rapport à celui du caecum.

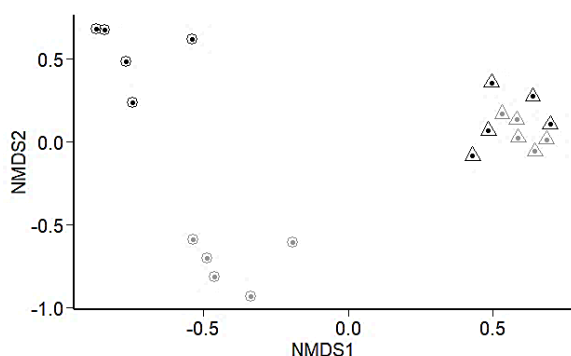


Figure 1 – Représentation Non Metric Dimensional Scaling (nMDS) de la diversité β utilisant la distance de Bray-Curtis distance.

Ronds : Jéjunum, Triangles : Caecum, Noir : CTRL, Gris : AA+PP

Au niveau taxonomique du phylum, la supplémentation en AA+PP est associée à l'absence de Bacteroidota dans le jéjunum, à la différence des porcelets témoins (abondance relative moyenne de 16,9%). Au niveau taxonomique de la

famille, la supplémentation en AA+PP a triplé l'abondance relative des Lactobacillaceae aux dépens de la majorité des autres familles dominantes du microbiote du jéjunum telles que les Bacteroidaceae, Lachnospiraceae et Ruminococcaceae (Tableau 2). La supplémentation en AA+PP n'a pas eu d'effet sur l'abondance relative des Enterobacteriaceae, la deuxième famille bactérienne la plus abondante dans le jéjunum.

Tableau 2 – Abondance relative des familles bactériennes dominantes (>1%) dans le jéjunum

Famille	Abondance relative moyenne (%)		P-value
	CTRL	AA+PP	
Lactobacillaceae	27,941	85,118	0,016
Enterobacteriaceae	22,694	13,873	0,917
Lachnospiraceae	13,788	0,033	0,009
Bacteroidaceae	9,915	0,026	0,009
Ruminococcaceae	5,435	0,002	0,008
Oscillospiraceae	5,055	0,011	0,009
Rikenellaceae	2,875	0,004	0,009
Barnesiellaceae	2,036	0,007	0,009
Acholeplasmataceae	1,342	0,002	0,034
Monoglobaceae	1,320	0,000	0,005
Clostridiaceae	1,143	0,044	0,009
Peptostreptococcaceae	1,080	0,018	0,009
Christensenellaceae	1,072	0,002	0,008

Aucun effet significatif de la supplémentation en AA+PP n'a été observé sur le métabolome dans le contenu du jéjunum (données non présentées).

2.3. Microbiote et métabolome dans le caecum

La supplémentation en AA+PP n'a pas modifié la diversité α et β du microbiote dans le caecum par rapport aux porcelets témoins (Figure 1). L'abondance relative du phylum des Proteobacteria était moins élevée chez les porcelets traités (0,98%) que chez les témoins (6,23%) ($P < 0,05$). Aucun effet significatif du traitement n'a été observé aux niveaux taxonomiques inférieurs (données non présentées).

L'analyse du métabolome par RMN dans le contenu du caecum a révélé un effet majeur de la supplémentation en AA+PP sur l'activité métabolique du microbiote intestinal. En effet, la concentration relative de plusieurs métabolites bactériens (butyrate, propionate, isovalérate, putrescine et 3-phenylpropionate) était plus élevée chez les porcelets traités que chez les témoins (Figure 2). Au contraire, la supplémentation en AA+PP a réduit la concentration relative en lactate par rapport aux témoins.

