



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme CHRISTELLE KNUDSEN

le mardi 16 décembre 2014

Titre :

STRATEGIES DE LIMITATION DE L'INGESTION CHEZ LE LAPIN:
OPTIMISATION DES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES, IMPACTS
PHYSIOLOGIQUES ET CONSEQUENCES SUR LA SANTE DIGESTIVE

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Tissus animaux, nutrition, digestion, écosystème et métabolisme (TANDEM)

Directeur(s) de Thèse :

M. THIERRY GIDENNE

MME SYLVIE COMBES

Rapporteurs :

Mme ISABELLE LE HUEROU-LURON, INRA RENNES

M. PAOLO TREVISI, UNIVERSITA DEGLI STUDI DE BOLOGNE

Membre(s) du jury :

M. ENRIQUE BLAS, UNIVERSITAT POLITECNICA DE VALENCE, Président

M. LILIAN LELOUTRE, , Membre

Mme SYLVIE COMBES, INRA TOULOUSE, Membre

M. THIERRY GIDENNE, INRA TOULOUSE, Membre

Remerciements

Me voilà arrivée à la fin de ce périple riche en émotions qu'est la thèse. Paradoxalement ces lignes qui seront lues en premier, sont bien entendu celles qui sont écrites en dernier. Mais comme l'énonçait si bien Boileau, « Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement, et les mots pour le dire arrivent aisément » ; ces dernières lignes sont ainsi pour moi les plus faciles à écrire, car sincères. Le plus difficile sera sans doute d'être concise...

Je tiens tout d'abord à remercier Isabelle Le Huërou-Luron de l'unité ADNC de l'INRA de Saint Gilles et Paolo Trevisi du département Agricultural and Food Science (DISTAL) de l'Université de Bologne pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de cette thèse, et Enrique Blas du département d'alimentation animale de l'Université Polytechnique de Valence en Espagne et Lilian Leloutre de Techna pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je tiens également à remercier l'ensemble du jury pour ses remarques pertinentes et les discussions constructives que nous avons pu avoir au cours de la soutenance.

Je tiens ensuite à remercier Xavier Fernandez pour son accueil au sein de l'unité GenPhySE. Je voudrais remercier mes deux directeurs de thèse : Thierry Gidenne et Sylvie Combes. Merci Thierry de m'avoir accordé ta confiance et permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions. Merci à toi Sylvie pour tes réponses à mes (très) nombreuses questions et tes conseils avisés allant bien au-delà du microbiote, et ce même pendant tes vacances ! Je pense que tes futurs petits doctorants sont entre de bonnes mains ☺

Je voudrais ensuite remercier les différents partenaires du GEC ayant financé ce projet: la CCPA, Evalis, INZO, Sanders, Techna et le CLIPP et remercier les différents acteurs grâce à qui ce travail a été possible: Jean-Marc Salaün et Paul Dorchies à Sanders, Christophe Briens et Roland Foret à la CCPA, Joël Duperray à Evalis, Delphine Weissman, Emeline Grand et Estelle Picard à INZO, Angélique Travel à l'ITAVI et Gwenaël Rebours et Lilian Leloutre à Techna. Mon hébergement administratif chez Techna m'a conduit à avoir un rapport privilégié avec ses employés. Je tiens donc à remercier vivement l'équipe lapin, pour ne pas citer Gwenaël, Pamela, Marjorie et Sophie, ainsi que toutes les personnes avec qui j'ai pu partager un moment convivial au sein de l'entreprise. Merci à tous pour votre accueil et votre bienveillance malgré ma brève présence au sein de vos murs.

Je ne pense pas pouvoir écrire ces remerciements sans parler de toi, Nathalie Le Floc'h, car c'est en effet en grande partie grâce à toi que j'écris ces lignes aujourd'hui. Je te remercie donc sincèrement pour ton encadrement et tes conseils bien au-delà de mon stage de fin d'étude, mais aussi et surtout, pour m'avoir encouragée à continuer en thèse.

Je tiens ensuite à remercier les membres de l'équipe NED et SYSED pour leur investissement dans ce travail mais aussi pour les moments de convivialité partagés. Merci à Laurent et à Géraldine pour ces nombreuses heures passées à triturer mes données de séquençage, et pour vos explications claires face à mes questions statistiquement significatives. Merci à toi Béa pour ton encadrement et tes conseils avisés au labo, mais aussi pour toutes nos discussions sur les fleurs, le badminton et la vie en général ; tu auras grandement contribué à égayer mes journées avec ta joie de vivre et ton dynamisme omniprésent. Merci à Muriel pour toutes les analyses effectuées pour ces deux manips, et pour ta continuelle bienveillance et ta bonne humeur. Merci à Carole pour tous ces dosages de digestibilité : on en aura connu des galères entre les pannes d'appareils et les modifications de protocoles ! Merci pour ta patience et ta persévérance. Merci enfin à Olivier, Laurence, Véro, Caro, Asma, Valérie, Viviane, Michelle et Gérard pour ces moments de convivialité que nous avons pu partager au labo ou en dehors. Une pensée particulière pour Katia et Nathalie sans qui mes pauses déjeunées auraient sans aucun doute été nettement moins animées !

Bien qu'officiellement basée à l'INRA d'Auzville, j'ai également passé une partie importante de mon temps dans les laboratoires de l'équipe 5 de Toxalim à l'INRA de Saint Martin du Touch. Je tiens donc à remercier sincèrement Isabelle Oswald pour son accueil au sein de son équipe mais aussi pour son encadrement et sa disponibilité. Merci aussi à Joëlle, Anne-Marie et Philippe pour m'avoir initiée aux techniques d'immunologie et pour m'avoir aiguillée dans mes réflexions méthodologiques. Merci à Yannick pour ton aide en qPCR.

Mon travail de thèse n'aurait pu aboutir sans l'aide précieuse de responsables et de techniciens d'élevages. Je tiens donc à remercier les personnes étant intervenues sur mes deux études au sein du GEC pour leur travail, leur disponibilité et leur accueil et convivialité lors de mes déplacements: Nicole et Olivier à Euronutrition, Jean-Marc à Evialis, George à INZO, Christophe et Pascal à l'Itavi et Elodie et l'INRA. Je tiens à remercier plus particulièrement toute la petite équipe « lapins » d'Auzeville pour tous les moments passés en leur compagnie : Patrick, Jean-Marie, Michel, Annette, François et David, ce fût un plaisir de travailler avec vous ; promis je ne manquerai pas

de revenir vous voir! Je n'oublie pas non plus l'équipe de Langlade étant souvent venue en renfort sur mes manips : Florence, Sébastien, Virginie et Claude.

Je voudrais également remercier les personnes dont j'ai pu croiser le chemin et qui ont apporté une pierre à cet édifice. Je pense notamment à Guillaume Coutelet de l'ITAVI pour son aide précieuse en économie et ses réponses à mes questions et Frédérique Blanchard d'Euronutrition pour son aide et sa grande réactivité lors des analyses d'aliments. Je voudrais également remercier Hanna pour ses travaux menés à mes côtés durant son stage de fin d'étude. Grazie Mille Hanna! Buona fortuna con la tesi (I hope Google Translate didn't mess the sentence up too much).

Je voudrais remercier tous mes petits compagnons co-thésards : Alix, Sarah, Tehya, Julie, Juliette, HK, Héloïse, Isaura et Rhoda. Merci pour votre amitié et tous ces moments passés avec vous à parler d'autre chose que de thèse ! Et Vincent, que dire de toi, si ce n'est merci pour ces trois années partagées dans ces 16m², on en aura connu des moments de craquage et des fous rires!

Je tiens aussi à remercier mes amis, les Toulousains et les plus lointains, qui ont toujours été présents au cours de ces trois années. J'ai ici une pensée particulière pour toi Aurélie, qui m'accompagne depuis bien des années maintenant. Courage, bientôt la fin des galères pour toi aussi ! Je tiens ici à remercier celui qui me supporte au quotidien, et pour qui ça n'a pas été facile tous les jours ; Merci pour ta patience, ta confiance et tes encouragements, surtout dans la dernière ligne droite ; Promis, je ne te réexpliquerai plus le fonctionnement d'une PCR ! Enfin, je tiens à remercier ma famille qui m'a soutenue et encouragée tout au long de ce périple malgré mes nombreux monologues sur la nutrition et la santé du lapin.

Celui qui veut aller vite voyage seul ; Mais celui qui veut voyager loin part accompagné

Proverbe Africain

Publications et communications issues de la thèse

Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture de rang A

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, G. Coutelet, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, d. Weissman, T. Gidenne, 2014. **Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status.** Livestock Science 169, 96-105.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, G. Coutelet, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, d. Weissman, T. Gidenne. **Substituting starch with digestible fiber does not impact on health status or growth in restricted fed rabbits.** In prep. Animal Feed Science and Technology.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, G. Coutelet, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, d. Weissman, T. Gidenne, I. P. Oswald, 2015. **Quantitative feed restriction rather than caloric restriction modulates the immune response of the growing rabbit.** Journal of Nutrition 145, 483-489.

C. Knudsen, S. Combes, H. Mousavikhorshidi, I. P. Oswald, T. Gidenne. **An LPS based method to stimulate the inflammatory response in growing rabbits.** Submitted World Rabbit Science.

C. Knudsen, T. Gidenne, L. Cauquil, G. Pascal, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, d. Weissman, S. Combes. **Quantitative and caloric feed restriction independently modulate cecal ecosystem composition and activity in the growing rabbit.** In prep. Plos One.

Communications en congrès

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, D. Weissman and T. Gidenne. **Impact of dietary energy content and feed level on the digestive efficiency in growing rabbit.** In EAAP, 2013, Nantes, France.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, D. Weissman and T. Gidenne. **Ingestion restreinte et concentration énergétique de l'aliment : Impact sur la santé, les performances et le rendement à l'abattage du lapin.** In 15èmes Journées de la Recherche Cunicole (Ed. G Bolet), pp. 47-50. ITAVI, Le Mans, France.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, D. Weissman, I. P. Oswald and T. Gidenne. **Feed restriction reduces IgA levels and modifies the ileal cytokine expressions in growing rabbits.** In EAAP, 2014, Copenhagen, Denmark.

Communications en journées d'animation

C. Knudsen. **Potentiel de réponse inflammatoire du lapin après une stimulation LPS : mise au point méthodologique.** In Journée de doctorants SEVAB, 2012.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, D. Weissman and T. Gidenne. **Régulation de l'ingestion et santé digestive chez le jeune lapin.** In Réunion de la commission technique du CLIPP, 4 juillet 2013.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, D. Weissman and T. Gidenne. **Régulation de l'ingestion et apport énergétique: impact sur la santé et la croissance.** In Journées Techniques Nationales Sanders, 21 mai 2014.

C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J-M. Salaun, A. Travel, D. Weissman and T. Gidenne. **Rendement et nutrition du lapin : effet du niveau et de la qualité de l'apport énergétique sur le rendement.** In Premières rencontres STARLAP, 18 juin 2014.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE.....	5
<i>Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture de rang A.....</i>	5
<i>Communications en congrès.....</i>	6
<i>Communications en journées d'animation.....</i>	6
TABLE DES MATIÈRES.....	8
Liste des tableaux.....	14
Liste des figures.....	16
Liste des photos.....	19
Liste des annexes.....	19
Liste des abréviations.....	20
INTRODUCTION GENERALE.....	23
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	27
CHAPITRE 1 – LES STRATEGIES DE LIMITATION DE L'INGESTION ET LEURS IMPACTS SUR LA SANTE ET LA CROISSANCE.....	29
I. <i>Constat : mortalité et morbidité en post sevrage et réduction des intrants médicamenteux.....</i>	29
I.A. Etat des lieux des troubles digestifs en post-sevrage.....	30
I.A.1. Agents identifiables.....	30
I.A.1.a. Parasites : les coccidies.....	30
I.A.1.b. Bactéries : colibacilloses, clostridioses.....	32
I.A.1.c. Virus.....	33
I.A.2. Une maladie bien décrite mais à l'étiologie inconnue : l'EEL.....	33
I.B. Impacts économiques des problèmes sanitaires.....	34
I.C. Réduction des intrants médicamenteux en accord avec la réglementation et les attentes sociétales	36
II. <i>Les stratégies de limitation de l'ingestion après le sevrage.....</i>	37
II.A. Réduction de l'ingestion et amélioration de l'état sanitaire.....	37
II.B. Réduction de l'ingestion et performances zootechniques.....	39
II.C. Une solution économiquement rentable.....	41
III. <i>Comment réduire l'ingestion ?.....</i>	42
III.A. Restriction alimentaire quantitative.....	42
III.B. Restriction alimentaire qualitative.....	43
III.C. Comportement d'ingestion et bien-être chez le lapin restreint.....	43
CHAPITRE 2 – LE SYSTEME DIGESTIF : UN ENSEMBLE COMPLEXE MODULABLE PAR L'ALIMENTATION.....	46
I. <i>Le lapin, un herbivore au système digestif particulier.....</i>	46
II. <i>Rôle nutritionnel.....</i>	48

II.A.	Digestion enzymatique endogène	49
II.A.1.	Une lyse efficace de la bouche à l'estomac.....	49
II.A.2.	Une lyse et une absorption importante dans l'Intestin grêle.....	50
II.B.	Digestion microbienne	52
II.B.1.	Dégradation microbienne conséquente dans le caecum	52
II.B.2.	Transit dans le côlon et production différentielle de caecotrophes ou de crottes dures	53
II.C.	Efficacité digestive globale chez le lapin en croissance	54
II.D.	Modulation de l'efficacité digestive via la régulation de l'ingestion.....	56
II.D.1.	Modulation du transit digestif	56
II.D.2.	Modulation de la dégradation enzymatique et de l'absorption intestinale.....	56
II.D.3.	Modulation de l'activité microbienne	57
II.D.4.	Modulation de l'efficacité digestive globale	57
III.	<i>Rôle de défense</i>	60
III.A.	Barrières physiques et chimiques	60
III.B.	Immunité digestive	60
III.B.1.	Le GALT : une structure caractéristique	61
III.B.2.	La réponse immunitaire intestinale.....	63
III.B.2.a.	Initialisation de la réponse immunitaire et reconnaissance antigénique aux sites inducteurs	63
III.B.2.b.	Production d'IgA et activité immunitaire aux sites effecteurs.....	65
III.C.	Le microbiote, une barrière naturelle aux agents pathogènes	67
III.C.1.	Le microbiote digestif du lapin	68
III.C.1.a.	Diversité et composition de l'écosystème digestif.....	68
III.C.1.b.	Structuration spatiale du microbiote.....	70
III.C.1.c.	Evolution post-sevrage et stabilité du microbiote digestif.....	71
III.C.2.	Le microbiote a une fonction de barrière.....	72
III.D.	Un microbiote en interaction avec l'immunité de l'hôte.....	72
III.D.1.	Le système immunitaire de l'hôte aux commandes de son microbiote	73
III.D.2.	Le microbiote affecte l'expression immunitaire de son hôte	73
III.D.3.	Le système immunitaire et le microbiote digestif interagissent pour permettre la tolérance orale	74
III.E.	Régulation de l'ingestion et modulation de la santé digestive	75
III.E.1.	Modulation morphologique et physiologique des organes impliqués dans la réponse immunitaire digestive	75
III.E.2.	Modulation de la réponse immunitaire	76
III.E.2.a.	Modulation de la réponse inflammatoire	76
III.E.2.b.	Modulation de la production d'anticorps	77
III.E.3.	Modulation du microbiote digestif et son interaction avec l'immunité de l'hôte.....	77
CHAPITRE 3 – LEVIERS NUTRITIONNELS D'AMELIORATION DE LA CROISSANCE ET DE MODULATION DE LA SANTE		79
I.	<i>Les besoins alimentaires du lapin en croissance</i>	79
I.A.	Les apports d'énergie digestible	81
I.B.	Les fibres	82

I.C.	Les apports protéiques	84
I.D.	Les vitamines et minéraux	85
I.E.	Contraintes économiques et environnementales dans la formulation alimentaire	87
II.	<i>Apports énergétiques et modulation de la croissance et de la santé</i>	87
II.A.	Modulation de la croissance et de la santé via les sources d'énergie.....	87
II.A.1.	Lipides	88
II.A.2.	Amidon.....	88
II.A.3.	Fibres digestibles.....	89
II.B.	Régulation de l'ingestion et apports énergétiques	89
OBJECTIFS		91
ETUDE EXPERIMENTALE		99
CHAPITRE 1 – OPTIMISATION DES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE SOUMIS A UNE		
RESTRICTION ALIMENTAIRE		101
I.	<i>L'augmentation de la concentration en énergie digestible de l'aliment améliore l'efficacité alimentaire sans détériorer la santé chez le lapin en croissance soumis à une restriction alimentaire</i>	
	102	
1.	Introduction.....	106
2.	Material and methods.....	106
2.1.	Experimental design, animals, housing and feeding.....	106
2.2.	Growth, feed intake and health status measurements	110
2.3.	Carcass and meat quality measurements	110
2.4.	Digestibility measurements	111
2.5.	Chemical analyses of feeds and faeces.....	111
2.6.	Calculations and statistical analysis	112
3.	Results	112
3.1.	Digestibility	112
3.2.	Performances	115
3.2.1.	Feed intake and growth	115
3.2.2.	Carcass and meat quality	115
3.2.3.	Health status.....	117
3.2.4.	Economic evaluation.....	117
4.	Discussion.....	119
4.1.	Effect of the intake level.....	119
4.2.	Effect of the dietary digestible energy level	121
5.	Conclusion	122
	Acknowledgments	123
	References.....	123
II.	<i>La substitution de l'amidon par des fibres digestibles ne modifie pas le statut sanitaire ou la croissance chez le lapin soumis à une stratégie de restriction alimentaire</i>	<i>127</i>
	Abstract	129

1. Introduction.....	130
2. Material and methods	130
2.1. Experimental design, animals, housing and feeding.....	130
2.2. Growth, feed intake and health status measurements	132
2.3. Carcass and meat quality measurements	134
2.4. Digestibility measurements	134
2.5. Chemical analyses of feeds and feces.....	135
2.6. Calculations and statistical analysis	135
3. Results	137
3.1. Digestibility	137
3.2. Performances.....	137
3.2.1. Feed intake and growth	137
3.2.2. Carcass and meat quality	140
3.2.3. Health status	140
3.2.4. Economic evaluation.....	141
4. Discussion	142
4.1. Effect of the intake level.....	142
4.2. Effect of the dietary energy source	143
5. Conclusion	144
Acknowledgments	145
References.....	145
CHAPITRE 2 - ETUDE DES MECANISMES PHYSIOLOGIQUES POUVANT EXPLIQUER LES EFFETS BENEFIQUES D'UNE INGESTION RESTREINTE SUR LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN EN CROISSANCE	149
<i>I. La masse ingérée plutôt que l'ingéré énergétique module la réponse immunitaire du lapin en croissance</i>	<i>150</i>
Abstract	153
1. Introduction.....	154
2. Material and methods	154
2.1. Experimental design, animals, housing and feeds	154
2.2. Ovalbumin immunization.	156
2.3. Killings and samplings.	156
2.4. Total and anti-OVA IgG ELISA measurements.....	157
2.5. Fecal IgA extractions and IgA ELISA measurements.	157
2.6. Expression of mRNA encoding for cytokines by real-time PCR.....	158
2.7. Calculations and Statistical analysis.....	158
3. Results	159
3.1. Body weight and Peyer's patch surface was lower with quantitative feed restriction without impacting on the relative spleen and appendix weight.	159
3.2. The total and anti-OVA plasma IgG concentrations were lower with quantitative feed restriction after four weeks of its application.	160
3.3. Quantitative feed restriction reduced fecal and plasmatic IgA concentrations to a greater extent than energy restriction.	162

3.4. Quantitative feed restriction tended to modify the cytokine expressions in the ileum.	164
3.5. Immunological parameters were affected by age.	165
4. Discussion.....	165
5. Conclusion.....	167
Acknowledgements.....	168
Literature cited.....	168
<i>II. Une méthode LPS pour stimuler la réponse inflammatoire du lapin en croissance</i>	<i>175</i>
Abstract.....	177
1. Introduction.....	178
2. Materials and methods.....	178
2.1. Animals, housing and feeds.....	179
2.2. LPS preparation and administration.....	180
2.3. Experimental treatments (Figure 1).	180
Trial 1, development step one.....	180
Trial 2, development step two.....	180
Trial 3, application.....	181
2.4. Rectal temperature measurements (trials 2 and 3).....	182
2.5. Blood samplings.....	182
2.6. Determination of plasma concentrations of TNF- α	182
2.7. Data Analysis.	183
3. Results.....	183
3.1. Growth measurements.....	183
3.2. Effect of the LPS injection on rectal temperature.	184
3.3. Effect of the LPS injection on plasmatic TNF- α concentrations.	184
4. Discussion.....	187
4.1. A consistent fever in response to the LPS injections.	187
4.2. A highly variable TNF- α response to the LPS injections.	188
4.3. A valid method on a large scale experiment.	189
5. Conclusion.....	190
Acknowledgements.....	190
References.....	190
<i>III. Le niveau d'ingestion et la concentration énergétique de l'aliment modulent de manière indépendante la composition de l'écosystème caecal et son activité chez le lapin en croissance</i>	<i>193</i>
Abstract.....	195
1. Introduction.....	196
2. Material and methods.....	196
2.1. Experimental design, animals, housing and feeds.....	196
2.2. Killings and samplings.....	198
2.3. DNA extractions and analysis of the bacterial community.....	199
2.4. Ammonia (NH ₃) and Volatile Fatty Acid (VFA) concentration measurements.....	199
2.5. Immunological parameter measurements.....	200
2.6. Sequence analysis.....	200

2.7. Statistical analysis.....	201
3. Results	201
3.1. Growth and Cecal Fermentative microbial activity.....	201
3.2. Taxonomical Profiles, Richness, and Diversity of Cecal Bacterial Community	204
3.3. sPLS analysis: relationship between bacterial taxonomic profiles and cecal and immunological parameters	208
4. Discussion.....	210
4.1. Effect of the feed intake level.....	210
4.2. Effect of the dietary energy level.....	211
4.3. Correlation between fermentative and immunological variables and the cecal microbiota.....	212
5. Conclusion	213
Acknowledgements	213
References.....	213
DISCUSSION GENERALE.....	219
I. <i>Intérêts et limites de nos stratégies expérimentales et méthodologiques.....</i>	<i>221</i>
I.A. Stratégies expérimentales générales.....	222
I.B. Méthodes d'analyses physiologiques	224
I.B.1. Méthodes d'analyse de la réponse immunitaire.....	225
I.B.2. Méthode d'analyse du microbiote caecal	227
II. <i>Optimisation des stratégies de restriction alimentaire.....</i>	<i>227</i>
II.A. Améliorer les performances de croissance et de rendement des animaux restreints via une modulation de la qualité nutritionnelle de l'aliment.....	227
II.B. Amélioration de l'efficacité alimentaire des animaux restreints via une modulation de la qualité nutritionnelle de l'aliment.....	230
II.C. Amélioration des performances des animaux restreints via une modulation de la qualité nutritionnelle de l'aliment sans pénaliser les paramètres sanitaires	231
III. <i>Phénomènes physiologiques sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire</i>	<i>234</i>
III.A. Stratégies alimentaires et modulation de la réponse immunitaire du lapin en croissance	234
III.B. Stratégies alimentaires et modulation du microbiote caecal et de son activité fermentaire	238
III.C. Stratégies alimentaires et modulation de l'efficacité digestive	244
IV. <i>Impacts économiques de la restriction alimentaire et de la modulation de la qualité énergétique des aliments.....</i>	<i>245</i>
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	249
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	253
ANNEXES.....	279
Abstract.....	283
Résumé.....	284

Liste des tableaux

Tableau 1 Etiologie des principaux troubles digestifs chez le lapin en croissance.....	31
Tableau 2 Consommation en antibiotiques et production carnée des différentes filières animales en France en 2012.....	35
Tableau 3 Une stratégie de limitation de l'ingestion chez le lapin en post-sevrage réduit la mortalité et la morbidité par troubles digestifs.	38
Tableau 4 Dégradation des différents composés alimentaires dans les différents compartiments du tractus digestif.	48
Tableau 5 Composition chimique des caecotrophes et des crottes dures.....	54
Tableau 6 Digestibilité des différents nutriments chez le lapin en croissance.....	55
Tableau 7 Une stratégie de limitation de l'ingestion chez le lapin en post-sevrage permet d'améliorer l'efficacité digestive.....	59
Tableau 8 Recommandations nutritionnelles pour le lapin en croissance.....	80
Tableau 9 Recommandations en apports de minéraux et de vitamines chez le lapin en croissance.	86
Tableau 10 Récapitulatif des travaux et expérimentations effectués.....	97
Tableau 11 Ingredients and chemical composition of the experimental diets	107
Tableau 12 Experimental conditions at the different sites and effective feed restriction for each experiment and diet.....	109
Tableau 13 Effect of feed intake and dietary DE ¹ levels on the whole tract digestive efficiency in growing rabbits (values are arithmetic means; n = 12 animals per treatment)	113
Tableau 14 Effect of feed intake and dietary DE ¹ levels on growth, intake and feed conversion of the rabbits ² in the performance experiment (values are arithmetic means; n = 472 animals per treatment).....	114
Tableau 15 Effect of feed intake and dietary DE ¹ levels on the carcass traits of 71-72 day old rabbits (values are arithmetic means; n =100 animals per treatment)	116
Tableau 16 Effect of feed intake and dietary DE ¹ levels on the health status of rabbits in the performance experiment according to the experimental sites.....	118
Tableau 17 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.	131
Tableau 18 Experimental conditions at the different sites and effective feed restriction for each experiment and diet.....	133
Tableau 19 Whole tract digestive efficiency in growing rabbits according to the feeding level and the diet (values are arithmetic means; n = 12 animals per treatment).....	136

Tableau 20 Growth, intake and feed conversion of the rabbits ¹ in the performance experiment according to the feeding level and the diet (values are arithmetic means; n = 418 animals per treatment).	138
Tableau 21 Carcass traits of 71-72 day old rabbits according to the feeding level and the diet (values are arithmetic means; n =95 animals per treatment).....	139
Tableau 22 Health status of rabbits according to the feeding level and the diet in the performance in the sites with a poor health conditions (sites 1 and 2, n= 272 animals per treatment).	141
Tableau 23 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the relative cytokine expressions in the ileum of growing rabbits between 50 and 63 days of age ¹	165
Tableau 24 Ingredients and formulated chemical composition of the experimental diets.	179
Tableau 25 Effect of the diet and the feeding level on the growth and the plasmatic concentrations of TNF- α 90 min after an LPS injection of 100 μ g/kg in trial 3 (n=8 rabbits per group).....	184
Tableau 26 Effect of the dose of LPS injected on the plasmatic concentrations of TNF- α 90 min after injection in trials 1 and 2.	186
Tableau 27 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.....	197
Tableau 28 Digestive parameters at 42 and 50 days of age according to the diet level and the feeding level.	202
Tableau 29 Fermentative microbial activity at 42 and 50 days of age according to the diet and the feeding level.	203
Tableau 30 Estimators of diversity according to the diet and the feeding level.	204
Tableau 31 Effect of age and intake level on the bacterial core phylum relative abundance (%) in the cecum of the growing rabbits.	206
Tableau 32 Effect of age, intake and dietary energy level on the bacterial core family relative abundance (%) in the cecum of the growing rabbits.	206
Tableau 33 Effect of age, intake and dietary energy level on the bacterial core genus relative abundance (%) in the cecum of the growing rabbits.	207
Tableau 34 Mesures de la réponse immunitaire.	225
Tableau 35 Besoins moyens d'entretien durant la période de restriction alimentaire (sevrage - 63/64 jours d'âge).	237

Liste des figures

Figure 1 Evolution de la mortalité en engraissement entre 1984 et 2012.....	30
Figure 2 Variations de la croissance et de l'indice de consommation chez le lapin, selon l'intensité de la restriction alimentaire durant son application.	39
Figure 3 Variations de la croissance et de l'indice de consommation selon l'intensité de la restriction alimentaire lors du retour à volonté.	40
Figure 4 Profils d'ingestion du lapin nourri à volonté (Ad libitum) ou en ingestion limitée à 75% de l'à volonté.	44
Figure 5 Morphologie générale du tube digestif du lapin à 12 semaines d'âge.....	47
Figure 6 Proportions en longueur du tube digestif des différents compartiments digestifs chez le cochon d'inde, le lapin et le porc.....	48
Figure 7 Anatomie de l'intestin grêle et histologie de la muqueuse digestive.	51
Figure 8 Anatomie des segments caeco-rectaux.....	52
Figure 9 Classifications des différentes fractions fibreuses d'un aliment.	55
Figure 10 Morphologie des tissus lymphoïdes du tube digestif du lapin.	61
Figure 11 Représentation schématique de l'organisation des tissus lymphoïdes au niveau de la muqueuse digestive, avec l'exemple représentatif de la plaque de Peyer.	62
Figure 12 Assimilation et reconnaissance des antigènes au niveau de la muqueuse intestinale.	65
Figure 13 Structure et formation des sIgA.....	66
Figure 14 Taxonomie du vivant.....	68
Figure 15 Profil taxonomique 16S de la communauté bactérienne du lapin adulte (63 jours d'âge).	69
Figure 16 Répartition spaciale du microbiote digestif chez le lapin adulte.....	70
Figure 17 Approche nMDS de l'évolution de la communauté bactérienne caecale du lapin entre 7 et 70 jours d'âge.	71
Figure 18 Besoins et utilisation alimentaire avec l'exemple de l'énergie.	79
Figure 19 Les connaissances actuelles des effets de la restriction alimentaire sur la physiologie du lapin en croissance.....	94
Figure 20 Axes d'approche utilisés pour répondre à nos objectifs.....	96
Figure 21 Effect of feed intake (100 vs 75%) and dietary DE levels (low energy LE vs high energy HE) on the gross margin in France in 2011, on each experimental site and on average (performance experiment).....	119

Figure 22 Effect of feed intake level (100 vs 75%) and diet (ST vs DF) on the gross margin in France in 2013, on each experimental site and on average (performance experiment).	142
Figure 23 Experimental design.	156
Figure 24 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the growth of the rabbits from 35 to 72 days of age.....	159
Figure 25 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the development of Peyer's Patches from 42 to 72 days of age in growing rabbits.	160
Figure 26 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the total plasma IgG concentrations from 42 to 72 days of age in growing rabbits.	161
Figure 27 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the plasma anti-OVA IgG concentrations at 63 and 72 days of age in growing rabbits.	162
Figure 28 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the fecal (A) and plasma (B) IgA concentrations from 42 to 72 days of age in growing rabbits.	163
Figure 29 Mean fecal IgA levels per treatment according to the mean digestible energy intake at 50 and 63 days of age in growing rabbits.....	164
Figure 30 Experimental design of the 3 trials.....	181
Figure 31 Effect of the dose of LPS injected on the mean rectal temperature change from baseline in trial 2 (n=6 rabbits per group).	185
Figure 32 Effect of the diet and the feeding level on the mean rectal temperature change from baseline in animals injected with 100 µg/kg of LPS in trial 3 (n=8 rabbits per group).....	186
Figure 33 Correlation between the maximal rectal temperature changes from baseline and the TNF-α concentrations at 90 min post injections.	187
Figure 34 sPLS variables representation of the physicochemical parameters (blue) and the selected bacterial OTU (red) on the first two sPLS dimensions.....	208
Figure 35 Heatmap representation of the similarities between the OTU and the immune and fermentative parameters.	209
Figure 36 Un schéma expérimental commun à nos deux études.....	222
Figure 37 Qualité nutritionnelle des aliments utilisés dans nos deux études chez les animaux nourris à volonté.	223
Figure 38 Diminution de la croissance selon le niveau de restriction alimentaire - comparatif de notre étude avec les études précédentes.	228
Figure 39 Effet de la quantité d'énergie digestible ingérée sur la croissance durant la période de restriction alimentaire (sevrage – 63/64 jours).....	228

Figure 40 Résultats sanitaires sur la période totale d'engraissement selon le niveau d'ingestion et l'aliment sur les sites avec des conditions sanitaires favorables (A) ou défavorables(B).....	232
Figure 41 Effet de la quantité d'énergie digestible ingérée sur l'index de risque sanitaire durant la période de restriction alimentaire (sevrage – 63/64 jours).....	233
Figure 42 Approche ACP des paramètres du biotope caecal chez les lapins âgés de 42 et 49 jours d'âge.....	239
Figure 43 Effets physiologiques de la restriction alimentaire chez le lapin en croissance.....	243
Figure 44 Impact économique de la restriction alimentaire selon le statut sanitaire.	246

Liste des photos

Photo 1 Plaque de Peyer d'un lapin adulte (72 jours d'âge).....	63
--	----

Liste des annexes

Annexe 1 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.	171
Annexe 2 Nucleotide sequences of primers for qRT-PCR.	172
Annexe 3 Effect of the age on the relative weight of the appendix and the spleen and the surface of the Peyer's patches according to the experimental treatment in growing rabbits.	173
Annexe 4 Effect of age the fecal (A) and plasma (B) IgA concentrations and the IgG plasma concentration (C) according to the experimental treatment in growing rabbits.	174
Annexe 5 Nucleotide sequences of primers for qRT-PCR.	217
Annexe 6 Ingrédients et composition chimique des quatre aliments utilisés dans nos deux études expérimentales.	281
Annexe 7 Valeurs nutritives des quatre aliments utilisés dans nos deux études expérimentales.	282

Liste des abréviations

ADF	Acid detergent fiber
ADL	Acid detergent lignin
ADNr	Acide desoxyribonucléique ribosomal
AGV (VFA)	Acides gras volatils (Volatil fatty acids)
ALEA	Animal Level of Exposure to Antimicrobials
APC	Antigen presenting cell
ARNm	Acide ribonucélique messenger
ASFC	Association scientifique française de cuniculture
CES	Contrôle d'état sanitaire
CE-SSCP	Capillary electrophoresis single strand conformation polymorphism
DC	Dendritic cell
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ED (DE)	Energie digestible (Digestible energy)
EEL (ERE)	Enterocolite epizootique du lapin (Epizootic rabbit enteropathy)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	Energie métabolisable
FAE	Follicle-associated epithelium
Fc	cristallizable fragment
FD (DF)	Fibres digestibles (Digestible fiber)
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GEC	Groupe d'experimentation cunicole
GMQ	Gain moyen quotidien
IFN γ	Interferon gamma
IgA	Immunoglobulines A
IgG	Immunoglobulines G
IgM	Immunoglobulines M
IL	Interleukine
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LPS	Lipopolysaccharide
MLN	Mesenteric lymph node
NDF	Neutral detergent fiber

NDSF	Neutral detergent soluble fiber
nMDS	non-metric multidimensional scaling
OVA	Ovalbumine
PD (DP)	Protéines digestibles (Digestible protein)
pIgR	Polymeric immunoglobulin receptor
PLN	Peripheral lymph node
PM	Poids métabolique
PV	Poids vif
qRT-PCR	Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction
SED	Sub-epithelial dome
SEM	Standard error of mean
sPLS	sparse Partial Least Squares
TGF β	Transforming growth factor beta
Th1	Type 1 T helper
TNF	Tumor necrosis factor

Abréviations des noms de régimes et de substrats utilisés

75	Feed restricted at 75% of the <i>ad libitum</i> intake
100	<i>ad libitum</i>
AL	<i>Ad libitum</i>
DF	High energy diet rich in digestible fiber
HE	High energy diet
LE	Low energy diet
R	Restreint
ST	High energy diet rich in starch

INTRODUCTION

GENERALE

Afin de limiter la mortalité et la morbidité en élevage, les antibiotiques sont utilisés de manière préventive et curative. Cette utilisation est aujourd'hui largement contestée pour des raisons sociétales et de santé publique. En effet, le risque d'excrétion et de propagation de bactéries résistantes et le transfert de leurs gènes de résistance à d'autres bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme, ou pour l'animal, amène à se poser d'importantes questions sur l'utilisation des antibiotiques et les risques sanitaires encourus (Barton, 2000; Landers et al., 2012; Sommer and Dantas, 2011). En 1999, des recommandations et des mesures réglementaires ont donc été mises en place par l'U.E. pour réduire l'utilisation des antibiotiques en élevage (Chardon and Brugere, 2014).

Ces recommandations peuvent avoir des conséquences importantes en élevage, particulièrement chez le jeune mammifère en période de sevrage, période à fort risque de trouble digestifs chez plusieurs espèces (porcelet, veau, lapereau,...). En cuniculture, les enquêtes menées par l'ANSES ont montré une importante utilisation d'antibiotiques. En effet, en 2012, en France, 7,1% des ventes d'antibiotiques étaient destinées aux élevages cynicoles (Chevance and Moulin, 2013) alors que cette filière ne représente que 0,9% de la production carnée nationale brute (FranceAgriMer, 2012). Face à ce constat, les professionnels se sont engagés, fin 2011, dans une démarche nationale de réduction de leur emploi. En réduisant l'utilisation d'antibiotiques, l'élaboration de nouvelles stratégies pour préserver la santé des animaux devient cruciale. Plusieurs solutions peuvent être envisagées. L'utilisation du levier alimentaire apparaît comme le plus efficace et le plus facile à mettre en œuvre, via l'utilisation de prébiotiques, probiotiques ou d'huiles essentielles, mais aussi via la modulation de la qualité et de la quantité des nutriments (fibres, protéines, énergie). D'autres alternatives sont également envisageables telles que des modifications des pratiques d'élevage, et en particulier les stratégies de limitation de l'ingestion en post-sevrage.

En effet, ces stratégies de limitation de l'ingestion permettent de réduire les troubles digestifs en post sevrage (Gidenne et al., 2012b), et sont utilisées dans la majorité des élevages commerciaux français depuis une dizaine d'années. Elles contribuent ainsi à réduire la fréquence d'utilisation des antibiotiques. De plus, les stratégies de limitation de l'ingestion permettent d'augmenter l'efficacité alimentaire, réduisant ainsi les coûts alimentaires, ce qui est fortement recherché dans le contexte actuel de flambée des prix des matières premières (Coutelet, 2012). Cependant, ces stratégies d'alimentation induisent inévitablement un retard de croissance et une baisse du rendement à l'abattage par rapport à des animaux nourris à volonté. De plus, très peu d'éléments sont disponibles pour expliquer les effets bénéfiques d'une limitation transitoire de l'ingestion sur la santé et l'efficacité alimentaire.

De ces deux constats ont émané deux interrogations : Comment optimiser les performances de croissance et de rendement à l'abattage des animaux soumis à une restriction alimentaire sans pénaliser les paramètres sanitaires ? Quels sont les mécanismes physiologiques qui permettent d'expliquer les effets bénéfiques d'une ingestion restreinte sur la santé et l'efficacité alimentaire ?

Afin de répondre à la première question nous avons cherché à optimiser des stratégies de limitation de l'ingestion en nous focalisant sur les effets de la concentration et de la qualité énergétique de l'aliment. Afin d'apporter des éléments de réponse à la deuxième question nous avons choisi dans notre travail de thèse, de nous intéresser aux capacités digestives du lapin, à son écosystème caecal et aux paramètres de la réponse immunitaires. Une approche intégrative de ces paramètres devait nous permettre de mieux comprendre les effets bénéfiques d'une ingestion restreinte sur la santé et l'efficacité alimentaire.

Ce mémoire présente dans un premier temps les connaissances bibliographiques disponibles sur les stratégies de limitation de l'ingestion post-sevrage chez le lapin, le rôle de digestion et de défense du système digestif et les leviers nutritionnels d'amélioration de la croissance et de la santé. Une seconde partie sera consacrée aux méthodes expérimentales mises en place et les résultats obtenus au cours de cette thèse. Enfin, dans une troisième partie, nous discuterons nos résultats en relation avec la bibliographie, afin de répondre à nos questions et objectifs initiaux et émettre des perspectives pour des travaux futurs.

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 – Les stratégies de limitation de l’ingestion et leurs impacts sur la santé et la croissance

I. CONSTAT : MORTALITE ET MORBIDITE EN POST SEVRAGE ET REDUCTION DES INTRANTS MEDICAMENTEUX

A partir des années 80 et jusqu’en 2010 la mortalité en engraissement était globalement en diminution (14% vs 7%), malgré l’épidémie d’EEL (Entéropathie Epizootique du Lapin) en 1997 (**Figure 1**). Cependant, à partir de 2011, avec la réduction de l’utilisation des intrants médicamenteux, la courbe s’est inversée avec une augmentation de 1% par rapport à 2010 soulignant l’importance d’adopter de nouvelles stratégies pour la maîtrise sanitaire en engraissement. Ainsi, en 2012, les pertes en engraissement étaient de 8% en moyenne mais pouvaient dépasser les 20% dans certains élevages (Coutelet, 2012) induisant de fortes pertes économiques. Les troubles digestifs sont responsables de 50% des cas de mortalité chez le lapin en croissance, et en font donc la principale cause de problèmes sanitaires (Marlier et al., 2003). Ceux-ci se manifestent généralement une à deux semaines après le sevrage, soit entre 5 et 8 semaines d’âge. Un agent pathogène spécifique peut souvent être identifié comme cause primaire (e.g. colibacilles). D’autres agents pathogènes peuvent provoquer un simple déséquilibre digestif pouvant conduire à la prolifération d’agents secondaires nuisibles. Plusieurs agents pathogènes en association sont donc observés dans la plupart des cas de mortalité par affections digestives, même si parfois aucun agent pathogène connu n’est identifiable (Licois and Marlier, 2008). L’hygiène, l’alimentation et les paramètres d’ambiance des bâtiments (température, hygrométrie, ventilation...) sont autant de facteurs pouvant favoriser le développement de diverses pathologies.

Nous aborderons dans cette partie les principaux troubles digestifs retrouvés en élevage, leurs agents pathogènes associés et leurs conséquences zootechniques et économiques ainsi que les stratégies mises en place en France pour limiter ces troubles. La modulation nutritionnelle des troubles digestifs sera quant à elle abordée dans le troisième chapitre de ce mémoire.

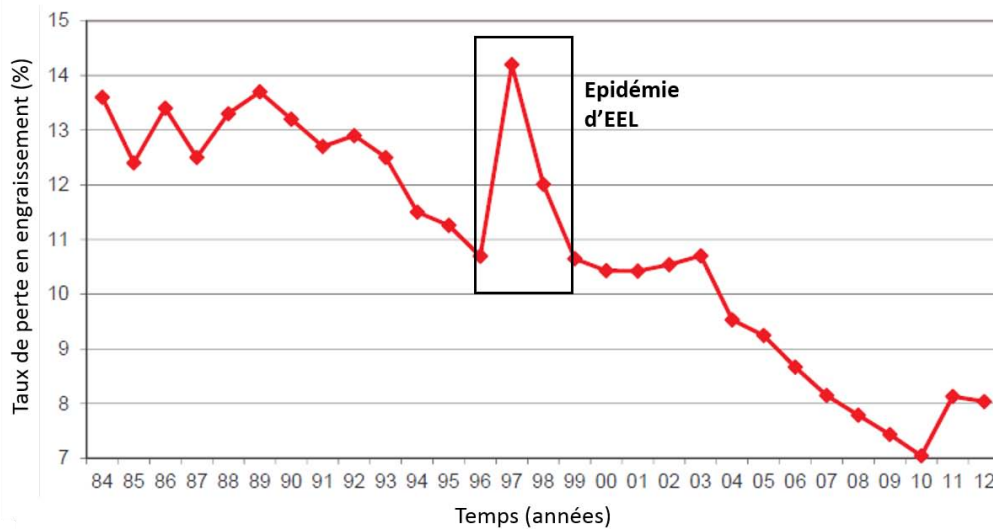


Figure 1 Evolution de la mortalité en engraissement entre 1984 et 2012.
Adapté d’après Coutelet et al. (2012)

I.A. ETAT DES LIEUX DES TROUBLES DIGESTIFS EN POST-SEVRAGE

L’état pathologique est généré par un ou plusieurs agents pathogènes (Boucher and Nouaille, 1996) dont un agent principal et un à plusieurs agents opportunistes éventuels. L’élaboration d’un diagnostic précis peut dès lors s’avérer complexe. On distingue cependant plusieurs agents pathogènes classiquement rencontrés en engraissement que nous allons présenter brièvement (**Tableau 1**).

I.A.1. Agents identifiables

I.A.1.a. *Parasites : les coccidies*

La principale pathologie digestive parasitaire du lapin en croissance est la coccidiose. Celle-ci est due à la présence de parasites : les coccidies. Parmi les 11 espèces identifiées, leur pouvoir pathogène est très variable, les plus pathogènes étant *E.flavescens* et *E. intestinalis* (Licois and Marlier, 2008). La présence de ces parasites est caractérisée par une congestion et un œdème de la paroi intestinale, ou des lésions hépatiques dans le cas de la coccidie du foie. Les coccidioses pouvant provoquer de fortes pertes (mortalité supérieure à 50% pour les espèces les plus pathogènes) mais aussi des retards de croissance importants, des anticoccidiens, considérés au plan réglementaire comme des additifs zootechniques, sont couramment utilisés en élevage (Licois and Marlier, 2008; Marlier et al., 2003). Cependant, il n’est pas rare d’observer la présence de coccidies, *Lambliia intestinalis* par exemple, en association avec d’autres pathogènes, principalement bactériens, comme agents secondaires opportunistes.

Tableau 1 Etiologie des principaux troubles digestifs chez le lapin en croissance.

Agent pathogène		Symptômes		Conséquences élevage	Traitements		
Agents connus	Parasites	Coccidies		Congestion paroi intestinale ou Lésions hépatiques	Mortalité pouvant être >50% Retards de croissance	Anticoccidiens (Sulfamides)	
	Bactéries	Colibacilles (<i>E. coli</i>)		Inflammation de la muqueuse digestive Diarrhée +/- forte	Forte prévalence Mortalité pouvant atteindre 100% (souches très pathogènes) Retards de croissance	Antibiotiques	
		Clostridies	<i>C. piliforme</i>		Responsable de la maladie de Tizzer Forte diarrhées Très mauvais état général		Faible prévalence mais conséquences graves (mortalité, baisse de croissance)
			<i>C. spiriforme</i>		Paralyse intestinale Ballonnements Diarrhée		Agent pathogène opportuniste Mortalité associée
	Virus	Rotavirus		troubles digestifs mineurs	Retards de croissance (conséquences plus graves si associé avec d'autres pathogènes)	?	
		Coronavirus		Pouvoir pathogène limité	Agents opportunistes en associations avec d'autres pathogènes		
		Parvovirus					
Enterovirus							
Agent inconnu	EEL		Diarrhées aqueuses Ballonnements Eventuelles parésies PAS d'inflammation du tractus digestif	Mortalité de 30 à 80% Morbidity forte Forts retards de croissance	Antibiotiques		

I.A.1.b. Bactéries : colibacilloses, clostridioses

Deux types de pathologies digestives d'origine bactérienne prédominent chez le lapin en croissance : les colibacilloses (*Escherichia coli*) et les clostridioses (*Clostridium piliforme* et *Clostridium spiroforme*). *Salmonella enteritidis*, *Pasteurella multocida* et *Clostridium perfringens* ont également pu être identifiés chez certains animaux présentant des troubles digestifs. Leur prévalence est cependant très faible chez le lapin en engraissement et leur pouvoir pathogène est parfois encore mal connu (Marlier et al., 2003). Malgré un effort de recherche de stratégies vaccinales contre les colibacilloses, le traitement des pathologies bactériennes repose encore aujourd'hui principalement sur l'antibiothérapie.

La colibacillose

Malgré la difficulté d'établir un diagnostic précis dans le cadre d'épisodes diarrhéiques, les colibacilloses semblent avoir une forte prévalence en élevage cynicole. En effet, avant l'épidémie d'EEL de 1997, les colibacilloses, en association fréquente avec des rotavirus ou des coccidies, représentaient environ 70% des cas de diarrhées observés dans les élevages espagnols (Blanco et al., 1997). Des souches d'*E. coli* sont naturellement présentes dans le tractus digestif du lapin à une concentration modérée (jusqu'à 10^5 ufc/g de contenu caecal), qui peut s'élever lors d'un dérèglement digestif à 10^8 - 10^9 ufc/g. C'est la multiplication de souches d'*E. coli* pathogènes (EPEC) qui provoque la diarrhée. Cette multiplication peut être associée à la présence de facteurs favorisants tels que la présence d'un autre pathogène (virus ou parasite) ou à une mauvaise gestion de l'environnement ou de l'alimentation (Marlier et al., 2003). Selon la pathogénicité de la souche d'EPEC les conséquences zootechniques varient entre des baisses de croissance légères et des taux de mortalité élevés. Les souches les plus pathogènes appartiennent au pathovar O103 dont l'inoculation expérimentale peut induire un taux de mortalité allant jusqu'à 100% (Licois and Marlier, 2008). La manifestation clinique des colibacilloses se caractérise par une inflammation de la muqueuse digestive, une augmentation du pH caecal, un contenu intestinal liquide et des diarrhées plus ou moins fortes selon la pathogénicité des souches (Boucher and Nouaille, 1996).

La clostridioses

Les clostridies sont des hôtes classiques du tube digestif, seul deux souches de clostridies sont reconnues comme des pathogènes primaires chez le lapin : *Clostridium piliforme* (gram -) et *Clostridium spiroforme* (gram +). *Clostridium piliforme* est l'agent responsable de la maladie de Tizzer, se manifestant par des diarrhées aiguës pouvant avoir de graves conséquences au niveau

des élevages. Cependant, sa prévalence étant très faible, nous ne détaillerons pas sa pathogénicité ici.

L'infection à *Clostridium spiroforme* est plus commune et caractérisée par une paralysie intestinale et des ballonnements ou de la diarrhée, conduisant le plus souvent à la mort de l'animal. Elle est détectée dans 10% des cas de mortalité liés à des pathologies digestives, même si cette souche apparaît le plus souvent comment agent secondaire opportuniste durant les stades terminaux et que rarement comme agent pathogène principal (Licois and Marlier, 2008). De même, l'utilisation de certains antibiotiques et une alimentation non adaptée favoriseraient le développement de cette souche bactérienne.

I.A.1.c. Virus

Les virus sont des pathogènes observés dans un peu moins de 40% des cas de mortalité par pathologies digestives en Italie (Nieddu et al., 2000). Cette étude montre que les virus principalement observés lors de pathologies digestives sont les rotavirus (42% des cas), les coronavirus (26% des cas), les parvovirus (21% des cas) et les entérovirus (10% des cas). Les rotavirus, coronavirus et enterovirus sont considérés comme modérément pathogènes alors que les parvovirus, présents naturellement au niveau du tractus, ont un pouvoir pathogène très limité. Les virus sont très souvent observés en association avec d'autres virus (20% des cas) ou pathogènes tels que les bactéries ou parasites (>90% des cas). A l'exception des rotavirus, dont la pathogénicité a été établie, les virus observés au niveau digestif sont rarement la cause principale de la mort de l'animal, mais plutôt des agents opportunistes ou secondaires présents naturellement ou non au niveau du tractus digestif. Une hypothèse serait que les virus altèreraient la muqueuse intestinale et favoriseraient ainsi l'implantation et la multiplication de bactéries pathogènes.

I.A.2. Une maladie bien décrite mais à l'étiologie inconnue : l'EEL

Entre 1996 et 1997 un nouveau syndrome clinique, l'entéropathie épizootique du lapin (EEL), fait son apparition en France et en Europe et cause de graves problèmes sanitaires en engraissement avec une augmentation du taux de mortalité moyen de 3,5% en 1997 (Coutelet, 2012). Cette pathologie atteint majoritairement les lapins en croissance et se caractérise par une apparition brutale d'une faible diarrhée aqueuse et d'un fort ballonnement de l'abdomen. A l'autopsie, aucune inflammation intestinale n'est observée, mais une forte dilatation de l'intestin grêle et de l'estomac est visible, parfois accompagnée d'une parésie caecale (40 à 60% des cas). L'EEL peut

conduire à une très forte mortalité allant de 30 à 80% et une morbidité allant jusqu'à 100% (Marlier et al., 2003). Aujourd'hui, malgré les améliorations techniques (hygiène, stratégies d'alimentation, ...) ayant permis de réduire son impact en élevage, l'EEL reste une préoccupation sanitaire forte en Europe, et la principale cause de prescription d'antibiotiques en élevages cynicoles en France. De plus, cette pathologie n'a, à l'heure actuelle, pas d'agent pathogène causal identifié même si les pistes de recherche actuelle s'orientent sur une bactérie entérotoxique. En effet, les antibiotiques permettent de réduire les effets de l'EEL, suggérant l'implication d'un agent bactérien (Licois and Marlier, 2008). La baisse de GMQ immédiate après inoculation expérimentale, et non contrôlable par l'antibiothérapie, serait liée à l'implication d'une toxine (Licois, 2007).

Les troubles digestifs chez le lapin en croissance se distinguent en 3 catégories :

- Les plus courants : des troubles aux symptômes et aux agents causals connus (colibacillooses, clostridioses, coccidioses, virus)*
- Les troubles aux symptômes connus mais aux agents inconnus (EEL)*
- Une proportion significative de troubles sans signature clinique spécifique ni agent causal facilement identifiable*

I.B. IMPACTS ECONOMIQUES DES PROBLEMES SANITAIRES

Les troubles digestifs en engraissement entraînent une augmentation de la mortalité, une baisse des performances (dégradation de la croissance et augmentation de l'indice de consommation) et une augmentation des frais vétérinaires. Ces trois facteurs conduisent à un manque à gagner plus ou moins important pour l'éleveur selon la gravité des troubles. Peu d'études ont permis d'estimer les pertes économiques induites par les troubles digestifs. Néanmoins, Morel-Saives et Limet (2007) ont évalué sur l'année 2006 l'impact d'un épisode de troubles digestifs (EEL ou colibacillose dans plus de 90% des cas) à un manque à gagner moyen de 78 centimes d'euro par lapin (avec une mortalité de 16,7% et une baisse de poids à l'abattage de 170 g). Ceci correspond à 30% du gain net de vente par lapin sur cette même période, soulignant encore une fois l'importance de la maîtrise de l'état sanitaire en engraissement. Même si les traitements curatifs permettent d'endiguer la mortalité, ils ne permettent pas de compenser entièrement la baisse de croissance observée. L'utilisation de traitements préventifs est donc souvent proposée en élevage professionnel pour « sécuriser » la période péri-sevrage et assurer le revenu de l'éleveur.

Tableau 2 Consommation en antibiotiques et production carnée des différentes filières animales en France en 2012.

		Bovins	Chats & chiens	Chevaux	Poissons	Lapins	Ovins & Caprins	Porcs	Volailles	Autres	Total
Antibiotiques vendus	Tonnes	166.06	16.59	12.39	3.58	55.27	61.44	287.41	176.65	2.54	781.94
	%	21.2%	2.1%	1.6%	0.5%	7.1%	7.9%	36.8%	22.6%	0.3%	100.0%
<hr/>											
Poids vif traité	1000 Tonnes	3 025	108	118	11	269	426	2 895	2 202	20	9 074
	%	33.3%	1.2%	1.3%	0.1%	3.0%	4.7%	31.9%	24.3%	0.2%	100.0%
<hr/>											
Production carnée	1000 Tonnes équivalent carcasse	1558.2	-	7.6	-	47.3	92.8	2011	1716.6	-	5433.5
	%	28.7%	-	0.1%	-	0.9%	1.7%	37.0%	31.6%	-	100.0%
<hr/>											
ALEA		0.326	0.685	0.391	0.217	2.887	0.691	0.991	1.177	0.508	0.592

D'après FranceAgriMer (2012) et Chevance and Moulin (2013).

ALEA : Animal Level of Exposure to Antimicrobials, c'est un indicateur correspondant au % de la masse totale d'une espèce animale traité avec la posologie nominale.

I.C. REDUCTION DES INTRANTS MEDICAMENTEUX EN ACCORD AVEC LA REGLEMENTATION ET LES ATTENTES SOCIETALES

Afin de limiter la mortalité et la morbidité, les antibiotiques sont utilisés en élevage de manière préventive et curative. En 2012, en France, 7,1% des ventes d'antibiotiques étaient destinées aux élevages cynicoles (Chevance and Moulin, 2013) alors que cette filière ne représente que 0,9% de la production carnée nationale brute (FranceAgriMer, 2012) (**Tableau 2**). Chez le lapin en croissance, 60 à 70% des antibiotiques utilisés sont destinés au traitement des pathologies digestives. Les 30 à 40% restants sont eux destinés en grande majorité au traitement des pathologies respiratoires en maternité (Chauvin et al., 2011).

Cette utilisation est aujourd'hui largement contestée pour des raisons sociétales et de santé publique. Les premières inquiétudes ont concerné la transmission de résidus antibiotiques de l'animal à l'homme via la consommation de produits carnés (Barton, 2000). Afin de réduire ce risque, des délais de retraits sont prévus en élevage pour assurer une élimination suffisante des substances médicamenteuses utilisées avant abattage. L'utilisation des antibiotiques en élevage contribue aussi à sélectionner des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Or, de nombreux antibiotiques utilisés en élevage ont leurs homologues utilisés en médecine humaine. Aujourd'hui, le risque d'excrétion et de propagation de bactéries résistantes et le transfert de leurs gènes de résistance à d'autres bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme, ou pour l'animal, amène à se poser d'importantes questions sur l'utilisation des antibiotiques et les risques sanitaires encourus (Barton, 2000; Landers et al., 2012; Sommer and Dantas, 2011). En 1999 des recommandations et des mesures réglementaires ont donc été mises en place par l'U.E. pour réduire l'utilisation des antibiotiques en élevage (Chardon and Brugere, 2014).

Après une augmentation de l'exposition aux antibiotiques en élevages cynicoles de 1999 à 2004 (index ALEA), on observe aujourd'hui une diminution régulière depuis 2007. L'exposition globale a ainsi diminué de 11,2% entre 1999 et 2012 avec une accélération de la diminution ces cinq dernières années suite à la forte mobilisation de la filière dans ce sens (Chevance and Moulin, 2013). De plus, entre 2009 et 2010 la part de l'aliment blanc (sans antibiotiques) livré a augmenté de 40 à 49% (Chauvin et al., 2011).

Cependant, en réduisant l'utilisation d'antibiotiques, l'élaboration de nouvelles stratégies pour préserver la santé des animaux devient encore plus nécessaire. Plusieurs solutions peuvent être envisagées. L'utilisation du levier alimentaire apparaît comme le plus efficace et le plus facile à mettre en œuvre, via l'utilisation de prébiotiques, probiotiques ou d'huiles mais aussi via la modulation de la qualité et de la quantité des nutriments (fibres, protéines, énergie). D'autres

alternatives sont également envisageables telles que des modifications des pratiques d'élevage, et en particulier les stratégies de limitation de l'ingestion en engraissement.

II. LES STRATEGIES DE LIMITATION DE L'INGESTION APRES LE SEVRAGE

Les stratégies de limitation de l'ingestion sont couramment utilisées en élevage afin d'atteindre différents objectifs selon les espèces et le stade physiologique d'intérêt. En effet, ces stratégies peuvent être utilisées afin d'améliorer l'état sanitaire et l'efficacité alimentaire en post sevrage, comme c'est le cas en élevage cunicole ou porcin (Gidenne et al., 2012b; Rantzer et al., 1996), mais aussi afin d'améliorer la préparation à la reproduction, la fertilité ou les qualités maternelles comme pratiqué sur les reproductrices dans la plupart des espèces d'élevage (Butler, 2014; Robinson et al., 1993) ou afin d'améliorer les qualités bouchères (limitation du dépôt adipeux par exemple) comme pratiqué en fin d'engraissement en élevage porcin (Leborgne, 2013). Ici, nous développerons uniquement les avantages de la limitation de l'ingestion applicables en post sevrage en élevage cunicole, à savoir l'amélioration de l'état sanitaire et de l'efficacité alimentaire. De même, nous nous focaliserons sur les cas de restrictions alimentaires sans malnutrition, signifiant que tous les besoins nutritionnels d'entretien de l'animal sont couverts sans forcément atteindre une vitesse de croissance maximale.

II.A. REDUCTION DE L'INGESTION ET AMELIORATION DE L'ETAT SANITAIRE

En cuniculture professionnelle, la limitation de l'ingestion a été initialement utilisée pour réduire la mortalité liée à l'EEL et les syndromes d'entéropathies non spécifiques à la fin des années 1990 (Lebas, 2007). Elle est appliquée depuis plus de 10 ans en France comme une méthode efficace pour réduire l'incidence des troubles digestifs (en particulier liés à l'EEL) chez le lapin en croissance (Gidenne et al., 2012b). En effet, selon une enquête menée en 2007 par l'ASFC (Association Scientifique Française de Cuniculture), cette méthode est conseillée et utilisée par la quasi-totalité des groupements de producteurs (Lebas, 2007). En revanche, dans les autres pays producteurs européens, l'Italie et l'Espagne principalement, cette pratique était encore peu rependue avant 2005, mais tend à se développer. Ainsi, en 2007, cette pratique aurait été appliquée chez 20 à 40% des éleveurs italiens et espagnols (Lebas, 2007).

Tableau 3 Une stratégie de limitation de l'ingestion chez le lapin en post-sevrage réduit la mortalité et la morbidité par troubles digestifs.

Niveau ¹ d'ingestion	Conditions expérimentales	Période de restriction (R)		Période totale (R+AL)		Références
		Mortalité, %	Morbidité, %	Mortalité %	Morbidité %	
100	R1: 34 ² à 58j	28,1 ^a	56,3 ^a	28,1		(Boisot et al., 2003) ³
80	AL : 58 à 70j	20,8 ^{ab}	39,6 ^b	26,0		
60	(n = 96 lapins/lot 80/60 et 64 lapins/lot 100)	12,5 ^b	29,2 ^b	18,1		
100	R1: 35 ² à 54j	12,2 ^a	12,0 ^a	17,6 ^a	11,9 ^a	(Gidenne et al., 2009b)
80	AL: 54 à 70j	5,5 ^b	11,2 ^a	12,4 ^b	11,2 ^{ab}	
70	(n = 496 lapins/lot)	5,4 ^b	5,4 ^b	15,0 ^{ab}	6,7 ^b	
60		2,8 ^b	6,7 ^b	11,9 ^b	5,6 ^b	
100	R1: 35 ² à 63j	19,9 ^a	15,3 ^a	21,6 ^a	18,7 ^a	(Gidenne et al., 2008)
75	AL: 63 à 70j (n = 503 lapins/lot)	10,7 ^b	10,2 ^b	11,9 ^b	14,0 ^b	
100	R1: 35 ² à 63j	30,6 ^a	21,1			(Gidenne et al., 2009a)
80	(n = 170 lapins/lot)	25,3 ^b	19,4			
100	R1/2: 28 ² à 51j	5,6	13,8			(Martignon et al., 2009)
70	(n = 160 lapins/lot)	3,8	17,5			
100	R2: 35 ² à 49j	22,9 ^a	33,3 ^a	25,6 ^a	41,4 ^a	(Romero et al., 2010)
85	AL: 49 à 63j (n = 96 lapins/lot)	4,2 ^b	8,1 ^b	6,3 ^b	12,7 ^b	
100	R1: 35 à 84j	29,5 ^a				(Szendro et al., 2008)
90	(n = 40 lapins/lot)	28,1 ^a				
80		4,8 ^b				
100	R1: 35 ² à 63j			12,5		(El Maghraby, 2011)
87	AL: 63 à 77j			0		
73	(n = 32 lapins/lot)			3,1		
100	R1: 35 ² à 63j	7,0 ^a	8,9 ^a	8,2 ^a	11,5	(Gidenne et al., 2012a)
75	AL: 63 à 70j (n = 541 lapins/lot)	2,4 ^b	6,2 ^b	3,3 ^b	12,4	

D'après Gidenne *et al.* (2012a; 2012b) et Boisot *et al.* (2003).

Abréviations : AL : A volonté ; R1: limitation de l'ingestion par distribution quotidienne d'une quantité fixe d'aliment granulé ; R2 : limitation de l'ingestion par réduction du temps d'accès à la mangeoire ;

¹ en pourcentage de l'ingestion à volonté (100%= à volonté) ; ² âge au sevrage ; ³ animaux inoculés à l'EEL ;

a, b: écart significatif (P<0,05) entre AL et R, pour une même étude.

Dans un cadre expérimental, une réduction de l'ingéré de plus de 20% par rapport à l'ingestion libre permet de réduire la mortalité et la morbidité post-sevrage de près de la moitié (Gidenne et al., 2009b). Cette réduction peut être très variable d'une étude à un autre selon les conditions sanitaires, les pathologies rencontrées et la composition chimique des aliments utilisés (**Tableau 3**). Dans les élevages commerciaux, où les niveaux de restrictions appliqués sont souvent moins sévères qu'au niveau expérimental, la réduction de la mortalité serait de 2 à 3%, voire 7% dans certains cas, correspondant à une réduction d'un tiers de la mortalité (Lebas, 2007).

La restriction alimentaire permet de limiter les problèmes sanitaires en engraissement. Cependant, cette limitation reste très variable et le lien avec la qualité de l'aliment faiblement étudié. Une connaissance plus approfondie des mécanismes physiologiques sous-jacents et des interactions avec les valeurs nutritionnelles des aliments permettrait dès lors une optimisation des stratégies de restriction alimentaire.

II.B. REDUCTION DE L'INGESTION ET PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES

Limiter l'ingestion réduit naturellement la vitesse de croissance. Cependant, cette réduction n'est pas directement proportionnelle à la réduction de l'ingestion (**Figure 2**). Ainsi, pour une réduction de l'ingéré de 20% la croissance est réduite en moyenne de 15,6% (Gidenne et al., 2012b). Ceci permet par conséquent d'améliorer l'efficacité alimentaire de l'ordre de 5 à 10% avec une réduction de l'ingéré de 25% (Gidenne et al., 2012b) avec cependant des variations importantes selon les études. Rappelons également que la croissance, comme l'efficacité alimentaire, varie fortement en fonction de la composition nutritionnelle des aliments (**Figure 2**). Dans les élevages commerciaux, les éleveurs observent une amélioration de l'indice de consommation de 0,1 à 0,2 points (Lebas, 2007).

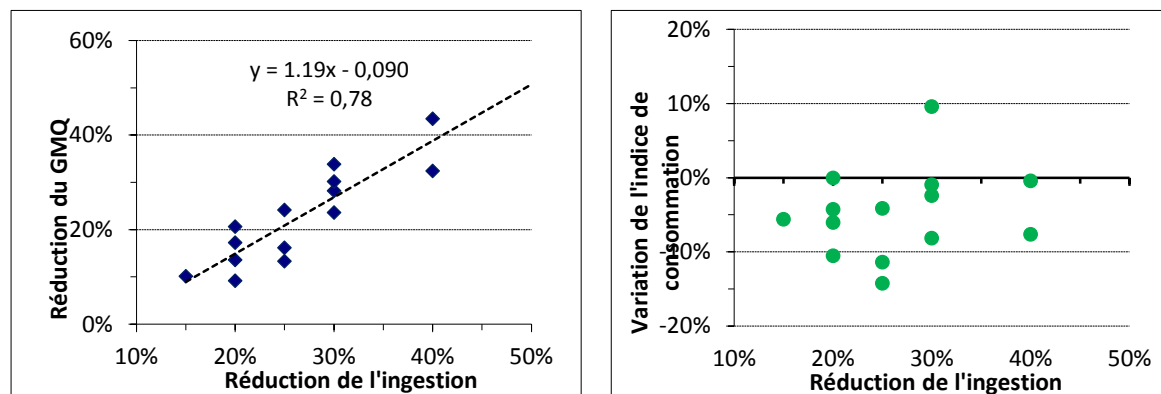


Figure 2 Variations de la croissance et de l'indice de consommation chez le lapin, selon l'intensité de la restriction alimentaire durant son application.

D'après Gidenne et al. (pour synthèse, 2012b)

Par ailleurs, lorsque les animaux reviennent à une alimentation à volonté une forte croissance compensatrice peut être observée (**Figure 3**) accompagnée d'une légère surconsommation par rapport aux animaux nourris à volonté depuis le sevrage (Gidenne et al., 2012b; Szendro et al., 2008), sans pour autant compenser entièrement le retard de croissance induit par la restriction alimentaire. Cela induit en dernier lieu une forte amélioration de l'efficacité alimentaire (Gidenne et al., 2009b; Perrier, 1998).

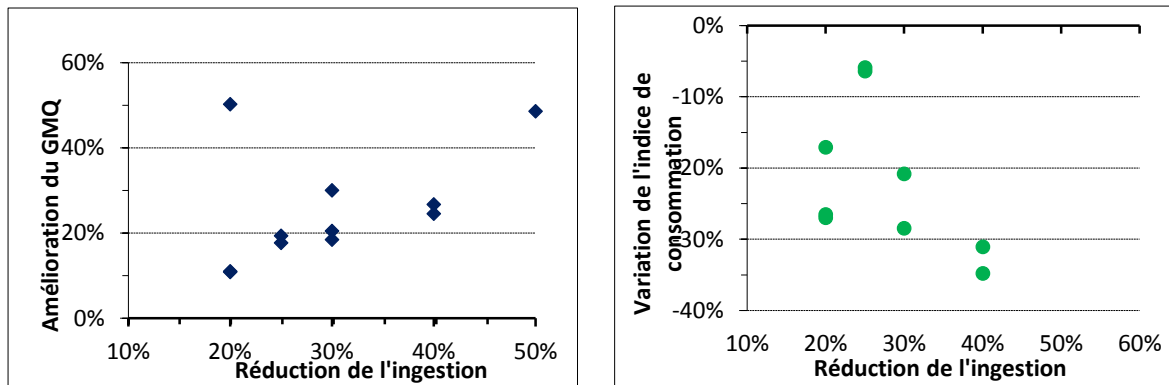


Figure 3 Variations de la croissance et de l'indice de consommation selon l'intensité de la restriction alimentaire lors du retour à volonté.
D'après Gidenne *et al.* (pour synthèse, 2012b)

Conjointement à la baisse de croissance, la limitation de l'ingestion, pouvant être suivie d'une période d'ingestion libre, tend à réduire le rendement à l'abattage à âge équivalent (Xiccato, 1999). La baisse de rendement s'explique principalement par une diminution de la croissance musculaire au profit du développement des organes internes. En effet, le poids relatif du tractus digestif plein et vide est plus important chez les animaux restreints que chez les animaux nourris à volonté (Bovera et al., 2008a), pénalisant ainsi le rendement, malgré une diminution du poids relatif de la peau (Metzger et al., 2009; Perrier, 1998). Cependant, à poids d'abattage équivalent, le rendement est nettement amélioré chez les animaux à ingestion limitée continue ; ce n'est pas le cas chez les animaux ayant bénéficié d'une période de retour à volonté favorisant le développement des organes internes (Ledin, 1984a; Perrier, 1998). La limitation de l'ingestion modifie également la qualité de la viande via une réduction de l'adiposité de 15 à 30% pour une réduction de l'ingestion de 20 à 30% (Bovera et al., 2008a; Foubert et al., 2008; Perrier, 1998) et semblerait réduire la concentration énergétique de la viande de 15% pour une réduction de l'ingestion de 20% alors que le taux protéique ne serait pas affecté (Xiccato, 1999). Selon les objectifs de poids vifs à l'abattage fixés par les abattoirs, l'éleveur peut donc choisir d'abattre des animaux plus légers, ou au contraire de prolonger la période d'engraissement de 3 à 5 jours pour une ingestion réduite jusqu'à 70% de l'à volonté, avec ou sans retour à volonté en fin

d'engraissement (Perrier, 1998; Xiccato, 1999), pour atteindre un poids équivalent aux animaux nourris à volonté.

En élevage commercial, différentes stratégies sont utilisées selon le niveau technique de l'atelier, en particulier le niveau sanitaire, ou selon l'objectif à atteindre pour le poids à la vente. Par exemple, certains éleveurs préfèrent appliquer une restriction alimentaire jusqu'à l'âge d'abattage afin d'optimiser le contrôle sanitaire, alors que d'autres ont recours à une alimentation libre durant la ou les dernières semaines d'élevage pour profiter du phénomène de croissance compensatrice (Lebas, 2007).

La restriction alimentaire permet d'améliorer l'état sanitaire et l'indice de consommation. Cependant, la croissance et le rendement à l'abattage s'en trouvent pénalisés, et ce malgré les phénomènes de croissance compensatrice observés lors d'un retour éventuel à une alimentation à volonté.

Une optimisation des stratégies alimentaires, notamment via une modulation de la qualité nutritionnelle de l'aliment, pourrait donc permettre d'améliorer les performances de croissance et le rendement à l'abattage tout en conservant les effets bénéfiques de la restriction alimentaire.

II.C. UNE SOLUTION ECONOMIQUEMENT RENTABLE

Aujourd'hui la majorité des éleveurs de lapins français appliquent une restriction alimentaire pour des raisons sanitaires mais aussi économiques. En effet, les bénéfices économiques d'une restriction alimentaire sont nombreux, et principalement liés à deux facteurs. Tout d'abord, la réduction des problèmes sanitaires (mortalité et morbidité) avec une réduction, voire suppression, des apports médicamenteux, permet de réduire les frais vétérinaires et d'obtenir une meilleure valorisation de la production. La réduction des dépenses médicamenteuses a en effet été estimée à 15 centimes d'euros par IA (Insémination Artificielle) en moyenne (Lebas, 2007). Enfin, la réduction de l'indice de consommation induit un coût alimentaire plus faible. Or, l'aliment constitue le poste principal de dépenses dans un élevage et représentait 53% du prix de vente d'un lapin en 2012 (Coutelet, 2012). Ce dernier point revêt aujourd'hui une grande importance avec la flambée des prix des matières premières, et donc de l'aliment (Coutelet, 2012). Martignon (2010) a ainsi estimé que la limitation de l'ingestion permettait d'améliorer la marge sur coût alimentaire d'environ 23 centimes d'euros par lapin sur la base économique de 2008.

III. COMMENT REDUIRE L'INGESTION ?

Au niveau expérimental comme en élevage commercial de nombreuses stratégies post-sevrage de limitation de l'ingestion se côtoient. L'ingéré peut être modifié de manière quantitative, mais aussi qualitative en modulant la valeur nutritionnelle des aliments. De plus, au sein de ces deux types de restriction, plusieurs approches existent et vont être détaillées.

III.A. RESTRICTION ALIMENTAIRE QUANTITATIVE

La restriction alimentaire quantitative, c.à.d. une réduction de la quantité d'aliment fournie à l'animal peut s'effectuer par 3 méthodes: une distribution d'une quantité fixe (et réduite par rapport à l'ingestion volontaire) d'aliment, une limitation du temps d'accès à l'eau de boisson ou du temps d'accès à la mangeoire.

Limiter l'ingestion via la réduction de la quantité d'aliment distribuée est la méthode la plus répandue en élevage (60 à 90% des éleveurs). Elle consiste à réduire d'un certain pourcentage la quantité d'aliment distribuée par rapport à l'ingéré théorique volontaire. Le contrôle précis de la quantité d'aliment ingéré constitue son principal avantage. Cependant, dans le cadre d'une alimentation manuelle cette méthode peut être fastidieuse. Cette tâche est grandement facilitée avec l'usage de chaîne d'alimentation automatique et programmable. Cependant, selon le matériel utilisé et la position relative des cages sur la chaîne de distribution, la quantité d'aliment distribuée peut différer sensiblement entre les cages, induisant un biais sur le niveau de restriction réel appliqué.

Du fait de sa simplicité d'usage, la restriction via la limitation du temps d'accès à l'eau de boisson serait employée dans 5 à 30% des élevages commerciaux. Pour une limitation du temps d'accès à l'eau de 1 à 3h par jour on observe une diminution de l'ingestion d'aliment granulé d'environ 20 à 30%. Malgré son efficacité démontrée sur la santé digestive post-sevrage (Boisot et al., 2005; Verdelhan et al., 2004), cette méthode soulève cependant des réticences en lien avec le bien-être animal, notamment dans les zones climatiques chaudes. De plus, malgré une corrélation forte entre la diminution de la consommation en eau et celle en aliment (Gidenne et al., 2012b), le suivi de l'ingestion solide reste moins précis qu'avec une limitation de la distribution d'aliment. Enfin, l'arrêt des rampes d'abreuvement pendant une grande partie de la journée est parfois peu compatible avec l'administration de médicaments via l'eau de boisson.

Enfin, la technique de limitation du temps d'accès à la mangeoire peut s'opérer au niveau journalier, avec une réduction du nombre d'heures d'accès à la mangeoire, ou hebdomadaire,

avec un ou deux jours de jeûne dans la semaine. Comme pour la restriction hydrique, cette dernière méthode soulève des questions d'éthique relatives au bien-être animal pouvant expliquer sa faible application en élevage (Lebas, 2007). En revanche, la limitation journalière du temps d'accès à la mangeoire a permis d'obtenir des résultats similaires à ceux observés avec une réduction quantitative du distribué (Jerome et al., 1998; Salaün et al., 2011) et est préconisée par certains fabricants d'aliments pour préserver la santé tout en améliorant la rentabilité.

3 méthodes de restriction alimentaire prédominent ainsi dans les élevages commerciaux :

- La plus commune : la distribution d'une quantité fixe (et réduite par rapport à l'ingestion volontaire) d'aliment. Méthode présentant l'avantage d'être précise mais pouvant être fastidieuse dans le cas d'une alimentation manuelle.

- Une limitation du temps d'accès à l'eau de boisson. Méthode facile à mettre en place, mais moins précise que la 1^{ère} et posant des problèmes éthiques.

- Une limitation du temps d'accès à la mangeoire. Méthode efficace et appliquée dans certains élevages commerciaux mais toujours moins précise que la 1^{ère} méthode.

III.B. RESTRICTION ALIMENTAIRE QUALITATIVE

L'ingestion volontaire de l'animal peut également être modulée en modifiant la composition chimique de l'aliment, et en particulier sa concentration en fibres, elle-même liée à la concentration énergétique.

En effet, le lapin régule son ingestion en fonction du niveau énergétique de l'aliment (Gidenne et al., 2010c) dans une gamme de concentration énergétique supérieure à 9 MJ d'ED/kg, et sans modifications majeures de l'apport en lipides ou en fibres très digestibles. Dans ces conditions, l'ingéré énergétique volontaire est fonction du poids métabolique (PM, équivalent au poids vif à la puissance 0,75) de l'animal (Xiccato, 1999) et est de 0,9 à 1 MJ d'ED/kg PM (Xiccato and Trocino, 2010). Dans cette gamme, le lapin consommera donc plus d'aliment si celui-ci est moins énergétique. La composition de l'aliment étant un levier important de la santé et de la croissance, ce volet sera détaillé et approfondi dans le dernier chapitre de ce mémoire.

III.C. COMPORTEMENT D'INGESTION ET BIEN-ETRE CHEZ LE LAPIN RESTREINT

La restriction alimentaire modifie de manière drastique le comportement alimentaire du lapin. Dans le cadre d'une alimentation à volonté, le lapin a une consommation relativement étalée sur

la journée, même si celle-ci a préférentiellement lieu la nuit (Martignon, 2010; Prud'hon et al., 1975). Chez le lapin restreint, l'ingestion ne suit plus le rythme nyctéméral, mais a lieu dans les heures suivant la distribution (Figure 4). Ainsi un pic de consommation est observé dans l'heure qui suit la distribution, puis la totalité de l'aliment est consommé dans les 6 à 10h suivantes selon le niveau de restriction alimentaire appliqué (Gidenne and Feugier, 2009; Martignon et al., 2011). Ce nouveau rythme d'ingestion est également accompagné d'un comportement d'anticipation du moment de la distribution. En effet, durant cette période, chez de nombreuses espèces, l'activité locomotrice, la température corporelle et la stimulation du système digestif sont augmentés (pour synthèse, Froy, 2007). Enfin, les animaux semblent compenser la réduction de l'ingestion via une consommation en eau accrue de l'ordre de 10% pour une réduction de l'ingestion de 20% (Martignon, 2010). Lorsque les animaux sont remis à volonté après une période de 4 semaines de restriction alimentaire, les animaux maintiennent pendant deux à trois jours cette habitude d'ingestion rapide puis retrouvent un rythme d'ingestion classique (Martignon, 2010).

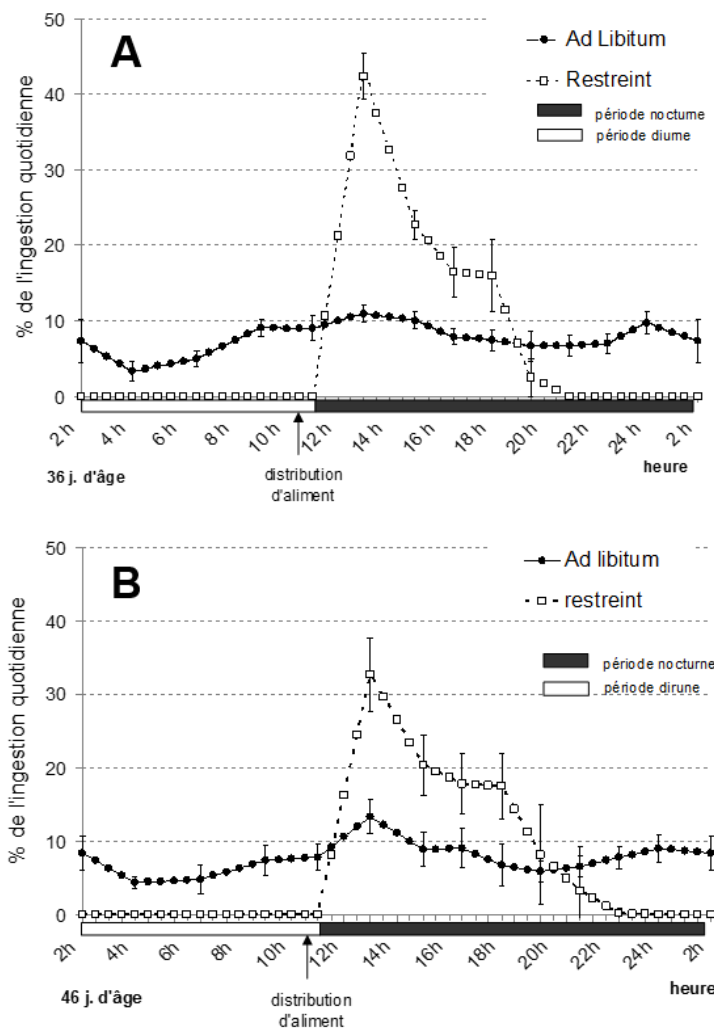


Figure 4 Profils d'ingestion du lapin nourri à volonté (Ad libitum) ou en ingestion limitée à 75% de l'à volonté.

D'après Martignon et al. (2009).
A, B: mesures réalisées 8 jours (A) et 16 jours (B) après l'application de la restriction alimentaire depuis le sevrage (28j)

L'absence de faim et de soif fait partie des cinq principes du bien-être animal établis par le Farm Animal Welfare Council (1992). Cependant, la restriction alimentaire permet aussi de réduire les problèmes sanitaires permettant de répondre à un autre de ces cinq principes : la bonne santé et l'absence de blessure ou de douleur. La dualité de l'utilisation de la restriction alimentaire soulève dès lors des questions d'éthique. En effet, une durée quotidienne prolongée du jeûne pourrait induire le développement de comportements anormaux liés à l'ennui tels que les stéréotypies. De même, la réduction de la quantité d'aliment disponible pourrait provoquer des comportements d'agressivité au sein d'une même cage. Cependant, la seule étude disponible à ce sujet n'indique pas d'augmentation des phénomènes d'agressivité ou de stéréotypie ni du nombre de blessures en fin d'engraissement chez les animaux soumis à une restriction alimentaire de l'ordre de 25% (Martignon et al., 2011).

La restriction alimentaire, présente dès lors de nombreux avantages dans un contexte de réduction des intrants médicamenteux. Elle permet de maintenir un bon état sanitaire tout en améliorant l'efficacité alimentaire, et par conséquent la rentabilité. Plusieurs mécanismes physiologiques sous-jacents permettraient d'expliquer ces effets bénéfiques, comme l'immunité ou l'activité digestive.

Chapitre 2 - Le Système digestif : un ensemble complexe modulable par l'alimentation

Le système digestif est un ensemble complexe à l'interface entre l'animal et son milieu digestif ayant deux fonctions primordiales. Sa première fonction est, de façon intuitive, une fonction de nutrition. Le système digestif permet ainsi à l'animal d'assimiler les différents éléments nutritifs présents dans les aliments. Le rôle de défense du système digestif, est quant à lui moins évident mais tout aussi important. En effet, l'épithélium digestif est une muqueuse, qui, mal protégée, constitue une voie d'entrée de prédilection pour les pathogènes. Le microbiote commensal, en interaction permanente avec le système immunitaire de l'hôte, permettent dès lors de protéger ce milieu. Dans cette partie seront abordés dans un premier temps le rôle nutritionnel du système digestif puis son rôle de défense après un bref rappel d'anatomie.

L'effet de la restriction alimentaire sera évalué pour chaque fonction du système digestif. Cependant, nous nous attarderons ici que sur les effets de la restriction alimentaire de courte durée chez un animal jeune et non sur les effets de la restriction alimentaire chronique, étudiée principalement sur des modèles souris et rats à des visées humaines.

I. LE LAPIN, UN HERBIVORE AU SYSTEME DIGESTIF PARTICULIER

Le lapin est un mammifère monogastrique herbivore appartenant à l'ordre des lagomorphes. En élevage, l'alimentation du lapin en croissance est assurée par l'apport de granulés à haute teneur en matière sèche. Cet aliment est caractérisé par une formulation souvent complexe avec la participation de nombreuses matières premières pour satisfaire les différents besoins nutritionnels notamment en fibres, énergie et protéines (**Cf Chapitre 3**).

Le système digestif du lapin est composé d'une succession de compartiments dont la muqueuse entre en contact avec le bol alimentaire : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le caecum, le colon et enfin le rectum. A ces organes s'ajoutent des glandes sécrétoires annexes telles que le foie, les glandes salivaires et le pancréas (**Figure 5**).

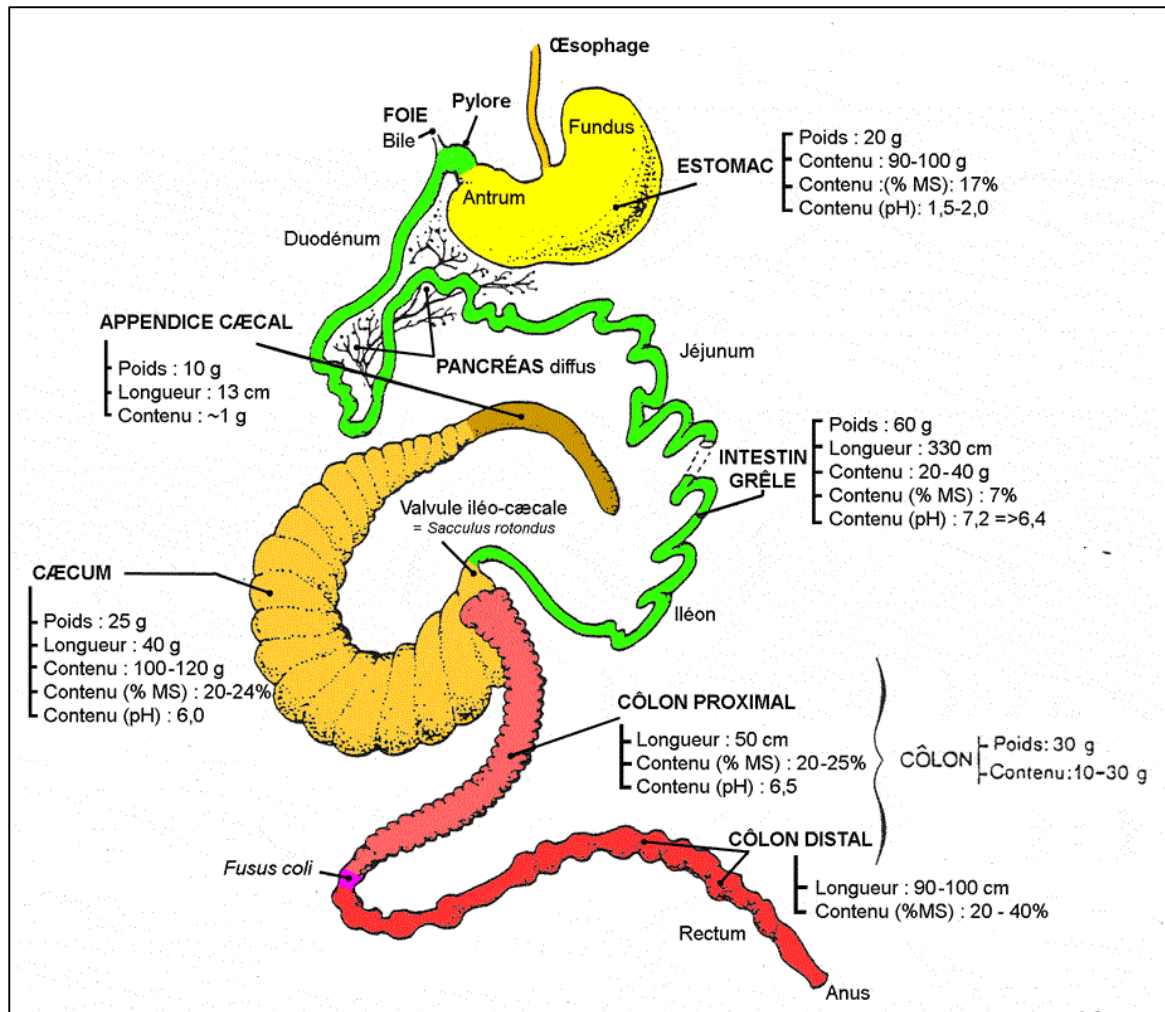


Figure 5 Morphologie générale du tube digestif du lapin à 12 semaines d'âge. D'après Lebas *et al.* (1996).

Le système digestif du lapin présente cependant quelques particularités qu'il convient de préciser (Snipes and Snipes, 1997). En effet, le lapin, contrairement à la majorité des autres monogastriques, possède un caecum très développé servant de fermenteur digestif. 90% du volume de l'ensemble allant de l'intestin grêle au colon y est attribué alors que chez la plupart des autres espèces domestiques, telles que le chat, le chien ou le porc, celui-ci n'en constitue que 4 à 11%. Conjointement, l'intestin grêle représente 63% de la longueur de cet ensemble (**Figure 6**) mais seulement 12% du volume. Enfin, le temps de rétention de l'aliment, de 17h en moyenne, est également plus court chez le lapin que dans d'autres espèces herbivores (Warner, 1981). Ceci est partiellement dû au comportement de caecotrophie, spécifique de l'ordre des lagomorphes dont le lapin fait partie (cf p.53).

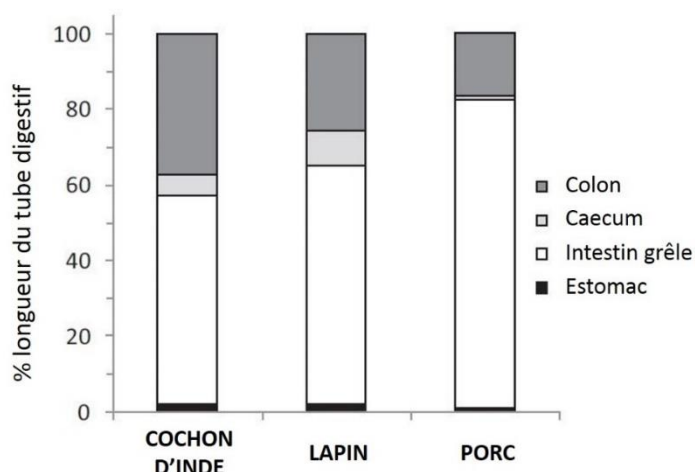


Figure 6 Proportions en longueur du tube digestif des différents compartiments digestifs chez le cochon d'inde, le lapin et le porc. D'après Merchant et al. (2011)

En outre, différents organes lymphoïdes, diffus ou organisés, sont présents tout au long du tube digestif. Ces organes sont représentés au niveau de l'intestin grêle par les plaques de Peyer mais aussi des agrégats diffus de cellules lymphoïdes. Une spécificité du lapin est le développement important de deux organes lymphoïdes, en amont du caecum avec le *sacculus rotundus*, et en aval avec l'appendice vermiforme (Merchant et al., 2011) que nous aborderons plus en détails en troisième partie (p.60).

II. RÔLE NUTRITIONNEL

Le rôle nutritionnel du tube digestif peut essentiellement se décomposer en 2 parties : une partie haute reliant la bouche à l'intestin grêle et une partie basse reliant le caecum au rectum. En effet, les activités digestives enzymatiques endogènes ont principalement lieu dans la partie haute alors que la digestion microbienne a lieu dans la partie basse permettant une dégradation différentielle des composants alimentaires (**Tableau 4**). Dans cette partie nous détaillerons séparément les mécanismes de digestion ayant lieu dans ces deux sections du tube digestif.

Tableau 4 Dégradation des différents composés alimentaires dans les différents compartiments du tractus digestif.

	bouche	estomac	intestin	caecum
Protéines	-	++	+++	++
Lipides	-	++	+++	+
Glucides non fibreux	+	-	+++	+
Fibres	-	-	-	+++

Symboles : - pas de dégradation ; + peu de dégradation ; ++ dégradation partielle ; +++ dégradation majoritaire.

II.A. DIGESTION ENZYMATIQUE ENDOGENE

II.A.1. Une lyse efficace de la bouche à l'estomac

La digestion de l'aliment commence dès sa préhension dans la bouche ou celui-ci subit des dégradations mécaniques et chimiques. Des mouvements masticateurs latéraux permettent ainsi de réduire la taille des particules alimentaires (Schwartz et al., 1989) alors que différentes enzymes, principalement des amylases et des galactosidases, assurent le début de la dégradation chimique (Blas et al., 1988; Davies and Davies, 2003).

Lors de la déglutition, le bol alimentaire transite alors via l'œsophage vers l'estomac où la lyse chimique se poursuit durant 1,7 à 4h (Gidenne, 1987), aboutissant à la production d'un chyme gastrique. Une des principales caractéristiques du milieu stomacal du lapin est sa forte acidité, comparativement à d'autres espèces (pH=1,0 à 2,6), obtenue via la sécrétion d'acide chlorhydrique (Davies and Davies, 2003; Marounek et al., 1995). Cette acidité permet notamment d'activer les enzymes digestives, de faciliter la dénaturation des protéines mais aussi d'inactiver et lyser les micro-organismes ingérés, rendant l'estomac et le début de l'intestin grêle quasiment stériles (Davies and Davies, 2003; Martinsen et al., 2005). Le brassage du bol alimentaire avec les sucs gastriques a lieu de manière indirecte via des mouvements intestinaux ou l'activité locomotrice de l'animal, impactant sur la motilité gastrique (Davies and Davies, 2003). A travers ce brassage l'action digestive s'effectue essentiellement sur trois leviers :

- Les protéines sont dénaturées et lysées en peptides via l'action des pepsines, elles-mêmes activées par l'acidité stomacale (Davies and Davies, 2003).
- Les acides gras à chaînes courtes et moyennes sont lysés par la lipase gastrique (Denigris et al., 1988; Moreau et al., 1988).
- La vitamine B12 est absorbée grâce à la sécrétion d'un facteur intrinsèque (Serfilippi and Donaldson, 1986).

Les caecotrophes ingérés « échappent » cependant à cette règle. En effet, ceux-ci ne sont pas mastiqués, et restent donc protégés quelques heures par leur enveloppe de mucus lors de leur passage dans l'estomac. Les fermentations microbiennes peuvent donc se poursuivre, conduisant à une production d'acide lactique. Le pH peut alors atteindre une valeur de 3 durant la période de caecotrophie (Griffiths and Davies, 1963).