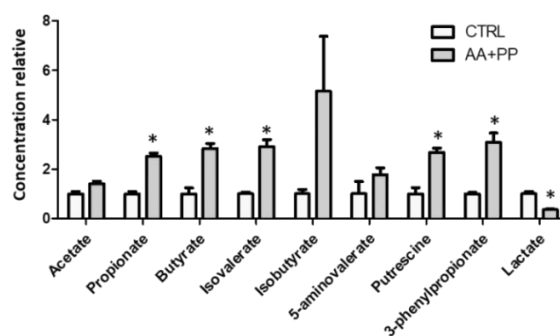


Figure 2 – Concentration relative de métabolites bactériens détectés dans le contenu du caecum * : $P < 0,05$

2.4. Effets du mélange AA+PP sur les organoïdes

Les effets directs du mélange d'AA et PP sur l'épithélium intestinal ont été évalués *in vitro* dans des organoïdes de jéjunum de porcelets. Dans ce modèle innovant de culture cellulaire en 3 dimensions, tous les types de cellules épithéliales (absorbatives et sécrétoires) sont présentes et s'auto renouvellent grâce à la présence de cellules souches issues de l'espèce d'intérêt (Beaumont, *et al.*, 2021a). Ces caractéristiques indiquent que les organoïdes d'intestin de porc reproduisent plus fidèlement la physiologie de l'épithélium digestif que les lignées cellulaires classiquement utilisées (e.g. IPEC-J2) qui présentent des anomalies génomiques et ne sont composées que d'un type cellulaire.

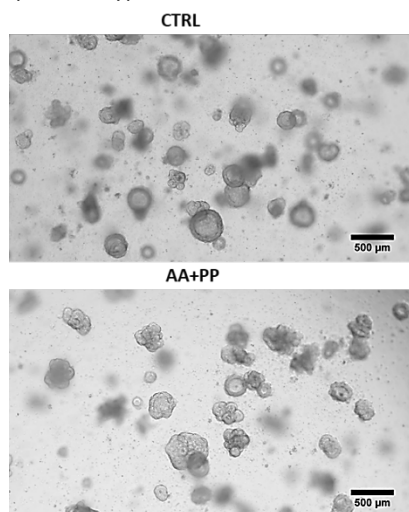


Figure 3 – Observation au microscope optique des organoïdes de jéjunum de porc.

Le mélange d'AA et PP n'a pas modifié le nombre, la surface et la morphologie des organoïdes (sphériques versus non sphériques) (Figure 3). L'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal a été analysé par qPCR (Figure 4). Le traitement avec les AA+PP a induit une forte augmentation de l'expression du gène ALPI (alkaline phosphatase intestinale), un marqueur de la différenciation épithéliale. Au contraire, les AA+PP ont réduit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération des cellules épithéliales (OLF4, olfactomedin 4 ; MKI67, marker of proliferation Ki-67 ; PCNA, proliferating cell nuclear antigen) en comparaison des organoïdes non traités. L'expression génique de CLDN2 (Claudine-2, une protéine formant des pores au niveau des jonction serrées) était réduite dans les organoïdes traités avec les AA+PP par rapport aux organoïdes témoins. Le traitement des AA+PP a également réduit l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines jouant un rôle clé dans les réponses immunitaires innées de l'épithélium intestinal : LBP (lipopolysaccharide binding protein), NFKB2 (nuclear factor kappa B subunit 2) et RELA (nuclear factor kappa B p65 subunit). Les données obtenues dans le modèle organoïdes montrent donc que le traitement par le mélange d'AA et PP régule des fonctions majeures de l'épithélium intestinal du porc.

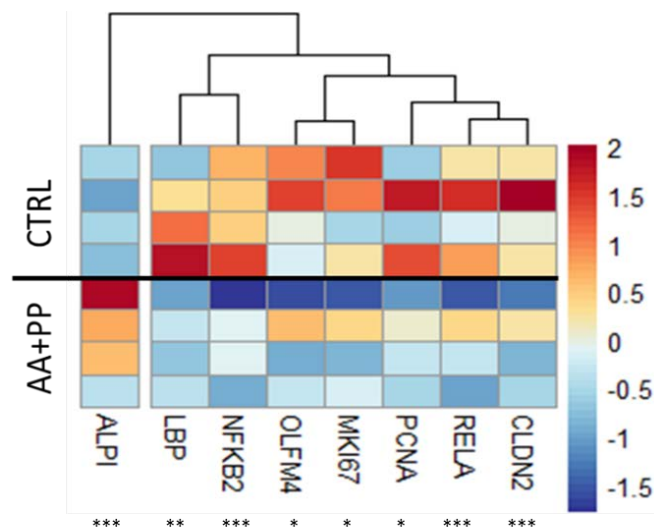


Figure 4 – Représentation du niveau d'expression de gènes (niveau d'ARN messager – unité arbitraire) différentiellement exprimés dans les organoïdes en fonction des groupes