II.A.2. Une lyse et une absorption importante dans l'Intestin grêle

Le chyme gastrique transite ensuite vers l'intestin grêle. Celui-ci mesure environ 3 mètres de long chez le lapin adulte et peut se décomposer en trois segments: le duodénum, le jéjunum et l'iléon qui débouche sur le caecum. Le temps de rétention dans l'intestin grêle, de l'ordre de 1h30, est relativement court par rapport aux autres espèces herbivores, mais peut varier considérablement selon la quantité et la qualité de l'ingéré (Davies and Davies, 2003; Vernay and Raynaud, 1975).

Les actions de lyse amorcées au niveau de l'estomac se poursuivent dans l'intestin avec quatre actions principales permises par des sécrétions intestinales, pancréatiques ou hépatiques:

- La neutralisation de l'acidité du chyme gastrique via la sécrétion pancréatique et duodénale d'ions bicarbonates ramenant le pH intestinal à des valeurs de 6,5 à 7 (Davies and Davies, 2003; Marounek et al., 1995).
- La protéolyse via les protéases pancréatiques (trypsine, chymotrypsine, élastase et carboxypeptidases pancréatique). Les produits de cette dégradation sont ensuite hydrolysés par les peptidases de la bordure en brosse intestinale, principalement dans le duodénum et le jéjunum, en peptides ou en acides aminés (Davies and Davies, 2003).
- La lyse des lipides via diverses enzymes pancréatiques. La lipase et la colipase pancréatique permettent l'hydrolyse des triglycérides alors que les estérases sont responsables de l'hydrolyse des autres composés lipidiques (phospholipide, cholestérol,...). L'acide cholique et chenodeoxycholic, présents dans la bile sécrétée par le foie, agissent comme détergents et facilitent la lyse et l'absorption des matières grasses (Davies and Davies, 2003). L'hydrolyse des lipides conduit à la libération d'acides gras libres, de mono- et di-glycérides, de glycérol, de phosphatidylcholine et de cholestérol.
- La lyse enzymatique des glucides, bien que faible au niveau de l'intestin grêle du lapin. Elle se cantonne ainsi à la lyse des glucides non fibreux grâce à l'amylase pancréatique (Corring and Rérat, 1983) ainsi qu'à la formation d'oses simples via l'intervention des saccharidases intestinales.

En dehors des activités de lyse, l'intestin grêle représente le site principal d'absorption des nutriments. La paroi intestinale est constituée de replis circulaires macroscopiques, les valvules conniventes, dont la muqueuse est à son tour constituée d'un grand nombre d'invaginations appelées villosités. Enfin, tous les entérocytes, cellules principales de la muqueuse intestinale, présentent à leur surface apicale une multitude de replis, les microvillosités, aussi appelées « bordure en brosse » (**Figure 7**). Tous ces replis de la muqueuse intestinale permettent dès lors

d'augmenter considérablement la surface d'échange entre le bol alimentaire et le milieu endogène, facilitant l'absorption des nutriments. Les produits de la digestion sont ainsi absorbés principalement au niveau des bordures en brosse du jéjunum (Davies and Davies, 2003). Le transport de peptides ou d'acides aminés, issus de la lyse des protéines, d'acides gras libres et de monoglycérides, issus de la lyse des lipides, et d'oses simples, issus de la lyse des glucides, peut s'effectuer par diffusion passive ou par l'intermédiaire de transporteurs membranaires (Erickson and Kim, 1990; Thomson et al., 1993; Wright et al., 2003). Les acides gras à chaînes courtes ou moyenne sont quant à eux, pour la plupart, transportés directement dans la circulation sanguine (Ramirez et al., 2001).

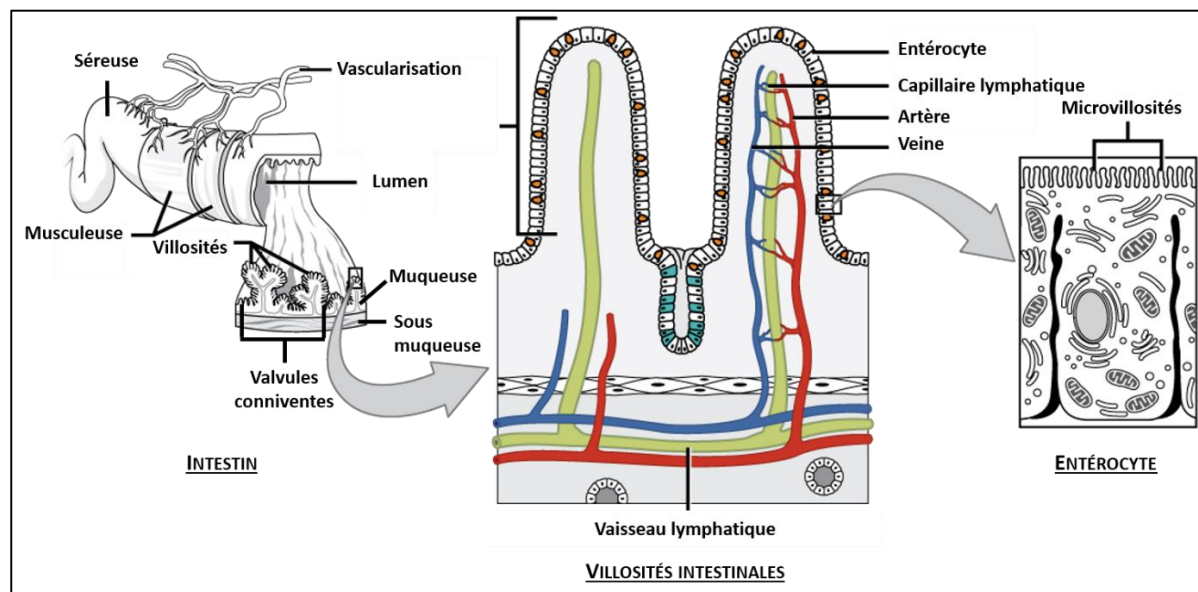


Figure 7 Anatomie de l'intestin grêle et histologie de la muqueuse digestive.

Adapté d'après OpenStax College (OpenStax CNX. 21 juin 2013)

Dès lors, une grande partie des nutriments présents dans les aliments auront été digérés. Cependant, comme pour tous les mammifères, le système digestif enzymatique n'est pas équipé pour digérer les composés glucidiques et phénoliques des parois végétales (ou fibres).

La digestion « haute » permet donc en un premier temps de lyser les nutriments au niveau de l'estomac et de l'intestin. Les produits de la dégradation protéique (peptides, acides aminés), lipidique (acides gras libres, monoglycérides) et glucidique (oses simples) sont ensuite absorbés au niveau de la bordure en brosse de l'intestin.

Cette digestion endogène ne permet cependant pas de tirer profit des nutriments présents dans les matrices fibreuses des parois végétales. La dégradation microbienne vient alors compléter cette première digestion.

II.B. DIGESTION MICROBIENNE

II.B.1. Dégradation microbienne conséquente dans le caecum

A la sortie de l'iléon, le bol alimentaire transite vers la base du caecum via le *sacculus rotundus*. Celui-ci constitue un fermenteur digestif en cul de sac (**Figure 8**) par rapport à l'axe intestin grêle-colon (Snipes and Snipes, 1997). C'est aussi le compartiment digestif dans lequel les particules alimentaires vont séjourner le plus longtemps. En effet, la durée de rétention caeco-rectale des particules grossières (> 300 µm) oscillerait entre 7 et 12 heures alors que celle des particules plus fines serait de 26 à 42 heures (Gidenne, 1997).

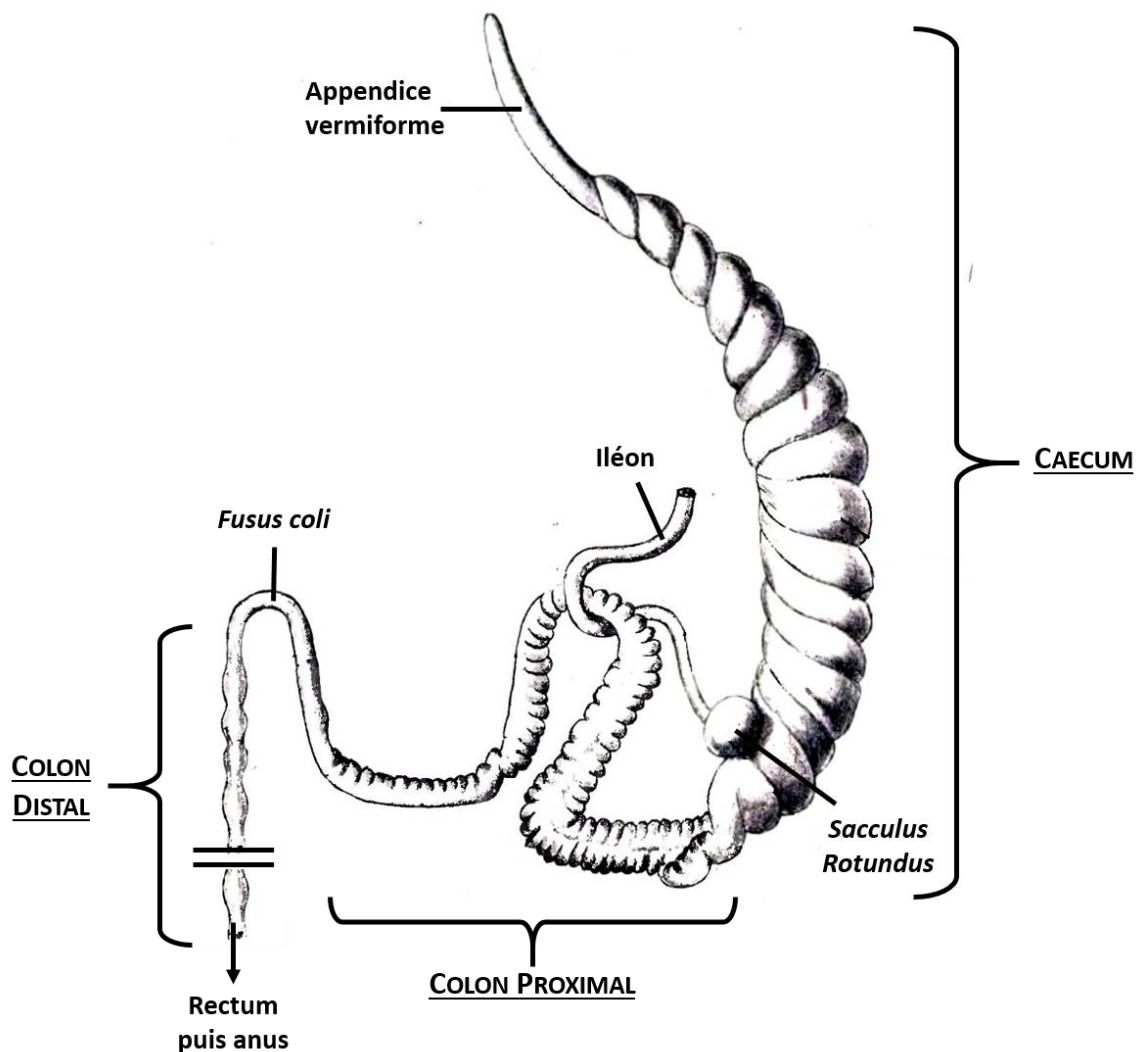


Figure 8 Anatomie des segments caeco-rectaux.

Adapté d'après Ramsay and Stewart (1889).

Le microbiote caecal particulièrement abondante chez le lapin (cf p.67) permet de dégrader et de transformer les nutriments résistants aux enzymes de l'hôte, à savoir les fibres et les composés

non dégradés auparavant (amidon résistant, résidus protéiques, etc..) mais aussi les molécules endogènes produites dans l'intestin, essentiellement protéiques (mucus, cellules épithéliales desquamées,...) (Fonty and Gouet, 1989). L'activité microbienne se joue alors 2 étapes principales:

1/ Les polymères complexes sont hydrolysés par différentes enzymes bactériennes (polyssacharidases, glycosidases, proteases, peptidases). L'activité fibrolitique au sein du caecum est dominée par ordre d'importance par les pectinases, les xylanases et les cellulases (Carabaño et al., 2010).

2/ Les produits solubles de cette lyse (monosacharides, acides aminés,...) sont ensuite utilisés par des microorganismes à activité hydrolytique ou fermentaire. Cette utilisation permet la production des protéines et des enzymes structurelles des microorganismes eux-mêmes, mais aussi la production de divers « coproduits » : acides gras volatils (AGV), ammoniac (NH₃), métabolites intermédiaires (acides lactique, succinique et formique) et gaz (CO₂, CH₄, H₂) (Davies and Davies, 2003).

Les produits du métabolisme microbien sont ensuite utilisés par l'hôte via une absorption au sein du caecum ou du côlon par diffusion passive, comme c'est le cas pour les AGV et l'ammoniac. Les microorganismes eux-mêmes, essentiellement des bactéries, sont partiellement utilisés via l'ingestion et la digestion intestinale des caecotrophes. L'assimilation des AGV permet ainsi à elle seule de couvrir 10 à 50% des besoins énergétiques d'entretien du lapin adulte (Gidenne, 1994; Hoover and Heitmann, 1972; Marty and Vernay, 1984) alors que l'ingestion de caecotrophes contribuerait en moyenne pour 15% des protéines totales ingérées (Garcia et al., 2004). De même, 30 à 50% de la fraction digestible de la matière organique serait digérée dans les compartiments caeco-coliques (Gidenne, 1992; Gidenne et al., 2000), indiquant l'importance du microbiote caecal dans l'efficacité digestive globale.

II.B.2. Transit dans le côlon et production différentielle de caecotrophes ou de crottes dures

A la sortie du caecum, le bol alimentaire transite dans le côlon. Celui-ci peut être divisé en deux parties : le côlon proximal et le côlon distal séparés par le *fusus coli* (**Figure 8**). L'activité de digestion est limitée dans ce compartiment, la principale fonction du côlon étant la production séquentielle de caecotrophes de crottes dures. Cette production suit le rythme d'ingestion du lapin, à savoir le rythme circadien dans le cadre d'une alimentation à volonté (Laplace, 1978) et l'heure de distribution de l'aliment dans le cas d'une restriction alimentaire (Fioramonti and

Ruckebusch, 1974; Hornicke et al., 1984). L'excrétion des crottes dures a lieu lorsque l'ingestion est maximale, et l'excrétion des caecotrophes a lieu environ 8 heures après.

La production de crottes dures implique plusieurs mécanismes de séparation mécanique permettant de refouler les particules fines (< 300µm) et les substances solubles dans l'eau vers le caecum pour y être plus amplement métabolisées par le microbiote (Björnhag, 1972; Pickard and Stevens, 1972). En revanche, lors de la production de caecotrophes, l'expression de ces mécanismes est fortement diminuée; la composition de ces excréta est ainsi relativement semblable à celle du contenu caecal (Ruckebusch and Hörnicke, 1977). Les crottes dures sont ainsi majoritairement constituées de fibres alors que les caecotrophes sont encore riches en nutriments (protéines, vitamines et minéraux) utilisables par l'animal (**Tableau 5**).

Tableau 5 Composition chimique des caecotrophes et des crottes dures.

	Contenu caecal	Caecotrophes	Crottes dures
Matière sèche (%)	20	27-34	47-53
Protéines brutes (%MS)	28	30	13-17
Cellulose brute (%MS)	17	18-22	30-38
Matière organique (%MS)		85-92	86-95
Lipides (%MS)		2.2	2.7

Adapté d'après Carabaño et al. (2010)

La digestion microbienne, ayant lieu dans le caecum, permet de dégrader les matières fibreuses et de valoriser les produits protéiques endogènes. Les produits du métabolisme microbien et les protéines microbiennes elles-mêmes sont ensuite valorisés par l'animal via une absorption au niveau caecal ou via la consommation des caecotrophes produits dans le côlon. Le microbiote caecal participe de ce fait à l'efficacité digestive globale du lapin.

II.C. EFFICACITE DIGESTIVE GLOBALE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE

La digestibilité globale des différents nutriments peut être estimée via des mesures de quantité et de qualité des aliments ingérés et des fèces excrétées selon la formule suivante :

$$Digestibilité_x(\%) = \frac{(Ingéré_{MS} \times [X_{aliment}]) - (Excrété_{MS} \times [X_{fèces}])}{Ingéré_{MS} \times [X_{aliment}]} \times 100$$

Avec X le nutriment d'intérêt et [X] sa concentration exprimée en g/kg (ou en kcal/kg pour l'énergie).

Tableau 6 Digestibilité des différents nutriments chez le lapin en croissance.

	Digestibilité Iléale (%)	Digestibilité caecale (%)	Digestibilité Fécale (%)
Matière organique			70-90
Protéines	55-75	8-15	65-85
Energie			50-90
Lipides			70-95
Amidon	85-100		85-100
Fibres	Lignine		10-15
	Cellulose	7-19	15-28
	Hémicelluloses		25-46
	Pectines		40-76

D'après Blas et Gidenne (2010), Gidenne et al. (1996; 2010a), Villamide et al. (2010b) and Xiccato (2010).

Chez le lapin en croissance nourris à volonté l'amidon ainsi que les lipides sont quasiment entièrement digérés alors que les protéines et l'énergie ne sont que partiellement digérées (**Tableau 6**). La fraction fibreuse est plus ou moins dégradée selon les composants. Ainsi les méthodes de laboratoire actuelles permettent d'analyser de manière séparée ces différentes fractions (**Figure 9**). La lignine correspond ainsi à la mesure de l'ADL, la cellulose à l'ADF-ADL et les hémicelluloses à NDF-ADF.

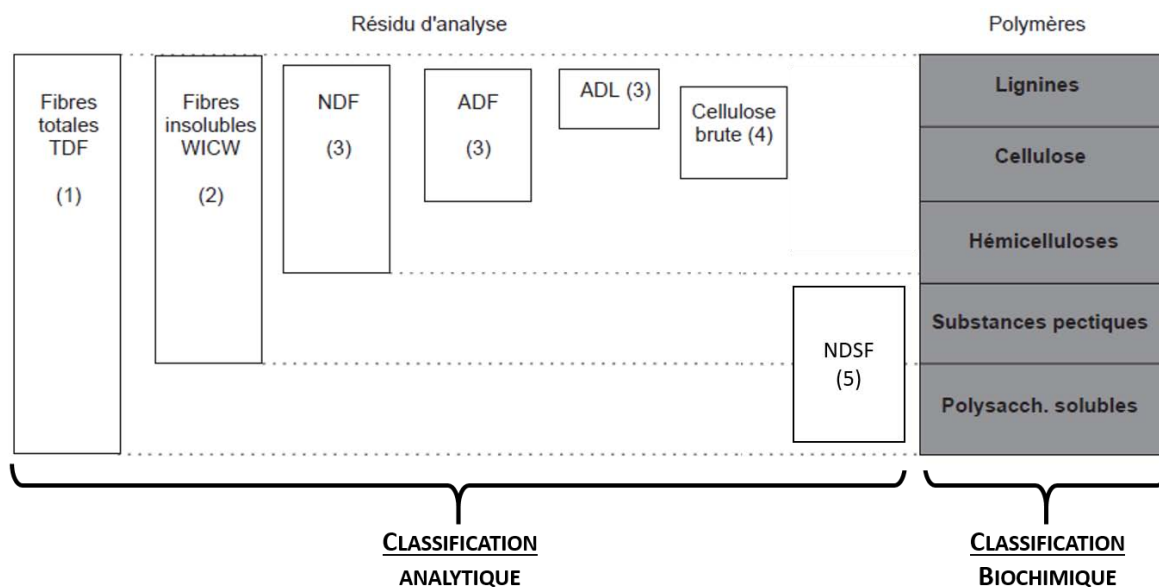


Figure 9 Classifications des différentes fractions fibreuses d'un aliment.

Adapté d'après Gidenne et al. (1996)

Abréviations : WICW: Water insoluble cell-wall; NDF : Neutral detergent fibre ; ADF : Acid detergent fibre ; ADL : Acid detergent lignin; NDSF: Neutral Detergent Soluble Fibre.

Méthodes de dosage: (1) Lee et al. (1992); (2) Carré et Brillouet (1989) ; (3) Van Soest et al. (1991); (4) Weende (A.O.A.C., 1995a); (5) Somme des pectines solubles et insolubles dans l'eau, des beta-glucanes, des fructanes et des oligosaccharides de degré de polymérisation >15, Hall et al. (1997).

II.D. MODULATION DE L'EFFICACITE DIGESTIVE VIA LA REGULATION DE L'INGESTION

La restriction alimentaire réduit la quantité de nutriments ingérés, modifiant par conséquent la physiologie et les mécanismes de digestion mis en place par l'animal. Comme précisé précédemment, la restriction alimentaire augmente le poids relatif du tractus digestif plein et vide (Bovera et al., 2008a; Xu et al., 2011), indiquant un développement préférentiel des organes internes. Le développement préférentiel du tractus digestif est-il accompagné d'une amélioration des fonctions digestives ?

II.D.1. Modulation du transit digestif

Chez le lapin en croissance, la restriction alimentaire augmente le temps de rétention des aliments dans le segment caeco-colique. En effet, une restriction alimentaire comprise entre 20 et 40% augmente le temps de rétention des particules de l'ordre de 45 à 65% (Gidenne and Feugier, 2009; Ledin, 1984a). De plus, l'activité motrice du caecum et de l'intestin est augmentée chez les animaux soumis à une restriction alimentaire (Fioramonti and Ruckebusch, 1974). Ces modifications de motricité et de vitesse de transit pourraient dès lors affecter la digestibilité des nutriments via une augmentation de la durée de contact des enzymes endogènes et microbiennes avec l'aliment mais aussi via un meilleur brassage du bol alimentaire.

II.D.2. Modulation de la dégradation enzymatique et de l'absorption intestinale

Chez les lapins restreints, l'ingestion se fait sur une durée très courte, le pH gastrique s'en trouve dès lors augmenté après le repas (Gidenne and Feugier, 2009; Martignon et al., 2010). Cependant, cette augmentation serait transitoire et due à l'augmentation rapide du flux gastrique induisant une augmentation de la dilution des sucs gastriques (Gidenne et al., 2012b). La seule étude de physiologie digestive réalisée sur l'espèce cunicole ne révèle pas de modifications de la physiologie de l'intestin avec la restriction alimentaire et concordent avec les résultats obtenus sur d'autres espèces telles que la souris (Ferraris et al., 2001). La hauteur des villosités et la profondeur des cryptes est ainsi similaire entre les animaux nourris à volonté et ceux soumis à une restriction alimentaire de l'ordre de 25% (Martignon et al., 2010).

Concernant la dégradation enzymatique des aliments, aucune étude n'a, à ce jour, été menée chez le lapin pour évaluer l'effet d'une restriction alimentaire sur l'activité enzymatique au niveau de l'estomac. En revanche, l'activité de la maltase iléale ne semble pas affectée par la restriction alimentaire, alors que les sécrétions enzymatiques sont habituellement fonction de l'ingéré

(Martignon et al., 2010). Des résultats similaires avaient été obtenus au niveau duodéal et jéjunal chez le poulet après une semaine de restriction alimentaire sévère (45 à 70% de l'à volonté) (Duarte et al., 2011; Fassbinder-Orth and Karasov, 2006). En revanche, l'activité et l'expression de l'aminopeptidase seraient augmentées chez le poulet. Ces mesures pourraient cependant être affectées par le moment de prélèvement et sa position relative face au pic d'ingestion de l'animal. Des études dynamiques mériteraient donc d'être menées sur les activités enzymatiques intestinales chez le lapin soumis à une limitation de l'ingestion.

Enfin, la restriction alimentaire augmenterait l'absorption intestinale de certains nutriments chez la souris adulte. L'application d'une restriction alimentaire de 30% sur une durée de 24 jours induirait ainsi une amélioration de l'absorption de fructose alors que son application sur une durée prolongée (270 jours) permettrait également d'améliorer l'absorption du glucose et de la proline de 20 à 100% (Ferraris et al., 2001). De même, chez le poulet, la restriction alimentaire augmenterait l'expression de certains transporteurs membranaires de peptides (PepT1, SGLT1) (Duarte et al., 2011; Gilbert et al., 2008). Ces résultats indiqueraient que la restriction alimentaire améliore l'absorption intestinale des nutriments disponibles.

II.D.3. Modulation de l'activité microbienne

La restriction alimentaire modifie le rythme d'ingestion du lapin ; dès lors les rythmes de fermentations s'en trouvent bousculés, et rendent la comparaison de l'activité fermentaire entre animaux nourris à volonté ou restreint plus complexe. Cependant, lorsque les rythmes d'ingestion sont synchronisés le pH caecal et la quantité totale d'AGV ne semblent pas affectés par le niveau d'ingestion. En revanche, une restriction alimentaire de 25% diminuerait le potentiel redox d'environ 10% et modifierait le profil fermentaire avec une augmentation de la proportion d'acétate et une diminution de celle en butyrate (Martignon, 2010). L'activité fibrolytique des bactéries caecales ne semble pas non plus affectée par la restriction alimentaire (Gidenne and Feugier, 2009; Martignon et al., 2010).

II.D.4. Modulation de l'efficacité digestive globale

De nombreux auteurs ont observé une amélioration de la digestibilité fécale de certains nutriments chez le lapin en croissance avec une régulation de l'ingestion (**Tableau 7**). Celle-ci concerne principalement l'énergie et les protéines (2 à 10% d'amélioration selon les études) alors que la digestibilité des fibres n'est que peu affectée (Gidenne et al., 2012b). Ceci permet

d'expliquer partiellement l'amélioration de l'efficacité alimentaire (cf Chapitre 1). Cependant, l'effet de la restriction alimentaire sur la digestibilité est sujet à de très fortes variations qui ne seraient pas corrélées à la durée ou à l'intensité de la restriction appliquée. Trois facteurs principaux permettraient d'expliquer les variations observées:

- La période de mesure: en effet, Diaz et al. (1999) n'ont trouvé aucune amélioration de la digestibilité, même avec une restriction alimentaire forte lorsque la mesure de digestibilité était effectuée immédiatement après le début de la restriction. Une durée d'adaptation à l'aliment de 8 à 10 jours semblerait donc nécessaire pour observer une amélioration de la digestibilité.
- L'état sanitaire est susceptible de moduler la digestibilité fécale. Aucun élément bibliographique n'est cependant disponible dans le cadre de l'application d'une restriction alimentaire.
- La composition nutritionnelle des aliments peut interagir avec la stratégie de rationnement. En effet, Gidenne et al. (2009a) ont montré une amélioration de l'efficacité digestive chez le lapin restreint nourri avec un aliment riche en énergie, alors que la restriction alimentaire réduisait l'efficacité digestive avec un aliment témoin.

Une connaissance approfondie des interactions entre qualité nutritionnelle et niveau d'ingestion est dès lors nécessaire afin de définir correctement les effets de la restriction alimentaire sur l'efficacité digestive.

La restriction alimentaire permet d'améliorer l'efficacité alimentaire, en particulier via une digestibilité accrue de l'énergie et des protéines. Cette amélioration pourrait s'effectuer via une augmentation de la dégradation enzymatique intestinale et une amélioration de l'absorption intestinale comme observé chez le poulet. L'impact du milieu caecal sur l'efficacité digestive reste cependant peu connu ou peu décrit et mériterait d'être d'avantage étudié. D'autre part, l'amélioration de l'efficacité digestive étant très variable, une étude approfondie des interactions entre niveau d'ingestion et composition nutritionnelle, notamment énergétique, permettrait d'optimiser l'efficacité digestive et la croissance, et par conséquent l'efficacité alimentaire.

Tableau 7 Une stratégie de limitation de l'ingestion chez le lapin en post-sevrage permet d'améliorer l'efficacité digestive.

Niveau ¹ d'ingestion	Conditions expérimentales	Digestibilité fécale (%)			Références
		Matière organique	Protéines brutes	NDF	
100	R ^f : 35 ² à 72j	66,8 ^a	77,9 ^a		Ledin (1984b)
60		68,2 ^b	82,0 ^b		
50		71,0 ^c	84,0 ^c		
100	R ^f : ≈45 à 75j	57,5 ^a	64,6 ^a	27,8	Ledin (1984a)
60		66,8 ^b	74,3 ^b	52,3	
100	R ^f :40 à 64j	63,7 ^a	70,0 ^a	19,6	Xiccato et al. (1992)
75		64,7 ^b	72,5 ^b	20,0	
100	R: 45 à 60j (digestibilité calculée pour une période de 15j)	76	85	25	Diar Arca et al. (1999)
60		75	87	23	
40		74	86	21	
10		73	85		
100	R ^f 35 ² à 85j	63,5 ^a	79,8	19,1 ^a	Di Meo et al. (2007) ³
90		66,0 ^b	79,9	24,5 ^b	
100	R ^f 42 à 49j	39,2	68,6 ^a		Tumova et al. (2007)
≈60		44,2	70,6 ^b		
100	R ^f :35 ² à 54j	71,9	82,1	29,9	Gidenne et Feugier (2009)
80		71,7	82,1	29,3	
70		72,7	83,5	30,1	
60		72,8	83,7	30,1	
100	R ^f : 35 ² à 63j	64,2 ^a	72,0	29,1 ^a	Gidenne et al. (2009a)
80		aliment témoin	58,1 ^b	71,0	
100	R ^f : 35 ² à 63j	63,8 ^a	73,7	32,5 ^a	
80		aliment riche en energie	68,9 ^b	80,8	
100	R ^f : 35 ² à 63j	60,3 ^a	70,1 ^a	14,5	Gidenne et al. (2009c)
75		62,7 ^b	76,2 ^b	17,3	
100	R ^f : 35 ² à 63j	59,3 ^a	62,6 ^a	33,1 ^a	Gidenne et al. (2011)
75		aliment témoin	64,3 ^b	71,9 ^b	
100	R ^f : 35 ² à 63j	60,6 ^a	71,0	29,9 ^a	
75		aliment riche en protéines	64,1 ^b	74,7	

D'après Gidenne et al. (2012b)

Abréviations : NDF : Neutral detergent fibre ; R: limitation de l'ingestion par distribution quotidienne d'une quantité fixe d'aliment granulé ; ¹ en pourcentage de l'ingestion à volonté (100%= à volonté) ; ² âge au sevrage ; ³ digestibilité calculée à 77j d'âge, avec une méthode de marquage (acid insoluble ash); a, b: écart significatif (P<0,05) entre les animaux nourris à volonté (100) et R, pour une même étude.

III. ROLE DE DEFENSE

Le rôle de défense du système digestif est complexe, puisqu'il doit faire office de barrière contre les agents pathogènes indésirables tout en maintenant une tolérance vis-à-vis du microbiote commensal et des aliments. Des organes et des mécanismes immunitaires spécifiques sont dès lors nécessaire afin d'assurer cette tâche en communication permanente avec le microbiote digestif. Nous aborderons ainsi dans cette partie les barrières physiques et chimiques dans un premier temps, puis le système immunitaire digestif et enfin nous verrons le rôle du microbiote digestif et les interactions de celui-ci avec l'immunité de son hôte et les possibles modulations via l'alimentation.

III.A. BARRIERES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Plusieurs barrières chimiques sont présentes au niveau du tube digestif afin de limiter l'entrée et le développement de microorganismes pathogènes. L'acidité du milieu stomacal constitue ainsi une première barrière chimique à l'activité et au développement bactérien (Davies and Davies, 2003; Martinsen et al., 2005). De même, plusieurs substance aux propriétés bactériolytiques ou bactériostatiques (lactoferrine, lactoperoxidase, lysozyme, α -défensines) ainsi que des peptides aux propriétés antibiotiques (cryptidine) sont sécrétées au niveau intestinal (Caccavo et al., 2002; Cunliffe, 2003; Schroder, 1999).

Plusieurs barrières physiques sont ensuite présentes. Au niveau des cellules épithéliales intestinales les jonctions serrées empêchent le passage intracellulaire d'agents pathogènes, malgré la faible épaisseur de l'épithélium (20 μ m) (Gill et al., 2011). De même, le péristaltisme intestinal, responsable des mouvements de transit, réduit la durée de contact entre les agents pathogènes potentiels présents dans le contenu intestinal et les cellules épithéliales. Le mucus digestif constitue également une couche protectrice de l'épithélium, réduisant les possibilités de fixation des pathogènes. Enfin le renouvellement cellulaire rapide par desquamation des cellules épithéliales permet d'éliminer les éventuels pathogènes pouvant s'y être attachés (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007).

III.B. IMMUNITE DIGESTIVE

Le tube digestif constitue une grande surface d'échange en contact permanent avec une multitude d'antigènes que le système immunitaire se doit de discriminer entre inoffensifs et nocifs (Mowat, 2003). De ce fait, le GALT, pour Gut-Associated Lymphoid Tissue, est l'ensemble contenant le plus

de cellules immunitaires dans l'organisme. A titre de référence, chez l'homme, le GALT comprend, à lui seul, 70% des cellules immunitaires (Corthier, 2011). Nous allons ici expliciter les différentes fonctions immunitaires mises en place par ce système complexe.

III.B.1. Le GALT : une structure caractéristique

Le GALT comprend tous les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (**Figure 10**). Ces tissus sont divisés en sites inducteurs d'une part, permettant d'identifier les antigènes et d'activer le système immunitaire, et des sites effecteurs d'autre part, permettant l'élimination d'agents pathogènes (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007).

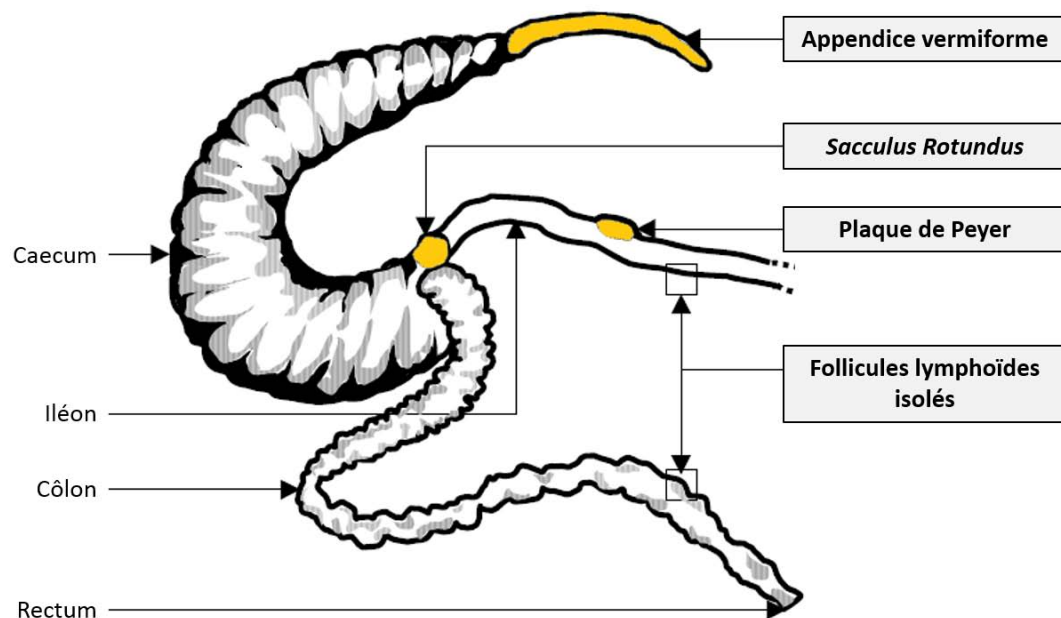


Figure 10 Morphologie des tissus lymphoïdes du tube digestif du lapin.
D'après Fortun-Lamothe et Boullier (2007)

Chez le lapin, les tissus inducteurs sont particulièrement nombreux. En effet, comme chez tous les mammifères, l'intestin grêle, et plus particulièrement l'iléon, est parsemé d'agrégats de cellules lymphoïdes appelés Plaques de Peyer. Leur nombre est relativement faible comparé à d'autres espèces avec une moyenne de sept plaques de Peyer chez le lapin adulte (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Martignon, 2010; Merchant et al., 2011) alors que le cochon d'inde par exemple en possède plus de 60 réparties tout au long du tube digestif (caecum compris) (Merchant et al., 2011). Des follicules lymphoïdes isolés, avec une structure comparable à des « micro » plaques de Peyer, sont également présent tout au long de l'intestin et du colon. Le lapin possède enfin deux

tissus lymphoïdes organisés, propres à l'ordre des lagomorphes : l'appendice vermiforme, à l'extrémité distale du caecum, et le *sacculus rotundus*, à la jonction iléo-caecale (Lanning et al., 2000b). Chez le lapin adulte, l'appendice mesure en moyenne 10 cm de long pour 60 cm² de surface alors que le *sacculus rotundus* a une surface moyenne de 10 cm² (Merchant et al., 2011). En revanche, le lapin ne possède pas de tissus ou de follicules lymphoïdes au niveau du caecum, contrairement à d'autres mammifères, tels que le cochon d'inde ou le porc (Merchant et al., 2011). L'appendice constituerait à elle seule la moitié du GALT, mettant en emphase la singularité du système immunitaire digestif du lapin (Perey et al., 1968).

Les sites effecteurs sont quant à eux représentés par lymphocytes dispersés au niveau de l'épithélium digestifs et de la *lamina propria* de la muqueuse digestive (**Figure 11**) (Mowat, 2003). Ce sont principalement les lymphocytes T (80 à 90% des lymphocytes totaux dans l'épithélium et 40 à 90% dans la *lamina propria*) (Abreu-Martin and Targan, 1996). Ces sites effecteurs sont en relation étroite avec les ganglions lymphatiques mésentériques (MLN pour mesenteric lymph node) qui contribuent largement à l'immunité locale. Ces ganglions ne sont cependant pas capables d'échantillonner des antigènes dans la lumen digestif et ne sont donc pas considérés comme faisant partie du GALT (Corthesy, 2007).

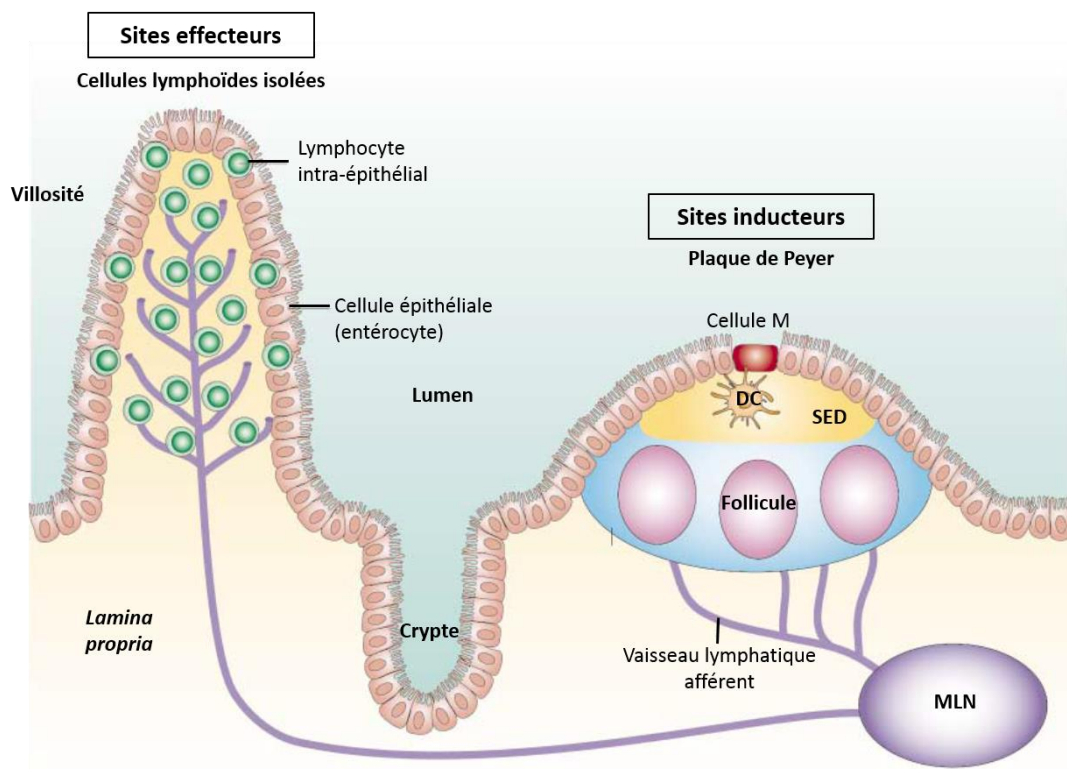


Figure 11 Représentation schématique de l'organisation des tissus lymphoïdes au niveau de la muqueuse digestive, avec l'exemple représentatif de la plaque de Peyer. D'après Mowat (2003).

Abréviation: DC: Dendritic cells; MLN: Mesenteric Lymph Node; SED: Subepithelial dome.

Les plaques de Peyer ont une structure caractéristique en forme de dôme à la surface de l'épithélium intestinal et sont visibles à l'œil nu chez le lapin adulte (1 cm² de surface environ, **Photo 1**). A maturité celles-ci sont constituées en grande partie de follicules de cellules B et dans une moindre mesure de cellules T. Ceux-ci sont surmontés par une zone diffuse, appelée le dôme sub-épithéliale (SED pour subepithelial dome), elle-même dominée par l'épithélium folliculaire associé (FAE pour follicle-associated epithelium). Cet épithélium se distingue de celui recouvrant les villosités classiques par une plus faible hauteur des microvillosités des entérocytes, une moindre production enzymatique et une infiltration massive par les cellules B et T ainsi que par des macrophages et des cellules dendritiques (DC pour dendritic cells). De plus, l'épithélium folliculaire associé présente à sa surface des cellules dépourvues de microvillosités et de mucus, appelées les cellules M, permettant la fixation de pathogènes (**Figure 11**) (Mowat, 2003). Chez le lapin ces cellules représentent environ 50% de la surface de la FAE (Pappo, 1989). L'appendice vermiforme et le *sacculus rotundus* contiennent chacun des centaines de dômes folliculaires avec une structure analogue à celle des plaques de Peyer (Mage, 1998).

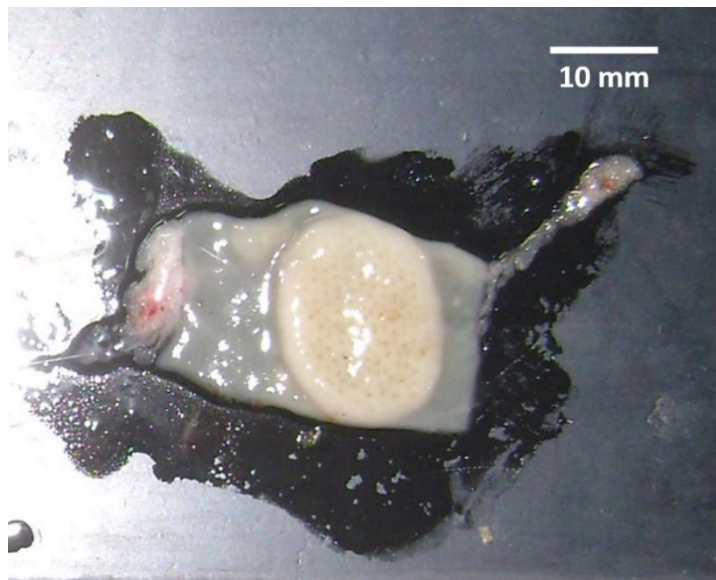


Photo 1 Plaque de Peyer d'un lapin adulte (72 jours d'âge).

III.B.2. La réponse immunitaire intestinale

III.B.2.a. *Initialisation de la réponse immunitaire et reconnaissance antigénique aux sites inducteurs*

Les mécanismes de reconnaissance antigénique ne sont pas entièrement connus. Cependant, de nombreux chercheurs s'accordent sur deux voies principales de reconnaissance (Corthesy, 2007; Mowat, 2003). Dans le cadre de la 1^{ère} voie, les antigènes se fixeraient sur les cellules M (**Figure 12, 1**) et seraient capturés par macro-pinocytose. Ces antigènes seraient ensuite transférés à des cellules de traitement antigéniques (APCs pour antigen presenting cells), ici les cellules

dendritiques. Celles-ci pourraient, soit descendre au niveau de la zone folliculaire et interagir directement avec des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (**Figure 12, 2**), soit migrer via les vaisseaux lymphatiques vers les MLNs ou une interaction avec des lymphocytes naïfs serait à nouveau possible (**Figure 12, 2'**). Les lymphocytes B, quant à eux, pourraient reconnaître les antigènes sans traitement préalable par les DC (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007), provoquant un « switch » de ces cellules vers la production d'IgA, d'IgG ou d'IgM. Les tissus lymphoïdes organisés tels que les plaques de Peyer sont considérés comme les zones principales de reconnaissance antigénique (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007). Cependant, de manière inévitable, des antigènes peuvent passer la barrière épithéliale (Corthesy, 2007; Hooper et al., 2012). Ceux-ci sont la plupart du temps phagocytés et éliminés par les macrophages de la *lamina propria* (Hooper et al., 2012), mais ils peuvent aussi suivre un circuit de reconnaissance antigénique correspondant à la deuxième voie de reconnaissance identifiée (**Figure 12, 1'**). De manière analogue à ce qui peut se produire au niveau des zones folliculaires, l'antigène serait pris en charge par une cellule de traitement antigénique (APC) qui le mettrait en contact avec les lymphocytes de la *lamina propria* ou des MLN (**Figure 12, 2'**). A de rares occasions, des antigènes libres pourraient suivre la voie sanguine et être traités au niveau des ganglions lymphatiques périphériques (**Figure 12, 2''**). Cependant, ces phénomènes étant rares, les antigènes de la lumière digestive ne rentrent quasiment jamais en contact avec les tissus lymphoïdes systémiques, et n'induisent donc pas de réponse immunitaire systémique (Hooper et al., 2012). La réponse immunitaire dirigée vers le microbiote commensal est ainsi confinée au milieu digestif, c'est pourquoi plusieurs auteurs parlent de phénomènes « d'ignorance » plus que de « tolérance » des commensaux au niveau systémique (Brown et al., 2013; Duerkop et al., 2009) (voir partie III).

Par la suite, et quel que soit la voie suivie, les lymphocytes subissent une maturation au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques ou périphériques puis transitent vers la circulation systémique afin d'atteindre par voie sanguine les sites effecteurs (**Figure 12, 3 et 3'**).

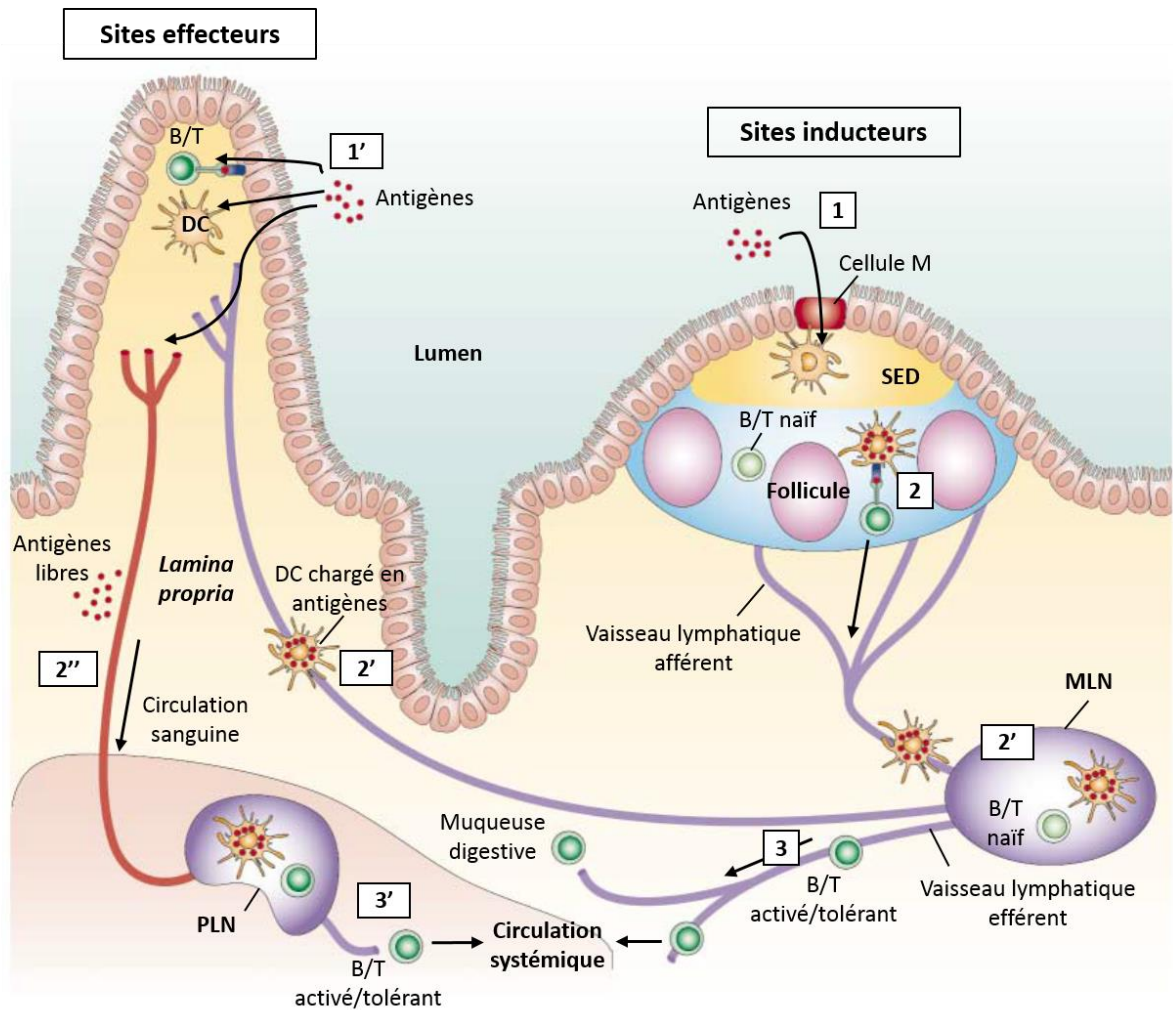


Figure 12 Assimilation et reconnaissance des antigènes au niveau de la muqueuse intestinale.

D'après Mowat (2003)

Abréviation: B/T: lymphocytes B ou T; DC: Dendritic cells; MLN: Mesenteric Lymph Node; PLN: Peripheral lymph node; CD4⁺: Lymphocyte T CD4⁺ (CD pour cluster de différenciation); SED: Subepithelial dome.

III.B.2.b. Production d'IgA et activité immunitaire aux sites effecteurs

Les cellules B et T continuent leurs différenciation sous l'effet de nombreuses cytokines (TGF- β , IL-10, IL-4, IL-5 et IL-6 notamment) et se répartissent ensuite entre la *lamina propria* et l'épithélium des sites effecteurs tout au long du tractus digestif (Corthesy, 2007). Les cellules B sont transformées en cellules plasmiques IgA-sécrétantes et restent dans la *lamina propria* (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Mowat, 2003) alors que le devenir des cellules T est plus diversifié. Les cellules T CD4⁺ restent dans la *lamina propria* alors que les cellules T CD8⁺ migrent préférentiellement vers l'épithélium. Le rôle des lymphocytes T de la muqueuse digestive n'est pas clairement défini, mais il semblerait qu'ils aient un phénotype préférentiel de « mémoire ». De plus, les cellules T CD4⁺ participent activement à la production de cytokines (IFN- γ , IL-4 et IL-10 notamment) et donc à la régulation des phénomènes inflammatoires (Mowat, 2003).

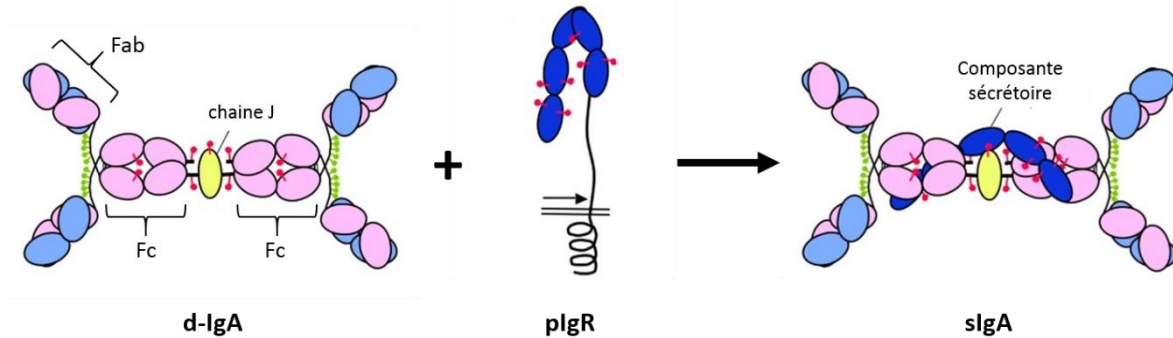


Figure 13 Structure et formation des sIgA.

D'après Woof et Russell (2011).

Abréviations: d-IgA: IgA dimérique; sIgA: IgA sécrétoire; pIgR: polymeric immunoglobulin receptor; Fc: cristallisable fragment, région inductrice d'une réponse immunitaire ; Fab: antigen binding fragment, région permettant la détection et la fixation des antigènes.

Les IgA (Immunoglobulines A) sont les principaux anticorps produits au niveau du tractus digestif et font partie de la 1^{ère} ligne de défense du système immunitaire digestif. Après synthèse sous forme de pIgA (polymeric IgA) ou dIgA (dimeric IgA) par les cellules plasmiques de la *lamina propria*, celles-ci sont transportées par transcytose par les pIgR (Polymeric Immunoglobulin Receptor) des entérocytes jusqu'à la lumière du tube digestif. Ici, les IgA sécrétoires, notées sIgA, sont libérées comme un complexe entre les pIgA/dIgA et la portion extracellulaire de la protéine pIgR (Corthesy, 2007). La région Fc (fragment cristallisable) des IgA, inductrice d'une réponse immunitaire, est enveloppée dans la composante sécrétoire, ce qui confère une forte résistance à l'anticorps face aux enzymes bactériennes présentes dans le lumen (**Figure 13**). Les sIgA, qui se concentrent principalement dans la couche de mucus, ont pour fonction de prévenir la colonisation et l'invasion bactérienne ou virale de la muqueuse (Salzman, 2011). Cette fonction se concrétise par trois actions principales :

- les sIgA présents dans le lumen empêchent l'adhésion et l'entrée des antigènes dans l'épithélium. La majorité des sIgA sont non-spécifiques et dirigées contre des composés de la surface bactérienne. Certains IgA sont cependant dirigés contre des antigènes spécifiques d'organismes pathogènes, conférant une protection contre d'éventuelles réinfections (Gill et al., 2011).
- Les IgA de la *lamina propria* se fixent sur les antigènes ayant réussi à pénétrer dans la muqueuse et les excrètent dans le lumen (Corthesy, 2007).
- Les IgA en cours de transfert dans l'épithélium peuvent inhiber la production virale et neutraliser les antigènes pro-inflammatoires (Corthesy, 2007).

Le fonctionnement des sIgA est donc très différent de celui des principaux anticorps circulants, les IgG. En effet, celles-ci ne provoquent pas d'opsonisation. En d'autres termes, elles ne favorisent pas la phagocytose par les macrophages et n'activent pas les voies classiques du complément. La fixation de sIgA n'aboutit donc pas à la lyse des bactéries (Corthesy and Kraehenbuhl, 1999). Ces spécificités sont en accord avec le rôle protecteur des IgA, couplé à la nécessité de ne pas soumettre la muqueuse à des traumatismes inflammatoires inutiles (Corthesy, 2007). Enfin, les rongeurs et les lagomorphes sont dotés d'une pompe hépatique permettant un transfert d'IgA sériques dans le lumen via la bile. Ces IgA auraient une structure polymérique similaire aux sIgA (Bouvet and Fischetti, 1999) leur confèrent des propriétés d'exclusion des pathogènes, de manière analogue aux sIgA d'origine maternelle (Bouvet and Fischetti, 1999).

De nombreux mécanismes sont mis en place au niveau digestif afin de maintenir l'homéostasie. Ainsi les barrières physiques (épithélium, mucus) et les barrières chimiques (sécrétions de substances antimicrobiennes, variation de pH) permettent de contrôler et d'endiguer la population bactérienne. Le système immunitaire vient compléter cet ensemble complexe avec des mécanismes spécifiques au système digestif (échantillonnage de la flore, sécrétion d'IgA,...).

III.C. LE MICROBIOTE, UNE BARRIERE NATURELLE AUX AGENTS PATHOGENES

1 cellule de l'hôte pour 10 cellules microbiennes : c'est un constat éloquent, régulièrement retranscrit dans la presse de vulgarisation pour indiquer l'importance du microbiote digestif chez les mammifères. Ainsi, le phénotype d'un individu est défini par l'expression de ses propres gènes mais également par celle des gènes des communautés microbiennes, appelée microbiote, qui le colonisent. En effet, au cours de ces dernières années les recherches sur le microbiote digestif ont permis de mesurer son impact sur la physiologie et la nutrition de son hôte et de mieux préciser le dialogue entre l'hôte et sa flore digestive.

Une relation hôte/microbiote basée sur un modèle de symbiose définit "l'écosystème digestif" où chaque partenaire trouve un bénéfice à cette association. Outre le service écosystémique de nutrition détaillé précédemment (Chapitre 2, partie I), le microbiote digestif joue un rôle trophique sur le tractus digestif (angiogenèse et développement de la muqueuse), participe à l'immunité innée de l'hôte (rôle barrière), et stimule le système immunitaire inné et acquis (immunité cellulaire et humorale). Ce sont ces deux derniers points que nous allons aborder ici, chez le lapin adulte, après un bref rappel de la composition du microbiote chez le lapin.

III.C.1. Le microbiote digestif du lapin

III.C.1.a. *Diversité et composition de l'écosystème digestif*

Comme tout organisme vivant, la taxonomie des microorganismes digestifs suit la classification biologique usuelle (**Figure 14**). Les microorganismes rencontrés dans le tractus digestif des mammifères appartiennent aux trois domaines du vivant : Les bactéries (*Bacteria*), les archées (*Archaea*) et les eucaryotes (*Eucarya*). Les virus, à la tranche de la définition des microorganismes, ne sont pas considérés comme des êtres vivants mais peuvent également être présents au niveau du tube digestif.

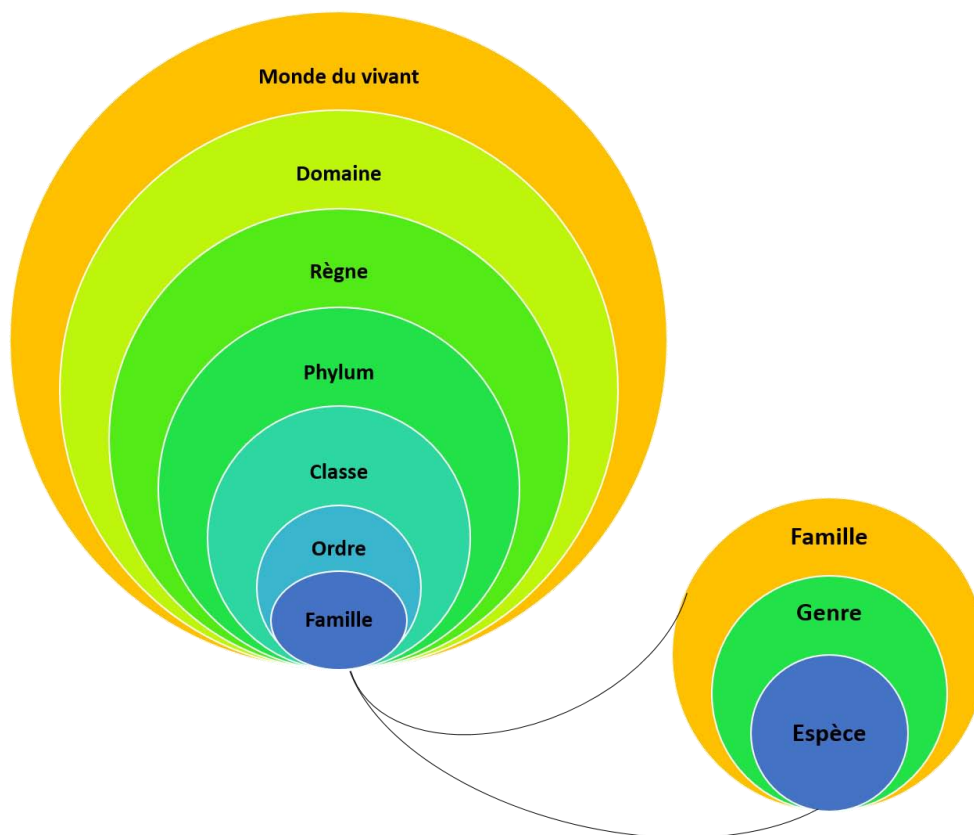


Figure 14 Taxonomie du vivant.

Les bactéries représentent de loin la plus forte proportion des microorganismes présents au niveau du tube digestif du lapin, avec en moyenne 10^{10} à 10^{12} bactéries/g de contenu caecal (Gouet and Fonty, 1979). Viennent ensuite les archées qui sont présents à 10^7 copies d'ARN 16S par gramme de contenu caecal (Bennegadi et al., 2003; Combes et al., 2011). La diversité des archées du milieu digestif est faible, et leurs représentantes sont toutes anaérobies et méthanogènes (Jones et al., 1987). Les eucaryotes sont très peu représentés chez le lapin. Des protozoaires anaérobies stricts ciliés et flagellés ont pu être observés par Lelkes et Chang (1987). En revanche,

le caecum ne semble pas contenir de champignons anaérobies (Bennegadi et al., 2003). Enfin les levures ont pu être mises en évidence par certains auteurs (Forsythe and Parker, 1985), même si leur implantation n'a pas pu être démontrée (Kimse et al., 2012); ces résultats demandent donc encore confirmation.

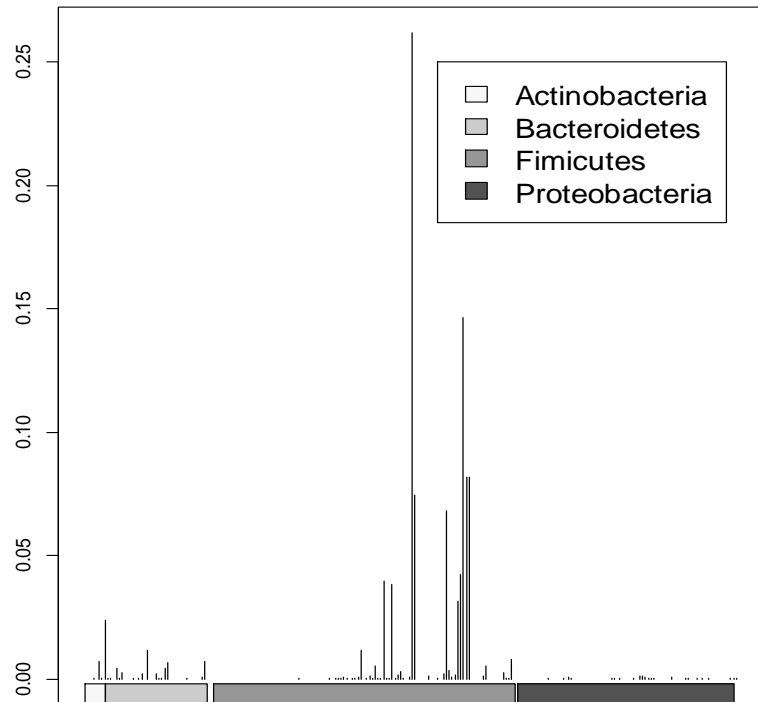


Figure 15 Profil taxonomique 16S de la communauté bactérienne du lapin adulte (63 jours d'âge). D'après Massip et al. (2012)
Les ordonnées correspondent à des abondances relatives et en abscisse les taxons sont ordonnés par ordre alphabétique.

Des études récentes du microbiote caecal par des approches de séquençage haut débit ont permis d'obtenir des données générale sur sa composition bactérienne. Ces études ont indiqué que le microbiote caecal du lapin était très particulier, avec une proportion des séquences bactériennes allant de 80 à 90% n'appartenant à aucune espèce cultivable connue (Abecia et al., 2005; Monteils et al., 2008). En revanche, ces études ont permis d'identifier les phylums et les familles bactériennes majoritaires (**Figure 15**). Ainsi, au sein du règne des bactéries, une très grande majorité des séquences obtenus appartiennent au phylum des Firmicutes (>90%) alors que les Bacteroidetes n'en représentent que 4% environs (Combes et al., 2013). Deux autres phylums, Actinobacteria et Proteobacteria, ont également pu être mis en évidence dans de faibles proportions (<1%) (Massip et al., 2012). Au sein du phylum des Firmicutes, *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae* sont les familles majoritaires avec respectivement 45% et 35% des séquences totales affiliées à ces familles (Combes et al., 2014; Massip et al., 2012). D'une manière générale,

la diversité bactérienne rencontrée dans les fermenteurs digestifs est extrêmement faible en comparaison avec d'autres milieux, tels que le sol ou l'eau par exemple, probablement en raison des fortes contraintes écologiques (pH, potentiel redox,...) et de la spécialisation fonctionnelle de cet écosystème.

III.C.1.b. Structuration spatiale du microbiote

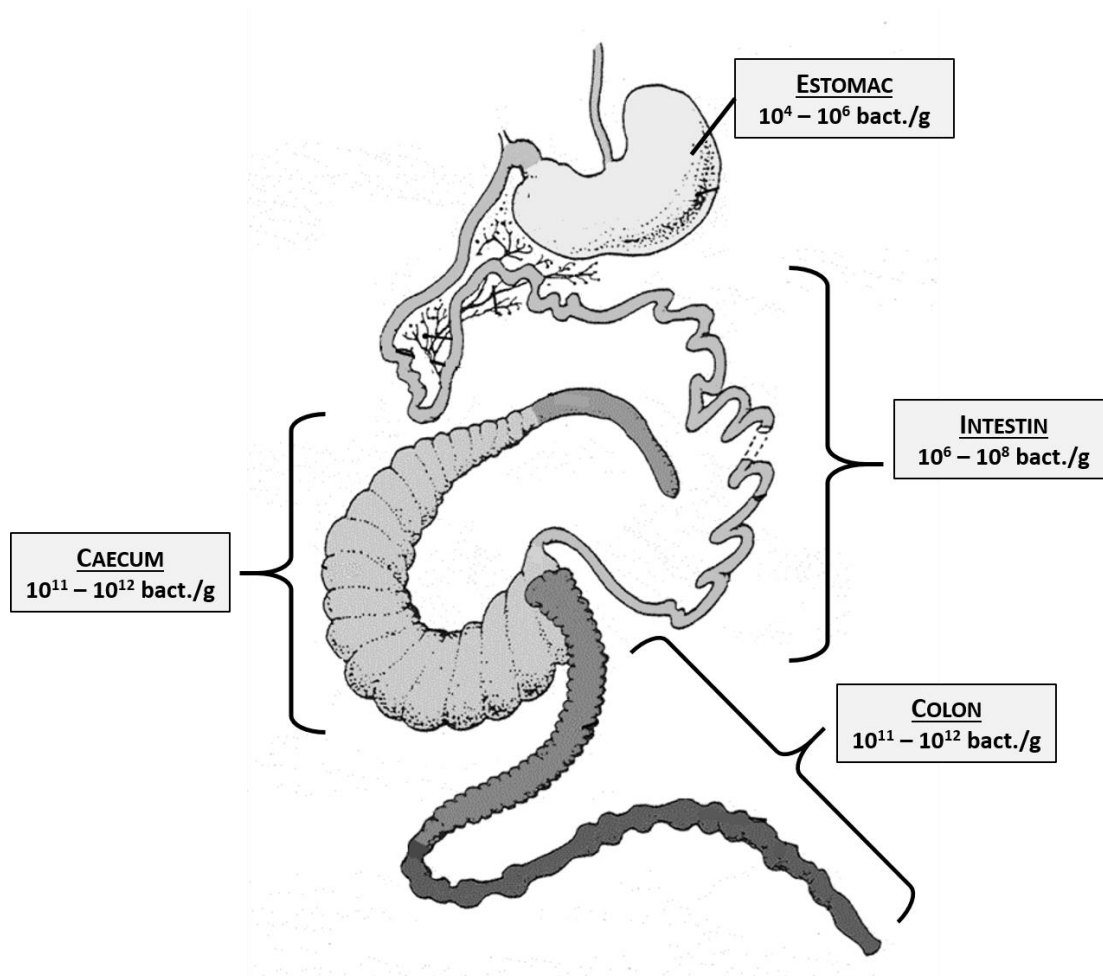


Figure 16 Répartition spatiale du microbiote digestif chez le lapin adulte. D'après Combes et al. (2013) et Gouet et Fonty (1979)

Le caecum étant le fermenteur digestif principal chez le lapin, la flore y est aussi la plus abondante avec en moyenne 10^{11} bactéries/g de contenu caecal. Cependant, la flore digestive est également présente dans une moindre mesure dans les compartiments en amont du caecum et dans des proportions similaires en aval, dans le côlon proximal (**Figure 16**). Tout le tractus digestif est ainsi en contact avec une population microbienne plus ou moins abondante (Combes et al., 2013; Gouet and Fonty, 1979). Cette structuration spatiale peut principalement s'expliquer par les conditions physico-chimiques (pH, potentiel redox, humidité,...) de chaque segment digestif qui

sont plus ou moins favorables au développement bactérien (Kimse et al., 2009). Cependant, bien que moins abondante, la flore iléale serait plus diversifiée que la flore caecale (Badiola et al., 2005).

III.C.1.c. Evolution post-sevrage et stabilité du microbiote digestif

L'implantation et l'évolution de l'écosystème digestif s'effectue dès la naissance et jusqu'à 70 jours d'âge ou celui-ci est considéré comme mature (Combes et al., 2011). Au moment du sevrage (28 à 35 jours d'âge), les animaux ont déjà une flore digestive relativement développée avec un nombre de bactéries totales stable dès 21 jours d'âge. Le nombre d'archées continue lui d'augmenter après le sevrage jusqu'à 70 jours d'âge. De même, la variabilité interindividuelle de la composition bactérienne du microbiote caecal reste forte jusqu'à 49 jours d'âge, alors qu'à 70 jours elle est devenue homogène (**Figure 17**) (Combes et al., 2011). Enfin, la proportion de Bacteroidetes diminue avec l'âge induisant une augmentation du rapport Firmicutes/Bacteroidetes (Combes et al., 2011).

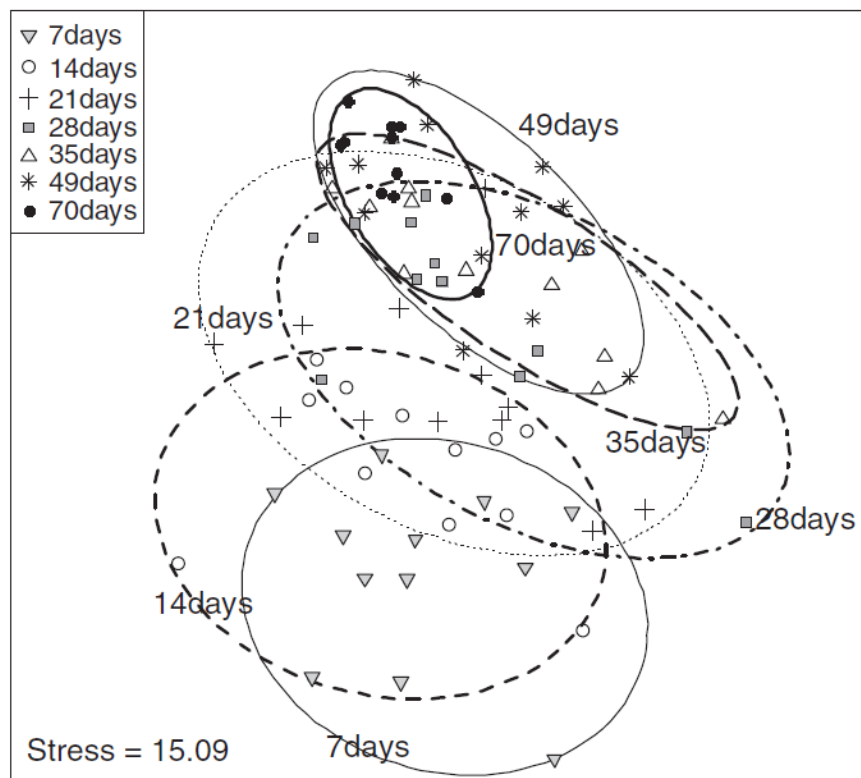


Figure 17 Approche nMDS de l'évolution de la communauté bactérienne caecale du lapin entre 7 et 70 jours d'âge.

D'après Combes et al. (2011)

Abbréviations: d: days (jours d'âge).

La variabilité interindividuelle est forte jusqu'à 49 jours d'âge alors qu'à 70 jours d'âge la composition de la communauté bactérienne caecale est plus stable. De plus la composition bactérienne évolue progressivement entre 7 et 70 jour

Chez le lapin adulte, et en l'absence de perturbations induites, la communauté bactérienne du caecum reste stable dans le temps. Ainsi à l'âge adulte, le microbiote digestif atteint un équilibre et la diversité et la composition microbienne dominante restent stables (Michelland et al., 2010; Michelland et al., 2011).

La composition du microbiote digestif est dominée par la population bactérienne, elle-même constituées à 90% de Firmicutes chez le lapin adulte. Ce microbiote est principalement situé au niveau du fermenteur digestif qu'est le caecum, mais il est également présent dans une moindre mesure dans les autres segments du tube digestif.

Enfin, la stabilisation du microbiote caecal s'effectue entre 49 et 70 jours d'âge. Ceci laisserait donc une « fenêtre d'action » ouverte de 0 à 49 jours sur son contrôle.

III.C.2. Le microbiote a une fonction de barrière

Le microbiote digestif joue un rôle de barrière au niveau du tractus digestif. En effet, sa présence empêche l'implantation des microorganismes exogènes pathogènes (Berg, 1996; Gill et al., 2011). Plusieurs hypothèses quant aux mécanismes d'actions de cette barrière ont été proposées :

- L'adhérence de la flore commensale à la muqueuse digestive empêcherait l'adhérence des bactéries pathogènes, et donc leur entrée dans l'épithélium digestif (Abt and Artis, 2013). A titre d'exemple, les bactéries segmentées filamenteuses empêcheraient ainsi la colonisation iléale par *E. coli* (O103) en étant en compétition directe pour leur site de fixation aux cellules épithéliales chez le lapin (Heczko et al., 2000).
- L'espace, et surtout les nutriments disponibles, seraient saturés par le microbiote commensal, empêchant ainsi les microorganismes pathogènes de s'implanter (Kudsk, 2002).
- Une proportion des bactéries digestives seraient capables d'inhiber la croissance des autres bactéries compétitrices pour les nutriments via la production de substances antimicrobiennes (Guarner and Malagelada, 2003).

III.D. **UN MICROBIOTE EN INTERACTION AVEC L'IMMUNITÉ DE L'HÔTE**

Depuis maintenant plusieurs décennies, de nombreux auteurs ont pu observer que le microbiote digestif et l'immunité de l'hôte n'évoluaient pas de manière autonome mais bien de manière conjointe avec de multiples interactions. De plus, le développement de nouveaux outils d'analyse tels que le séquençage des gènes du microbiote, la transcriptomique et la métabolomique, mais

aussi l'utilisation d'animaux élevés dans des conditions stériles, a permis de faire des avancées considérables ces dernières années pour mieux comprendre la communication à double sens entre le système immunitaire de l'hôte et son microbiote (Hooper et al., 2012; Kau et al., 2011).

III.D.1. Le système immunitaire de l'hôte aux commandes de son microbiote

Le système immunitaire peut dans une certaine mesure remanier la composition du microbiote digestif. Ainsi, comme précisé précédemment (p.60), plusieurs protéines antibactériennes sont produites au niveau des cellules épithéliales. Chez la souris, certaines de ces substances, comme l' α -defensine, permettraient de moduler la composition du microbiote. Leurs mécanismes d'action ne sont cependant pas clairement définis. L'action des substances antibactériennes pourrait ainsi avoir lieu dans le lumen ou au niveau du mucus sur certaines bactéries servant de « réservoirs » à la communauté luminale (Hooper et al., 2012). De plus, chez la souris, l'induction de déficiences immunitaires a pour conséquences de modifier la composition du microbiote digestif, indiquant que l'expression du système immunitaire impacte le microbiote digestif (Hooper et al., 2012).

III.D.2. Le microbiote affecte l'expression immunitaire de son hôte

Le microbiote digestif participe activement à la mise en place et au développement de l'immunité de son hôte. En effet, chez les lapins élevés dans des conditions stériles le développement du système immunitaire digestif est réduit : la densité et la taille des follicules lymphoïdes et la taille des plaques de Peyer sont réduites par rapport aux animaux élevés dans des conditions classiques (Stepankova et al., 1980). De même, les concentrations en anticorps circulants se trouvent pénalisées, démontrant un effet du microbiote, non seulement sur le système immunitaire digestif, mais aussi sur le système immunitaire systémique, à l'échelle de l'individu (Guarner and Malagelada, 2003; Hooper et al., 2012). Le microbiote digestif joue donc un rôle dans le développement du répertoire primaire d'anticorps (Lanning et al., 2000a; Lanning et al., 2000b).

Un nombre limité de genres bactériens ont été mis en évidence comme participant activement à la mise en place de l'immunité digestive. Les bactéries filamenteuses segmentées et les clostridies auraient avoir un rôle important dans le développement immunitaire (Umesaki and Setoyama, 2000). Les composants des parois bactériennes, tels que les peptidoglycanes ou les

lipopolysaccharides (LPS), joueraient un rôle important dans l'activation du système immunitaire (Hamann et al., 1998).

Le microbiote commensal agit également sur le système immunitaire de son hôte après sa mise en place. En effet, en cas de lésion de l'épithélium digestif par exemple, il permet d'activer les mécanismes de réparation. De même, chez la souris, plusieurs espèces bactériennes, comme *Bacteroides fragilis* ou certaines espèces de clostridies, stimuleraient les mécanismes anti-inflammatoires de l'hôte, via la production d'IL-10 notamment (Hooper et al., 2012).

III.D.3. Le système immunitaire et le microbiote digestif interagissent pour permettre la tolérance orale

Le système digestif doit être capable de faire la différence entre les nutriments, sa flore commensale propre et les microorganismes exogènes potentiellement pathogènes en activant des mécanismes de défense vis-à-vis de ces derniers uniquement. C'est ce qui définit la tolérance orale, nécessaire au bon fonctionnement du tube digestif (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Mowat, 2003). En effet, une réponse immunitaire dirigée contre le microbiote commensal induirait des troubles inflammatoires chroniques alors qu'une réponse dirigée contre les nutriments serait plutôt caractéristique de phénomènes allergiques (Simecka, 1998). La tolérance orale se traduit par l'élimination, ou tout au moins la réduction, de la réponse immunitaire systémique à un antigène donné rencontré antérieurement dans le tractus digestif (Kagnoff, 1993). Les mécanismes impliqués dans la tolérance orale sont encore mal connus, mais le microbiote, conjointement à l'immunité digestive, joue un rôle important dans sa mise en place (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007). Chez les souris déficientes en IgA, le système immunitaire systémique est fortement stimulé, induisant une production d'IgG circulants orientés contre le microbiote commensale pouvant induire de graves troubles inflammatoires (Brown et al., 2013). Les IgA, favorisent ainsi une « ignorance » du microbiote commensal par le système immunitaire systémique. Le microbiote commensal serait aussi nécessaire au maintien de l'hyposensibilité de l'immunité systémique à un antigène donné (Gaboriau-Routhiau and Moreau, 1996). En effet, l'implantation d'une flore commensale « classique » chez des animaux jeunes élevés dans des conditions stériles permet d'instaurer une tolérance alimentaire ; Cependant, chez des animaux adultes, cette procédure s'avère inefficace (Sudo et al., 1997), indiquant le rôle crucial d'une interaction hôte-microbiote précoce (Isolauri et al., 2001).

III.E. REGULATION DE L'INGESTION ET MODULATION DE LA SANTE DIGESTIVE

La santé digestive repose sur l'interaction entre trois leviers importants : l'hôte et son immunité digestive, le microbiote commensal et enfin l'aliment (Montagne et al., 2003). Les deux premiers leviers et leurs interactions ont été présentés précédemment ; l'aliment, sa qualité et sa quantité, peut cependant affecter de manière notable ces deux leviers. Ici, nous explorerons les effets d'une restriction alimentaire quantitative sur l'immunité de l'hôte et son microbiote, pouvant impacter en dernier lieu la santé générale de l'animal.

III.E.1. Modulation morphologique et physiologique des organes impliqués dans la réponse immunitaire digestive

La restriction alimentaire semble réduire le poids des organes lymphoïdes chez le lapin en croissance. En effet, une restriction alimentaire de 25% durant deux semaines réduit le poids de l'appendice vermiforme d'environ 30%, de la rate d'environ 35% et des plaques de Peyer d'environ 20% par rapport aux animaux nourris à volonté. En revanche le poids du *sacculus rotundus* et le nombre de plaques de Peyer ne semblent pas affectés par la restriction alimentaire (Martignon, 2010). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez la souris (Ksiazek and Konarzewski, 2012; Rogers et al., 2008) et la gerbille (Xu et al., 2011), alors que chez le poulet la restriction alimentaire affecte peu le poids de la rate et de la bourse de Fabricius (équivalent fonctionnel de l'appendice vermiforme chez les volailles) même en cas de restriction alimentaire sévère (65%) durant une semaine (Fassbinder-Orth and Karasov, 2006). En revanche, comme montré par Rogers et al. (2008) chez la souris et Martignon et al. (2010) chez le lapin, le poids relatif des organes lymphoïdes ne semble pas affecté par la restriction alimentaire ou énergétique (réduction de l'ingéré énergétique via un aliment moins riche en énergie). La croissance des organes lymphoïdes ne serait donc pas pénalisée par la restriction alimentaire.

En revanche, le nombre de cellules lymphoïde présentes dans ces organes semble affecté par la restriction alimentaire. Chez la souris, le nombre de cellules T et B de la rate est réduit avec une restriction alimentaire de 30% (Rogers et al., 2008) ou 50% (Kubo et al., 1984) alors que le nombre de leucocytes plasmatiques ne semble pas affecté par une restriction alimentaire de 30% appliquée durant 4 semaines (Ksiazek and Konarzewski, 2012). Dès lors, malgré une croissance des organes lymphoïdes maintenue, une réduction de leur activité serait envisageable via une réduction du nombre de cellules immunitaire.

III.E.2. Modulation de la réponse immunitaire

III.E.2.a. *Modulation de la réponse inflammatoire*

La réponse inflammatoire fait partie de l'immunité innée, qui constitue la première ligne de défense mise en place par l'organisme contre un agent infectieux. Afin d'étudier cette réponse, la plupart des études ont recours à une stimulation de l'inflammation. Dans ce cadre, le LPS (Lipopolysaccharide), composé structurel de la paroi des bactéries Gram- et puissant inducteur de la réponse inflammatoire, est largement reconnu comme modèle de simulation d'une infection bactérienne (Redl et al., 1993).

Les études menées sur les rongeurs s'accordent à dire que la restriction alimentaire permet de réduire la réponse inflammatoire induite par une stimulation au LPS. En effet, la restriction alimentaire réduirait, voir supprimerait, les manifestations cliniques de l'inflammation. La durée de la fièvre serait ainsi diminuée avec une restriction alimentaire de 25 à 50% et les animaux ne démontreraient pas de comportements d'anorexie classiquement observés chez les animaux à volonté (MacDonald et al., 2012; MacDonald et al., 2011). Au niveau physiologique, la restriction alimentaire augmenterait l'expression et la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 notamment et SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) qui favorise les effets anti-inflammatoires d'IL-10 et réduit la production d'IL-6) (MacDonald et al., 2011) et réduirait celle des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Matsuzaki et al., 2001). Matsuzaki et al. (2001) ont émis l'hypothèse que l'augmentation préalable des taux de corticostérone chez les animaux restreints aurait un effet préventif sur la réponse inflammatoire. Cette hypothèse reste cependant à vérifier, d'autant plus que certains auteurs ont observé une absence d'effet (Hangalapura et al., 2005), voir une diminution (Xu et al., 2011) des taux de corticostérone avec la restriction alimentaire. Enfin, chez la souris, la restriction alimentaire de 50% favoriserait la survie lors d'injections intrapéritonéales de bactéries vivantes (*Salmonella typhimurium*) (Peck et al., 1992), indiquant une réponse immunitaire favorisée via la restriction alimentaire.

Dans le cadre d'études de la réponse inflammatoire sans stimulation préalable, les effets de la restriction alimentaire semblent plus variables. Une restriction alimentaire moyen terme (17 semaines) chez la souris augmenterait ainsi l'expression de TNF- α , IFN- γ , TGF- β et IL-10 et diminuerait celle d'IL-2 au niveau duodénal (Lara-Padilla et al., 2011) sans indications nettes d'un effet sur la réponse pro- ou anti-inflammatoire. Les effets de la restriction énergétique sur le statut inflammatoire sembleraient également liés à la corpulence de l'animal. En effet, chez la souris

adulte, une restriction alimentaire de 70% durant 7 semaines augmenterait l'expression des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-2 et IL-10) dans les tissus adipeux chez les souris minces alors qu'elle serait diminuée chez les souris obèses (Kurki et al., 2012).

III.E.2.b. Modulation de la production d'anticorps

Comme précisé précédemment, les IgA constituent les anticorps majoritaires au niveau du tractus digestif. Les effets de la restriction alimentaire sur leur sécrétion sont très peu documentés. Chez la souris, une restriction alimentaire de durée moyenne (17 semaine) diminuerait les niveaux d'IgA intestinaux de 20% (Lara-Padilla et al., 2011) alors qu'une restriction alimentaire sévère mais de courte durée n'affecterait pas leurs taux chez le poulet (Fassbinder-Orth and Karasov, 2006). Une certaine durée de restriction semblerait donc nécessaire afin d'observer des modulations des niveaux d'IgA, mais ceci reste à confirmer. Dans le cadre d'une restriction longue, la diminution des sécrétions d'IgA serait due à une diminution du nombre de cellules productrices d'IgA et non à une réduction du transport vers le lumen (Lara-Padilla et al., 2011).

Afin d'étudier la réponse immunitaire spécifique systémique à un antigène donné, des protocoles « vaccinaux » sont régulièrement utilisés avec des antigènes à priori inconnus pour l'animal. Ainsi le KLH (Keyhole limpet hemocyanin) et l'OVA (Ovalbumine) sont couramment utilisés pour stimuler la réponse immunitaire systémique sans inflammation associée (Ksiazek and Konarzewski, 2012).

Dans ce cadre, la restriction alimentaire ne semble pas affecter la réponse immunitaire en termes d'IgG sériques à la première exposition à l'antigène chez la souris (Xu et al., 2011) ou le poulet (Hangalapura et al., 2005) alors que les taux d'IgM spécifiques seraient diminués (Ksiazek and Konarzewski, 2012). La restriction alimentaire semble en revanche pénaliser la mémoire immunitaire. En effet, chez la souris adulte lors de la réexposition au KLH (rappel vaccinal) la réponse en termes d'IgG sériques est réduite de 95% par rapport aux animaux nourris à volonté (Martin et al., 2008; Martin et al., 2007). Enfin, une restriction alimentaire sur une durée plus longue semble également diminuer les taux d'IgG totaux d'environ 30% (Lara-Padilla et al., 2011).

III.E.3. Modulation du microbiote digestif et son interaction avec l'immunité de l'hôte

Peu d'études fiables sont disponibles sur les effets de la restriction alimentaire de courte durée sur la composition du microbiote digestif. Une des rares études disponibles indiquerait que chez le rat, une restriction alimentaire de 20 à 40% appliquée pendant 4 semaines modifierait la

composition du microbiote caecal via une augmentation de la quantité de lactobacilles, de bifidobactéries et de bacteroidaceae (Morishita, 1995). Cependant, cette étude ne prenant en compte que les bactéries cultivables, ces résultats seraient à vérifier avec des approches méthodologiques plus récentes.

Chez le lapin en croissance, une restriction alimentaire de l'ordre de 25% appliquée pendant deux semaines (52 jours d'âge) ou quatre semaines (63 jours d'âge) ne semble pas affecter la structure et la diversité du microbiote caecal quel que soit la précision de la méthode utilisée, via une analyse CE-SSCP (Martignon et al., 2010) ou par séquençage haut débit 454 (Massip et al., 2012). Cependant, comme décrit précédemment, le microbiote se stabilise à partir de 49 jours (Combes et al., 2011). Dès lors, la restriction alimentaire pourrait avoir un effet précoce sur le microbiote, avec une stabilisation ultérieure équivalente à celle des animaux nourris à volonté. Des études de l'effet de la restriction alimentaire avant 49 jours mériteraient donc d'être effectuées.

Les études menées sur différentes espèces semblent indiquer que malgré une croissance des organes lymphoïdes maintenue avec la restriction alimentaire, l'activité du système immunitaire est modulée. Chez les rongeurs, la restriction alimentaire réduirait la réponse pro-inflammatoire et favoriserait la réponse anti-inflammatoire dans le cadre d'une stimulation alors qu'au niveau basal, les effets de la restriction alimentaire sur le statut inflammatoire restent encore à confirmer. De plus, la restriction alimentaire induirait, chez les rongeurs, une diminution de la réponse adaptative en termes de production d'anticorps. Enfin, la restriction alimentaire ne semble pas avoir d'effet notable sur le microbiote digestif, ces résultats restent à confirmer chez l'animal jeune.

Question soulevées :

Les effets bénéfiques de la restriction alimentaire observés sur la santé du lapin en post-sevrage seraient ils dû à une modulation de l'inflammation ? La modulation de l'immunité serait-elle liée à une modulation du microbiote digestif avant 49 jours ?

Enfin, les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sont-ils liés à la quantité d'ingéré ? A la durée du jeûne ? Ou à la quantité d'énergie ingérée ?

Chapitre 3 – Leviers nutritionnels d’amélioration de la croissance et de modulation de la santé

La restriction alimentaire ralentit la croissance et dégrade le rendement à l'abattage. Une optimisation de la composition en nutriments de l'aliment permettrait d'améliorer la croissance tout en maintenant les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé digestive. Le lapin est un herbivore avec des exigences nutritionnelles qui lui sont propres, avec notamment d'importants besoins en fibres. Il convient donc de bien connaître les leviers d'action alimentaires possibles, leurs limites et leurs effets sur la croissance, le rendement et la santé digestive. C'est ce que nous verrons dans ce troisième volet.

I. LES BESOINS ALIMENTAIRES DU LAPIN EN CROISSANCE

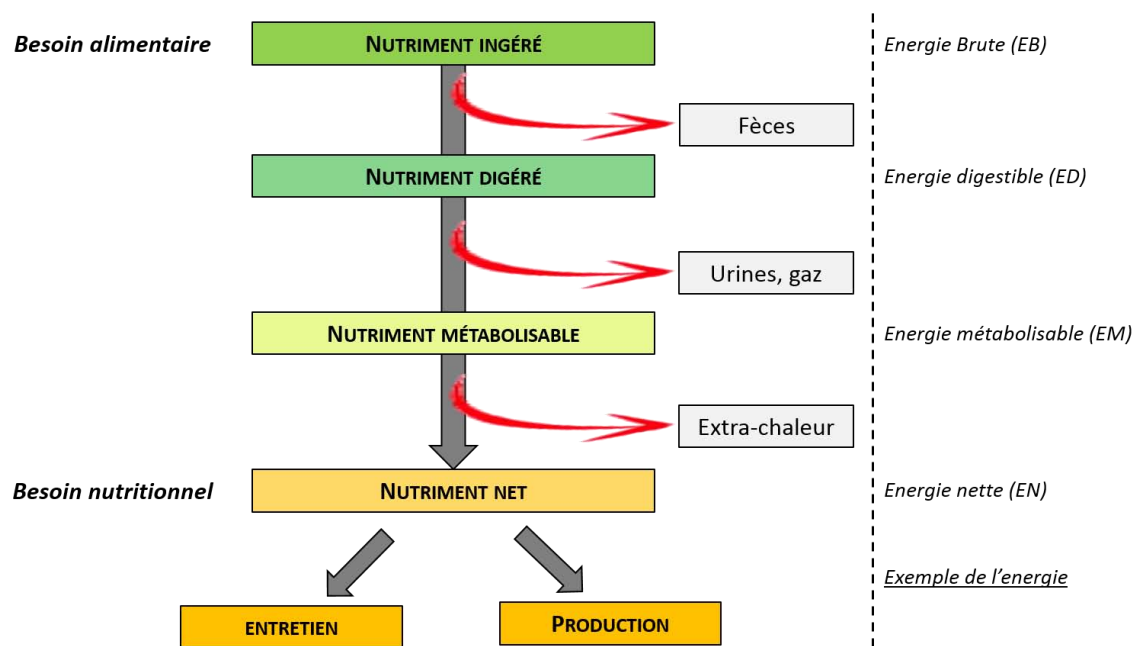


Figure 18 Besoins et utilisation alimentaire avec l'exemple de l'énergie.

Les besoins nutritionnels correspondent aux nutriments nécessaires pour assurer les fonctions d'entretien (métabolisme de base, thermorégulation,...) et de production (croissance, lactation ou gestation). Afin de déterminer les besoins alimentaires il faut prendre en compte les besoins nets mais aussi ceux liés aux pertes d'énergie lors de la digestion et l'assimilation des nutriments (fèces, urines, gaz, extra-chaaleur,...) (**Figure 18**) (Drogoul et al., 2004b). Les recommandations

alimentaires prennent ensuite en compte une marge de sécurité sur les besoins alimentaire, en raison des incertitudes sur les calculs de valeurs nutritives des aliments et les variations individuelles des besoins et des conditions d'élevage.

Tableau 8 Recommandations nutritionnelles pour le lapin en croissance.

	Post sevrage immédiat (sevrage jusqu'à 49 jours d'âge)	Finition (49 jours jusqu'à l'âge d'abattage)
Composition chimique (g/kg)		
Energie digestible (MJ/kg)	9.4-9.8	9.8-10.3
Protéines brutes		140-160
Protéines digestibles	≥115	110-115
Amidon	<140	≤180
Fibres		
NDF		330-350
ADF (Lignocellulose)	≥190	≥170
Cellulose brute	≥130	≥110
ADL (Lignine)	≥55	≥50
Fibres digestibles/ADF		≤1,3
Lignine/Cellulose		>0,4
Ingrédients (g/kg)		
Céréales ^a		100-200
Graisses animales ou végétales		5-30
Mélasses		0-30
Pulpes et cosses		0-100
Coproduits de céréales ^b		150-350
Luzerne déshydratée		150-300
Coproduits fibreux ^c		50-150
Concentrés protéiques ^d		120-220

D'après Gidenne (2000) et de Blas et Mateos (De Blas and Mateos, 2010)

Abréviations: NDF: Neutral Detergent Fibre; ADF: Acid Detergent Fibre; ADL: Acid Detergent Lignin. ^a Principalement blé et avoine; ^b Principalement du son de blé, du gluten feed de maïs et des coproduits de distilleries; ^c Principalement de la paille, et des coproduits d'olive et de raisin; ^d Principalement du tournesol, du colza et du soja.

Les besoins alimentaires du lapin varient en fonction de son stade de développement physiologique et de son activité. En élevage conventionnel, la vie du lapin en croissance peut se

découper en deux phases : du sevrage à 49 jours d'âge, puis de 49j d'âge jusqu'à l'âge d'abattage (70 à 74j). Comme présenté précédemment, durant la phase post-sevrage le risque de troubles digestifs est généralement plus élevé. L'aliment sera donc formulé en fonction de cette contrainte avec un enrichissement en fibres. En revanche, en fin de croissance le risque de pathologies digestives est souvent plus faible, l'aliment sera alors formulé pour contenir moins de fibres et avoir une concentration énergétique plus élevée, permettant d'améliorer l'indice de consommation.