La couleur représente le niveau d'expression (rouge : élevée, bleue : faible). Chaque ligne correspond à un échantillon et chaque colonne correspond à un gène. * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$; *** : $P < 0,001$

3. DISCUSSION

Au moment du sevrage, la composition du microbiote intestinal et son activité métabolique sont fortement altérés, principalement en raison de la modification des substrats disponibles pour les bactéries (Bian *et al.*, 2016; Beaumont *et al.*, 2021b). Ces modifications peuvent éventuellement conduire à un déséquilibre (« dysbiose ») du microbiote favorisant l'inflammation intestinale et les infections entériques impliquées dans les diarrhées post-sevrage (Gresse *et al.*, 2017). Il est donc important d'identifier des stratégies nutritionnelles de modulation du microbiote au moment du sevrage pour contribuer à maintenir la santé digestive des porcelets.

L'intérêt d'une supplémentation en AA ou en PP chez le porc a été démontré par des études précédentes, lorsque ces nutriments sont apportés individuellement (Chalvon-Demersay *et al.*, 2021 ; Girard et Bee, 2020). Notre travail montre que l'apport simultané d'un mélange complexe de cinq AA et d'un extrait de raisin riche en PP améliore la croissance et l'efficacité alimentaire des porcelets après le sevrage. Les résultats obtenus suggèrent que les effets bénéfiques de la supplémentation en AA+PP pourraient être liés à deux mécanismes complémentaires : 1) la modulation de la composition du microbiote et de son activité métabolique et 2) la régulation de fonctions clés de l'épithélium intestinal. Ces nouvelles données suggèrent qu'une supplémentation en AA+PP pourraient être une stratégie prometteuse pour faciliter la transition du sevrage chez le porc.

Dans notre étude, nous avons analysé les effets de la supplémentation en AA+PP sur la composition du microbiote du jéjunum et du caecum. Comme attendu, les communautés bactériennes colonisant ces deux segments digestifs étaient largement distinctes. Dans le jéjunum, nous avons observé que les AA+PP ont très fortement favorisé la famille des Lactobacillaceae, aux dépens de la majorité des autres familles bactériennes. Il s'agit de la famille la plus abondante du microbiote de l'intestin grêle chez le porc (Holman *et al.*, 2017). Les Lactobacillaceae sont généralement considérés bénéfiques pour la santé digestive en raison de leur capacité à prévenir la colonisation par des pathogènes, à sécréter des composés antimicrobiens et à stimuler le système immunitaire (Valeriano *et al.*, 2017). En effet, de nombreux probiotiques utilisés en production porcine sont issus du genre *Lactobacillus*. Les AA et les PP pourraient chacun contribuer à l'augmentation des Lactobacillaceae dans le jéjunum des porcelets. Précédemment, des études contradictoires ont été présentées concernant les effets de PP de raisin sur l'abondance des Lactobacillaceae, probablement en raison de différences de source ou de niveau de supplémentation (Choy *et al.*, 2014 ; Han *et al.*, 2016). Par ailleurs, une étude chez la souris a montré qu'une supplémentation en arginine pouvait augmenter l'abondance des *Lactobacillus* dans le jéjunum (Ren *et al.*, 2014).

Dans le caecum, la supplémentation en AA+PP n'a pas eu d'effet global sur la structure du microbiote. Ces différences en fonction des segments digestifs pourraient être dus à la variation de la disponibilité des AA et des PP le long du tractus digestif. Cependant, l'apport d'AA+PP a réduit l'abondance du phylum des Proteobacteria dans le caecum. Des pathogènes entériques potentiellement impliqués dans les diarrhées post-sevrage des porcelets appartient à ce phylum (*Salmonella enterica*, *Escherichia coli*) (Gresse *et al.*, 2017). Il a déjà été montré que l'abondance des Enterobacteriaceae pouvait être réduite par l'apport de PP de raisin ou par l'apport d'AA ramifiés (Yang *et al.*, 2016 ; Verhelst *et al.*, 2014).