Ici nous verrons les différents nutriments nécessaires à la croissance et à la bonne santé du lapin en croissance et les recommandations quant à leur taux d'incorporation dans l'aliment (**Tableau 8**). Dans un dernier temps nous aborderons les contraintes économiques et environnementales ayant un impact fort sur la formulation alimentaire.

I.A. LES APPORTS D'ÉNERGIE DIGESTIBLE

Chez le lapin, les recommandations sont généralement basées sur l'énergie digestible (ED), calculée par différence entre l'énergie brute de l'aliment ingéré et les pertes fécales. Les pertes d'énergie dans les urines sont très fortement liées à la concentration en azote urinaire (Xiccato and Trocino, 2010). Il est donc plus simple (moins coûteux et plus rapide) de les calculer par équation, et non de les mesurer. Ainsi, l'énergie métabolisable (EM) n'est pas utilisée pour définir les besoins, contrairement à ce qui peut être pratiqué dans d'autres espèces d'élevage telles que les volailles (**Figure 18**). Enfin, les pertes par fermentations gazeuses ou liées à la digestion (extra-chaleur) sont difficiles à mesurer chez le lapin, et ont été peu étudiées. L'utilisation de l'ED peut induire des biais d'évaluation des nutriments avec, notamment, une surestimation de la valeur énergétique des fibres digestible et une sous-estimation de celle des matières grasses. Ces biais sont principalement liés à une différence de coût énergétique de l'assimilation de ces nutriments. Il convient donc de prendre ces facteurs en considération lors de l'évaluation de l'énergie digestible d'un aliment (Villamide et al., 2010a).

Chez le lapin en croissance, une concentration énergétique de 9,4 à 9,8 MJ d'ED/kg est recommandée en période post-sevrage, alors que ces valeurs peuvent être augmentées à 9,8 à 10,3 MJ ED/kg en période de "finition" (**Tableau 8**) (Gidenne, 2000). Comme précisé dans le Chapitre 1, le lapin régule assez bien son ingestion dans une certaine gamme de concentration énergétique par le biais de modifications de la glycémie et des concentrations en AGV sanguins (Gidenne et al., 2010c). L'ingéré énergétique est ainsi stable (0,9 à 1 MJ ED/kg PV^{0,75}) dans une gamme de concentration énergétique de 9 à 11 MJ d'ED/kg, sachant que 40 à 50% de cette énergie

est allouée aux besoins d'entretien (Xiccato and Trocino, 2010). En dessous du seuil de 9 MJ d'ED/kg, les limites imposées par la physiologie digestive ne permettent plus au lapin d'augmenter son ingéré pour couvrir ses besoins. L'ingestion des autres nutriments va donc en grande partie dépendre de la concentration en énergie digestible de l'aliment. Il conviendra d'exprimer la concentration alimentaire de ces nutriments (protéines notamment) par rapport à la concentration en énergie digestible afin de couvrir tous les besoins nutritionnels du lapin. L'ingestion dépend aussi de d'autres facteurs, tels que la forme d'apport énergétique. En effet, la relation entre niveau d'ingestion et concentration énergétique est avérée lorsque la source principale d'énergie est l'amidon. Dans ce cas, l'ingéré est même plus précisément corrélé à la concentration en lignocellulose (ADF) (Gidenne et al., 2010c). Si l'accroissement de la concentration en ED se fait via un apport de lipides, sans variation du taux de fibres alimentaires, le niveau d'ingestion brut est peu modifié, augmentant l'ingéré d'ED. Enfin, l'ED de l'aliment peut augmenter dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire post-sevrage (Cf Chapitre 2), et peut varier selon les conditions d'élevage (température, hygrométrie,...) et le stade physiologique de l'animal (adulte vs jeune) (Xiccato and Trocino, 2010). Une bonne connaissance des qualités nutritionnelles des matières premières est dès lors nécessaire afin d'effectuer une formulation précise de la valeur énergétique des aliments.

I.B. LES FIBRES

Les fibres englobent de nombreux constituants des parois végétales : les lignines (ADL), la cellulose (\approx ADF-ADL), les hémicelluloses (\approx NDF-ADF), les pectines solubles et insolubles et les polysaccharides solubles (**Figure 9**, Chapitre 2). Sachant que les lignines sont très peu dégradables par le microbiote du tube digestif chez les mammifères, les fibres peuvent être classées par rapport à leur niveau de digestibilité chez le lapin en trois principales classes: les fibres peu digestes et lentement fermentescibles (lignines et cellulose \approx ADF), les fibres digestibles (hémicelluloses et pectines insolubles) et enfin les fibres très digestibles et très rapidement fermentescibles qui sont solubles dans l'eau (arabinoxylanes solubles, pectines solubles, bêta-glucanes, ...). Les fibres représentent ainsi la fraction la plus importante de l'aliment du lapin avec 40 à 50% du total (Gidenne et al., 2010a) (**Tableau 8**).

Chaque fraction fibreuse (ADF, ADL,...) a, selon sa digestibilité, une signification nutritionnelle particulière en lien avec la santé digestive du jeune lapin. Mais, les méthodes d'analyse couramment utilisées en alimentation animale ne permettent cependant pas de mesurer précisément chacune de ces fractions fibreuses. Néanmoins, pour établir des recommandations

en taux de fibres, Gidenne (2003) a proposé d'utiliser les critères de la méthode de fractionnement de Van-Soest pour définir les apports en fibres peu digestibles: les Lignines (résidu ADL) et la cellulose (ADF-ADL). Les fibres peu digestibles, car lentement fermentescibles, représentées par la fraction lignocellulosique (ADF), bien que peu intéressantes d'un point de vue énergétique, jouent un rôle important dans le maintien de la santé digestive chez le lapin. L'augmentation de la proportion d'ADF dans l'aliment induit inévitablement une diminution de la concentration en ED de celui-ci. Ainsi, au-delà d'un certain seuil d'ADF (>220 g/kg) le lapin en croissance ne parvient plus à couvrir ses besoins énergétiques via une augmentation de l'ingestion, induisant une diminution de la vitesse de croissance et de l'efficacité alimentaire. Cependant, un déficit en fibres peu digestibles (ADF<150 g/kg) induit une augmentation des risques de troubles digestifs (Bennegadi et al., 2001; Blas et al., 1994). De plus, il est important de noter que la qualité de la lignocellulose joue un rôle sur la santé digestive. En effet, une augmentation du ratio lignines sur cellulose réduit l'incidence des troubles digestifs (Gidenne et al., 2001a).

Les fractions les plus digestibles des fibres (hémicelluloses et pectines insolubles) jouant aussi un rôle dans la santé digestive du lapin, Gidenne (2003) a suggéré l'utilisation d'un critère "mixte" : les fibres digestibles, correspondant à la somme des "hémicelluloses" (mesurée par analyse = NDF-ADF) et des pectines insolubles (calculée à partir des tables). Etant rapidement fermentescibles, les fibres digestibles constituent un apport énergétique non négligeable qui sera détaillé dans la partie III. A niveaux d'ADF équivalents, l'incidence des troubles digestifs est réduite via un apport en fibres digestibles en substitution d'amidon (Gidenne et al., 2001b; Perez et al., 2000b). Cependant, lorsque le ratio fibres digestibles sur ADF augmente excessivement l'index de risque sanitaire (mortalité + morbidité) s'accroît (Gidenne, 2003). Trois critères sont dès lors utilisés pour évaluer l'apport en fibres : la quantité de lignocellulose (ADF), sa qualité, définie par la concentration en lignines (ADL) et l'équilibre entre fibres digestibles "FD" et peu digestibles, défini par le ratio FD /ADF (Gidenne, 2003). Ainsi, les apports en ADF doivent être supérieurs à 190 g/kg d'aliment en post sevrage et 170 g/kg en finition, la concentration en lignines doit être supérieure à 50 g/kg et le ratio FD/ADF doit demeurer inférieur à 1,3 (**Tableau 8**). Dès lors, un équilibre doit être trouvé entre ingestion énergétique et sécurité sanitaire pour définir les apports en fibres, digestibles **et** peu digestibles.

Les mécanismes sous-jacents à l'effet bénéfique des fibres sur la santé digestive sont encore mal connus, mais plusieurs hypothèses ont été formulées. Les fibres peu digestibles, et en particulier les lignines, induisent des modifications du transit. En effet, un apport accru de fibres peu digestibles accélère la vitesse du transit dans tous les compartiments du tube digestif et stimule par conséquent l'ingestion (Gidenne, 2003). Cette augmentation de la vitesse de transit

permettrait de stabiliser l'activité microbienne. D'une manière générale, les fibres affectent le microbiote digestif et son activité. En effet, un apport accru de la fraction NDF contribue à une augmentation de la diversité microbienne au niveau iléal et à une diminution de celle-ci au niveau caecal (Nicodemus et al., 2004). Les fibres digestibles (principalement la fraction pectines insoluble), quant à elles, réduiraient le pH et augmenteraient la concentration caecale en AGV (De Blas, 2013; Garcia et al., 2002). Enfin, l'augmentation de la fraction NDSF (Fibres solubles) augmenterait la surface d'échange digestive et modulerait la fréquence de détection de certaines espèces bactériennes potentiellement pathogènes (Gomez-Conde et al., 2007; Gomez-Conde et al., 2009).

I.C. LES APPORTS PROTEIQUES

Chez le lapin, comme chez les autres mammifères, les apports protéiques ont une grande importance dans l'alimentation car ils permettent la synthèse protéique, notamment des muscles. La valeur nutritive des apports azotés dépend de deux facteurs : leur digestibilité et leur composition en acides aminés. Ces apports doivent être sous forme de protéines ou d'acides aminés de synthèse, le lapin ne valorisant pas les apports azotés non protéiques tels que l'urée (Salses and Raynaud, 1977). De plus, certains acides aminés nécessaires au métabolisme et à la croissance ne peuvent être synthétisés par l'organisme et doivent donc impérativement être apportés via l'alimentation, c'est ce qu'on appelle les acides aminés essentiels qui sont au nombre de huit: la lysine, la thréonine, la méthionine, la phénylalanine, l'isoleucine, le tryptophane, la leucine et la valine (Villamide et al., 2010b).

Comme pour l'énergie, les nutritionnistes préfèrent se référer à la quantité de matière azotée digestible, aussi appelée protéine digestible (PD), plutôt qu'à la matière azotée brute de l'aliment. Les besoins protéiques d'entretien sont, comme pour l'énergie, sont fonction du poids métabolique et sont estimés à 2,9 g PD/kg $PV^{0,75}$ (Xiccato and Trocino, 2010). Sachant qu'en alimentation libre, le lapin régule son ingestion en fonction du niveau d'ED de l'aliment, la formulation d'un aliment doit s'effectuer sur la base du ratio PD sur ED pour garantir la quantité de protéines digestibles réellement ingérée (Villamide et al., 2010b). Pour le lapin en croissance on recommande une concentration d'au moins 115 g de PD/kg d'aliment en post-sevrage, et comprise entre 110 et 115 g/kg en finition (**Tableau 8**), soit un ratio PD/ED entre 10 et 11 g PD/MJ d'ED (De Blas et al., 1981; Xiccato and Trocino, 2010). D'autres auteurs proposent des ratios différenciés selon l'âge: supérieurs à 12 g PD/MJ d'ED en post-sevrage et compris entre 11,5 et 12 g PD/MJ d'ED en finition (Gidenne, 2000). L'utilisation des valeurs de PD est cependant remise en

question pour deux raisons principales : l'absorption des acides aminés intervient au niveau de l'intestin grêle et les protéines endogènes représentent plus de 60% du flux azoté total chez le lapin (Carabaño et al., 2009). De ce fait, et en fonction de la qualité des matières premières qui fournissent les protéines végétales, la digestibilité fécale apparente ne représente pas la digestibilité réelle des protéines ingérées. Ainsi, la valeur protéique d'un ingrédient sera classée différemment si sa digestibilité iléale, et non fécale, est prise en compte, ce qui modifiera la valeur nutritive calculée par formulation. Ces données sont donc à prendre en considération lors de l'évaluation de la qualité nutritionnelle des aliments.

Enfin, l'équilibre des apports en acides aminés est essentiel à la protéosynthèse, et donc à la croissance. En effet, la carence en un, ou plusieurs acides aminés (appelés facteurs limitants), entraîne une diminution des performances de croissance et une augmentation des rejets azotés. Chez le lapin quatre acides aminés ont pu être identifiés comme limitant de par leur faible concentration dans les matières premières couramment utilisées : la méthionine (et/ou la cystine), la lysine et la thréonine. Cependant, assez peu d'informations sont disponibles sur les concentrations alimentaires des autres acides aminés et les besoins du lapin en croissance (Xiccato and Trocino, 2010). Les suppléments en acides aminés de synthèse sont donc souvent effectués de façon relativement empirique.

Lorsque les besoins en acides aminés essentiels sont couverts, les besoins en PD sont proportionnels à la vitesse de croissance. Cependant, l'efficacité de transformation des protéines alimentaires en muscle diminue avec l'âge, les besoins d'entretiens augmentant également en proportion du poids métabolique. Comme présenté dans le chapitre 2, la digestion des protéines d'origine fibreuse ou endogène s'effectue au niveau du caecum via l'action de la flore endogène. L'excès de protéines pourrait dès lors être favorable au développement de certaines flores pathogènes, comme *E. coli* et les bactéries du genre *Clostridium*, induisant une dégradation de l'état sanitaire (Gidenne et al., 2007).

I.D. LES VITAMINES ET MINERAUX

Les vitamines sont des composés complexes indispensables au métabolisme et à la croissance. En effet, les carences vitaminiques entraînent des baisses de performances systématiques en élevage. Chez le lapin, la synthèse protéique bactérienne dans le caecum permet la synthèse de vitamines B, C et K qui sont par la suite ingérées via les caecotrophes. Une grande partie des besoins en ces trois vitamines sont donc couverts par la caecotrophie (Mateos et al., 2010). Enfin,

la vitamine A aurait un rôle important dans les défenses immunitaires, expliquant les forts niveaux d'incorporations alimentaires recommandés (**Tableau 9**).

Tableau 9 Recommandations en apports de minéraux et de vitamines chez le lapin en croissance.

	Post sevrage immédiat (sevrage jusqu'à 49 jours d'âge)	Finition (49 jours jusqu'à l'âge d'abattage)
Minéraux (g/kg)		
Calcium	6,0	4,0
Phosphore	4,5	3,2
Sodium		2,0-2,3
Chlore		1,7-3,2
Oligo-éléments (mg/kg)		
Fer		35-50
Cuivre		5-10
Zinc		40-60
Vitamines (ppm)		
Vitamine A		10000 UI
Vitamine D		1000 UI
Vitamine E		50
Vitamine K		2
Vitamine B1		2
Vitamine B2		6
Vitamine B6		2
Vitamine B12		0,01
Nicotinamide (vit PP)		30-50
Acide pantothénique		20
Acide folique		1-5
Biotine		0,1
Choline		200
Vitamine C		250

D'après Mateos et al. (2010), Drogoul et al. (2004a) et Lebas. (2000).

Comme pour tout animal en phase de croissance, les besoins en calcium et en phosphore sont importants chez le lapin, en particulier après le sevrage où la vitesse de croissance est élevée (**Tableau 9**). En effet, ces minéraux ont un rôle essentiel dans la contraction musculaire (calcium) et la croissance osseuse (calcium et phosphore). En revanche, les besoins en sodium et en chlore sont faibles. Les minéraux sont par la suite déposés dans les tissus musculaires notamment. La

viande de lapin est par conséquent riche en calcium et en phosphore mais pauvre en sodium et en potassium (Mateos et al., 2010).

I.E. CONTRAINTES ECONOMIQUES ET ENVIRONNEMENTALES DANS LA FORMULATION ALIMENTAIRE

L'objectif premier de l'éleveur n'est pas de maximiser les performances mais plutôt d'optimiser la rentabilité économique de son exploitation. Dès lors, le coût des matières premières joue un rôle important et la démarche de formulation ne peut être appliquée indépendamment du contexte économique. En effet, dans l'infinité des solutions techniques, c'est-à-dire des formulations possibles, il convient de choisir celle qui permet de minimiser le coût, à niveau égal de performances et de qualité de produit, ou bien de maximiser la marge de transformation des aliments en produits animaux. Dans le contexte économique actuel, les formules alimentaires peuvent connaître des changements importants. En effet, le prix des céréales (blé notamment) ayant considérablement augmenté, d'autres matières premières, telles que les coproduits de l'industrie agro-alimentaire, peuvent être d'avantage utilisées.

Enfin, les contraintes environnementales actuelles imposent une réduction des effluents d'élevages. Les rejets azotés sont les principaux agents mis en cause en raison de leur pouvoir de contamination important des sols et des nappes phréatiques. Dès lors, un ajustement précis des apports protéiques est nécessaire afin d'optimiser les performances mais aussi pour limiter les rejets (Xiccato and Trocino, 2010).

II. APPORTS ENERGETIQUES ET MODULATION DE LA CROISSANCE ET DE LA SANTE

II.A. MODULATION DE LA CROISSANCE ET DE LA SANTE VIA LES SOURCES D'ENERGIE

L'augmentation de la concentration en ED jusqu'à un seuil de 10 à 10,5 MJ/kg permet d'améliorer la vitesse de croissance (Renouf and Offner, 2007; Xiccato and Trocino, 2010) et surtout l'efficacité alimentaire, mais aurait un effet délétère sur la santé digestive (Gidenne et al., 2009a; Renouf and Offner, 2007) même avec une couverture en fibres suffisante.

Il est cependant difficile d'émettre des conclusions tranchées quant à l'effet "propre" du niveau énergétique sur la croissance et la santé digestive. En effet, l'origine de l'énergie a un effet important sur ces critères. En alimentation cunicole, l'énergie est principalement apportée par trois sources : l'amidon, les fibres digestibles et les lipides. Ces trois sources ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients que nous allons présenter ici.

II.A.1. Lipides

Les lipides sont la source d'énergie la plus concentrée puisque un gramme de lipides apporte en moyenne 37 kJ d'énergie et leur digestibilité est élevée chez le lapin en croissance (80 à 85%). Ainsi, un apport de lipides à raison de 10 g/kg d'aliment permet théoriquement d'augmenter la concentration en ED d'un aliment d'environ 314 kJ. De plus, chez le lapin en croissance, l'incorporation de lipides favoriserait le développement du système immunitaire et limiterait par conséquent les troubles digestifs (Xiccato, 2010). Leur taux d'incorporation dans l'aliment est cependant limité par deux facteurs : technologique et nutritionnel. En effet, l'incorporation de matières grasses réduit la tenue du granulé qui devient friable lorsque trop gras. L'augmentation du taux de matières grasses alimentaires augmente également le dépôt adipeux, rendant les carcasses plus grasses. Pour ces deux raisons, l'incorporation de matières grasses est inhabituelle pour le lapin en croissance et leur concentration reste en général inférieure à 30 g/kg.

II.A.2. Amidon

L'amidon est un polysaccharide végétal ayant, au sein de la plante, une fonction de réserve énergétique. L'amidon est une source d'apport énergétique intéressante car très digestible (digestibilité fécale > 0,97) chez le lapin (Blas and Gidenne, 2010). Sa digestion a principalement lieu au niveau intestinal (digestibilité iléale > 0,89) via l'action de l'amylase pancréatique. Cependant, chez le jeune lapin, comme l'activité pancréatique n'est pas totalement mature avant 42 jour (Scapinello et al., 1999), la concentration alimentaire en amidon est limitée afin d'éviter un gaspillage énergétique via l'activité fermentaire caecale. Dès lors, il est recommandé de limiter le niveau d'incorporation d'amidon à 140 g/kg d'aliment en post-sevrage alors que ce niveau peut être nettement plus élevé en finition (**Tableau 8**). Enfin, l'apport important d'amidon peu digestible (maïs, ou encore amidon cru de pomme de terre) au niveau intestinal peu également entraîner des troubles digestif (Gidenne, 1996), même si certains auteurs n'ont pas observé de dégradation du statut sanitaire avec l'incorporation de ce type de matières premières (Pinheiro et al., 2013). Il est donc important d'évaluer la quantité et la qualité de l'amidon apporté via l'alimentation.

II.A.3. Fibres digestibles

Contrairement à la fraction ADF, les hémicelluloses et les pectines sont relativement digestibles (cf **Tableau 6**, chapitre 2). La substitution de matières premières riches en amidon par des matières premières riches en fibres digestibles (pulpes de betterave, coques d'oléoprotéagineux, son de blé) affecte peu la vitesse de croissance ou l'efficacité alimentaire (Perez et al., 2000b). De plus, comme évoqué en partie I, à niveaux d'ADF équivalents, les fibres digestibles ont un effet favorable sur la santé du lapin en croissance en substitution d'amidon ou de protéines (Gidenne et al., 2013a). Les fibres digestibles constituent donc une source d'apport énergétique intéressante chez le lapin en croissance.

II.B. **REGULATION DE L'INGESTION ET APPORTS ENERGETIQUES**

Un aliment à forte concentration énergétique favorise la vitesse de croissance, l'efficacité alimentaire et le rendement à l'abattage. Aussi, pour compenser les effets délétères de la restriction alimentaire sur ces trois paramètres, il serait possible d'utiliser ce type d'aliment "énergétique". Peu d'études ont analysé cette possibilité et son impact sur la santé digestive post-sevrage. Les deux études disponibles sur ce sujet présentent des effets contradictoires. En effet, avec une restriction de 20% Gidenne et al. (2009a) ont observé qu'un aliment énergétique tendait à détériorer l'état sanitaire sans amélioration de la croissance, alors que Foubert et al. (2008) ont pu mettre en évidence une amélioration de la croissance sans détérioration de l'état sanitaire. La source d'énergie différait cependant entre ces deux études. De plus, les résultats ont été obtenus sur un faible nombre d'animaux. Il serait donc pertinent d'étudier l'optimisation des stratégies de limitation de l'ingestion via l'accroissement de la concentration énergétique de l'aliment, et de vérifier si la source de l'énergie (lipides, amidon, ...) n'interagit pas avec les effets sur la croissance et la santé.

Trois leviers nutritionnels principaux modulent la santé digestive et la croissance : l'énergie, les protéines et les fibres. Les fibres favorisent la santé digestive alors que les protéines et l'énergie favorisent la croissance et le rendement à l'abattage. Un équilibre est dès lors nécessaire entre ces nutriments pour optimiser les performances zootechniques.

Questions soulevées :

***L'utilisation d'un aliment haut en énergie digestible chez des lapins soumis à une restriction alimentaire permettrait il de compenser, ou tout au moins limiter, la baisse de croissance et de rendement à l'abattage induite par la restriction alimentaire ?
Quelle source majoritaire d'énergie digestible serait la plus intéressante pour atteindre cet objectif sans pénaliser la santé digestive ?***

OBJECTIFS

Dans un contexte de limitation des intrants médicamenteux, les stratégies de restrictions alimentaires constituent une alternative intéressante à l'antibiothérapie en permettant de préserver la santé du lapin en croissance via une réduction de la mortalité et la morbidité en post-sevrage. De plus, ces stratégies permettent d'améliorer l'efficacité alimentaire des animaux. Dès lors, les stratégies de restriction alimentaire présentent un intérêt économique majeur et sont largement appliquées dans les élevages professionnels en France. Cependant, ces stratégies induisent également une diminution de la croissance et du rendement à l'abattage, ce qui peut constituer un manque à gagner non négligeable pour l'éleveur. Par ailleurs, les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire ne sont pas connus (**Figure 19**). Une meilleure connaissance de ceux-ci permettrait également d'optimiser les stratégies de restriction alimentaire.

De ces constats ont émané deux objectifs principaux :

- i) Optimiser les performances zootechniques des lapins soumis à une restriction alimentaire via une modulation de la composition chimique des aliments.***
- ii) Expliquer les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire.***

Ces deux objectifs complémentaires répondent à un enjeu commun d'optimisation des stratégies de restriction alimentaire en vue de limiter les intrants médicamenteux en élevage cunicole

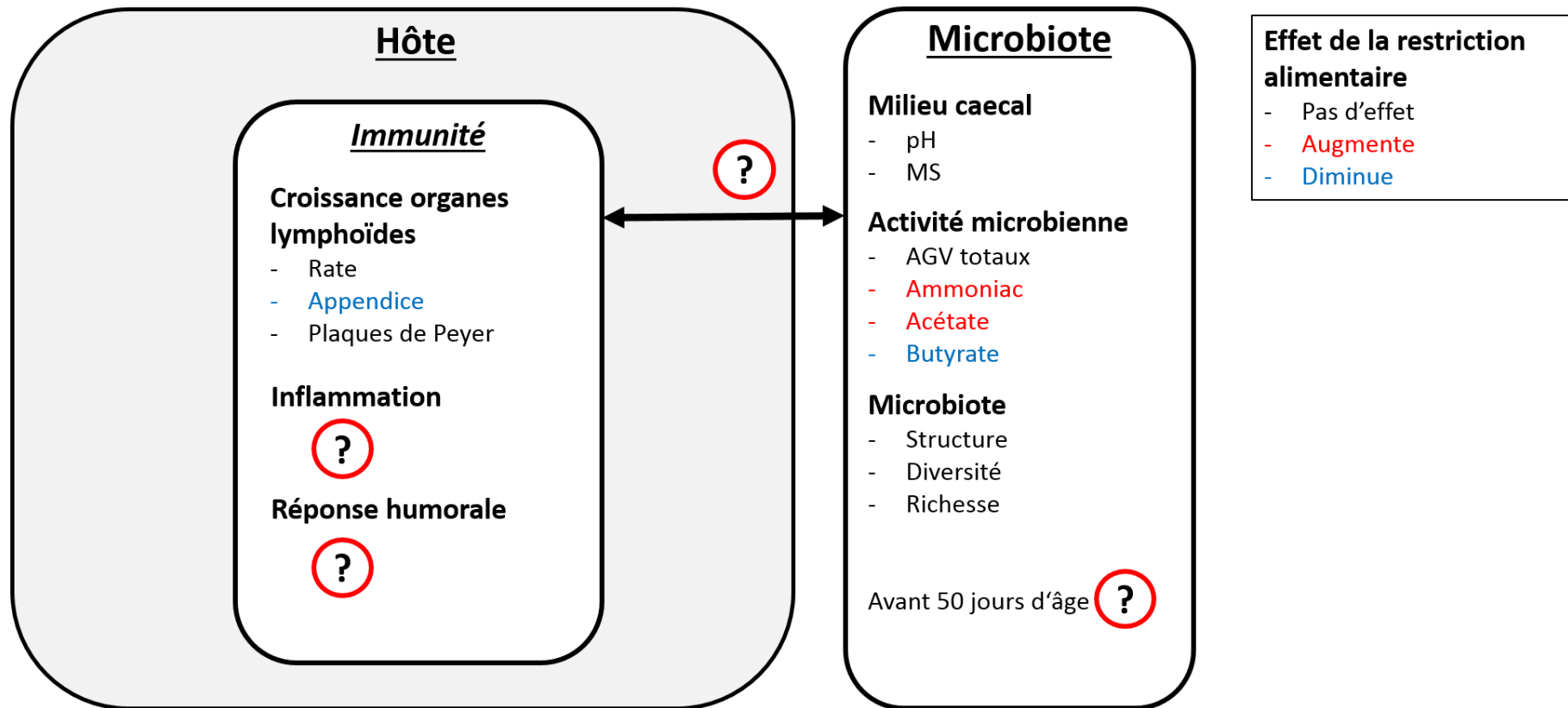


Figure 19 Les connaissances actuelles des effets de la restriction alimentaire sur la physiologie du lapin en croissance.

La restriction alimentaire n'affecterait pas la croissance des organes lymphoïdes, à l'exception d'une réduction légère pour l'appendice caecale. En revanche, aucune étude n'a permis de déterminer l'effet de la restriction alimentaire sur la réponse immunitaire innée (inflammation) ou humorale. Au niveau caecal, la restriction alimentaire modifierait le profil fermentaire (\nearrow acétate et \searrow butyrate) alors que la structure du microbiote ne semble pas affectée après 50 jours d'âge. En revanche aucune étude ne s'est intéressée à la composition du microbiote caecal avant 50 jours. De façon analogue, aucune information n'est disponible sur les interactions possibles entre ces deux facteurs.

Afin de répondre à ces deux objectifs, deux études ont été menées avec une même stratégie de limitation de l'ingestion après le sevrage, dite « 4+1 », avec quatre semaines d'ingestion limitée à 75% de l'ingestion libre suivies d'une semaine d'alimentation à volonté.

Nos résultats ont été retranscrits dans cinq articles (**Figure 20** et **Tableau 10**) :

- La première étude visait à étudier les interactions entre restriction alimentaire et concentration énergétique de l'aliment. En effet, une modulation de la quantité d'énergie digestible (ED) ingérée permettrait d'améliorer les performances de croissance des animaux soumis à une restriction alimentaire (objectif 1, article 1). D'autre part, la modulation de la quantité et de la "qualité" de l'ingéré nous permettait d'analyser les effets respectifs, sur la santé, de la quantité d'aliment et de l'énergie ingérée (objectif 2).

- La deuxième étude visait à étudier les interactions entre restriction alimentaire et qualité de l'apport énergétique. Notre étude bibliographique a permis de mettre en évidence un impact de la source énergétique sur la santé du lapin en croissance, notamment via une modulation de l'apport de fibres digestibles. Dès lors, nous avons cherché à moduler la santé et la croissance via un apport majoritaire d'énergie digestible via des fibres digestibles ou de l'amidon (objectif 2, article 2).

Afin d'évaluer les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur:

i) l'efficacité alimentaire, des mesures de digestibilité ont été effectuées sur les deux études (objectif 2, articles 1 et 2) ;

ii) la santé, des études du statut immunitaire (objectif 2, articles 3 et 4) et du microbiote digestif (objectif 2, article 5) ont été effectuées principalement lors de la première étude.

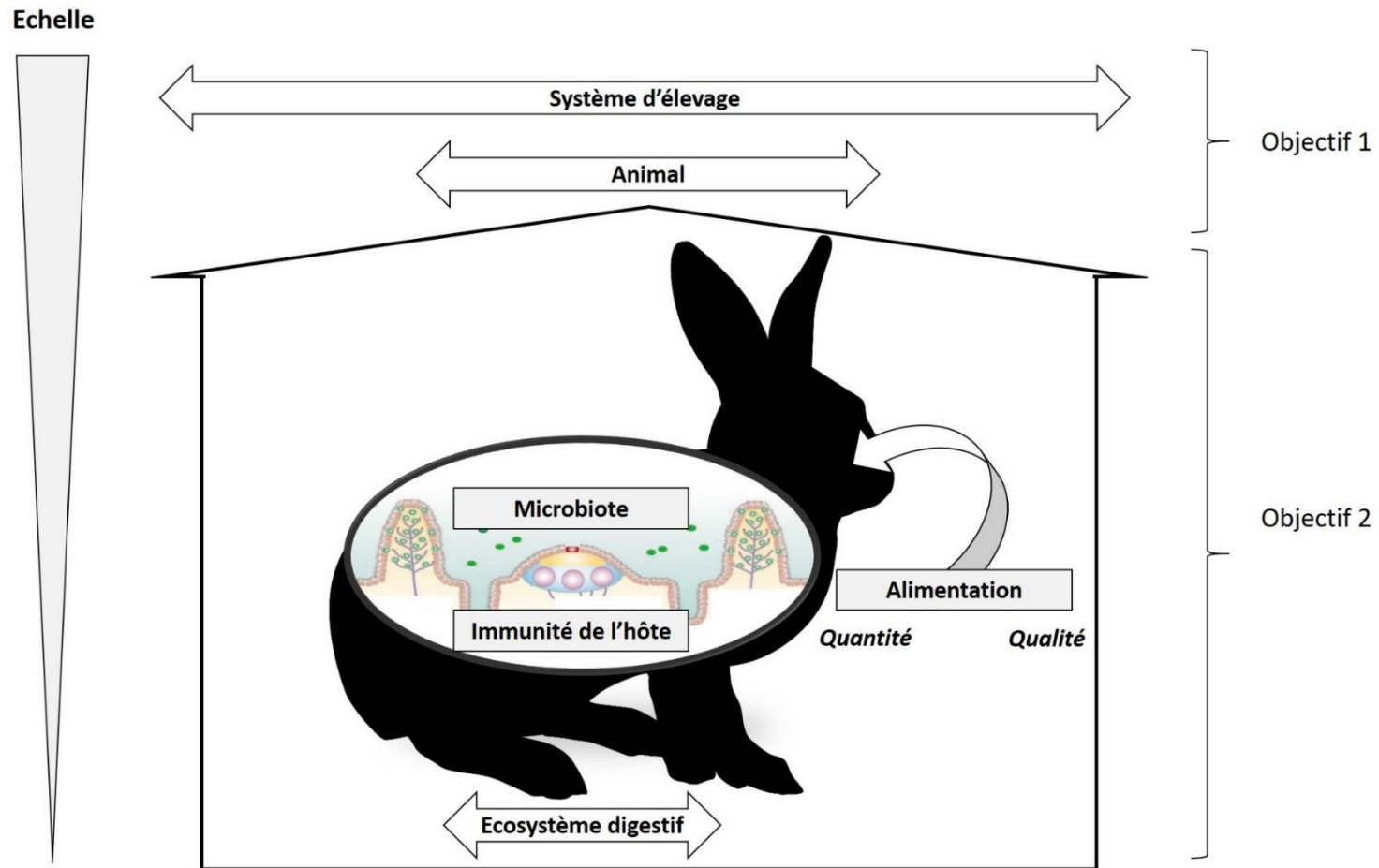


Figure 20 Axes d'approche utilisés pour répondre à nos objectifs.

Nous avons choisi d'étudier les effets de la modulation de la quantité et de la qualité nutritionnelle des aliments à différentes échelles allant du système de production (restreint à l'unité d'engraissement) à l'individu incluant la communauté bactérienne symbiotique de son appareil digestif

L'approche à l'échelle de l'unité d'engraissement des lapins nous permettait de répondre au premier objectif d'optimisation des stratégies alimentaires et leur impact sanitaire et économique tandis que l'intégration des données obtenues à l'échelle individuelle (performance zootechnique, réponse immunitaire, activité et composition de la communauté digestive cecale) apportait des réponses à notre deuxième objectif d'explication des effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur l'efficacité alimentaire et la santé digestive.

Tableau 10 Récapitulatif des travaux et expérimentations effectués.

Etude	Article	Objectifs	Nombre d'animaux par lot	Mesures	Techniques utilisées
Etude 1: Modulation de l'apport énergétique en interaction avec le niveau d'ingestion	Article 1	Optimiser la croissance (objectif 1) Evaluer l'efficacité digestive (objectif 2)	n = 472 pour les mesures de performances n = 12 pour les mesures de digestibilité	Croissance Consommation Sanitaire (mortalité/morbidité) Digestibilité	Pesées Mesures de digestibilité
	Article 3	Evaluation de l'effet du niveau d'ingestion et de l'apport énergétique sur le statut immunitaire (objectif 2)	n = 10/age	Poids rate et appendice Surface plaques de Peyer Anticorps plasmatiques (IgA, IgG) Anticorps fécaux (IgA) Expression de cytokines iléales	Pesées Analyse d'images (ImageJ) ELISA RT-qPCR
	Article 5	Evaluation de l'effet du niveau d'ingestion et de l'apport énergétique sur le microbiote digestif et son activité (objectif 2)	n = 10/age	Communauté bactérienne AGV, NH3 pH Matière sèche	Séquençage haut débit 454 CPG, colorimétrie Mesure <i>in-vivo</i> post mortem Pesées
Etude 2: Modulation de la qualité énergétique en interaction avec le niveau d'ingestion	Article 2	Optimiser la croissance (objectif 1) Evaluer l'efficacité digestive (objectif 2)	n = 418 pour les mesures de performances n = 12 pour les mesures de digestibilité	Croissance Consommation Sanitaire (mortalité/morbidité) Digestibilité	Pesées Mesures de digestibilité
Méthodologie : stimulation de l'inflammation avec du LPS Application à l'étude 2	Article 4	Mise au point méthodologique Evaluation de l'effet du niveau d'ingestion sur la réponse inflammatoire (objectif 2)	n = 5 (mise au point 1) n = 6 (mise au point 2) n = 8 (étude 2)	Croissance Température Cytokine TNF- α	Pesées Prise de température rectale ELISA

ETUDE

EXPERIMENTALE

Chapitre 1 – Optimisation des performances zootechniques chez le lapin en croissance soumis à une restriction alimentaire

Le premier objectif de cette thèse était d'optimiser la croissance et le rendement à l'abattage du lapin soumis à une stratégie de restriction alimentaire sans pénaliser les paramètres sanitaires. Nous avons tenté de répondre à cet objectif à travers deux études :

- La première étude visait à étudier les interactions entre restriction alimentaire et concentration énergétique de l'aliment. En effet, une hausse de la concentration en énergie digestible (ED) permet habituellement d'augmenter la quantité d'énergie digestible ingérée et donc d'augmenter la vitesse de croissance. Il s'agissait ici d'optimiser les performances de croissance et d'abattage des animaux restreints via une augmentation de l'ingéré énergétique, sans pénaliser les paramètres sanitaires (**Article 1**).

- La deuxième étude visait à étudier les interactions entre restriction alimentaire et qualité de l'apport énergétique. Notre bibliographie a permis de mettre en évidence un impact de la source de l'ED sur la santé digestive du lapin en croissance, via une modulation de l'apport de fibres digestibles notamment. Nous avons donc cherché à moduler la santé et la croissance via un apport d'énergie digestible fourni majoritairement par des fibres digestibles en comparaison avec de l'ED fournie par de l'amidon (**Article 2**).

Nous avons également effectué des mesures de digestibilité fécale au cours de ces deux études, pour répondre à notre 2^{ème} objectif d'expliquer les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur l'efficacité alimentaire.

I. L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION EN ENERGIE DIGESTIBLE DE L'ALIMENT AMELIORE L'EFFICACITE ALIMENTAIRE SANS DETERIORER LA SANTE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE SOUMIS A UNE RESTRICTION ALIMENTAIRE

Article publié dans *Livestock Science*, 2014, 169, 96-105.

Résumé:

Les stratégies de restriction alimentaire permettent de réduire la mortalité et la morbidité post-sevrage en élevage cynicole, mais induisent une diminution de la croissance et du rendement à l'abattage. Afin de palier à ces effets délétères, sans pénaliser les paramètres sanitaires, nous avons étudié la possibilité d'augmenter la concentration énergétique de l'aliment. Quatre traitements ont été mis en place selon un plan factoriel 2x2 avec deux niveaux d'énergie digestible (bas en énergie, LE = 9.08 MJ d'ED/kg vs haut en énergie, HE = 10.13 MJ d'ED/kg) et deux niveaux d'ingestion (à volonté et restreints à 75% de l'à volonté). Les animaux recevaient les aliments expérimentaux du sevrage (32-26 jours d'âge) à l'âge d'abattage (70-74 jours d'âge) et la restriction alimentaire était appliquée du sevrage à 63-64 jours d'âge. L'efficacité digestive a été évaluée durant la période de restriction alimentaire et lors du retour à volonté sur 48 animaux logés en cages individuelles. Les performances zootechniques ont été évaluées sur quatre sites expérimentaux sur un total de 1888 animaux logés en cages collectives, et des mesures de rendement et de qualité de carcasse ont été effectuées sur 400 animaux. La restriction alimentaire et l'aliment HE amélioraient la digestibilité fécale de la matière organique (+0,04 et +0,06 points respectivement; $P < 0,001$), des protéines (+0,05 et +0,05 points; $P < 0,001$) et de l'NDF (+0,06 et +0,07 points; $P < 0,001$). Lors du retour à volonté, les niveaux d'ingestion antérieurs n'affectaient pas la digestibilité alors que l'aliment avait un effet analogue à celui observé précédemment. La restriction alimentaire réduisait la croissance de 7% au cours de la période totale d'engraissement ($P < 0,001$) et le rendement de 1,1% ($P < 0,0001$). Elle améliorait l'efficacité alimentaire de 9% ($P < 0,001$), alors que l'utilisation de l'aliment HE l'améliorait de 11% ($P < 0,001$). Une réduction de l'ingestion de 25% réduisait l'index de risque sanitaire (IRS) dans des conditions sanitaires favorables et défavorables (2,7% vs 7,1%, $P < 0,01$ et 36,2% vs 44,3%, $P < 0,05$, respectivement). L'utilisation d'un aliment énergétique augmentait la morbidité dans des conditions sanitaires favorables (4,6% vs 2,5%, $P < 0,05$) et avait l'effet inverse dans des conditions sanitaires défavorables (17,5% vs 22,4%). Le calcul de la marge brute ont confirmé l'intérêt économique de la restriction alimentaire chez le lapin en croissance (+0.06 €/kg), alors que l'utilisation d'un

aliment énergétique dans le cadre d'une restriction alimentaire n'était avantageuse que lorsque la mortalité et la morbidité étaient faibles.

Mots clés: restriction alimentaire, énergie, lapin, santé, croissance.

Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status

C. Knudsen^{1,2,3,7}, S. Combes^{1,2,3}, C. Briens⁴, G. Coutelet⁵, J. Duperray⁶, G. Rebours⁷, J-M. Salaun⁸,
A. Travel⁹, D. Weissman¹⁰, T. Gidenne^{1,2,3,*}

¹ INRA, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan,
France

² Université de Toulouse, INP, ENSAT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage),
F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ Université de Toulouse, INP, ENVT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-
31076 Toulouse, France

⁴ CCPA, ZA du Bois de Teillay, F-35150 Janzé, France

⁵ ITAVI, Rue du Rocher, F-75008 Paris, France

⁶ Evalis, Talhouet BP234, F-56006 Vannes, France

⁷ TECHNA, BP10, rte de St Etienne de Montluc, F-44220 Coueron, France

⁸ Sanders, Centre d'affaires l'Odysée, ZAC Cicé Blossac, F-35170 Bruz, France

⁹ ITAVI, UMT BIRD, Centre INRA de Tours, BP1, F-37380 Nouzilly, France

¹⁰ INZO, Rue de l'église, BP50019, F-02407 Chierry, France

* Corresponding author: Thierry Gidenne. Tel: (+33)5 61 28 51 03.

EM: thierry.gidenne@toulouse.inra.fr.

ABSTRACT

Post-weaning feed restriction strategies have proved to reduce mortality and morbidity, but result in decreased growth and lower slaughter yield. To compensate for those deleterious effects without negatively impacting the health parameters, we have studied the possibility of increasing the dietary energy level of the feed. Four treatments differing in dietary digestible energy content (“low” energy content, LE = 9.08 MJ/kg vs “high” energy content, HE = 10.13 MJ/kg), and feeding level (*ad libitum* or restricted at 75%) were formed in a 2 x 2 factorial arrangement. Animals were fed the experimental diets from weaning (32-36 days of age) to slaughter age (70-74 days of age), and feed restriction was applied from weaning to 63-64 days of age. Digestive efficiency was assessed during feed restriction and after one week of *ad libitum* feeding in 48 animals housed in individual cages. A performance experiment was carried out in four different sites involving a total of 1888 animals housed in collective cages, including carcass and meat quality measurements in 400 animals. Feed restriction and the HE diet improved the faecal digestibility of organic matter (+0.04 and +0.06 respectively; $P < 0.001$), crude protein (+0.05 and +0.05; $P < 0.001$) and NDF (+0.06 and +0.07; $P < 0.001$). When returning to an *ad libitum* feeding, no effect of the previous feeding level was observed while the effect of the diet was similar to that observed during feed restriction. Restricted feeding reduced the growth by 7% during the whole fattening period ($P < 0.001$), and the slaughter yield by 1.1% ($P < 0.001$). It improved the feed conversion ratio by 9% ($P < 0.001$), while the HE diet improved it by 11% ($P < 0.001$). A 25% reduction in feed intake reduced the health risk index (HRI) in both good and poor health conditions (2.7% vs 7.1%, $P < 0.01$ and 36.2% vs 44.3%, $P < 0.05$ respectively). The use of a high energy diet increased the morbidity (4.6% vs 2.5%, $P < 0.05$) in good health conditions and had the opposite effect in poor health conditions (17.5% vs 22.4%). Calculations of the gross margin confirmed the economic advantage of feed restriction in growing rabbits (+0.06 €/kg), while the use of a restricted fed high energy diet was profitable only when mortality and morbidity was low.

Keywords: feed restriction, energy, rabbit, health, growth

1. INTRODUCTION

Post-weaning feed restriction has been used in French rabbit breeding systems for over ten years as an efficient method to reduce the incidence of digestive disorders in the growing rabbit (for review, Gidenne et al., 2012b). A reduction of the feed intake greater than 20% reduces the post-weaning mortality and morbidity (Gidenne et al., 2009b). Moreover, feed restriction improves feed efficiency during the restriction period and especially when animals return to an *ad libitum* feeding. However, restricted feeding reduces growth and can alter slaughter yield (Xiccato, 1999). One way to overcome these deleterious effects could be to increase the energy level of the feed. The positive effects of a high-energy diet on digestive efficiency and growth performance in *ad libitum* fed animals are well known (Maertens, 2010), but the effects upon feed restricted animals are scarcely documented. The source of energy is known to impact on the health and growth of the rabbit (Gidenne et al., 2010b). The incidence of digestive disorders is, for instance, reduced when the ratio of digestible fibre to starch is increased (Perez et al., 2000a). Thus, the Groupe d'Experimentation Cunicole (GEC) network, comprising four experimental facilities, conducted the present study. The aim was to optimize the growth and the slaughter yield through the use of a diet rich in digestible energy while preserving the favourable effects of feed restriction upon the post-weaning digestive health. Special attention was given to development of diets with equivalent ratios of digestible fibre, starch and fat on digestible energy in order to study the effect of the energy concentration independently from the contributing nutrients. The experiment was conducted at four experimental sites on 1,936 animals to assess the variability of the field conditions and evaluate the effects of our feeding strategies on the digestive health.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental design, animals, housing and feeding

A bifactorial design was used with two levels of feed intake, *ad libitum* feeding vs restricted feeding at 75% of *ad libitum* (respectively named 100 and 75), and two diets differing in digestible energy (DE) concentration: a “low” DE feed (LE) formulated with 9.08 MJ DE/kg, and a “high” DE feed (HE) formulated with 10.13 MJ DE/kg according to the EGRAN (European Group on Rabbit Nutrition) tables (Maertens et al., 2002). The LE diet was formulated to be slightly below the minimal DE recommendation for a post weaning diet whereas the HE diet was formulated to be slightly below the maximum recommendation for a finishing diet (Gidenne, 2000). Four treatments were consequently formed: LE100, LE75, HE100 and HE75. The diets were formulated to meet with the nutritional requirements of the growing rabbit (De Blas and Mateos, 2010) (**Tableau 11**) without any antibiotics or coccidiostats. Moreover, special attention was given to

obtain a theoretical deviation of 1 MJ DE/kg between the diets with the constraint of obtaining similar ratios of digestible fibre, starch and fat on digestible energy between the two diets. Likewise, both diets were formulated with equivalent levels of neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF). The feeds were manufactured and pelleted at one time using a single batch of raw materials by Euronutrition SAS (Saint-Symphorien, France).