La production de métabolites par le microbiote est un des mécanismes par lequel il influence la santé de son hôte. Le mélange d'AA+PP n'a pas eu d'effet sur le métabolome du jéjunum, contrairement au caecum. Ces différences en fonction du segment digestif sont probablement liées aux variations de disponibilité des substrats et de composition de microbiote. Dans le caecum, l'augmentation de la concentration des acides gras à courtes chaînes propionate et butyrate pourrait favoriser la santé digestive des porcelets, ces métabolites étant considérés protecteurs (van der Hee et Wells, 2021). L'augmentation de leur production par le microbiote est probablement liée à l'apport en PP, selon des études précédentes (Han *et al.*, 2016). Au contraire, l'augmentation de la production de métabolites bactériens issus du catabolisme des AA (isovalérate et putrescine) est probablement liée à

l'apport de leurs précurseurs (leucine et arginine, respectivement). Ces métabolites bactériens exercent de nombreux effets, il est donc difficile de prédire les conséquences pour la santé digestive de l'augmentation de leur concentration. Enfin, l'augmentation de la concentration du métabolite immunomodulateur 3-phenylpropionate est probablement lié à l'apport en précurseurs polyphénols (Larrosa *et al.*, 2009).

Les effets bénéfiques de la supplémentation en AA+PP chez les porcelets pourraient donc être liés à la modulation de la composition et de l'activité métabolique du microbiote intestinal. De plus, nos résultats obtenus *in vitro* sur les organoïdes d'intestin suggèrent que des effets directs du mélange d'AA+PP sur l'épithélium digestif pourrait également contribuer aux effets observés *in vivo*.

Le traitement des organoïdes par le mélange d'AA+PP a induit l'expression de gènes de certains marqueurs liés à la différenciation de l'épithélium et a réduit celle de certains marqueurs liés à la prolifération. Ces effets correspondent à ce qui a été observé précédemment sur des organoïdes intestinaux traités par des PP (Casanova-Martí *et al.*, 2020). Au contraire, les AA testés dans le mélange ont précédemment été décrits comme favorisant la prolifération épithéliale (Chalvon-Demersay *et al.*, 2021). Il semblerait donc que l'effet des PP l'emporte sur celui des AA concernant l'équilibre prolifération/différenciation dans l'épithélium. Le mélange d'AA+PP a également réduit l'expression de gènes impliqués dans les réponses immunitaires innées de l'épithélium. La littérature suggère que ces effets pourraient être dus à la fois aux AA et aux PP (Chalvon-Demersay *et al.*, 2021; Girard et Bee, 2020). Globalement, les résultats obtenus *in vitro* montrent que le mélange d'AA+PP module les fonctions de l'épithélium. Des études complémentaires seront nécessaires pour déterminer les conséquences de ces régulations pour la santé digestive des porcelets.

CONCLUSION

Notre étude montre qu'une supplémentation fonctionnelle avec une faible dose (0,1%) d'AA (L-arginine, L-leucine, L-isoleucine, L-valine, L-cystine) combinée avec 100 ppm d'un extrait de raisin riche en PP améliore la croissance et l'efficacité alimentaires des porcelets lors des deux premières semaines après le sevrage. L'augmentation de l'abondance des Lactobacillaceae dans le jéjunum, la diminution de l'abondance des Proteobacteria dans le caecum et l'augmentation de la production de métabolites bactériens pourraient contribuer aux effets bénéfiques du mélange d'AA et PP. Par ailleurs, les effets directs du mélange d'AA et PP sur l'épithélium intestinal pourraient également participer à améliorer la santé digestive des porcelets.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Beaumont M., Blachier F., 2020. Amino acids in intestinal physiology and health. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1265, 1-20.
- Beaumont, M., Blanc, F., Cherbuy, C., Egidy, G., Giuffra, E., Lacroix-Lamandé, S., Wiedemann, A., 2021a. Intestinal organoids in farm animals. *Vet. Res.*, 52, 33.
- Beaumont, M., Cauquil, L., Bertide, A., Ahn, I., Barilly, C., Gil, L., Canlet, C., Zemb, O., Pascal, G., Samson, A., Combes, S., 2021b. Gut microbiota-derived metabolite signature in suckling and weaned piglets. *J. Proteome Res.*, 20, 982-994.
- Bian, G., Ma, S., Zhu, Z., Su, Y., Zoetendal, E.G., Mackie, R., Liu, J., Mu, C., Huang, R., Smidt, H., Zhu, W., 2016. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model: Gut bacterial succession in piglets. *Env. Micro.*, 18, 1566-1577.
- Casanova-Martí, À., González-Abuín, N., Serrano, J., Blay, M.T., Terra, X., Frost, G., Pinent, M., Ardévol, A., 2020. Long term exposure to a rape seed proanthocyanidin extract enhances L-cell differentiation in intestinal organoids. *Mol. Nutr. Food Res.*, 64, 2000303.
- Chalvon-Demersay, T., Luise, D., Le Floc'h, N., Tesseraud, S., Lambert, W., Bosi, P., Trevisi, P., Beaumont, M., Corrent, E., 2021. Functional amino acids in pigs and chickens: Implication for gut health. *Front. Vet. Sci.*, 8.
- Choy, Y.Y., Quifer-Rada, P., Holstege, D.M., Frese, S.A., Calvert, C.C., Mills, D.A., Lamuela-Raventos, R.M., Waterhouse, A.L., 2014. Phenolic metabolites and substantial microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins. *Food Funct.*, 5, 2298-2308.
- Escudí, 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.
- Giacomoni, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.-F., Jacob, D., Goultquer, S., Thévenot, E.A., Caron, C., 2015. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*, 31, 1493-1495.
- Girard M., Bee G., 2020. Invited review: Tannins as a potential alternative to antibiotics to prevent coliform diarrhea in weaned pigs. *Animal*, 14, 95-107.
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S., 2017. Gut microbiota dysbiosis in postweaning piglets: understanding the keys to health. *Trends in Microbiology*, 25, 851-873.
- Han, M., Song, P., Huang, C., Rezaei, A., Farrar, S., Brown, M.A., Ma, X., 2016. Dietary grape seed proanthocyanidins (GSPs) improve weaned intestinal microbiota and mucosal barrier using a piglet model. *Oncotarget*, 7, 80313-80326.
- van der Hee B., Wells J.M., 2021. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*. 29, 700-712
- Holman D.B., Brunelle B.W., Trachsel J., Allen H.K., 2017. Meta-analysis to define a core microbiota in the swine gut. *mSystems*, 2, e00004-17.
- Lallès, J.-P., Boudry, G., Favier, C., Le Floc'h, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I.P., Pié, S., Piel, C., Sève, B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.*, 53, 301-316.
- Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., Dolara, P., 2009. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol Nutr Food Res*, 53, 1044-1054.
- Prates, J.A.M., Freire, J.P.B., de Almeida, A.M., Martins, C., Ribeiro, D.M., Osório, H., Pinho, M.A.S., Lopes, P.A., Correia, J.M.J., Pinto, R.M.A., Costa, T., Corrent, E., Chalvon-Demersay, T., 2021. Influence of dietary supplementation with an amino acid mixture on inflammatory markers, immune status and serum proteome in LPS-challenged weaned piglets. *Animals*, 11, 1143.
- Ren, W., Chen, S., Yin, J., Duan, J., Li, T., Liu, G., Feng, Z., Tan, B., Yin, Y., Wu, G., 2014. Dietary arginine supplementation of mice alters the microbial population and activates intestinal innate immunity. *J Nutr*, 144, 988-995.
- Valeriano V.D.V., Balolong M.P., Kang D.K., 2017. Probiotic roles of *Lactobacillus* sp. in swine: insights from gut microbiota. *J. Applied Micro.*, 122, 554-567.
- Verhelst R., Schroyen M., Buys N., Niewold T., 2014. Dietary polyphenols reduce diarrhea in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infected post-weaning piglets. *J. Livest. Sci.*, 160, 138-140.
- Yang, Z., Huang, S., Zou, D., Dong, D., He, X., Liu, N., Liu, W., Huang, L., 2016. Metabolic shifts and structural changes in the gut microbiota upon branched-chain amino acid supplementation in middle-aged mice. *Amino Acids*, 48, 2731-2745.