Tableau 11 Ingredients and chemical composition of the experimental diets

	LE ¹	HE ²		LE ¹	HE ²
Ingredients (g/kg)			Chemical composition (g/kg)		
Wheat	50	150	Dry matter	873	874
Barley	34	20	Crude ash	75	59
Wheat bran Milurex®	130	20	Crude protein (N X 6.25)	147	160
Pea	20	24	Digestible protein³	97	110
Rapeseed meal	32	110	Starch	102	118
Sunflower meal	157	223	Total sugars	65	58
Alfalfa	225	30	Crude fat	28	37
Wheat straw	70	59	Crude fibre	176	171
Sugarbeet pulp	108	208	Total dietary fibre (TDF)	413	407
Grape pulp	63	40	Neutral detergent fibre (NDF)	360	346
Apple pomace	20	50	Acid detergent fibre (ADF)	227	218
Cane molasses	60	30	Acid detergent lignin (ADL)	71	66
Rapeseed oil	5	17	Digestible fibre⁴	184	207
Dicalcium phosphate	5	0	Soluble fibre (TDF-NDF⁵)	11	27
Calcium carbonate	1	2	Gross energy (MJ/Kg)	16.15	16.57
Methionine 15%	3	1	Digestible energy (MJ/Kg)³	9.08	10.13
L-Lysine 25%	6	5			
Threonine 10%	1	2			
Vitamin premix	10	10			

¹ LE = Low energy diet; ² HE = High energy diet; ³ Calculated according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002); ⁴ Calculated as the sum of (NDF-ADF) and water insoluble pectins according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002); ⁵ NDF corrected for ash and nitrogen.

The study was conducted by the Groupe d'Experimentation Cunicole (GEC) network, and included two experiments: one experiment to measure the digestive efficiency, and a large scale multi-site experiment to obtain measurements of performances (growth, feed conversion and health). The

digestibility experiment was conducted at the INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UE PECTOUL (Castanet-Tolosan, France) breeding unit. Twelve animals per treatment were housed in individual metabolism cages (0.2 m² per rabbit). The performance experiment was replicated during the Spring of 2012 with the same protocol at four experimental sites in France (Euronutrition-SAS Saint-Symphorien, Evialis St Nolff, INRA, UE PECTOUL Castanet-Tolosan and ITAVI (Institut Technique de l'AViculture) Rambouillet). A total of 472 animals per treatment were used in closed units where the environment (temperature, lighting and ventilation) was monitored and controlled. The number of animals used differed according to the site (**Tableau 12**). They were housed in collective cages of five to seven animals, the density ranging from 14.5 to 19.0 rabbits/m² depending on the site. For both experiments, animals of both sexes were allotted at weaning (32-36 days of age) according to their weaning weight and litter of origin. Thus, litters were spread over the four treatments, and weight was standardised among treatments within each site. Within each treatment the mean live weight was similar among cages. The animals were then fed freely or restricted during four weeks after weaning (until 63-64 days of age), according to the treatment. Afterwards, all groups were fed freely until the end of the experiments (i.e. 74 days of age for the digestibility experiment, and slaughter at 71-72 days of age for the performance experiment).

The amounts of feed distributed to the restricted groups were calculated on the basis of a theoretical *ad libitum* ingestion curve, and readjusted for each diet and for each site according to the real ingestion of the *ad libitum* fed groups (LE100 and HE100) for periods of three to four days. The feed distributed was readjusted to the number of animals present in the cage depending on mortality. Feed was given once daily between 0800 and 0830 and water was provided *ad libitum*. Animals were handled according to the recommendations in animal care in experimentation in agreement with the Journal Officiel de la République Française 0278, 20652 (2009).

Tableau 12 Experimental conditions at the different sites and effective feed restriction for each experiment and diet.

	Number of rabbits per treatment	Rabbits per cage/ number of cages per treatment	Genotype	Age at weaning (days)	Age at the end of the restriction period (days)	Age at slaughter (days)	Number of slaughtered animals	Effective feed restriction (% of <i>ad libitum</i> intake)	
								LE ¹	HE ²
Digestibility experiment	12	1/12	INRA breed	35	63	- ³	- ³	75	76
Performance experiment									
Site 1	140	7/20	Hyplus	32	64	72	30	71	72
Site 2	120	6/20	Hyplus	36	64	72	40	74	73
Site 3	132	6/22	Hyplus	35	63	71	30	77	75
Site 4	80	5/16	INRA breed	35	63	- ⁴	- ⁴	75	74

¹ LE = Low Energy diet; ² HE = High Energy diet; ³ The animals weren't slaughtered but the experiment ended at 74 days of age; ⁴ The animals weren't slaughtered but the experiment ended at 72 days of age.

2.2. Growth, feed intake and health status measurements

Animals were weighed individually at weaning (32-36 days of age), in the middle of the restriction period (49-50 days of age), at the end of the restriction period (63-64 days of age) and after one week of *ad libitum* feeding (70-72 days of age) for both experiments on all sites. For the digestibility experiment, rabbits were also weighed at 42, 46, 70 and 74 days of age (start and end of each period of faecal collection). Feed intake was assessed for the same periods as for growth. In case of mortality, the remaining feed for the affected cage was weighed. A dead animal was considered not to have consumed any feed during the two days preceding its death. Thus, the feed consumed per animal was recalculated accordingly and the effective feed restriction per diet was obtained (**Tableau 12**). Mortality was assessed daily whereas morbidity was assessed individually only at weighing due to the great number of animals (n=1,936). The animals were observed for clinical signs of digestive disorders such as diarrhoea and caecal impaction or other pathologies (respiratory problems, injuries, etc.). Animals with a distended abdomen (“watery belly”) and light diarrhoeas were considered ill with ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy) (Marlier et al., 2003). Moreover, animals without clinical signs of illness, but presenting weight losses or very low growth (three s.d. below the mean) within a period, were considered morbid. In order to calculate the mortality and morbidity rates (number of affected animals divided by the initial number of animals), an animal was counted as morbid only once within a period, and was not accounted as morbid if it died later within the period. A health risk index (HRI) was then calculated as the sum of morbid and dead rabbits divided by the initial number of animals for a given period (Gidenne et al., 2009b).

2.3. Carcass and meat quality measurements

Slaughter yield and carcass quality measurements were performed at three experimental sites (sites 1, 2 and 3) on a total of a 100 animals per treatment (**Tableau 12**). The rabbits were selected on their weight at 70-71 days to conform to the mean weight for each treatment. The selected rabbits were weighed on the morning of the slaughter (71-72 days of age) before transportation and without prior fasting. Commercial dressing procedures were followed by removing the skin and gastrointestinal and genital tracts (Blasco and Ouhayoun, 1993). The carcasses, presented with head and liver, were weighed after 24 h of chilling. The livers were then retrieved and weighed separately. Finally, the adiposity of the carcasses was estimated following the AFNOR (Association Française de Normalisation) index (AFNOR (Association Française de Normalisation), 1994), rating the carcasses from one to five in order of increasing fatness. At site 3 the skin and

the whole gastrointestinal tract were weighed. The perirenal and scapular fat were dissected and weighed separately after chilling.

2.4. Digestibility measurements

Faeces were collected according to the 'European' reference method (Perez et al., 1995) during the feed restriction period, between 42 and 46 days of age, and after returning to an *ad libitum* feeding, between 70 and 74 days of age. A one-week period was provided to allow the animals to adapt to their experimental treatment before each collection began.

2.5. Chemical analyses of feeds and faeces

Chemical analyses were carried out on feed and faecal samples as described by EGRAN (2001). Dry matter was obtained after 24 h at 103 °C and ashes after 5 h at 550 °C. Gross energy was measured with adiabatic combustion (adiabatic calorimeter; PARR Instrument Co.; Moline, IL, USA). Nitrogen was determined with the DUMAS combustion method (A.O.A.C., 2005, method 968.06) with a Leco auto-analyser (model FP-428; Leco Corp., St Joseph, MI, USA) and converted into crude protein (N x 6.25). Finally, NDF, ADF and acid detergent lignin (ADL) were measured according to the sequential method of Van Soest *et al.* (1991) with an amyolytic pre-treatment. Hemicelluloses were calculated as NDF-ADF, and cellulose as ADF-ADL. Faecal samples of animals presenting clinical signs of illness, weight loss or low growth at the time of faecal collections were discarded from the analyses.

Starch, total sugar, crude fat, crude fibre and total dietary fibre (TDF) were measured on the diets. Starch was hydrolysed enzymatically and the resulting released glucose was measured using the hexokinase glucose-6-phosphate dehydrogenase system (D-Glucose®; Boehringer, Mannheim, Germany). Total sugar was measured according to the method of Luff-Schoorl (Anonymous, 2009). Crude fat was determined using Soxtec system H+ (after acid hydrolysis pre-treatment) according to the method described by Alstin and Nilsson (1990) and crude fibre was determined using the method of Weende (A.O.A.C., 1995b, method 978.10). TDF was determined according to the method elaborated by Proski *et al.* (1988). Soluble fibre was calculated as TDF-NDF corrected for ash and nitrogen, and digestible fibre calculated as the sum of (NDF-ADF) and water insoluble pectins as given in the EGRAN tables (Maertens et al., 2002).

2.6. Calculations and statistical analysis

DE intake was calculated for the restriction period in the performance experiment with the DE concentrations obtained from the first faecal collection period (42-46 days of age) in the digestibility experiment. Similarly, DE intake was calculated for the *ad libitum* feeding period in the performance experiment with the DE concentrations measured for the second faecal collection period (70-74 days of age) in the digestibility experiment.

The economic impact of the treatments was evaluated in the performance experiment for the sites 1, 2 and 3 by calculation based on the mean French values in 2012 (Coutelet, 2012). The diets were manufactured in early January 2012. Therefore, the cost of the diets was evaluated based on the cost of the ingredients in November 2011 in France. This economic evaluation took into account the feed costs and consumption, the weight at slaughter and the mortality. All other effects such as the feed consumption before weaning, the sales price of the rabbits and the expenses related to the labour or buildings were fixed according to the French mean values in 2012. This enabled us to calculate the gross margin for the breeder per kg of live weight sold as the difference between the sales price and the production costs per kg of live weight.

The results of both experiments were analysed with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012) using the MIXED procedure with a model containing two factors: the feed intake level and the energy level and the interaction between those two factors as fixed effects. For the performance experiment, the effect of the site, and the cage for the growth measurements, were considered random. Means were compared using the Bonferroni test in an analysis with the experimental treatment as factor (four levels). For the health status measurements, a categorical analysis with the CATMOD procedure was performed with the feed intake level, the energy level and the interaction between those two effects as factors. Due to high inter-site variability, this analysis was performed separating the sites with poor (sites 3 and 4) and good (sites 1 and 2) health status.

3. RESULTS

3.1. Digestibility

Digestive efficiency of six week old rabbits was improved for all nutrients when the feed intake was limited, regardless of the diet (namely +0.04 for organic matter, +0.04 for energy, +0.05 for crude protein and +0.06 for NDF, $P < 0.001$) (**Tableau 13**). Likewise digestive efficiency was improved for all nutrients with the HE diet (namely +0.06 for organic matter, +0.07 for energy, +0.05 for crude protein and +0.07 for NDF, $P < 0.001$). Accordingly, the measured DE and DP concentrations of the diets with feed restriction were higher than expected with the formulation from tables: +0.47 MJ/kg and +10 g/kg respectively for the LE diet, and +1.00 MJ/kg and +16 g/kg

Tableau 13 Effect of feed intake and dietary DE¹ levels on the whole tract digestive efficiency in growing rabbits (values are arithmetic means; n = 12 animals per treatment)

	Groups				RMSE ⁴	P levels		
	LE100 ²	LE75 ²	HE100 ³	HE75 ³		Dietary DE	intake level	DE x intake
<i>During feed restriction (42-46 days of age)</i>								
Live weight (g) ⁵	1319 ^a	1142 ^b	1310 ^a	1154 ^b	78		***	
Feed intake (g/day) ⁶	144	98	133	90	14		nc ⁷	nc ⁷
Digestibility coefficient								
Organic matter	0.582 ^a	0.608 ^b	0.630 ^b	0.683 ^c	0.019	***	***	*
Energy	0.565 ^a	0.593 ^b	0.619 ^c	0.674 ^d	0.020	***	***	*
Crude protein	0.671 ^a	0.712 ^b	0.705 ^{a,b}	0.773 ^c	0.030	***	***	
NDF	0.303 ^a	0.340 ^{a,b}	0.356 ^b	0.431 ^c	0.034	***	***	
ADF	0.152 ^a	0.182 ^a	0.183 ^a	0.272 ^b	0.036	***	***	*
Hemicelluloses (NDF-ADF)	0.514 ^a	0.562 ^{a,b}	0.587 ^{b,c}	0.644 ^c	0.050	***	**	
Cellulose (ADF-ADL)	0.275 ^a	0.293 ^a	0.332 ^a	0.427 ^b	0.065	***	**	
Nutritive value of the diets								
Digestible energy (MJ/kg as fed)	9.10 ^a	9.55 ^b	10.23 ^c	11.13 ^d	0.32	***	***	*
Digestible protein (g/kg as fed)	101 ^a	107 ^b	115 ^c	126 ^d	5	***	***	
<i>During the digestibility trial ad libitum feeding period (70-74 days of age)</i>								
Live weight (g) ⁵	2656	2564	2740	2612	177			
Feed intake (g/day) ⁶	218 ^a	224 ^a	195 ^b	207 ^{a,b}	18	***		
Digestibility coefficient								
Organic matter	0.586 ^a	0.586 ^a	0.643 ^b	0.629 ^b	0.017	***		
Energy	0.585 ^a	0.586 ^a	0.645 ^b	0.631 ^b	0.012	***		
Crude protein	0.711 ^a	0.710 ^a	0.753 ^b	0.737 ^{a,b}	0.024	***		
NDF	0.296 ^a	0.294 ^a	0.366 ^b	0.337 ^b	0.033	***		
ADF	0.117	0.106	0.150	0.121	0.046			
Hemicelluloses (NDF-ADF)	0.537 ^a	0.558 ^a	0.653 ^b	0.625 ^b	0.048	***		
Cellulose (ADF-ADL)	0.282 ^a	0.249 ^a	0.402 ^b	0.311 ^{a,b}	0.086	**	*	
Nutritive value of the diets								
Digestible energy (MJ/kg as fed)	9.41 ^a	9.44 ^a	10.65 ^b	10.43 ^b	0.20	***		
Digestible protein (g/kg as fed)	107 ^a	106 ^a	123 ^b	120 ^b	4	***		

¹ DE = Digestible Energy; ² LE = Low Energy diet; ³ HE = High Energy diet; ⁴ RMSE = Root Mean Square Error; ⁵ Mean live weight during the faecal collection; ⁶ Mean feed intake during the faecal collection; ⁷ nc = Non Calculable as the feed intake variance for restricted groups is null; *** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05; a,b,c,d Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

respectively for the HE diet. Moreover, the effect of the restricted feeding on the organic matter, energy and ADF digestion was greater with the HE diet than with the LE diet, which resulted in a significant interaction between the intake level and the dietary DE level.

Previous feed restriction did not improve the digestive efficiency at the end of the fattening period (70-74 days of age), and it reduced the cellulose digestibility (-0.06, P=0.02) (**Tableau 13**). The effect of the dietary DE concentration was similar to the one observed during the restriction period.

Tableau 14 Effect of feed intake and dietary DE¹ levels on growth, intake and feed conversion of the rabbits² in the performance experiment (values are arithmetic means; n = 472 animals per treatment)

	Groups				RMSE ⁵	P levels		
	LE100 ³	LE75 ³	HE100 ⁴	HE75 ⁴		dietary DE	intake level	DE x intake
Feed restriction period (weaning to 63-64 days of age)								
Weight at weaning (g)	979	979	980	977	91			
Weight at 63 days of age (g)	2453 ^a	2229 ^b	2483 ^a	2252 ^b	220	**	***	
Weight gain (g/day)	48.9 ^a	41.5 ^b	50.0 ^a	42.5 ^b	6.5	**	***	
Feed intake (g/day)	150	112	139	102	13	***	nc ⁶	nc ⁶
DE intake (kJ/day) ⁷	1368	1063	1424	1135	126	**	nc ⁶	nc ⁶
Feed conversion ratio	3.10 ^a	2.73 ^b	2.76 ^c	2.43 ^d	0.12	***	***	
Ad libitum feeding period (63-64 to 70-71 days of age)								
Weight at 70 days of age (g)	2771 ^a	2647 ^b	2821 ^c	2680 ^b	232	***	***	
Weight gain (g/day)	44.9 ^a	59.1 ^b	46.5 ^a	59.9 ^b	11.4		***	
Feed intake (g/day)	211 ^a	240 ^b	191 ^c	219 ^d	12	***	***	
DE intake (kJ/day) ⁷	1984 ^a	2265 ^b	2033 ^a	2279 ^b	126	*	***	
Feed conversion ratio	4.68 ^a	4.11 ^b	4.13 ^b	3.72 ^c	0.50	***	***	
Total experimental period (weaning to 70-71 days of age)								
Weight gain (g/day)	48.1 ^a	44.9 ^b	49.5 ^c	45.9 ^b	5.5	***	***	
Feed intake (g/day)	163 ^a	137 ^b	149 ^c	125 ^d	6	***	***	
DE intake (kJ/day) ⁷	1492 ^a	1297 ^b	1542 ^c	1359 ^d	58	***	***	
Feed conversion ratio	3.39 ^a	3.08 ^b	3.00 ^c	2.73 ^d	0.10	***	***	*

¹ DE = Digestible Energy; ² Morbid animals are included; ³ LE = Low Energy diet; ⁴ HE = High Energy diet; ⁵ RMSE = Root Mean Square Error; ⁶ nc = Non Calculable as the variance of feed intake for restricted groups is null; ⁷ Calculated from dietary DE concentration measured in the digestibility experiment (Table 3).

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05; a,b,c,d Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

3.2. Performances

3.2.1. Feed intake and growth

The feed intake of the restricted animals during the restriction period conformed to the level of 75% of *ad libitum* initially planned (respectively 75% and 73% for the LE diet and the HE diet) and DE intake on the whole restriction period was reduced to 78% of the *ad libitum* intake for the LE diet and 80% for the HE diet (**Tableau 14**). When returning to an *ad libitum* feeding, the previously restricted animals presented an overconsumption of 14% compared to the previously *ad libitum* fed animals regardless of the diet ($P<0.001$), which corresponded to a DE overconsumption of 13% ($P<0.001$). The growth of the restricted animals was reduced by 15% during the restriction period ($P<0.001$, **Tableau 14**). Then, when fed freely, their growth was close to 60 g/day and surpassed the growth of the *ad libitum* groups by 30% ($P<0.001$). The final weight of the restricted animals at 70-71 days of age was reduced by 4.7% ($P<0.001$) compared to the *ad libitum* fed animals and, over the whole experiment, their feed conversion ratio was improved by 9% ($P<0.001$).

Feed intake over the whole experiment was 9% lower with the HE diet ($P<0.001$), even though the DE intake was 4.0% higher with this diet ($P<0.001$) compared to the LE diet. Weight gain, final weight and feed conversion ratio were improved with the HE diet (+2.6%, +1.5% and -11%, respectively, $P<0.001$).

3.2.2. Carcass and meat quality

Because the animals for slaughter were chosen at the mean weight for each treatment, the restricted-fed animals were lighter than the ones fed *ad libitum* (-3.8%, $P<0.001$), and those fed the HE diet were heavier than the ones fed the LE diet (+1.5%, $P<0.001$) (**Tableau 15**). These results reflected on the chilled carcass weights (-5.6%, $P<0.001$ for the effect of the restriction and +2.5%, $P<0.001$ for the effect of the dietary DE). Consequently, the dressing out percentage was impaired by feed restriction (-1.1%, $P<0.001$), and improved with an HE diet (+0.6%, $P<0.001$) (**Tableau 15**). The carcasses of the restricted animals were less fat compared to the *ad libitum* fed animals (-0.6%, $P<0.001$; -2.4%, $P<0.001$; -0.6%, $P=0.02$ respectively for the fattening score and the relative weights of the perirenal and scapular fat). A rise in dietary DE level had the opposite effect (+0.2%, $P<0.01$; +2.9%, $P<0.001$; +0.6%, $P=0.02$ respectively for the fattening score and the relative weights of the perirenal and scapular fat). Due to a significant interaction, the effect of restricted feeding on the fattening score and the relative weight of the perirenal fat was greater if the animals were fed an HE diet. Feed restriction increased the relative weight of the liver (+1.2%, $P<0.001$), whereas the rise in dietary DE level had the opposite effect (-0.4%, $P<0.001$). Feed

Tableau 15 Effect of feed intake and dietary DE¹ levels on the carcass traits of 71-72 day old rabbits (values are arithmetic means; n =100 animals per treatment)

	Groups				RMSE ⁴	P levels		
	LE100 ²	LE75 ²	HE100 ³	HE75 ³		Dietary DE	intake level	DE x intake
Slaughter weight (g)	2786 ^a	2688 ^b	2836 ^c	2722 ^d	101	***	***	
Chilled carcass weight (g)	1605 ^a	1518 ^b	1649 ^c	1552 ^d	70	***	***	
Dressing out (%)	57.6 ^{a,c}	56.5 ^b	58.2 ^a	57.1 ^{b,c}	1.7	***	***	
Commercial skin (% of live weight)¹	13.4 ^{a,c}	12.7 ^{b,c}	13.9 ^a	12.6 ^b	1.0		***	
Full gastrointestinal tract (% of live weight)¹	17.8 ^{a,b}	18.8 ^{a,b}	17.4 ^a	19.3 ^b	2.2		***	
Liver (% of carcass weight)	5.5 ^a	6.8 ^b	5.2 ^c	6.4 ^d	1.0	***	***	
Fattening score (scale of 1 to 5)	3.3 ^a	2.8 ^b	3.6 ^c	2.9 ^b	0.6	**	***	*
Perirenal fat (‰ of chilled carcass weight)⁵	14.7 ^b	13.6 ^b	18.9 ^a	15.2 ^b	3.4	***	***	*
Scapular fat (‰ of chilled carcass weight)⁵	4.4 ^{a,b}	3.8 ^a	5.1 ^b	4.4 ^{a,b}	1.2	*	*	

¹ DE = Digestible Energy; ² LE = Low Energy diet; ³ HE = High Energy diet; ⁴ RMSE = Root Mean Square Error; ⁵ Measured in site 3 (n= 30 rabbits/treatment).

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

a,b,c,d Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

restriction also decreased the relative weight of the skin (-1.0%, $P < 0.001$), while it increased the relative weight of the gastrointestinal tract (+1.5%, $P < 0.001$).

3.2.3. Health status

The performance experiment was conducted without drug use, except on site 3, where antibiotic water-supplementation was adopted for all groups, in order to avoid an excessive mortality. Colistine was used between 45 and 51 days of age (300 mg/kg live weight) and bacitracine between 49 and 58 days of age (100 mg/kg live weight). Health problems mainly concerned the sites 3 (25% mortality and 25% morbidity) and 4 (12% mortality and 11% morbidity) whereas very few health problems were observed on sites 1 and 2 (<2% mortality and <6% morbidity). Overall, only 5% of the dead animals presented clinical symptoms of ERE, whereas 85% of the deaths were caused by acute diarrhoeas. Because the variability in health status was high, the analysis was performed separating the sites with good (sites 1 and 2) and poor (sites 3 and 4) health conditions. Feed restriction reduced the HRi (2.1% vs 6.5%, $P < 0.01$ and 35.7% vs 43.1%, $P < 0.05$, **Tableau 16**) in both good and poor health conditions, respectively, during its application. However, feed restriction only reduced morbidity under good health conditions (1.5% vs 4.8%, $P < 0.01$). The mortality was numerically lower in restricted fed animals in poor health conditions (17.0% vs 21.7%). During the first two weeks post-weaning, the high energy diet decreased the morbidity (20.8% vs 26.9%, $P < 0.05$) in poor health conditions leading to a reduced HRi (30.5% vs 40.5%, $P < 0.01$, data not shown). During the two following weeks, the diet did not affect the mortality or the morbidity, regardless of the health conditions. Over the entire restriction period (weaning to 63-64 days of age), the high energy diet increased morbidity (4.0% vs 2.3%, $P = 0.05$) in good health conditions, leading to an increased HRi with this diet (6.0% vs 2.7%, $P < 0.05$, **Tableau 16**). The number of health problems identified during the *ad libitum* period (63-64 to 70-71 days of age) was low (mean HRi=2%). Thus, the effects of feed restriction and diet during the whole experimental period were similar to the ones observed during feed restriction.

3.2.4. Economic evaluation

Based on the cost of the ingredients in November 2011 in France, the HE diet cost 6.74 €/T more than the LE diet (Euronutrition, personal communication). For all the farms analysed, the mean gross margin was higher when the animals were restricted: 0.16 €/kg for LE75 and 0.20 €/kg for HE75 vs 0.09 €/kg for LE100 and 0.14 €/kg for HE100 (**Figure 21**). This was especially true for the sites with a good health conditions (sites 1 and 2). In contrast, at site 3 (HRi>50%), the gross margin

was still higher for restricted fed groups, but was lower when the animals were restricted fed an HE diet.

Tableau 16 Effect of feed intake and dietary DE¹ levels on the health status of rabbits in the performance experiment according to the experimental sites

	Groups				P levels		
	LE100 ²	LE75 ²	HE100 ³	HE75 ³	Dietary DE	intake level	DE x intake
Good health status (sites 1 and 2)							
Feed restriction (weaning to 63-64 days of age)							
Mortality (%)	0.4	0.4	3.1	0.8			
Morbidity (%)	4.2 ^{a,b}	0.4 ^a	5.4 ^b	2.7 ^{a,b}	0.05	**	
Health risk index (HRi) ⁴	4.6 ^{a,b}	0.8 ^a	8.5 ^b	3.5 ^{a,b}	*	**	
(%)							
Ad libitum feeding (63-64 to 70-71 days of age)							
Mortality (%)	0	0.4	0.4	0			
Morbidity (%)	0.8	0.4	2.0	0.8			
Health risk index (HRi) ⁴	0.8	0.8	2.4	0.8			
(%)							
Whole experiment (weaning to 70-71 days of age)							
Mortality (%)	0.4	0.8	3.5	0.8			
Morbidity (%)	4.2 ^{a,b}	0.8 ^a	6.2 ^b	3.1 ^{a,b}	*	**	
Health risk index (HRi) ⁴	4.6 ^{a,b}	1.5 ^a	9.6 ^b	3.8 ^{a,b}	*	**	
(%)							
Poor health status (sites 3 and 4)							
Feed restriction (weaning to 63-64 days of age)							
Mortality (%)	23.0	16.1	20.4	17.9			
Morbidity (%)	25.4	19.9	17.5	17.5			
Health risk index (HRi) ⁴	48.3 ^a	36.0 ^{a,b}	37.9 ^{a,b}	35.4 ^b		*	
(%)							
Ad libitum feeding (63-64 to 70-71 days of age)							
Mortality (%)	0	0.7	2.2	2.1			
Morbidity (%)	2.4	2.2	2.2	2.8			
Health risk index (HRi) ⁴	2.4	2.9	4.3	4.8			
(%)							
Whole experiment (weaning to 70-71 days of age)							
Mortality (%)	23.0	16.6	22.3	19.3			
Morbidity (%)	25.8	19.0	17.5	17.5			
Health risk index (HRi) ⁴	48.8 ^a	35.5 ^b	39.8 ^{a,b}	36.8 ^{a,b}		*	
(%)							

¹ DE = Digestible Energy; ² LE = Low Energy diet; ³ HE = High Energy diet; ⁴ Health risk index (HRi) = Mortality + Morbidity.

** P<0.01; * P<0.05.

a,b Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

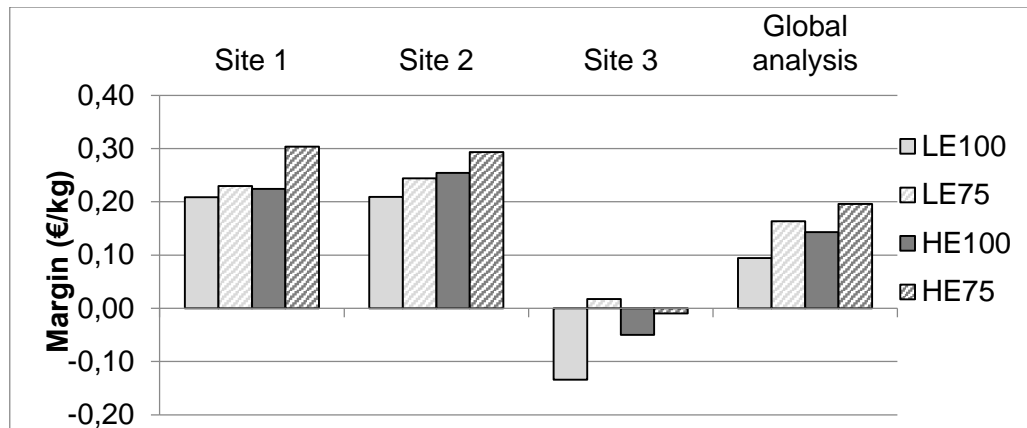


Figure 21 Effect of feed intake (100 vs 75%) and dietary DE levels (low energy LE vs high energy HE) on the gross margin in France in 2011, on each experimental site and on average (performance experiment).

4. DISCUSSION

In both experiments, the overall growth performance was higher than the average French breeding performance with a final weight at 70-71 days of age of 2729 g compared to 2460 g on average French farms (Coutelet, 2012). The overall mortality of 10% was slightly above that usually observed in commercial French rabbit breeding (8%) and inter-site variability was great. Thus, our experiments were representative of the field conditions allowing us to assess the variability of the breeding systems.

4.1. Effect of the intake level

Feed restriction was first used to reduce mortality caused by ERE or non-specific enteropathy syndromes. As intended, feed restriction resulted in a reduced health risk index of almost 20% in poor health conditions and up to 70% in good health conditions. However, the effect of feed restriction in poor health conditions in our study was moderate compared to that obtained in previous studies showing reductions in mortality and morbidity rising up to 50% (Gidenne et al., 2009b; Gidenne et al., 2008).

Although the feed intake was reduced by 25%, the growth rate was only reduced by 15% in agreement with previous studies (Gidenne et al., 2012b). The feed conversion ratio was improved by 12%, as previously shown by various authors (Gidenne et al., 2008; Szendro et al., 2008). In most studies, a more moderate improvement of the feed conversion ratio (5 to 10%) was observed (Gidenne et al., 2012b). Only seven days after the beginning of the restriction, the nutrient digestibility was greatly improved, thus partly explaining the decreased feed conversion ratio. As feed restriction is now a standard for the majority of French rabbit breeders, our results also point

out the need to quantify the rate of increase in nutrient digestibility according to feed restriction intensity to readjust the formulation of the diets.

As expected, when fed freely, previously restricted animals showed a compensatory growth exceeding the growth rate of the *ad libitum* groups by 30%. This compensatory growth was associated with a moderate overeating behaviour (+14%), thus leading to a decreased feed conversion ratio, as reported by several authors (Gidenne et al., 2009b; Perrier, 1998). There was no effect of previous feed restriction upon whole tract digestibility. This suggests that the improvement in feed conversion could also be of metabolic origin through, for example, a reduced extra-heat production. MacDonald *et al.* (2011) showed that mice fed 50 to 75% of the *ad libitum* intake demonstrated a reduced body temperature. The current results showed that the feed restricted animals had a higher relative weight of the full gastrointestinal tract at slaughter, thus leading to an overestimation of growth and a subsequent underestimation of the feed conversion ratio.

Despite the lower growth of the restricted animals, the gross margin was consistently higher when the feed intake was restricted, regardless of the feed used or the health status of the farm. These results complement those of Gidenne *et al.* (2012b) who estimated the margin on the feed cost with feed restriction at 0.30 € per weaned rabbit. However, in commercial breeding conditions the estimation of the gross margin could be refined. For instance, a longer fattening period (one or two more days) for the restricted animals could be taken into account according to the batch system used. Also, additional costs related to the automation of the feeding, extra labour hours, or savings related to the reduced drug consumption should be taken into account but are difficult to estimate.

Slaughter yield was impaired by feed restriction as reported by Xiccato (1999). This can be partially explained by the increased relative weight of the digestive tract, even though the relative weight of the skin was lower compared to the *ad libitum* fed animals as previously observed by various authors (Metzger et al., 2009; Perrier, 1998). The increase in the weight of the whole digestive tract might be caused by overeating behaviour of the previously feed restricted animals. Bovera *et al.* (2008b) reported an increase in weight of the empty digestive tract with feed restriction, suggesting a preferential development of the internal organs over muscles. The reduction in skin relative weight may also be associated with a reduction in the proportion of fat in the restricted animals, shown by the lower fattening score and relative weight of the perirenal and scapular fat, in agreement with the literature as reviewed by Xiccato (1999). The relative weight of the liver was considerably higher in the restricted groups. Ledin (1984a) also showed that animals restricted fed until slaughter age had a lighter liver weight than those fed *ad libitum*, indicating

that the increase in size of the liver occurs during the re-feeding period in response to increased functional demands such as glycogen storage...

4.2. Effect of the dietary digestible energy level

The HE diet caused an increase in morbidity and, to a lesser extent, mortality, in good health conditions, whereas it tended to cause a reduction in morbidity in poor health conditions although the differences were not significant. These apparently contradictory effects agreed with the results obtained in previous studies in *ad libitum* fed animals. In poor health conditions (mortality >20%), Montessuy *et al.* (2009) did not find any effect of the energy level, whereas Renouf and Offner (2007) showed, in good health conditions, a detrimental effect of a high energy diet (DE=11.3 MJ/kg) on mortality (8.3% vs 2.4% with a low energy diet of 9.5 MJ DE/kg). Gidenne *et al.* (2009a) also found that a high energy diet (DE=10.90 MJ/kg) fed restricted or *ad libitum* tended to increase the health risk index in growing rabbits compared to a low energy diet of 9.71 MJ DE/kg (56% vs 46%). In our experiment, the variation in DE only had a significant effect during the two first weeks post-weaning, thus confirming that this period is crucial in rabbit breeding.

Because the DE level of the diets only moderately impacted on health parameters, our results also suggest that the beneficial effects of feed restriction upon health were more related to the quantitative reduction in feed intake than to the reduction in energy intake. One hypothesis could be that these beneficial effects of feed restriction may be caused by the length of the daily fasting period. Romero *et al.* (2010) and Duperray and Guyonvarch (2013) showed that a reduction in feed intake through a time-limited access to the feeders reduced health problems in growing rabbits.

Renouf and Offner (2007) showed that growth is improved with a high energy diet (11.3 MJ vs 9.5 MJ DE/kg) only during the first two weeks after weaning, whereas Montessuy *et al.* (2009) did not find any differences in growth with diets differing in DE levels. That may have been due to a high incidence of health problems in their experiment. In the current study, growth rate and feed conversion were improved during the overall fattening period (by 2.6% and 11%, respectively) with an HE diet. The high energy diet contained a slightly higher level of soluble fibre (TDF-NDF) probably contributing to the beneficial effects on feed conversion (Trocino *et al.*, 2011). As expected, the slaughter yield was improved with the HE diet and the carcasses had a higher proportion of fat.

The use of an HE diet reduces the intake of the *ad libitum* fed animals because the animals regulate their DE intake. However, the DE intake was 4% higher with the HE diet, partly explaining the increased growth rate of those rabbits. Moreover, the use of an HE diet enhanced the beneficial

effects of feed restriction upon feed digestibility, meaning that, when using a diet rich in energy, restricted animals profited even more from the dietary nutrients. This may indicate a modification of the caecal microbiota through feed restriction and nutritive values of the diets. However, to date, the effects of feed restriction upon the composition of the caecal bacterial community have not been reported (Martignon et al., 2010). Thus, the synergetic effects of feed restriction and our HE diet remain to be determined.

Using the French mean values for 2012 and the feed costs calculated for November 2011 (manufacturing date), the gross margin was improved with the use of an HE diet because of the improved feed conversion and growth with the high energy diet and the limited impact of the diet on health status on the overall experiment. These results agree with those of Foubert *et al.* (2008) who found that restricting the feeding of a high energy diet improved the margin on the feed cost by 0.12€ per weaned rabbit compared to the restricted use of a low energy diet.

In good health conditions, the HE diet fed under a restriction strategy generated the highest gross margin. However, in poor health conditions, the restricted fed diet with the lower energy content (LE) gave the best results as shown on site 3. These results show that, for equivalent ratios of starch, digestible fibre and fat on digestible energy and a high level of low-digestible fibre (ADF), the use of a diet with a relatively high energy level would be more relevant on highly productive farms, despite a possible higher feed cost and higher morbidity rate. Another possibility could be the use of a diet with a high energy level for shorter periods of time depending on the periods of higher sensitivity to digestive disorders.

5. CONCLUSION

This study on four different sites using a large number of animals enabled us to provide conclusions on the effect of a restricted fed high energy diet. Our results show that the use of such a feeding strategy improved the feed conversion ratio while differentially affecting the mortality and morbidity according to the health status of the farm. In good health conditions the use of a high energy diet slightly increased the morbidity whereas opposite effects were observed in poor health conditions. We also confirmed the positive impact of limited post-weaning feed intake on mortality and morbidity. Finally, regardless of the health status, the gross margin for the breeder could be improved when using a restricted fed high energy diet despite the lower growth.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CLIPP (Comité Lapin Interprofessionnel pour la Promotion des Produits) for their financial support. The authors would also like to thank all the technicians involved in the experiments at Euronutrition, Evalis, INRA (PECTOUL unit) and ITAVI.

REFERENCES

- A.O.A.C., 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- A.O.A.C., 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- AFNOR (Association Française de Normalisation), 1994. Viandes de lapin : Production et transformation du lapin de chair domestique. Norme Française NF V47-001, 1-18.
- Alstin, F., Nilsson, M., 1990. The Soxtec® hydrolysis system improves the official methods for determining total fat content. *Industries Alimentaires et Agricoles* 107, 1271-1274.
- Anonymous, 2009. Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union* L 54, 1-130.
- Blasco, A., Ouhayoun, J., 1993. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.* 4, 93-99.
- Bovera, F., Piccolo, G., D'Urso, S., Nizza, A., Cutrignelli, M.I., 2008. Feed restriction during summer: effect on rabbit growth performance. *Proc. 9th World Rabbit Congress. World Rabbit Science Association, Verona, Italy*, pp. 567-572.
- Coutelet, G., 2012. Gestion technico-économique des éleveurs de lapin de chair - RENACEB (Réseau National Cunicole d'Élevage en Bandes) et RENALAP (Réseau National Lapin) - résultats 2012. ITAVI (Institut Technique de l'Aviculture).
- De Blas, C., Mateos, G.G., 2010. Feed formulation. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), *Nutrition of the Rabbit*. CABI, Wallingford, UK, pp. 222-232.
- Duperray, J., Guyonvarch, A., 2013. Interest of a fasting period to improve growth performances of fattening rabbits. *Proc. 15èmes journées de la Recherche Cunicole. ITAVI, Le Mans*, pp. 43-46.
- EGRAN (European Group on Rabbit Nutrition), 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. *World Rabbit Sci.* 9, 57-64.

Foubert, C., Duperray, J., Guyonvarch, A., 2008. Intérêt d'un aliment fibreux concentré en énergie chez le lapin de chair rationné. Proc. Journée Nationale ITAVI – Elevage du lapin de chair. ITAVI, Pacé, France, pp. 1-8.

Gidenne, T., 2000. Recent advances and perspectives in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. World Rabbit Sci. 8, 23-32.

Gidenne, T., Bannelier, C., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., 2009a. Interaction between the energetic feed concentration and the restriction strategy - impact on feeding behaviour, growth and health of the rabbit. Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole. ITAVI, Le Mans, France, pp. 63-66.

Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S., 2009b. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. Animal 3, 509-515.

Gidenne, T., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. Animal 6, 1407-1419.

Gidenne, T., Garcia, J., Lebas, F., Licois, D., 2010. Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), Nutrition of the Rabbit. CABI, Wallingford, UK, pp. 179-199.

Gidenne, T., Murr, S., Travel, A., Corrent, E., Foubert, C., Bebin, K., Mevel, L., Rebours, G., Renouf, B., 2008. Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau - premiers resultats d'une etude concertee du reseau GEC (Groupe d'Experimentation Cunicole). Proc. Journée Nationale ITAVI – Elevage du lapin de chair. ITAVI, Pacé, pp. 33-40.

Journal Officiel de la République Française 0278, 2009. Arrêté du 30 novembre 2009 modifiant l'arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux. 20652.

Ledin, I., 1984. Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth and organ growth in rabbit. Ann. Zootech. 33, 33-50.

MacDonald, L., Radler, M., Paolini, A.G., Kent, S., 2011. Calorie restriction attenuates LPS-induced sickness behavior and shifts hypothalamic signaling pathways to an anti-inflammatory bias. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 301, 172-184.

Maertens, L., 2010. Feeding systems for intensive production. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), Nutrition of the Rabbit. CABI, Wallingford, UK, pp. 253-266.

Maertens, L., Perez, J.M., Villamide, M., Cervera, C., Gidenne, T., Xiccato, G., 2002. Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. World Rabbit Sci. 10, 157-166.

Marlier, D., Dewree, R., Delleur, V., Licois, D., Lassence, C., Poulipoulis, A., Vindevogel, H., 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. Ann. Med. Vet. 147, 385-392.

Martignon, M.H., Combes, S., Gidenne, T., 2010. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol. 156, 156-162.

Metzger, S., Szendro, Z., Bianchi, M., Hullar, I., Febel, H., Maertens, L., Cavani, C., Petracci, M., Radnai, I., Biro-Nemeth, E., 2009. Effect of energy restriction in interaction with genotype on the performance of growing rabbits: II. Carcass traits and meat quality. Livest. Sci. 126, 221-228.

Montessuy, S., Reys, S., Rebours, G., Mascot, N., 2009. Effet du niveau énergétique de l'aliment sur les performances zootechniques des lapins en engraissement et conséquences sur le coût alimentaire du kilogramme de croît. Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole. ITAVI, Le Mans, France, pp. 22-25.

Perez, J.M., Gidenne, T., Bouvarel, I., Arveux, P., Bourdillon, A., Briens, C., Le Naour, J., Messenger, B., Mirabito, L., 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. Ann. Zootech. 49, 369-377.

Perez, J.M., Lebas, F., Gidenne, T., Maertens, L., Xiccato, G., Parigi-Bini, R., Dalle Zotte, A., Cossu, M.E., Carazzolo, A., Villamide, M.J., Carabaño, R., Fraga, M.J., Ramos, M.A., Cervera, C., Blas, E., Fernandez Carmona, J., Falcao E Cunha, L., Bengala Freire, J., 1995. European reference method for in-vivo determination of diet digestibility in rabbits. World Rabbit Sci. 3, 41-43.

Perrier, G., 1998. Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse. Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole. ITAVI, Lyon, France, pp. 179-182.

Prosky, L., Asp, N.G., Schweizer, T., Vries, J., Furda, I., 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in foods and foods products: interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71, 1017-1023.

Renouf, B., Offner, A., 2007. Effet du niveau énergétique des aliments et de leur période de distribution sur la croissance, la mortalité et le rendement à l'abattage chez le lapin. Proc. 12èmes Journées de la Recherche Cunicole. ITAVI, Le Mans, France, pp. 101-104.

Romero, C., Cuesta, S., Astillero, J.R., Nicodemus, N., De Blas, C., 2010. Effect of early feed restriction on performance and health status in growing rabbits slaughtered at 2kg live-weight. World Rabbit Sci. 18, 211-218.

SAS Institute Inc., 2012. SAS 9.4. Cary, NC, USA.

Szendro, Z., Metzger, S., Febel, H., Hullar, I., Maertens, L., Bianchi, M., Cavani, C., Petracci, M., Biro-Nemeth, E., Radnai, I., 2008. Effect of energy restriction in interaction with genotype on the performance of growing rabbits I: Productive traits. Livest. Sci. 118, 123-131.

Trocino, A., Fragkiadakis, M., Majolini, D., Carabano, R., Xiccato, G., 2011. Effect of the increase of dietary starch and soluble fibre on digestive efficiency and growth performance of meat rabbits. Anim. Feed Sci. Technol. 165, 265-277.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.

Xiccato, G., 1999. Feeding and meat quality in rabbits: a review. World Rabbit Sci. 7, 75-86.

II. LA SUBSTITUTION DE L'AMIDON PAR DES FIBRES DIGESTIBLES NE MODIFIE PAS LE STATUT SANITAIRE OU LA CROISSANCE CHEZ LE LAPIN SOUMIS A UNE STRATEGIE DE RESTRICTION ALIMENTAIRE

Article en préparation pour Animal Feed Science and Technology

Résumé:

Les stratégies de restriction alimentaire post-sevrage permettent de réduire la mortalité et la morbidité chez le lapin, mais induisent une diminution de la croissance et une baisse du rendement à l'abattage qui peuvent être partiellement compensés via l'utilisation d'un aliment énergétique. Afin d'optimiser les stratégies de restriction alimentaire nous avons étudié la possibilité de remplacer l'amidon par des fibres digestibles dans des aliments énergétiques. Sur quatre sites expérimentaux, les animaux ont été divisés en quatre groupes selon un schéma factoriel 2x2 avec deux ratios de fibres digestibles sur amidon (ST = 1,21 vs DF = 2,29), et deux niveaux d'ingestion (à volonté et restreints à 75% de l'à volonté). Les animaux recevaient les aliments expérimentaux du sevrage (32-36 jours d'âge) à l'âge d'abattage (71-72 jours d'âge) et la restriction alimentaire était appliquée du sevrage à 63-64 jours d'âge. L'efficacité digestive a été évaluée durant la période de restriction alimentaire sur 48 animaux logés en cages individuelles et le rendement et la de qualité de carcasse ont été mesurés (n=380). La restriction alimentaire réduisait la croissance de 9% durant la période totale d'engraissement ($P < 0,001$) et le rendement à l'abattage de 0,7% ($P < 0,001$) mais améliorait l'efficacité alimentaire de 9% ($P < 0,001$). L'ingestion était légèrement réduite avec l'aliment DF alors que la croissance et l'efficacité alimentaire n'étaient pas impactées par l'aliment. Le rendement à l'abattage était cependant pénalisé par l'utilisation de l'aliment DF (-0,5%, $P < 0,01$), via l'augmentation du poids relatif du tractus digestif (+1,1%, $P < 0,01$), indiquant une surestimation de la croissance avec cet aliment. La restriction alimentaire améliorait la digestibilité fécale de l'énergie (+0,02, $P < 0,01$) et des protéines (+0,03, $P < 0,001$) permettant d'expliquer partiellement l'amélioration de l'efficacité alimentaire. La digestibilité des fibres était améliorée avec l'aliment DF (+0,04 pour l'ADF, +0,05 pour le NDF, $P < 0,01$). Dans des conditions sanitaires défavorables la restriction alimentaire de 25% permettait de réduire la mortalité sur la période totale d'engraissement (9,3% vs 14,7%, $P < 0,01$) et tendait à réduire la morbidité uniquement avec l'utilisation de l'aliment ST. Ces résultats indiquent que l'utilisation d'un aliment riche en amidon favorise la croissance et le rendement à l'abattage dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire sans pénaliser les paramètres sanitaires.

Mots clés: restriction alimentaire, amidon, fibres digestibles, lapin, santé, croissance

Substituting starch with digestible fiber does not impact on health status or growth in restricted fed rabbits

C. Knudsen^{1,2,3,7}, S. Combes^{1,2,3}, C. Briens⁴, G. Coutelet⁵, J. Duperray⁶, G. Rebours⁷, J-M. Salaun⁸,
A. Travel⁹, D. Weissman¹⁰, T. Gidenne^{1,2,3,*}

¹ INRA, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France

² Université de Toulouse, INP, ENSAT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France

³ Université de Toulouse, INP, ENVT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31076 Toulouse, France

⁴ CCPA, ZA du Bois de Teillay, F-35150 Janzé, France

⁵ ITAVI, Rue du Rocher, F-75008 Paris, France

⁶ Evialis, Talhouet BP234, F-56006 Vannes, France

⁷ TECHNA, BP10, rte de St Etienne de Montluc, F-44220 Coueron, France

⁸ Sanders, Centre d'affaires l'Odyssée, ZAC Cicé Blossac, F-35170 Bruz, France

⁹ ITAVI, UMT BIRD, Centre INRA de Tours, BP1, F-37380 Nouzilly, France

¹⁰ INZO, Rue de l'église, BP50019, F-02407 Chierry, France

* Corresponding author: Thierry Gidenne. Tel: (+33)5 61 28 51 03.

EM: thierry.gidenne@toulouse.inra.fr.

ABSTRACT

Post-weaning feed restriction strategies have proved to reduce mortality and morbidity in rabbits, but result in decreased growth and lower slaughter yield that can be partially compensated for with the use of a high energy diet. To further optimize the feeding strategies we have studied the possibility of substituting starch with digestible fibers in high energy diets fed restricted. In four experimental sites, rabbits were divided into four equal groups differing in digestible fiber to starch ratio (ST = 1.21 vs DF = 2.29), and feeding level (*ad libitum* or restricted at 75%) according to a 2x2 experimental design. Animals were fed the experimental diets from weaning (32-36 days of age) to slaughter age (71-72 days of age), and feed restriction was applied from 35 to 63 days of age. Digestive efficiency was assessed during feed restriction in 48 animals and carcass and meat quality measurements were performed (n= 380). Restricted feeding reduced the growth by 9% on the whole fattening period (P<0.001), and the slaughter yield by 0.7% (P<0.001) but improved the feed conversion ratio by 9% (P<0.001). Feed intake was slightly reduced with the DF diet, whereas growth and feed conversion were unaffected by the diet. However, slaughter yield was impaired with the DF diet (-0.5%, P<0.01), as a result of a heavier digestive tract (+1.1%, P<0.001), thus indicating an overestimation of the growth with that diet. Feed restriction improved the fecal digestibility of energy (+0.02, P<0.01) and protein (+0.03, P<0.001), thus partly explaining the improved feed conversion, while the digestibility of fibers was improved with the DF diet (+0.04 for ADF, +0.05 for NDF, P<0.01). In poor health conditions on the overall experimental period, a 25% reduction in feed intake lowered the mortality rate (9.3% vs 14.7%, P<0.01) and tended to reduce morbidity only with the use of the ST diet. These results indicate that a diet rich in starch favors growth and slaughter yield in feed restricted animals without negatively impacting on the health parameters.

Keywords: feed restriction, starch, digestible fiber, rabbit, health, growth

Abbreviations: DF, Diet rich in digestible fibers; ST, Diet rich in starch; GEC, groupe d' experimentation cunicole; DE, digestible energy; DP, digestible protein; HRi, health risk index; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber; ADL, acid detergent lignin; TDF, total dietary fiber.

1. INTRODUCTION

Post-weaning feed restriction has been used in French rabbit breeding systems for over ten years as an efficient method to reduce the incidence of digestive disorders in the growing rabbit (for review, Gidenne et al., 2012b). A reduction of the feed intake greater than 20% reduces the post-weaning mortality and morbidity (Gidenne et al., 2009b). Moreover, feed restriction improves feed efficiency during the restriction period and especially when animals return to an *ad libitum* feeding. However, after four weeks of feed restriction followed by one week of *ad libitum* feeding growth and slaughter yield are slightly impaired. A recent study (Knudsen et al., 2014) has shown that the use of a high energy diet fed restricted could be profitable for the breeder as sanitary parameters are not impaired while feed efficiency and growth are improved, thus improving the economic results. Moreover, the source of energy is known to impact on the health and growth of the rabbit (Gidenne et al., 2010b). The incidence of digestive disorders is, for instance, reduced when the ratio of digestible fiber to starch is increased (Perez et al., 2000b). Thus, the Groupe d'Experimentation Cunicole (GEC) network, comprising four experimental facilities, conducted the present study in order to further optimize the effect of feed restriction on health using digestible fibers as energy source instead of starch. The aim was to evaluate the effects of increasing the digestible fiber to starch ratio in high energy diets fed restricted on growth, slaughter yield and sanitary parameters. Special attention was given to formulate diets with equivalent levels of low digestible fibers (ADF). The experiment was conducted at four experimental sites on 1,720 animals to assess the variability of the field conditions and evaluate the effects of our feeding strategies on the digestive health.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental design, animals, housing and feeding

A bifactorial design was used with two levels of feed intake, *ad libitum* feeding vs restricted feeding at 75% of *ad libitum* (respectively named 100 and 75), and two diets differing in digestible energy (DE) source: a diet rich in starch (ST) and a diet rich in digestible fibers (DF). Four treatments were consequently formed: ST100, ST75, DF100 and DF75. Both diets were formulated to meet with the nutritional requirements of the growing rabbit (De Blas and Mateos, 2010) without any antibiotics or coccidiostats (**Tableau 17**). Moreover, digestible energy levels were expected to be similar between diets at 10.11 MJ/kg according to the EGRAN (European Group on Rabbit Nutrition) tables (Maertens et al., 2002), corresponding to an energy level slightly below the maximum recommendation for a finishing diet (Gidenne, 2000). Finally, special attention was given to obtain similar levels of crude proteins, sugars, crude fat and ADF between diets in order

to study exclusively the effect of the variation of the starch to digestible fiber ratio. The feeds were manufactured and pelleted at one time using a single batch of raw materials by Euronutrition SAS (Saint-Symphorien, France).

Tableau 17 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.

	ST ¹	DF ²		ST ¹	DF ²
Ingredients (g/kg)			Chemical composition (g/kg)		
Wheat	90	124	Dry matter	869	867
Barley	150	20	Crude ash	62	63
Wheat bran Milurex	37	54	Crude protein (N X 6.25)	158	156
Rapeseed	20	22	Gross Energy (MJ/kg)	16.60	16.32
Rapeseed meal	28	94	Starch	141	96
Sunflower meal	250	218	Total sugars	58	56
Alfalfa	111	20	Crude fat	32	30
wheat straw	28	65	Crude fiber	174	173
sugarbeet pulp	129	250	Total dietary fiber (TDF)	368	408
Grape pulp	20	26	Neutral detergent fiber (NDF)	326	350
Apple pomace	63	53	Acid detergent fiber (ADF)	216	219
Cane molasses	43	30	Acid detergent lignin (ADL)	64	66
Rapeseed oil	5	5	Digestible fiber ⁴	170	220
Dicalcium phosphate	2	1	DF / Starch ratio	1.21	2.29
Méthionine 15%	3	2	Soluble fiber (TDF-NDF ⁵)	15	19
L-Lysine 25%	8	6			
Threonine 10%	4	1			
Vitamin premix	10	10			

¹ ST = Diet rich in Starch.

² DF = Diet rich in Digestible Fiber.

³ Calculated according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002).

⁴ Calculated as the sum of (NDF-ADF) and water insoluble pectins according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002).

⁵ NDF corrected for ash and nitrogen.

The study was conducted by the Groupe d'Experimentation Cunicole (GEC) network, and included two experiments: one experiment to measure the digestive efficiency, and a large scale multi-site experiment to obtain measurements of performances (growth, feed conversion and health). The digestibility experiment was conducted at the INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UE PECTOUL (Castanet-Tolosan, France) breeding unit. Twelve animals per

treatment were housed in individual metabolism cages (0.2 m² per rabbit). The performance experiment was replicated during the Spring of 2013 with the same protocol at four experimental sites in France (Euronutrition-SAS Saint-Symphorien, INRA, UE PECTOUL Castanet-Tolosan, INZO Chateau-Thierry, and ITAVI (Institut Technique de l'AViculture) Rambouillet). A total of 418 animals per treatment were housed in closed units where the environment (temperature, lighting and ventilation) was monitored and controlled. The number of animals used differed according to the site (**Table 2**). They were housed in collective cages of five to seven animals, the density ranging from 14.5 to 17.2 rabbits/m² depending on the site. For both experiments, animals of both sexes were allotted at weaning (32-36 days of age) according to their weaning weight and litter of origin. Thus, litters were spread over the four treatments, and weight was standardized among treatments within each site. Within each treatment the mean live weight was similar among cages. The animals were then fed freely or restricted during four weeks after weaning (until 63-64 days of age), according to the treatment. Afterwards, all groups were fed freely until the end of the experiments (i.e. 46 days of age for the digestibility experiment, and slaughter at 71-72 days of age for the performance experiment).

The amounts of feed distributed to the restricted groups were calculated on the basis of a theoretical *ad libitum* ingestion curve, and readjusted for each diet and for each site according to the real ingestion of the *ad libitum* fed groups (ST100 and DF100) for periods of three to four days. The feed distributed was readjusted to the number of animals present in the cage depending on mortality. Feed was given once daily between 0800 and 0830 and water was provided *ad libitum*. Animals were handled according to the recommendations in animal care in experimentation in agreement with the Journal Officiel de la République Française 0278, 20652 (2009).

2.2. Growth, feed intake and health status measurements

For the performance experiment, and on all sites, animals were weighed individually at weaning (32-36 days of age), in the middle of the restriction period (49-50 days of age), at the end of the restriction period (63-64 days of age) and after one week of *ad libitum* feeding (70-72 days of age). For the digestibility experiment, rabbits were weighed at weaning (35 days of age) and at the beginning and end of the fecal sampling period (42 and 46 days of age respectively). For both experiments, feed intake was assessed for the same periods as for growth. In case of mortality, the remaining feed for the affected cage was weighed. A dead animal was considered not to have consumed any feed during the two days preceding its death. Thus, the feed consumed per animal was recalculated accordingly and the effective feed restriction per diet was obtained (**Tableau 18**).

Tableau 18 Experimental conditions at the different sites and effective feed restriction for each experiment and diet.

	Number of rabbits per treatment	Rabbits per cage/ number of cages per treatment	Genotype	Age at weaning (days)	Age at the end of the restriction period (days)	Age at slaughter (days)	Number of slaughtered animals	Effective feed restriction (% of <i>ad libitum</i> intake)	
								ST ¹	DF ²
Digestibility experiment	12	1/12	INRA breed	35	46	- ³	- ³	74	75
Performance experiment									
Site 1	140	7/20	Hyplus	32	64	72	30	76	75
Site 2	132	6/22	Hyplus	35	63	71	30	78	74
Site 3	66	6/11	Hyplus	36	64	71	15	75	76
Site 4	80	5/16	INRA breed	35	64	72	20	78	77

¹ST = Diet rich in Starch.

²DF = Diet rich in Digestible Fiber.

³The animals weren't slaughtered but the experiment ended at 46 days of age.

Mortality was assessed daily whereas morbidity was assessed individually only at weighing due to the great number of animals (n=1,720). The animals were observed for clinical signs of digestive disorders such as diarrhea and cecal impaction or other pathologies (respiratory problems, injuries, etc.). Animals with a distended abdomen (“watery belly”) and light diarrheas were considered ill with ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy) (Marlier et al., 2003). Moreover, animals without clinical signs of illness, but presenting weight losses or very low growth (three SD below the mean) within a period, were considered morbid. In order to calculate the mortality and morbidity rates (number of affected animals divided by the initial number of animals), an animal was counted as morbid only once within a period, and was not accounted as morbid if it died later within the period. A health risk index (HRI) was then calculated as the sum of morbid and dead rabbits divided by the initial number of animals for a given period (Gidenne et al., 2009b).

2.3. Carcass and meat quality measurements

Slaughter yield and carcass quality measurements were performed on all sites on a total of a 95 animals per treatment (Table 2). The rabbits were selected on their weight at 70-71 days to conform to the mean weight for each treatment. The selected rabbits were weighed on the morning of the slaughter (71-72 days of age) before transportation and without prior fasting. Commercial dressing procedures were followed by removing the skin and gastrointestinal and genital tracts (Blasco and Ouhayoun, 1993). The carcasses, presented with head and liver, were weighed after 24 h of chilling. The livers were then retrieved and weighed separately (except on site 3). Finally, the adiposity of the carcasses was estimated following the AFNOR (Association Française de Normalisation) index (AFNOR (Association Française de Normalisation), 1994), rating the carcasses from one to five in order of increasing fatness. At sites 2 and 4 the skin and the whole gastrointestinal tract were weighed whereas the perirenal and scapular fat were dissected and weighed separately after chilling only on site 4.

2.4. Digestibility measurements

Feces were collected according to the ‘European’ reference method (Perez et al., 1995) during the feed restriction period, between 42 and 46 days of age. A one-week period was provided to allow the animals to adapt to their experimental treatment before collection began.

2.5. Chemical analyses of feeds and feces

Chemical analyses were carried out on feed and fecal samples as described by EGRAN (2001). Dry matter was obtained after 24 h at 103 °C and ashes after 5 h at 550 °C. Gross energy was measured with adiabatic combustion (adiabatic calorimeter; PARR Instrument Co.; Moline, IL, USA). Nitrogen was determined with the DUMAS combustion method (A.O.A.C., 2005, method 968.06) with a Leco auto-analyser (model FP-428; Leco Corp., St Joseph, MI, USA) and converted into crude protein (N x 6.25). Finally, NDF, ADF and acid detergent lignin (ADL) were measured according to the sequential method of Van Soest *et al.* (1991) with an amylolytic pre-treatment. Hemicelluloses were calculated as NDF-ADF, and cellulose as ADF-ADL. Fecal samples of animals presenting clinical signs of illness, weight loss or low growth at the time of fecal collections were discarded from the analyses.

Starch, total sugar, crude fat, crude fiber and total dietary fiber (TDF) were measured on the diets. Starch was hydrolyzed enzymatically and the resulting released glucose was measured using the hexokinase glucose-6-phosphate dehydrogenase system (D-Glucose®; Boehringer, Mannheim, Germany). Total sugar was measured according to the method of Luff-Schoorl (Anonymous, 2009). Crude fat was determined using Soxtec system H+ (after acid hydrolysis pre-treatment) according to the method described by Alstin and Nilsson (1990) and crude fiber was determined using the method of Weende (A.O.A.C., 1995b, method 978.10). TDF was determined according to the method elaborated by Proski *et al.* (1988). Soluble fiber was calculated as TDF-NDF corrected for ash and nitrogen, and digestible fiber calculated as the sum of (NDF-ADF) and water insoluble pectins as given in the EGRAN tables (Maertens *et al.*, 2002).

2.6. Calculations and statistical analysis

The economic impact of the treatments was evaluated in the performance experiment for the sites 1, 2 and 3 by calculation based on the mean French values in 2012 (Coutelet, 2012). The cost of the diets was evaluated based on the cost of the ingredients in November 2011 in France. This economic evaluation took into account the feed costs and consumption, the weight at slaughter and the mortality. All other effects such as the feed consumption before weaning, the sales price of the rabbits and the expenses related to the labor or buildings were fixed according to the French mean values in 2012. This enabled us to calculate the gross margin for the breeder per kg of live weight sold as the difference between the sales price and the production costs per kg of live weight.

Tableau 19 Whole tract digestive efficiency in growing rabbits according to the feeding level and the diet (values are arithmetic means; n = 12 animals per treatment).

	Groups				RMSE ³	P levels		
	ST100 ¹	ST75 ¹	DF100 ²	DF75 ²		Diet	intake level	diet x intake
Live weight (g) ⁴	1546 ^a	1358 ^b	1524 ^a	1366 ^b	56		***	
Feed intake (g/day) ⁵	143	108	140	109	10		nc ⁶	nc ⁶
Digestibility coefficient								
Organic matter	0.642	0.657	0.642	0.647	0.023			
Energy	0.636 ^{a,b}	0.658 ^a	0.629 ^b	0.640 ^{a,b}	0.019	0.05	**	
Crude protein	0.742 ^{a,b}	0.764 ^a	0.725 ^b	0.761 ^a	0.021		***	
NDF	0.363 ^a	0.375 ^{a,b}	0.411 ^{b,c}	0.419 ^c	0.039	***		
ADF	0.279	0.299	0.334	0.328	0.048	**		
Hemicelluloses (NDF-ADF)	0.551 ^a	0.580 ^{a,b}	0.577 ^{a,b}	0.631 ^b	0.058	*	*	
Cellulose (ADF-ADL)	0.308	0.319	0.353	0.331	0.076			
Nutritive value of the diets								
Digestible energy (MJ/kg as fed)	10.69 ^{a,c}	11.06 ^a	10.27 ^b	10.45 ^{b,c}	0.32	***	**	
Digestible protein (g/kg as fed)	117 ^{a,b}	121 ^a	114 ^b	120 ^a	3		***	

¹ST = Diet rich in Starch.

²DF = Diet rich in Digestible Fiber.

³RMSE = Root Mean Square Error.

⁴ Mean live weight during the faecal collection.

⁵ Mean feed intake during the faecal collection.

⁶ nc = Non Calculable as the feed intake variance for restricted groups is null.

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

a,b,c Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

The results of both experiments were analyzed with SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). The MIXED procedure was used for the performance experiment, while the GLM procedure was used for the digestibility experiment, with a model containing two factors: the feed intake level and the energy level and the interaction between those two factors as fixed effects. For the performance experiment, the effect of the site, and the cage for the growth measurements, were considered random. For the health status measurements, a categorical analysis with the CATMOD procedure was performed with the feed intake level, the energy level and the interaction between those two effects as factors. Due to high inter-site variability, this analysis was performed separating the sites with poor (sites 1 and 2) and good (sites 3 and 4) health status. Means were compared using the Bonferroni test in an analysis with the experimental treatment as factor (four levels).

3. RESULTS

3.1. Digestibility

No interactions between the DF/Starch ratio and the feed intake level were observed on the digestive efficiency of six week old rabbits (**Tableau 19**). Regardless of the diet, the digestive efficiency was improved with feed restriction for energy (+0.02, $P < 0.01$), crude protein (+0.03, $P < 0.001$) and hemicelluloses (+0.04, $P < 0.05$) whereas other nutrients were not affected by the feed intake level. Digestibility of fibers was improved with the DF diet, namely +0.05 for NDF ($P < 0.001$), +0.04 for ADF ($P < 0.01$) and +0.04 for hemicelluloses ($P < 0.05$), whereas the digestibility of other nutrients was not affected by diet despite a numeric increase in energy digestibility with the ST diet (+0.01, $P = 0.05$).

Accordingly, feed restriction resulted in higher DE and DP concentrations of the diets than expected with the formulation from tables (respectively +0.26 MJ/kg, $P < 0.01$ and +4.7 g/kg, $P < 0.001$). Likewise, the DE concentration of the ST diet was also higher than formulated (10.11 MJ/kg) regardless of the feeding level (+0.51 MJ/kg, $P < 0.001$).

3.2. Performances

3.2.1. Feed intake and growth

The feed intake of the restricted animals during the restriction period conformed to the level of 75% of *ad libitum* initially planned (respectively 76.4% and 75.5% for the ST diet and the DF diet) (**Tableau 18**). When returning to an *ad libitum* feeding, the previously restricted animals presented an overconsumption of 17% compared to the previously *ad libitum* fed animals regardless of the diet ($P < 0.001$). The growth of the restricted animals was reduced by 12% during

the restriction period ($P < 0.001$, **Tableau 20**). A significant interaction between feeding level and diet indicated that the lower growth induced by feed restriction was greater with the DF diet than with the ST diet ($P < 0.05$). Then, when fed freely, the growth of the previously restricted animals was close to 52 g/day and exceeded the growth of the *ad libitum* groups by 25% ($P < 0.001$). The final weight of the restricted animals at 70-71 days of age was reduced by 4% ($P < 0.001$) compared to the *ad libitum* fed animals and, over the whole experiment, their feed conversion ratio was improved by 9% ($P < 0.001$). Diet had a very moderate effect on growth parameters, affecting only the feed intake over the whole experiment, with a 1% reduction with the DF diet ($P < 0.05$) compared to the ST diet.

Tableau 20 Growth, intake and feed conversion of the rabbits¹ in the performance experiment according to the feeding level and the diet (values are arithmetic means; n = 418 animals per treatment).

	Groups				RMSE ⁴	P levels		
	ST100 ²	ST75 ²	DF100 ³	DF75 ³		Diet	intake level	diet x intake
Feed restriction period (weaning to 63-64 days of age)								
Weight at weaning (g)	1004	1003	1005	1005	94			
Weight at 63 days of age (g)	2488 ^a	2333 ^b	2494 ^a	2288 ^b	256		***	
Weight gain (g/day)	50.4 ^a	45.0 ^b	50.5 ^a	43.4 ^b	7.7		***	*
Feed intake (g/day)	144	110	143	108	11		nc	nc
Feed conversion ratio	2.88 ^a	2.48 ^b	2.85 ^a	2.50 ^b	0.16		***	
Ad libitum feeding period (63-64 to 70-71 days of age)								
Weight at 70 days of age (g)	2781 ^a	2696 ^b	2790 ^a	2660 ^b	254		***	
Weight gain (g/day)	41.2 ^a	50.9 ^b	41.5 ^a	52.6 ^b	15.2		***	
Feed intake (g/day)	189 ^a	222 ^b	187 ^a	218 ^b	15		***	
Feed conversion ratio	4.47 ^a	4.29 ^{a,b}	4.50 ^a	4.10 ^b	0.63		***	
Total experimental period (weaning to 70-71 days of age)								
Weight gain (g/day)	48.7 ^a	46.3 ^b	48.9 ^a	45.3 ^b	6.1		***	
Feed intake (g/day)	152 ^a	131 ^b	152 ^a	129 ^c	6	*	***	
Feed conversion ratio	3.13 ^a	2.84 ^b	3.10 ^a	2.84 ^b	0.12		***	

¹ Morbid animals are included.

² ST = Diet rich in Starch.

³ DF = Diet rich in Digestible Fiber.

⁴ RMSE = Root Mean Square Error.

⁵ nc = Non Calculable as the variance of feed intake for restricted groups is null

*** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

a,b,c Means in the same row with unlike superscripts differ ($P < 0.05$)

Tableau 21 Carcass traits of 71-72 day old rabbits according to the feeding level and the diet (values are arithmetic means; n =95 animals per treatment).

	Groups				RMSE ³	P levels		
	ST100 ¹	ST75 ¹	DF100 ²	DF75 ²		Diet	intake level	Diet x intake
Slaughter weight (g)	2820 ^a	2738 ^b	2825 ^a	2695 ^c	99		***	*
Chilled carcass weight (g)	1618 ^a	1557 ^b	1612 ^a	1513 ^c	69	***	***	*
Dressing out (%)	57.35 ^a	56.82 ^a	57.04 ^a	56.14 ^b	1.54	**	***	
Commercial skin (% of live weight) ⁵	14.06 ^a	13.19 ^b	14.14 ^a	12.86 ^b	0.82		***	
Full gastrointestinal tract (% of live weight) ⁵	16.93 ^a	18.10 ^b	18.18 ^b	18.99 ^b	1.83	***	***	
Liver (% of carcass weight) ⁴	5.31 ^a	6.24 ^b	4.99 ^a	5.76 ^b	0.90	***	***	
Fattening score (scale of 1 to 5)	3.01 ^a	2.76 ^b	3.02 ^a	2.57 ^b	0.56		***	
Perirenal fat (‰ of chilled carcass weight) ⁶	13.46 ^{a,b}	11.97 ^a	15.80 ^b	11.58 ^a	3.85		*	
Scapular fat (‰ of chilled carcass weight) ⁶	4.95 ^{a,b}	4.17 ^{b,c}	5.48 ^a	4.01 ^c	1.03		***	

¹ST = Diet rich in Starch.

²DF = Diet rich in Digestible Fiber.

³RMSE = Root Mean Square Error.

⁴ Measured in sites 1, 2 and 4 (n= 80 rabbits/treatment).

⁵ Measured in sites 2 and 4 (n= 50 rabbits/treatment).

⁶ Measured in site 4 (n= 20 rabbits/treatment).

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

a,b,c Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

3.2.2. Carcass and meat quality

At slaughter, the restricted-fed animals were lighter than the ones fed *ad libitum* (-4%, $P<0.001$). Due to a significant interaction between feeding level and diet, the live weight reduction at slaughter induced by feed restriction was greater with the DF diet than with the ST diet ($P<0.05$) (**Tableau 21**). Consequently carcass weights were reduced with feed restriction (-5%, $P<0.001$), but also with the use of the DF diet (-2%, $P<0.001$). The significant interaction between feeding level and diet was maintained, thus indicating that the reduction in chilled carcass weight induced by feed restriction was increased with the DF diet ($P<0.05$). Consequently, the dressing out percentage was impaired by feed restriction (-0.7%, $P<0.001$), and the DF diet (-0.5%, $P<0.01$) (Table 5). The carcasses of the restricted animals were less fat compared to the *ad libitum* fed animals (-0.35 points, $P<0.001$; -2.9‰, $P<0.05$; -1.1‰, $P<0.001$ respectively for the fattening score and the relative weights of the perirenal and scapular fat) whereas the diet did not seem to affect the adiposity of the carcasses. Feed restriction and the use of the ST diet increased the relative weight of the liver (+0.8%, $P<0.001$ and +0.4%, $P<0.001$ respectively). Feed restriction also decreased the relative weight of the skin (-1.1%, $P<0.001$), while it increased the relative weight of the gastrointestinal tract (+1%, $P<0.001$). Diet did not affect the weight of the skin but the use of the DF diet increased the relative weight of the gastrointestinal tract (+1.1%, $P<0.001$).

3.2.3. Health status

The performance experiment was conducted without drug use on all sites, regardless of their sanitary status. A higher incidence of digestive disorders was found for the sites 1 (14% mortality and 23% morbidity) and 2 (10% mortality and 18% morbidity) compared to the sites 3 and 4 (<2% mortality and <6% morbidity). Overall, over 90% of the cases of mortality were caused by digestive disorders, among which acute diarrheas accorded for 60% and ERE diagnosis for 26% of total cases. Despite a numeric difference between diets in the occurrence of digestive disorders as cause of death (96% vs 87% respectively for the ST and the DF diets), no effect of the experimental treatments were found on the causes of death. Accordingly, the statistical analysis was performed separating the sites with low (sites 3 and 4) and high (sites 1 and 2) incidence of digestive disorders.

For the two sites with good health conditions neither diet nor feeding level significantly affected mortality or morbidity rates, regardless of the period considered. With poor health conditions feed restriction significantly reduced mortality during its application (8.3% vs 13.8%, $P<0.01$). A significant interaction between feeding level and diet was observed on morbidity, even though

there were no significant difference between groups when compared two by two. This interaction reflected on the HRI, which was decreased with feed restriction with the use of the ST diet, but not with the DF diet (**Tableau 22**). During the *ad libitum* feeding period (63-64 to 70-71 days of age) there were no significant effects of the diet or the feeding level on the health parameters. Thus, the effects of feed restriction and diet during the whole experimental period were similar to the ones observed during feed restriction.

Tableau 22 Health status of rabbits according to the feeding level and the diet in the performance in the sites with a poor health conditions (sites 1 and 2, n= 272 animals per treatment).

	Groups				P levels		
	ST100 ¹	ST75 ¹	DF100 ²	DF75 ²	Diet	intake level	Diet x intake
Feed restriction (weaning to 63-64 days of age)							
Mortality (%)	14.7	7.7	12.9	8.8		**	
Morbidity (%)	19.1	14.0	15.4	20.2			*
Health risk index (HRI) ³ (%)	33.8 ^a	21.7 ^b	28.3 ^{a,b}	29.0 ^{a,b}		*	*
<i>Ad libitum</i> feeding (63-64 to 70-71 days of age)							
Mortality (%)	0.9	1.2	0.9	1.2			
Morbidity (%)	9.1	8.0	4.0	7.7			
Health risk index (HRI) ³ (%)	9.9	9.2	4.9	8.9			
Whole experiment (weaning to 70-71 days of age)							
Mortality (%)	15.4	8.8	14.0	9.9		**	
Morbidity (%)	24.3	19.5	17.3	22.1			*
Health risk index (HRI) ³ (%)	39.7 ^a	28.3 ^b	31.3 ^{a,b}	32.0 ^{a,b}			*

¹ST = Diet rich in Starch.

²DF = Diet rich in Digestible Fiber.

³ Health risk index (HRI) = Mortality + Morbidity.

** P<0.01; * P<0.05.

a,b Means in the same row with unlike superscripts differ (P<0.05).

3.2.4. Economic evaluation

Based on the cost of the ingredients in November 2011 in France, the ST diet cost 2.49 €/T more than the DF diet (Euronutrition, personal communication). On average, the gross margin was higher when the animals were restricted: 0.24 €/kg for ST75 and 0.22 €/kg for DF75 vs 0.14 €/kg for ST100 and 0.17 €/kg for DF100 (**Figure 22**). This was especially true for the sites with a poor health conditions (sites 1 and 2). In contrast, at site 3, the gross margin was equivalent between treatments.

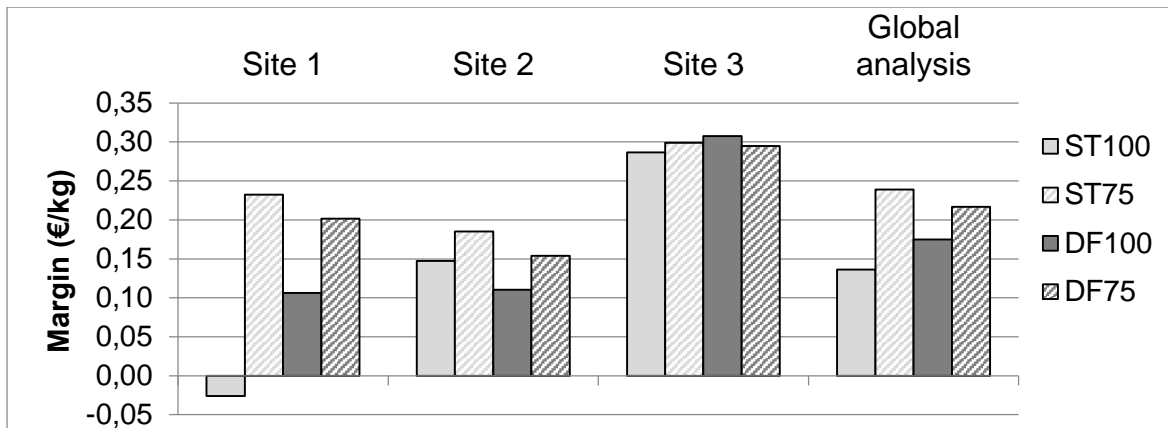


Figure 22 Effect of feed intake level (100 vs 75%) and diet (ST vs DF) on the gross margin in France in 2013, on each experimental site and on average (performance experiment).

4. DISCUSSION

4.1. Effect of the intake level

In poor health conditions, a 25% reduction in feed intake reduced the mortality rate by more than 60%, as previously evidenced (Gidenne et al., 2009b; Gidenne et al., 2008). Moreover, 60% of the mortality was caused by acute diarrheas, thus indicating a possibly favorable effect of feed restriction on colibacillosis associated mortality, unlike what was previously assumed (Martignon, 2010). Growth was only moderately impaired (-12%) by a 25% feed restriction, while feed efficiency was greatly improved (+13%), as previously described by Knudsen et al. (2014) using an identical experimental design. After only one week of restriction, energy and protein digestion was improved, thus partly explaining the improved feed efficiency. However, Knudsen et al. (2014) found higher improvements for nutrient digestion (+0.05 for energy and +0.07 for protein) and on all nutrients, including fibers, with a similar improvement of the feed efficiency and a diet with a similar digestible energy content. Thus, the improvement in feed conversion ratio observed in our study would not solely be attributed to the improvement in whole tract digestion. One hypothesis could be that a better feed efficiency would also be of metabolic origin through, for example, a better VFA absorption and utilization or a reduced extra-heat production. MacDonald *et al.* (2011) for instance showed that mice fed 50 to 75% of the *ad libitum* intake demonstrated a reduced body temperature.

As expected, when fed freely, previously restricted animals showed a compensatory growth exceeding the growth rate of the *ad libitum* groups by 25%. This compensatory growth was associated with an overeating behavior (+17%), thus leading to a decreased feed conversion ratio, as reported by several authors (Gidenne et al., 2009b; Perrier, 1998). However, the current results showed that the feed restricted animals had a higher relative weight of the full gastrointestinal

tract at slaughter, thus leading to an overestimation of growth and a subsequent underestimation of the feed conversion. Carcass growth was thus impaired by the feed restriction resulting in a reduced slaughter yield as previously demonstrated (Xiccato, 1999). Finally, the relative weight of the liver was considerably higher in the restricted groups, possibly due to increased functional demands such as glycogen storage during the return to the *ad libitum* feeding.

In poor health conditions (sites 1 and 2) the gross margin was consistently higher when the feed intake was restricted, regardless of the feed used. However, in good sanitary conditions, the gross margin was unaffected by the feeding level and the diet. These results contrasted with those of Knudsen et al. (2014) who showed an improved of the gross margin with feed restriction regardless of the sanitary status of the farm. These contradictory effects could be explained by a decrease in morbidity with feed restriction observed by Knudsen et al. in good sanitary conditions, which we did not observe in the present study.

4.2. Effect of the dietary energy source

In our study, the energy source did not impact on the health parameters regardless of the sanitary status as previously observed by Tazzoli et al. (2009). At iso-ADF levels, it is commonly admitted that increasing the level of DF reduces the incidence of digestive disorders in growing rabbits in replacement of proteins (Gidenne et al., 2013b) or starch (Jehl and Gidenne, 1996; Perez et al., 2000a). These differences might be due to the relatively moderate variations and high values of the digestible fiber to starch ratios (1.2-2.3 in our study and 1.0 to 1.9 in Tazzoli et al.'s study) compared to the ones in Perez et al. (2000) and Jehl and Gidenne's (1996) studies (0.6-2.1). The HRI was however only decreased with feed restriction with the use of the ST diet. This might indicate that due to the positive effect of DF on health, the reduction in feed intake does not induce a supplementary reduction of the HRI.

As expected, and previously shown (Gidenne and Perez, 2000), the digestibility of the hemicellulose fraction was improved with the increase of the digestible fiber to starch ratio. The increased digestibility of the lignocellulose fraction (ADF) might be associated with the origin of the dietary fibers, more specifically the pulp and alfalfa proportions. Indeed, it has been shown that pulp has a high cellulose accessibility for the cecal bacteria (Bertin et al., 1988) favoring their hydrolysis and fermentation processes. In contrast, alfalfa has a low ADF digestibility (Candau et al., 1978) thus explaining the lower ADF digestion with the ST diet. Even though the digestibility of energy was not significantly affected by the diet, and despite an iso-DE formulation of the diets,

the DE content of the ST diet was higher than the one of the ST diet, mainly due to a higher gross energy content.

The rabbit regulates its feed intake according to the digestible energy level of the diet (Gidenne, 2003). Surprisingly, feed intake was slightly reduced with the use of the DF diet in this study despite a reduced DE level of that diet compared to the ST diet (-4 to -6% depending on the feeding level). However, previous studies also found a decreased feed intake (Jacquier et al., 2013; Tazzoli et al., 2009) or an absence of effect on the intake level (Gidenne et al., 2013b) with the use of diets rich in digestible fiber. Despite the higher DE intake, growth was not improved with the ST diet and feed efficiency was unaffected by the diet. However, the current results showed that the animals fed the DF diet had a higher relative weight of the full gastrointestinal tract at slaughter, thus leading to an overestimation of growth and a subsequent underestimation of the feed conversion ratio. Carcass growth was thus impaired by the DF diet resulting in a reduced slaughter yield. Moreover, the impairment of growth caused by feed restriction was enhanced when the DF/Starch ratio was increased. Starch is mainly digested in the small intestine whereas the digestible fibers are digested in the cecum by the commensal microbiota. One hypothesis could therefore be that the host's enzymatic activity is more efficient than the bacterial activity under a restriction strategy. Indeed, the microbiota first uses the available energy for its own growth, only the excess created by the bacterial activity is made available for the host.

The ST diet did not cause an increase in fat deposition as reported by previous authors (Chen et al., 2012; Tazzoli et al., 2009). The weight of the liver was however increased with the ST diet, possibly due to a greater energy storage in the liver. Finally, the relative weight of the gastrointestinal tract was increased with the DF diet. Garcia et al. (1993) found similar results with an increase inclusion of sugarbeet pulp in respect to barley This increase could be caused by the higher water retention capacity of the water-soluble fibrous fraction, leading to a more aqueous digestive content, and consequently a heavier tract.

5. CONCLUSION

Our results confirmed the positive effects of feed restriction upon health and feed efficiency whereas dietary energy source did not seem to impact on the sanitary parameters with a digestible fiber to starch ratio above 1.2. In spite of an equivalent growth between diets, the diet rich in digestible fibers penalized the slaughter yield without significantly affecting the gross margin for the breeder due to a higher cost of the starch enriched diet. In light of these results, the preferential use of a diet over another could be made according to the price of the diet at a

given time point, with the limitation of using a diet with a digestible fiber to starch ratio above 1.2 in order to avoid detrimental effects on health parameters.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CLIPP (Comité Lapin Interprofessionnel pour la Promotion des Produits) for their financial support. The authors would also like to thank all the technicians involved in the experiments at Euronutrition, INRA (PECTOUL unit), INZO and ITAVI.

REFERENCES

- A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis No. Chap. 4, 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- A.O.A.C. 2005. Official Methods of Analysis No. Chap. 4, 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- AFNOR (Association Française de Normalisation). 1994. Viandes de lapin : Production et transformation du lapin de chair domestique. Norme Française NF V47-001: 1-18.
- Alstin, F., and M. Nilsson. 1990. The Soxtec® hydrolysis system improves the official methods for determining total fat content. *Industries Alimentaires et Agricoles* 107: 1271-1274.
- Anonymous. 2009. Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union L 54*: 1-130.
- Bertin, C., X. Rouau, and J. F. Thibault. 1988. Structure and properties of sugar beet fibers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44: 15-29.
- Blasco, A., and J. Ouhayoun. 1993. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.* 4: 93-99.
- Candau, M., B. Bertrand, and J. Fioramonti. 1978. Variation de la digestibilité des constituants de la ration chez le lapin. *CR Séances Soc. Biol.* 172: 554-559.
- Chen, Y. J. et al. 2012. Effect of Protein and Starch Level in Practical Extruded Diets on Growth, Feed Utilization, Body Composition, and Hepatic Transaminases of Juvenile Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. World Aquacult. Soc.* 43: 187-197.

Coutelet, G. 2012. Gestion technico-économique des éleveurs de lapin de chair - RENACEB (Réseau National Cunicole d'Élevage en Bandes) et RENALAP (Réseau National Lapin) - résultats 2012. ITAVI (Institut Technique de l'Aviculture).

De Blas, C., and G. G. Mateos. 2010. Feed formulation. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 222-232. CABI, Wallingford, UK.

EGRAN (European Group on Rabbit Nutrition). 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. World Rabbit Sci. 9: 57-64.

Garcia, G., J. F. Galvez, and J. C. Deblas. 1993. Effect of substitution of sugarbeet pulp for barley in diets for finishing rabbits on growth performance and energy and nitrogen efficiency. J Anim Sci 71: 1823-1830.

Gidenne, T. 2000. Recent advances and perspectives in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. World Rabbit Sci. 8: 23-32.

Gidenne, T. 2003. Fibres alimentaires et prévention des troubles digestifs chez le lapin en croissance: rôles respectifs des fibres digestibles et peu digestibles. In: *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France. p 3-11.

Gidenne, T. et al. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. Animal 3: 509-515.

Gidenne, T., S. Combes, and L. Fortun-Lamothe. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. Animal 6: 1407-1419.

Gidenne, T., J. Garcia, F. Lebas, and D. Licois. 2010. Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 179-199. CABI, Wallingford, UK.

Gidenne, T. et al. 2013. Protein replacement by digestible fibre in the diet of growing rabbits: 2- Impact on performances, digestive health and nitrogen output. Anim. Feed Sci. Technol. 183: 142-150.

Gidenne, T. et al. 2008. Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau - premiers résultats d'une étude concertée du réseau GEC (Groupe d'Expérimentation Cunicole). In: Proc. Journée Nationale ITAVI – Élevage du lapin de chair, Pacé. p 33-40.

Gidenne, T., and J. M. Perez. 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. I. Effects on digestion, rate of passage and retention of nutrients. *Annales de Zootechnie* 49: 357-368.

Jacquier, V., S. Combes, I. Oswald, C. Rogel-Gaillard, and T. Gidenne. 2013. Incorporation of rapidly fermentable fibres in a diet around weaning: impact on digestion, growth and health of the rabbit. In: *Proc. 15èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans*. p 55-58.

Jehl, N., and T. Gidenne. 1996. Replacement of starch by digestible fibre in feed for the growing rabbit .2. Consequences for microbial activity in the caecum and on incidence of digestive disorders. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61: 193-204.

Journal Officiel de la République Française 0278. 2009. Arrêté du 30 novembre 2009 modifiant l'arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux. 20652.

Knudsen, C. et al. 2014. Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. *Livest Sci*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.1008.1015>.

MacDonald, L., M. Radler, A. G. Paolini, and S. Kent. 2011. Calorie restriction attenuates LPS-induced sickness behavior and shifts hypothalamic signaling pathways to an anti-inflammatory bias. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: 172-184.

Maertens, L. et al. 2002. Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. *World Rabbit Sci.* 10: 157-166.

Marlier, D. et al. 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. *Ann. Med. Vet.* 147: 385-392.

Martignon, M. H. 2010. Conséquences d'un contrôle de l'ingestion sur la physiopathologie digestive et le comportement alimentaire du lapin en croissance, Université de Toulouse, Toulouse.

Perez, J. M. et al. 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. *Annales de Zootechnie* 49: 369-377.

Perez, J. M. et al. 1995. European reference method for in-vivo determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci.* 3: 41-43.

Perrier, G. 1998. Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole. p 179-182. ITAVI, Lyon, France.

Prosky, L., N. G. Asp, T. Schweizer, J. Vries, and I. Furda. 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in foods and foods products: interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 1017-1023.

SAS Institute Inc. 2012. SAS 9.4, Cary, NC, USA.

Tazzoli, M., L. Carraro, A. Trocino, D. Majolini, and G. Xiccato. 2009. Replacing starch with digestible fibre in growing rabbit feeding. Ital. J. Anim. Sci. 8: 148-150.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.

Xiccato, G. 1999. Feeding and meat quality in rabbits: a review. World Rabbit Sci. 7: 75-86.

Chapitre 2 - Etude des mécanismes physiologiques pouvant expliquer les effets bénéfiques d'une ingestion restreinte sur la santé digestive du lapin en croissance

Le 2^{ème} objectif de cette thèse était de contribuer à l'identification des mécanismes physiologiques sous-jacents aux effets bénéfiques d'une ingestion restreinte sur la santé digestive du lapin en croissance. Afin de répondre à cet objectif nous avons choisi d'étudier deux éléments importants de la santé digestive: le système immunitaire et le microbiote digestif. En effet, la sphère digestive du jeune mammifère est le lieu d'un dialogue permanent entre ces deux éléments.

Nous avons ainsi évalué l'impact de nos traitements (restriction alimentaire, quantité et qualité de l'énergie digestible) sur le développement des organes lymphoïdes secondaires et sur la réponse immunitaire innée et humorale avec et sans stimulation spécifique (**Article 3**). Aucune méthode permettant de stimuler et de mesurer la réponse inflammatoire n'avait été mise au point chez le lapin en croissance. Nous avons donc élaboré un protocole de stimulation par injection intra-péritonéale de LPS (Lipopolysaccharide) afin de mesurer la réponse inflammatoire en termes de fièvre et de niveaux plasmatiques de TNF α . Nous avons par la suite appliqué ce protocole à notre deuxième étude (**Article 4**).

Le microbiote module la santé et l'efficacité digestive comme présenté en bibliographie (p.67 et p.52). Afin d'expliquer les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé, nous avons donc étudié la composition et l'activité du microbiote caecal dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire et d'une modulation de la concentration énergétique de l'aliment (**Article 5**).

I. LA MASSE INGEREE PLUTOT QUE L'INGERE ENERGETIQUE MODULE LA REPONSE IMMUNITAIRE DU LAPIN EN CROISSANCE

Article publié dans Journal of Nutrition, 2015, 145, 483-489.

Résumé:

Contexte. Les stratégies de restriction alimentaire de courte durée sont utilisées en élevage cynicole afin de réduire les troubles digestifs post-sevrage, mais peu de données sont disponibles sur l'implication du système immunitaire dans ces effets bénéfiques.

Objectif. Les conséquences de la réduction de l'ingéré quantitatif et énergétique sur la réponse immunitaire ont été étudiés.

Méthodes. Au sevrage 320 lapins mâles et femelles ont été allottés en quatre traitements: HE100, HE75, LE100 and LE75, avec deux niveaux d'énergie digestible alimentaire (formulés à HE = 10.13 et LE = 9.08 MJ d'ED/kg) et deux niveaux d'ingestion (100 = à volonté et 75 = restreints à 75% de l'à volonté). Les animaux étaient restreints ou nourris à volonté jusqu'à 63 jours d'âge suivi d'un retour à volonté pour tous les animaux. Dix animaux par lot et par âge étaient abattus à 42, 50, 63 et 72 jours. La rate et l'appendice caecale étaient pesées, la surface des plaques de Peyer était déterminée par analyse d'image, les IgG plasmatiques totaux et anti-ovalbumine (OVA) et les IgA plasmatiques et fécaux étaient dosés par ELISA enfin l'expression iléale de cytokines était mesurée par qRT-PCR à 50 et 63 jours d'âge.

Résultats. Le poids relatif et la taille des organes lymphoïdes n'étaient pas affectés par les traitements. La restriction alimentaire réduisait la quantité d'IgG totaux après son application (-22%) et les IgG anti-OVA à 63 jours d'âge (-41%). Les concentrations en IgA fécaux étaient réduites par la restriction alimentaire quantitative (-40%, -52% et -65% à 42, 50 et 63 jours d'âge) et énergétique (-56%, -46% et -73% à 50, 63 et 72 jours d'âge) alors que la restriction alimentaire quantitative réduisait également la concentration en IgA plasmatiques à 63 (-41%) et 72 jours d'âge (-29%). Enfin, la restriction alimentaire quantitative tendait à réguler l'expression des cytokines iléales.

Conclusions. Ces résultats démontrent que la restriction alimentaire quantitative et, dans une moindre mesure, la concentration énergétique de l'aliment modulent l'immunité digestive.

Mots clés: lapin, restriction alimentaire, ingestion énergétique, santé, réponse immunitaire

Quantitative feed restriction rather than caloric restriction modulates the immune response of the growing rabbit¹⁻⁴

Christelle Knudsen^{5,6,7}, Sylvie Combes^{5,6,7}, Christophe Briens⁸, Joël Duperray⁹, Gwenaël Rebours¹⁰, Jean-Marc Salaun¹¹, Angélique Travel¹², Delphine Weissman¹³, Thierry Gidenne^{5,6,7*}, Isabelle P. Oswald^{14,15}

⁵ INRA, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁶ Université de Toulouse, INP, ENSAT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁷ Université de Toulouse, INP, ENVT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31076 Toulouse, France

⁸ CCPA, ZA du Bois de Teillay, F-35150 Janzé, France

⁹ Eivalis, Talhouet BP234, F-56006 Vannes, France

¹⁰ TECHNA, BP10, rte de St Etienne de Montluc, F-44220 Coueron, France

¹¹ Sanders, Centre d'affaires l'Odyssée, ZAC Cicé Blossac, F-35170 Bruz, France

¹² ITAVI, UMT BIRD, Centre INRA de Tours, BP1, F-37380 Nouzilly, France

¹³ INZO, Rue de l'église, BP50019, F-02407 Chierry, France

¹⁴ INRA, Toxalim, UMR 1331, 180, Chemin de Tournefeuille, Toulouse Cedex 931027, France

¹⁵ Université de Toulouse, INP, Toxalim, UMR 1331, 180, Chemin de Tournefeuille, Toulouse Cedex 931027, France

RUNNING TITLE: Feed restriction modulates rabbit immunity

WORD COUNT: 5.787; NUMBER OF FIGURES: 7; NUMBER OF TABLES: 1

SUPPLEMENTAL MATERIAL: 1 supplemental figure, 3 supplemental tables and supplemental references.

AUTHOR LIST FOR INDEXING: Knudsen, Combes, Briens, Duperray, Rebours, Salaun, Travel, Gidenne, Oswald

¹ Supplemental Tables 1-3, Supplemental Figure 1 and Supplemental References are available from the “Online supporting Material” link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at jn.nutrition.org.

² Abbreviations used: ADF (Acid Detergent Fiber), AL (*Ad Libitum*), B2M (Beta-2 Microglobulin), DE (Digestible Energy), DE (Digestible Protein), ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy), GEC (Groupe d’Experimentation Cunicole), HE (High Energy diet), HE100 (High Energy *ad libitum* fed group), HE75 (High Energy restricted fed group), HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), LE (Low Energy diet), LE100 (Low Energy *ad libitum* fed group), LE75 (Low Energy restricted fed group), NDF (Neutral Detergent Fiber), OVA (Ovalbumin)

³ This project has been funded by different partners implicated in the project: Sanders, Techna, CCPA, Evalis, Inzo, Itavi, INRA and the CLIPP (Comité Lapin Interprofessionnel pour la Promotion des Produits).

⁴ Author disclosure: C. Knudsen, S. Combes, C. Briens, J. Duperray, G. Rebours, J.M. Salaun, A. Travel, T. Gidenne and I. Oswald have no conflicts of interest.

* Corresponding author: Thierry Gidenne. Tel: (+33)5 61 28 51 03.

EM: thierry.gidenne@toulouse.inra.fr.

ABSTRACT

Background. Short-term feed restriction strategies are used in rabbits to reduce post-weaning digestive disorders, but little is known about the implications of the immune system in these beneficial effects.

Objective. In the present study the consequences of feed and energy restriction on the immune response were investigated.

Methods. At weaning 320 male and female rabbits were allotted into four groups: HE100, HE75, LE100 and LE75, differing in dietary digestible energy concentrations (HE = 10.13 or LE = 9.08 MJ DE/kg, formulated values) and intake levels (100 = *ad libitum* or 75 = restricted at 75% of *ad libitum*). Rabbits were feed-restricted or consumed feed *ad libitum* until 63 days of age followed by 9 days of *ad libitum* intake. Ten animals per group and per age were killed at 42, 50, 63 and 72 days of age. The spleen and appendix were weighed, Peyer's patch surface was determined by image analysis, total plasma IgG, anti-ovalbumin (OVA) IgG and fecal and plasma IgA concentrations were determined by ELISA and ileal expressions of cytokines were measured by qRT-PCR at 50 and 63 days of age.

Results. The relative weight and size of the lymphoid organs were not affected by treatments. Levels of total plasma IgA (-41% at 63 days and -29% at 72 days), IgG (-22% at 72 days) and anti-OVA IgG (-41% at 63 days) were lower with feed restriction. Fecal IgA concentrations were lower with quantitative (-40%, -52% and -65% at 42, 50 and 63 days of age) and energy restriction (-56%, -46% and -73% at 50, 63 and 72 days of age). Feed restricted animals tended to have greater expressions of IL-1 β and IL-2 and lower expressions of TNF α ($P < 0.1$).

Conclusions. These results demonstrated that feed restriction and, to a lesser extent, the dietary energy concentration modulate gut immunity.

Keywords: rabbit, feed restriction, energy intake, health, immune response.

1. INTRODUCTION

Brutal dietary changes are prone to cause digestive disorders. In mammals, weaning generates important changes as the young animal shifts from milk to solid feed, and is often responsible for various digestive disorders (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Lalles et al., 2004). These disorders are particularly penalizing in agricultural species as they imply economic losses for the breeder. Moreover, current European legislations and recommendations are strongly discouraging the use of antibiotics (Landers et al., 2012), thus new alternatives are needed in order to preserve the animals' health (Gallois et al., 2009). Short term feed restriction has proved to reduce post-weaning digestive disorders in rabbits and has been used by breeders in France for over 10 years as an efficient method to preserve the digestive health of the growing rabbit (for review, Gidenne et al., 2012b). Indeed, a reduction of the feed intake (below 20% of free intake) allows reducing the post-weaning mortality and morbidity (Gidenne et al., 2009b). Previous studies in mice or rats have suggested that a long term feed restriction and the nutritional value of the diet could affect gut immunity (Lara-Padilla et al., 2011; McGee and McMurray, 1988; Perez-Berezo et al., 2011). In growing rabbits, the effect of some nutrients, such as starch and fiber, on the immune response have been documented. Indeed, increased levels of fiber could improve the mucosal immunity through an increased number of membranous epithelial cells in the appendix of post weaning rabbits (Zhu et al., 2013). However, the implications of the immune system in the reduction of post-weaning digestive troubles by short term feed restriction are scarcely documented. Likewise, the short term effect of the dietary energy concentration on the immune system has, to our knowledge, not yet been studied in agricultural species. Thus, the present study was conducted to evaluate the impact of both quantitative feed restriction and dietary digestible energy concentration on gut immunity in the growing rabbit.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental design, animals, housing and feeds.

The experiment was conducted at the INRA UE PECTOUL (Castanet-Tolosan, France) breeding unit using 320 healthy male and female (sex ratio of 50:50) hybrid rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). A bifactorial design was used with two levels of feed intake, *ad libitum* feeding vs restricted feeding at 75% of *ad libitum* (respectively named 100 and 75), and two diets differing in digestible energy (DE) concentration, a "low" energy diet (LE), formulated with 9.08 MJ DE/kg, and a "high" energy diet (HE), formulated with 10.13 MJ DE/kg according to the EGRAN tables of Maertens *et al.* (2002). Four treatments were consequently formed: LE100, LE75, HE100 and HE75. The diets were formulated to meet with the nutritional requirements of the growing rabbit, fed *ad libitum* or

restricted, (De Blas and Mateos, 2010) without drug supplementation (antibiotics or coccidiostatics). A special attention was given to obtain a theoretical deviation of 1 MJ/kg of DE between the diets with the constraint of obtaining similar ratios of digestible fibers, starch and fat to DE, starch to digestible fibers and digestible proteins (DP) to DE between the two diets. Likewise, both diets were formulated with equivalent concentrations of ADF (Acid detergent fiber) and NDF (Neutral detergent fiber) (**Annexe 1**). The feeds were manufactured and pelleted using one batch of raw materials by Euronutrition SAS (Saint-Symphorien, France).

The rabbits were housed in collective cages of 5 animals (density of 15 rabbits/m²) in a closed unit where the environment (temperature, lighting and ventilation) was monitored and controlled. 320 animals of both sexes were randomly assigned at weaning (35 days of age) to one of the four treatments. Thus, mean weights were similar between treatments and litters were split in order to avoid any maternal effect. The HE100 and LE100 groups were then fed freely while the LE75 and HE75 groups were fed restricted during four weeks, until 63 days of age. Afterwards, all groups were fed freely until the end of the experiment at 72 days of age. Also, 32 animals per group were immunized with ovalbumin (OVA) as described below (**Figure 23**). The amounts of feed distributed to the restricted groups were calculated on the basis of a theoretical *ad libitum* ingestion curve, and readjusted for each diet according to the real ingestion of the *ad libitum* fed groups (LE100 and HE100) for periods of 3 to 4 days. Feed was given daily in a single distribution between 8:00 and 8:30 and water was provided *ad libitum*. Animals were handled according to the recommendations in animal care in experimentation in agreement with the French national legislation (Journal Officiel de la République Française 0278, 2009).

Animals were weighed individually at weaning (35 days of age), after one week of feed restriction (42 days of age), in the middle of the restriction period (50 days of age), at the end of the restriction period (63 days of age) and at the end of the experiment, after 9 days of *ad libitum* feeding (72 days of age). Health status of the animals was assessed through a control of clinical signs of digestive disorders such as diarrhoea, cecal impaction, suspicion of ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy) or other pathologies (respiratory problems, injuries ...). Animals without clinical signs of illness, but presenting weight losses or very low growth (3 SD below the mean) were considered morbid and excluded from the experiment.

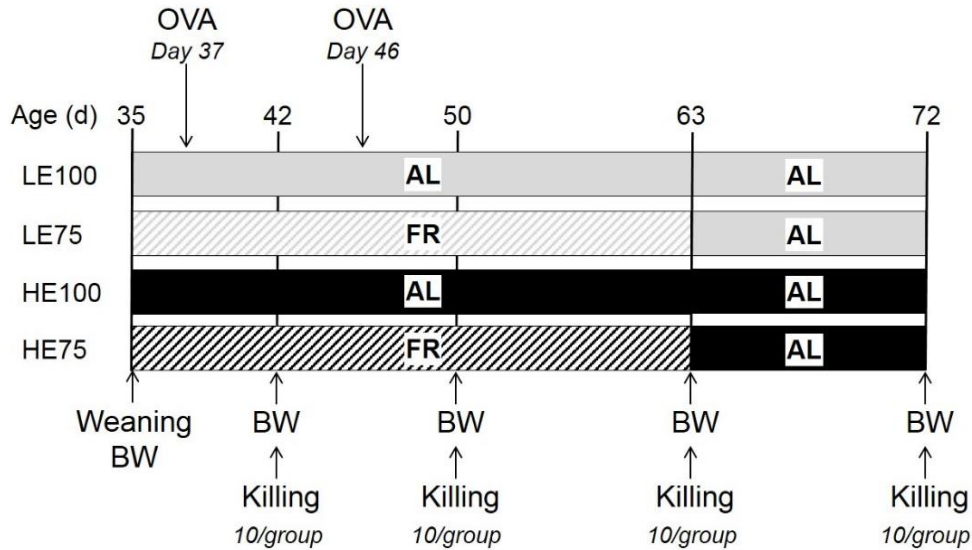


Figure 23 Experimental design.

HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group); BW = Body Weight; rab. = Rabbit; OVA = Ovalbumin immunization; FR = Feed restriction; AL = Ad libitum feeding.

2.2. Ovalbumin immunization.

At 37 days of age, 32 rabbits per group were immunized with a 1 ml subcutaneously injection of 600 µg of ovalbumin (OVA) (Sigma-Aldrich) in incomplete Freund's adjuvant (Sigma) and challenged 9 days later (46 days of age) with 300 µg of ovalbumin in incomplete Freund's adjuvant. The average weight at 35 days of age and standard deviation of the rabbits selected for immunization and that of the remaining animals were equivalent in order to have a representative sample of the experimental animals.

2.3. Killings and samplings.

10 healthy animals per treatment were killed at 42, 50, 63 and 72 days of age. All the animals killed at 63 and 72 days of age had been immunized with OVA whereas those killed at 42 and 50 days of age had not been immunized. The average weight and standard deviation of the rabbits selected for samplings and that of the remaining animals were equivalent in order to have a representative sample of the experimental animals. The animals were euthanized by an electrical stunning followed by an exsanguination. Blood was collected from the aorta at euthanasia in heparinized tubes (Vacuette, 9ml NH Sodium Heparin; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and immediately stored on ice. After centrifugation, the plasmas were stored at -20°C until further analysis. Lymphoid organs (spleen and vermiform appendix) were collected and weighed individually. Feces were collected in the rectum of the euthanized animals and transferred in dry

tubes on ice until arrival at the laboratory where the samples were stored at -20°C until further analysis. A 5 cm long section of the ileum was collected 10 cm from the ileo-caecal junction, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The first Peyer's patch encountered from the ileo-caecal junction was isolated, the ileum was cut up and a picture of the patch was taken alongside a ruler. Images were analyzed using the software ImageJ (Schneider et al., 2012) in order to evaluate the surface of the patches.

2.4. Total and anti-OVA IgG ELISA measurements.

Concentrations of plasma immunoglobulin G (IgG) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as already described (Accensi et al., 2006). Goat anti-rabbit IgG (Fc fragment specific), were used as capture antibodies (Bethyl Laboratories, Interchim, Montluçon, France) and horseradish peroxidase (HRP) labeled goat anti-rabbit IgG were used as detection antibodies in conjunction with a TMB substrate (1:1 H₂O₂ – Tetramethylbenzidine) (Thermo Fisher Scientific). Optical density (OD) of each well was read at 540 nm and subtracted from the readings at 450 nm (Spectra thermo scan, Tecan, NC, USA) in order to correct for the optical imperfections in the plates. The mean OD of each sample was then calculated, and the mean value of the negative control was subtracted from all sample values. IgG concentrations were then obtained thanks to the standard curve elaborated with the OD values of an IgG standard solution.

Concentrations of specific anti-OVA IgG were also measured by ELISA (Meissonnier et al., 2008). Briefly, ELISA plates were coated with ovalbumin diluted in carbonate buffer (4 mg/mL NaHCO₃ 0.1 M, pH 9.6) and incubated over night at 4 °C. Diluted plasma samples were then added to the plates and the anti-ovalbumin antibodies were detected with HRP-labelled anti-rabbit IgG (Bethyl Laboratories). Plasma samples were quantified by reference to standard curves constructed with a hyperimmune rabbit serum.

2.5. Fecal IgA extractions and IgA ELISA measurements.

A small amount of fecal matter (200-600 mg) was diluted at 50 mg/mL in cold PBS. The samples were dispersed for 10 seconds on ice (T25 Ultra-Turax, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) and centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C. The supernatants were then collected and stored at -20°C until analysis. Concentrations of plasma and fecal immunoglobulin A (IgA) were quantified by ELISA using specific polyclonal goat anti-rabbit IgA antibody (Bethyl Laboratories). Relative sample IgA concentrations were obtained thanks to the standard curve elaborated with the OD values of a diluted reference serum (Bethyl Laboratories).

2.6. Expression of mRNA encoding for cytokines by real-time PCR.

Tissue RNA of 50 and 63 days old rabbits was processed as previously described (Grenier et al., 2011). Concentrations, integrity and quality of RNA were determined spectrophotometrically (O.D.260) using the Nanodrop ND1000 (Labtech International, Paris, France). The sequences of primers used in PCR for *IL-1β*, *IL-2*, *IL-8*, *IL-10* and *TNFα* are detailed in **Annexe 2** and were purchased from Sigma. Real-time quantitative PCR were performed in 384 well plates using SYBR green as reporter. qRT-PCR data were expressed as $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ and normalized with a housekeeping gene. Beta-2 microglobulin (*B2M*) was chosen among 3 other candidate reference genes (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), Cyclophilin A) as its expression was not affected by our experimental treatments or age, and was thus considered as a valid reference. The amplification efficiency and initial fluorescence were determined by DART-PCR method. Finally, gene expression was expressed relative to the LE100 group. Specificity of qRT-PCR products was assessed at the end of the reactions by analyzing dissociation curves.

2.7. Calculations and Statistical analysis.

The digestible energy contents of the diets were obtained from digestibility measurements presented in a companion paper (Knudsen et al., 2014). Average digestible energy intakes were then estimated for each treatment at each age as the average gross intake per rabbit in the sampled cages, from weaning to killing, multiplied by the digestible energy content of the diet for each treatment. Average fecal IgA levels were plotted according to the average digestible energy intake at 42, 50 and 63 days of age. As the restricted animals were lighter than the *ad libitum* fed animals, the weight of the organs (spleen and appendix) were expressed for body weight to correct for body size. All measurements were analyzed using the GLM procedure (SAS). In order to account for unequal variances, a logarithm transformation of the data was performed when necessary. Effects of treatments were analyzed for each age for relative organ weights, Peyer's patch surfaces and antibody levels using the feed intake level, the diet and the interactions between feed intake level and diet as fixed effects. Body weight was added as co-variable for the analysis of Peyer's patch surfaces. Effect of age was analyzed for each treatment using the age as fixed effect. Finally, the model for cytokine measurements used the feed intake level, the diet, the age and all the interactions between these factors as fixed effects. Mean comparisons were performed using the Tukey test. Differences were considered significant for $P < 0.05$ whereas differences with $0.05 < P < 0.1$ were considered tendencies and only $P < 0.1$ are shown on the figures.

Values in the text, tables and figures are means \pm SEM. Tendencies were only discussed for the analysis of cytokine expressions.

3. RESULTS

3.1. Body weight and Peyer’s patch surface was lower with quantitative feed restriction without impacting on the relative spleen and appendix weight.

The feed intake of the animals fed *ad libitum* averaged 135 g/day from 35 to 63 days of age. The feed intake of the restricted animals was conform to the level of 75% initially planned (respectively 75% and 74% for the LE and the HE diet, from 35 to 63 days of age). As expected, growth rate was lower with feed restriction leading to a lower weight of the restricted animals from 42 days of age whereas diet did not affect the growth (**Figure 24**).

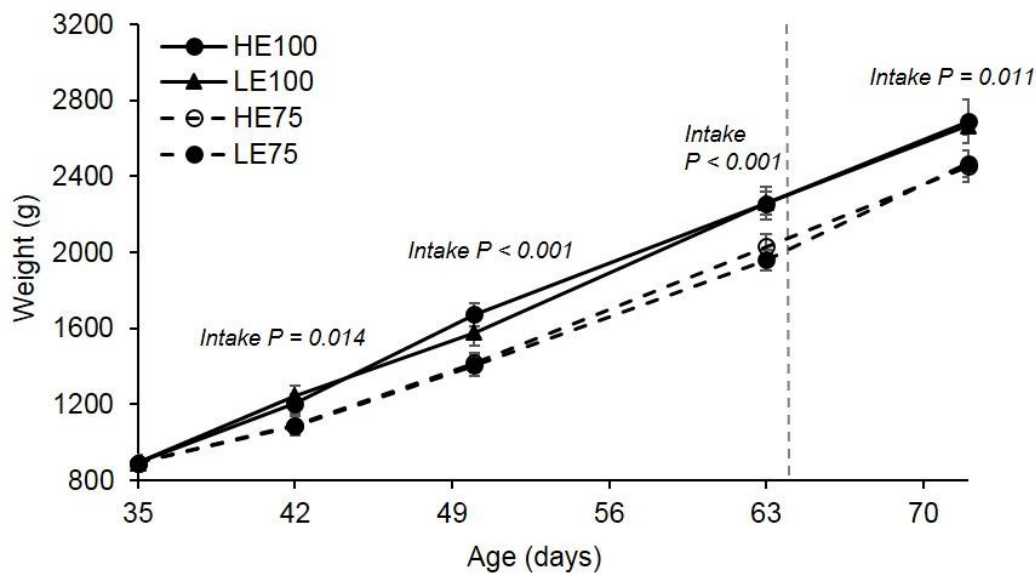


Figure 24 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the growth of the rabbits from 35 to 72 days of age.

Values are presented as means \pm SEMs, n = 10 per treatment and per age. HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group).

The effects of feed intake level and dietary energy concentration were first studied on physiological measurements of the killed animals. The relative weights of both organs were not affected by the experimental treatments during the feed restriction period. However, the relative weight of the appendix was greater with the LE diet after one week of *ad libitum* feeding at 72 days of age ($P < 0.05$, 0.32 ± 0.01 % vs 0.28 ± 0.01 %, data not shown). The surface of the Peyer’s

patches was not affected by the experimental treatments at 42 and 50 days of age but was lower with feed restriction at 63 days of age ($P < 0.01$, -0.2 cm^2). After one week of *ad libitum* feeding, the surface of the Peyer's patches of the previously restricted animals remained smaller compared to animals continuously *ad libitum* fed ($P < 0.05$, -0.2 cm^2 , **Figure 25**). However, when the body weight of the animals was added as co-variable in our model, no effect of our treatments was detectable, regardless of the age.

In conclusion, the body weight of the animals was lower with feed restriction but the growth of the secondary lymphoid organs (spleen and appendix) and the surface of the Peyer's patches were not affected by the feeding level whereas the dietary energy concentration only had a moderate effect on the growth of the appendix.

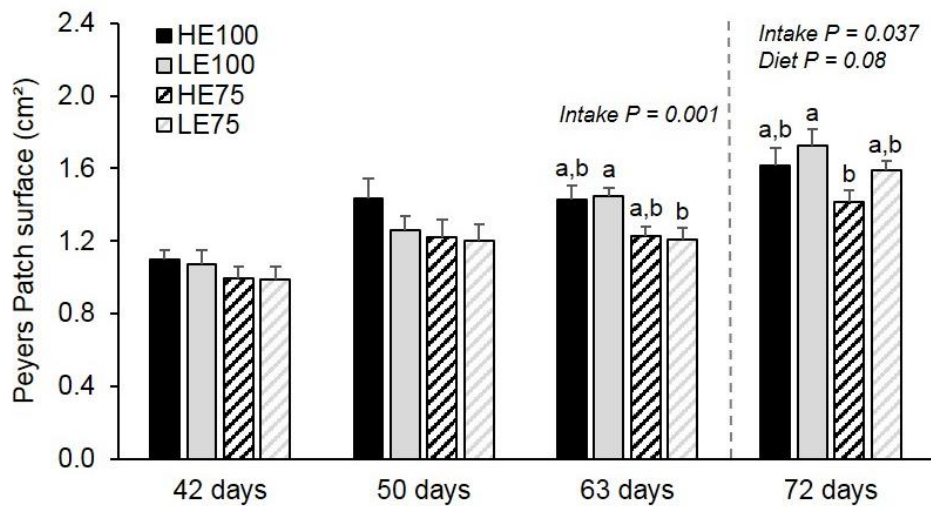


Figure 25 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the development of Peyer's Patches from 42 to 72 days of age in growing rabbits.

Values are presented as means \pm SEMs, $n = 10$ per treatment and per age. For an age, labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. HE100 (High Energy *ad libitum* fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy *ad libitum* fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group).

3.2. The total and anti-OVA plasma IgG concentrations were lower with quantitative feed restriction after four weeks of its application.

The main objective of this study was to assess the effects of feed intake level and dietary energy concentration on the immune response. The systemic immune response, measured with the plasma IgG concentrations, was therefore studied. Total plasma IgG concentrations were not affected by feed restriction during its application (**Figure 26**). However, when returning to an *ad libitum* feeding, previously restricted animals had lower IgG concentrations than the previously *ad libitum* fed animals (-22% , $P < 0.01$). Concerning the effect of the dietary energy concentration,

after one week of experiment, the IgG concentrations were higher with the HE diet compared to the LE diet (+23%, $P < 0.05$), but for all following dates the diet did not affect the plasma IgG concentrations (**Figure 26**).

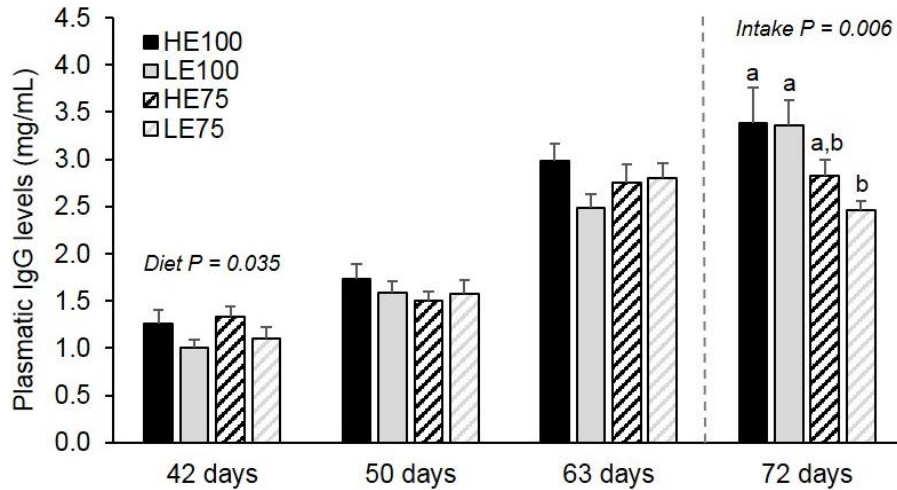


Figure 26 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the total plasma IgG concentrations from 42 to 72 days of age in growing rabbits. Values are presented as means \pm SEMs, $n = 10$ per treatment and per age. For an age, labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group).

The immunization protocol with OVA allowed us to investigate the effects of feed intake level and dietary energy concentration on antigen-specific immunity. Specific plasma anti-OVA IgG concentrations were lower with feed restriction at 63 days of age (-41%, $P < 0.05$, **Figure 27**) but after one week of *ad libitum* feeding, previous feeding levels did not affect specific antibody levels. Diet did not affect the anti-OVA IgG concentrations regardless of the age. Taken together, these results demonstrate that feed restriction and dietary energy concentration had a limited effect on the total plasma IgG concentrations, but feed restriction greatly affected the specific anti-OVA IgG production after 4 weeks of application.

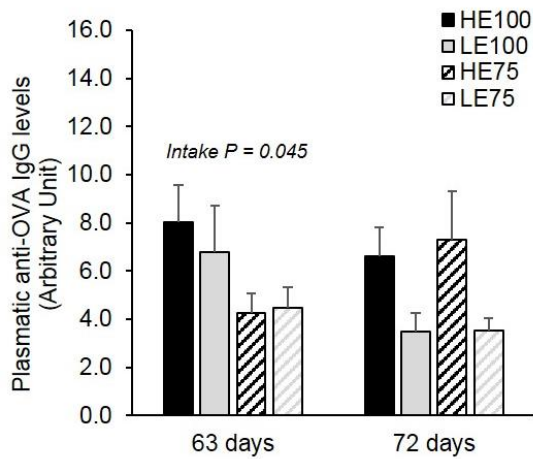


Figure 27 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the plasma anti-OVA IgG concentrations at 63 and 72 days of age in growing rabbits.

Values are presented as means \pm SEMs, n = 10 per treatment and per age. For an age, labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group).

3.3. Quantitative feed restriction reduced fecal and plasmatic IgA concentrations to a greater extent than energy restriction.

The aim of this study was also to assess the effect of feed intake level and dietary energy concentration on the local immune response in the digestive tract through measurements of fecal IgA concentrations. The fecal IgA concentrations were lower with feed restriction during its application (-40% at 42 days of age, $P < 0.05$, -52% at 50 days of age, $P < 0.001$ and -65% at 63 days of age, $P < 0.001$, **Figure 28, A**). When returning to an *ad libitum* feeding, no effect of the previous feeding levels was observed. The fecal IgA concentrations was higher with the HE diet compared to the LE diet from 50 days of age and onwards (+56% at 50 days of age, $P < 0.01$, +46% at 63 days of age, $P < 0.05$ and +73% at 72 days of age, $P < 0.05$). When plotting the average fecal IgA levels according to the average digestible energy intake per treatment, a linear relationship between those two variables could be observed at 50 and 63 days of age but not at 42 days of age (**Figure 29**).

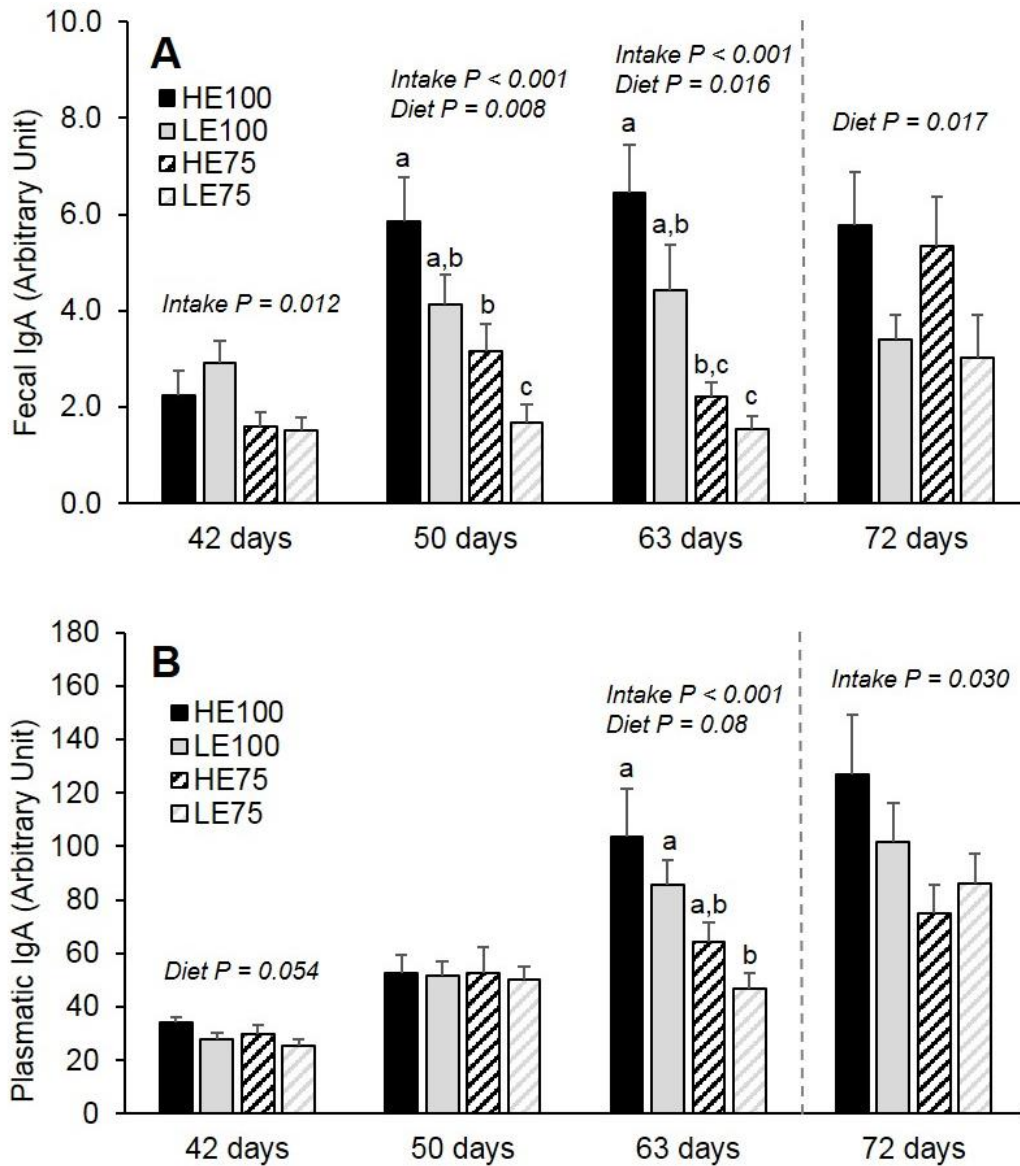


Figure 28 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the fecal (A) and plasma (B) IgA concentrations from 42 to 72 days of age in growing rabbits.

Values are presented as means \pm SEMs, n = 10 per treatment and per age. For an age, labeled means without a common letter differ, P<0.05. HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group).

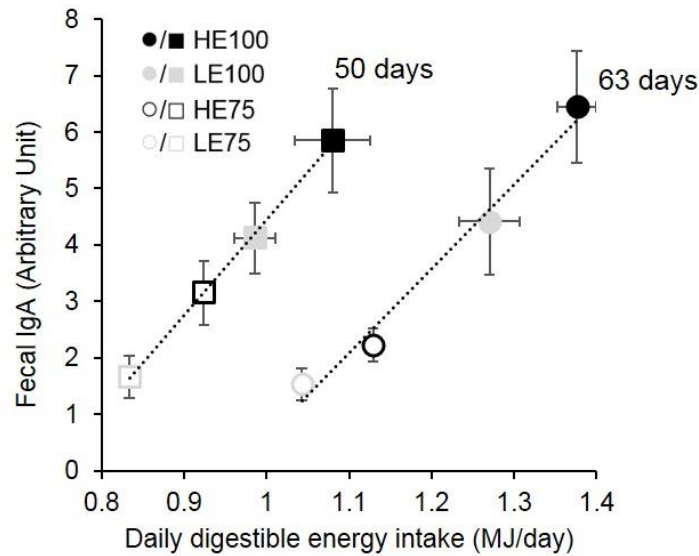


Figure 29 Mean fecal IgA levels per treatment according to the mean digestible energy intake at 50 and 63 days of age in growing rabbits.

Values are presented as means \pm SEMs, $n = 10$ per treatment and per age. HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group).

To complete fecal analyses, plasma measurements of IgA concentrations were performed. Plasma IgA concentrations were lower with feed restriction after 4 weeks of application (63 days of age, -41%, $P < 0.001$) and after one week of *ad libitum* feeding (72 days of age, -29%, $P < 0.05$). The diet did not affect the plasma IgA concentrations (**Figure 28, B**). These results indicate that the fecal IgA concentrations were lower with limited feed intake and reduced dietary energy concentration and plasma IgA concentrations were also, to a lesser extent, lower with feed restriction.

3.4. Quantitative feed restriction tended to modify the cytokine expressions in the ileum.

Cytokines play a key role in regulating immunity, and more specifically inflammation. The expressions of IL-1 β and IL-2 were greater with feed restriction (+30% and +77% respectively, $0.05 \leq P < 0.1$) whereas that of TNF α was lower with feed restriction (-15%, $0.05 \leq P < 0.1$). Feed restriction did not affect the expression of IL-8 and IL-10 (**Tableau 23**).

Tableau 23 Effect of feed intake level and dietary DE concentration on the relative cytokine expressions in the ileum of growing rabbits between 50 and 63 days of age¹.

	50 days of age				63 days of age				pooled SEM	P levels ²		
	LE100	LE75	HE100	HE75	LE100	LE75	HE100	HE75		Age	Diet	Intake level
IL-1β	1.05	1.77	1.18	1.47	1.02	1.21	1.10	1.24	0.08	0.38	0.97	0.053
TNFα	1.09	0.73	0.95	0.84	1.03	0.86	0.93	0.96	0.04	0.59	0.91	0.07
IL-8	1.18	0.88	1.01	1.06	1.04	1.24	1.13	1.56	0.07	0.16	0.49	0.52
IL-2	1.26	3.79	1.67	2.41	1.11	1.96	1.56	1.80	0.30	0.87	0.57	0.07
IL-10	0.89	1.57	0.95	0.93	1.24	1.31	1.35	1.29	0.10	0.30	0.10	0.65

¹Values are presented as means \pm SEM, n = 10 per treatment and per age.

²All interactions between factors were non-significant.

DE = Digestible Energy; HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group); SEM = Standard Error of the Mean.

3.5. Immunological parameters were affected by age.

The relative weight of the spleen decreased with age ($P < 0.01$) for all groups whereas the relative weight of the appendix increased with age until 63 days of age and decreased afterwards for all groups except LE75 where age did not impact on the relative weight of the appendix (**Annexe 3**). The surface of the Peyer's patches moderately increased with the age for all groups ($P < 0.01$, **Annexe 3**). The fecal IgA concentrations increased with age ($P < 0.01$) for the HE100 and HE75 groups but were unaffected by age for the LE100 and LE75 groups (**Annexe 4, A**). Total plasma IgG and IgA concentrations increased with age regardless of the experimental group ($P < 0.001$, **Annexe 4, B and C**).

4. DISCUSSION

Dietary strategies influence animal health. The present study aimed to analyze the effects of quantitative feed restriction and dietary energy concentration on the immune response of the growing rabbit. We demonstrated that, feed restriction rather than the dietary energy concentration modulate the immune response of the growing rabbit.

The spleen, the appendix and the Peyer's patches are major secondary lymphoid organs. As previously demonstrated in mice (Rogers et al., 2008), feed restriction did not affect the relative weight of the spleen or the appendix. The dietary energy concentration only had a very moderate effect on the relative weight of the appendix at the end of the experiment. Similarly, the smaller surface of the Peyer's patches in the restricted animals may be correlated to the lower weight of

these animals. Feed restriction and energy restriction therefore did not impair the growth of the secondary lymphoid organs. Similar results were reported by Rogers *et al.* who showed that a 30% reduction in feed intake did not affect the number of Peyer's patches, nor their number of cells (Rogers *et al.*, 2008). However, Kubo *et al.* demonstrated that a 50% feed restriction reduced the number of cells in the spleen of growing mice (Kubo *et al.*, 1984). Thus immune activity might be compromised by feed restriction despite the lack of effect on the physiological parameters of the secondary lymphoid organs measured.

Concerning the adaptive systemic immune response, feed restriction only affected total IgG concentrations after its application. A similar delayed dietary effect was reported by Zhu *et al.* (Zhu *et al.*, 2013) in growing rabbits fed diets differing in starch and fiber concentrations. As for the effects of feed restriction upon the immune response to a specific antigen, the response was much more prompt: specific anti-OVA concentrations were considerably lower after 4 weeks of feed restriction. Similar results were obtained by Martin *et al.* in 30% feed restricted deer mice submitted to a KLH challenge (Martin *et al.*, 2007). These findings could indicate that immunological memory is an energetically costly process, penalized by feed restriction. Another hypothesis could be that the antibody production is indirectly reduced through variations in nutrient or metabolite signals caused by the reduced feed intake. Surprisingly previous feeding levels had no effect on the specific response to OVA after 1 week of *ad libitum* feeding. This could indicate that the specific immune response is readjusted very quickly after a change in ingestion level.

The present study evaluated the effect of feed intake level and dietary energy concentration upon the local immune response through the fecal and plasma IgA concentrations and ileal cytokine expressions. Our results showed that the fecal IgA concentrations were lower with feed restriction in growing rabbits, confirming the results obtained on intestinal fluids and submandibular gland cultures in mice with long term feed restriction (Lara-Padilla *et al.*, 2011; Muthukumar *et al.*, 2000). However, to our knowledge, this is the first study to evidence an effect of a short term feed restriction on the fecal IgA concentrations. According to our previous results (Knudsen *et al.*, 2014), digestible energy intake was greater with the HE diet and ranked as follow LE75<HE75<LE100<HE100 and in this study a linear relationship between DE intake and fecal IgA levels was evidenced. We could therefore hypothesize that the fecal IgA concentration might be regulated by the digestible energy intake rather than the quantity of feed ingested. The regressions made were however based on the energy intake of a sample of rabbits and not on individual measurements. Thus, additional experiments would be necessary to confirm our hypothesis. Muthukumar *et al.* (Muthukumar *et al.*, 2000) showed that a 40% reduction in feed

intake resulted in lower submandibular gland IgA concentrations and attenuated the onset of diseases in autoimmune prone mice, indicating a possible protective effect of the reduction in IgA concentrations. The mycotoxin deoxynivalenol also induces an increase in IgA levels in mice (Pestka, 2003) associated with intestinal lesions in pigs (Bracarense et al., 2012). Thus, the lower fecal IgA concentrations could be related to the lower incidence of digestive disorders observed in restricted fed rabbits and detailed in our companion paper (Knudsen et al., 2014). In addition our results showed that plasma IgA concentrations were lower with feed restriction after 4 weeks of application. The change in plasma IgA concentrations lagged behind the one occurring at fecal level (63 vs 42 days of age) suggesting that the immune response in the peripheral blood occurs subsequently to the response in the digestive tract. This hypothesis is coherent with the results obtained on plasma IgG concentrations in our study and the study of Zhu *et al.* (Zhu et al., 2013).

The results on cytokine expressions suggested that feed restriction tended to regulate the pro-inflammatory response (IL-1 β and TNF α) and increase the expression of IL-2. In contrast, Lara-Padilla *et al.* (2011) found an greater expression of TNF α and IL-10 and a lower expression of IL-2 in the duodenum of mice fasted on alternate days for 17 weeks whereas Kurki *et al.* (Kurki et al., 2012) recently found that long term feed restriction at 70% of *ad libitum* in lean mice increased the protein expression of IL-2, IL-1 β , IL-10 and TNF α in adipose tissues. This suggests either that the cytokines are differentially expressed in the ileum, or that the immune response is dependent on the duration and the type of feed restriction. Finally, IL-2 and TNF α regulate the synthesis of IgA (Lebman and Coffman, 1994), thus the potential differential expression in those two cytokines could be related to the reduced IgA concentrations observed with feed restriction. However, this hypothesis remains to be confirmed as the mechanisms by which cytokines regulate the production of IgA are complex.

5. CONCLUSION

The present study demonstrated the impact of a short-term feed restriction on the systemic and local digestive immunity of the growing rabbit. Fecal IgA levels rapidly decreased with both feed restriction and energy restriction whereas the effects on the systemic immune response (plasma IgG and IgA levels) lagged behind in time. Thus, the local immune response was modulated at an earlier stage than the systemic immune response. The innate immune response seemed less affected by our treatments as cytokine expressions in the ileum only tended to be modulated by quantitative feed restriction. Taken together our results demonstrated that, feed restriction and, to a lesser extent, the dietary energy concentration of the feed modulated gut immunity. These

elements remain however to be correlated to the beneficial impacts of feed restriction on post weaning digestive health in rabbits.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank P. Aymard, E. Balmisse and J-M. Bonnemere from the INRA UE PECTOUL for the animal handling and care during the experiment. The authors would also like to thank J. Laffitte, A. M. Cossalter and A. Pierron from the TOXALIM unit and Y. Lippi from the TRIX platform for their technical support in ELISA protocols and qRT-PCR analyses. C. K., C. B., J. D., G. R., J. M. S., A. T., D. W. and T. G. designed the research. C. K., S. C. and T. G. conducted the research. I. P. O. provided the immunological reagents and materials. C. K. performed the statistical analysis. C. K., S. C., I. P. O. and T. G. wrote the paper. T. G. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

LITERATURE CITED

1. Lalles JP, Boudry G, Favier C, Le Floch N, Lurona I, Montagne L, Oswald IP, Pie S, Piel C, Seve B. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res* 2004;53:301-16.
2. Fortun-Lamothe L, Boullier S. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livest Sci* 2007;107:1-18.
3. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports* 2012;127:4-22.
4. Gallois M, Rothkotter HJ, Bailey M, Stokes CR, Oswald IP. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal* 2009;3:1644-61.
5. Gidenne T, Combes S, Fortun-Lamothe L. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal* 2012;6:1407-19.
6. Gidenne T, Combes S, Feugier A, Jehl N, Arveux P, Boisot P, Briens C, Corrent E, Fortune H, Montessuy S, et al. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 2009;3:509-15.
7. McGee DW, McMurray DN. Protein malnutrition reduces the IgA immune response to oral antigen by altering B-cell and suppressor T-cell functions. *Immunology* 1988;64:697-702.

8. Lara-Padilla E, Campos-Rodriguez R, Jarillo-Luna A, Reyna-Garfias H, Rivera-Aguilar V, Miliar A, de la Rosa FJB, Navas P, Lopez-Lluch G. Caloric restriction reduces IgA levels and modifies cytokine mRNA expression in mouse small intestine. *J Nutr Biochem* 2011;22:560-6.
9. Perez-Berezo T, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Perez-Cano FJ, Castell M. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:S56-S66.
10. Zhu YL, Wang CY, Wang XP, Li B, Sun LZ, Li FC. Effects of dietary fiber and starch levels on the non-specific immune response of growing rabbits. *Livest Sci* 2013;155:285-93.
11. Maertens L, Perez JM, Villamide M, Cervera C, Gidenne T, Xiccato G. Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. *World Rabbit Sci* 2002;10:157-66.
12. De Blas C, Mateos GG. Feed formulation. Edtion ed. In: De Blas C, Wiseman J, eds. *Nutrition of the Rabbit*. Wallingford, UK: CABI, 2010:222-32.
13. Journal Officiel de la République Française 0278. Arrêté du 30 novembre 2009 modifiant l'arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux. 2009:20652.
14. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671-5.
15. Accensi F, Pinton P, Callu P, Abella-Bourges N, Guelfi JF, Grosjean F, Oswald IP. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. *J Anim Sci* 2006;84:1935-42.
16. Meissonnier GM, Laffitte J, Raymond I, Benoit E, Cossalter AM, Pinton P, Bertin G, Oswald IP, Galtier P. Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs. *Toxicology* 2008;247:46-54.
17. Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Luciola J, Pacheco GD, Cossalter AM, Moll WD, Schatzmayr G, Oswald IP. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:761-71.
18. Knudsen C, Combes S, Briens C, Coutelet G, Duperray J, Rebours G, Salaun J-M, Travel A, Weissman D, Gidenne T. Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. *Livest Sci* 2014:<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.08.015>.

19. Rogers CJ, Berrigan D, Zaharoff DA, Hance KW, Patel AC, Perkins SN, Schlom J, Greiner JW, Hursting SD. Energy restriction and exercise differentially enhance components of systemic and mucosal immunity in mice. *J Nutr* 2008;138:115-22.
20. Kubo C, Day NK, Good RA. Influence of early or late dietary restriction on life-span and immunological parameters in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5831-5.
21. Martin LB, Navara KJ, Weil ZM, Nelson RJ. Immunological memory is compromised by food restriction in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292:R316-R20.
22. Muthukumar AR, Jolly CA, Zaman K, Fernandes G. Calorie restriction decreases proinflammatory cytokines and polymeric Ig receptor expression in the submandibular glands of autoimmune prone (NZB X NZW)F-1 mice. *J Clin Immunol* 2000;20:354-61.
23. Pestka JJ. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol Lett* 2003;140:287-95.
24. Bracarense A-PFL, Luciola J, Grenier B, Pacheco GD, Moll W-D, Schatzmayr G, Oswald IP. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Br J Nutr* 2012;107:1776-86.
25. Kurki E, Jin S, Martonen E, Finckenberg P, Mervaala E. Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice. *Nutr Metab* 2012;9:10.1186/743-7075-9-64.
26. Lebman DA, Coffman RL. Cytokines in the mucosal immune system. Edition ed. In: Ogra PL, Lamm ME, McGhee J, Mestecky J, Strober W, Bienenstock J, eds. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press, 1994:243–9.

Annexe 1 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.

	LE	HE
Ingredients (g/kg)		
Wheat	50	150
Barley	34	20
Wheat bran Milurex®	130	20
Pea	20	24
Rapeseed meal	32	110
Sunflower meal	157	223
Alfalfa	225	30
Wheat straw	70	59
Sugarbeet pulp	108	208
Grape pulp	63	40
Apple pomace	20	50
Cane molasses	60	30
Rapeseed oil	5	17
Dicalcium phosphate	5	0
Calcium carbonate	1	2
DL-Methionine 15%	3	1
L-Lysine 25%	6	5
L-Threonine 10%	1	2
Vitamin premix ¹	10	10
Chemical composition (g/kg)		
Dry matter	873	874
Crude ash	75	59
Crude protein (N X 6.25)	147	160
Starch	102	118
Total sugars	65	58
Crude fat	28	37
Crude fiber	176	171
Neutral detergent fiber (NDF)	360	346
Acid detergent fiber (ADF)	227	218
Digestible fiber ²	184	207
Gross energy (MJ/Kg)	16.15	16.57
Formulated nutritive values²		
Digestible protein (DP, g/kg)	97	110
Digestible energy (DE, MJ/Kg)	9.08	10.13
Ratio DP/DE (g/MJ)	10.68	10.86

¹: Content (per kilogram of premix): vitamin A (retinyl acetate): 1 000 000 IU; cholecalciferol.: 100 000 IU; vitamin E (dl-alpha tocopheryl acetate): 5 000 UI; menadione: 200 mg; thiamin: 200 mg; vitamin C: 25 000 mg ; choline chloride: 20 000 mg; Cu (copper sulfate): 1 000 mg; Fe (iron carbonate): 10 000; Zn (zinc oxide): 5 000 mg; Mn (manganous oxide): 500 mg; I (potassium iodide): 20 mg; Co (cobalt carbonate): 10.4 mg and Se (sodium selenite): 20 mg.

²: calculated according to tables of ingredients (11).

ADF = Acid Detergent Fiber; DE = Digestible Energy; DP = Digestible Protein; HE = High Energy diet; LE = Low Energy diet; NDF = Neutral Detergent Fiber.

Annexe 2 Nucleotide sequences of primers for qRT-PCR.

Gene Symbol	Gene Name	Primer Sequences	GenBank accession number
<i>B2M</i> ¹	Beta-2-Microglobulin	F : AACGTGGAACAGTCAGACC R : AGTAATCTCGATCCCATTTC	XM002717921.1
<i>TNFα</i>	Tumor Necrosis Factor alpha	F : GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA R : ATCTGGGCCACAGGGTTGA	E08303
<i>IL-1β</i>	Interleukin 1 beta	F : CAAGTGGTGTCTCCATGAGTTTT R : CTTGTCGTTACTTTCTTCTCCTTGC	M26295.1
<i>IL-8</i>	Interleukin 8	F : TGGCTCTCTTGGCAACCTTC R : CAGAACTGCAGCTTCACAAAGAGT	NM1082293
<i>IL-2</i>	Interleukin 2	F : TCCAGGATGCTCACATTCAA R : GCACTTCTCCAGAGGTTTG	DQ852342.1
<i>IL-10</i>	Interleukin 10	F : AGAACCACAGTCCAGCCATC R : TTTTCACAGGGGAGAAATCG	AF068058.1

¹ Primer sequences were obtained from Peng *et al.* (1).

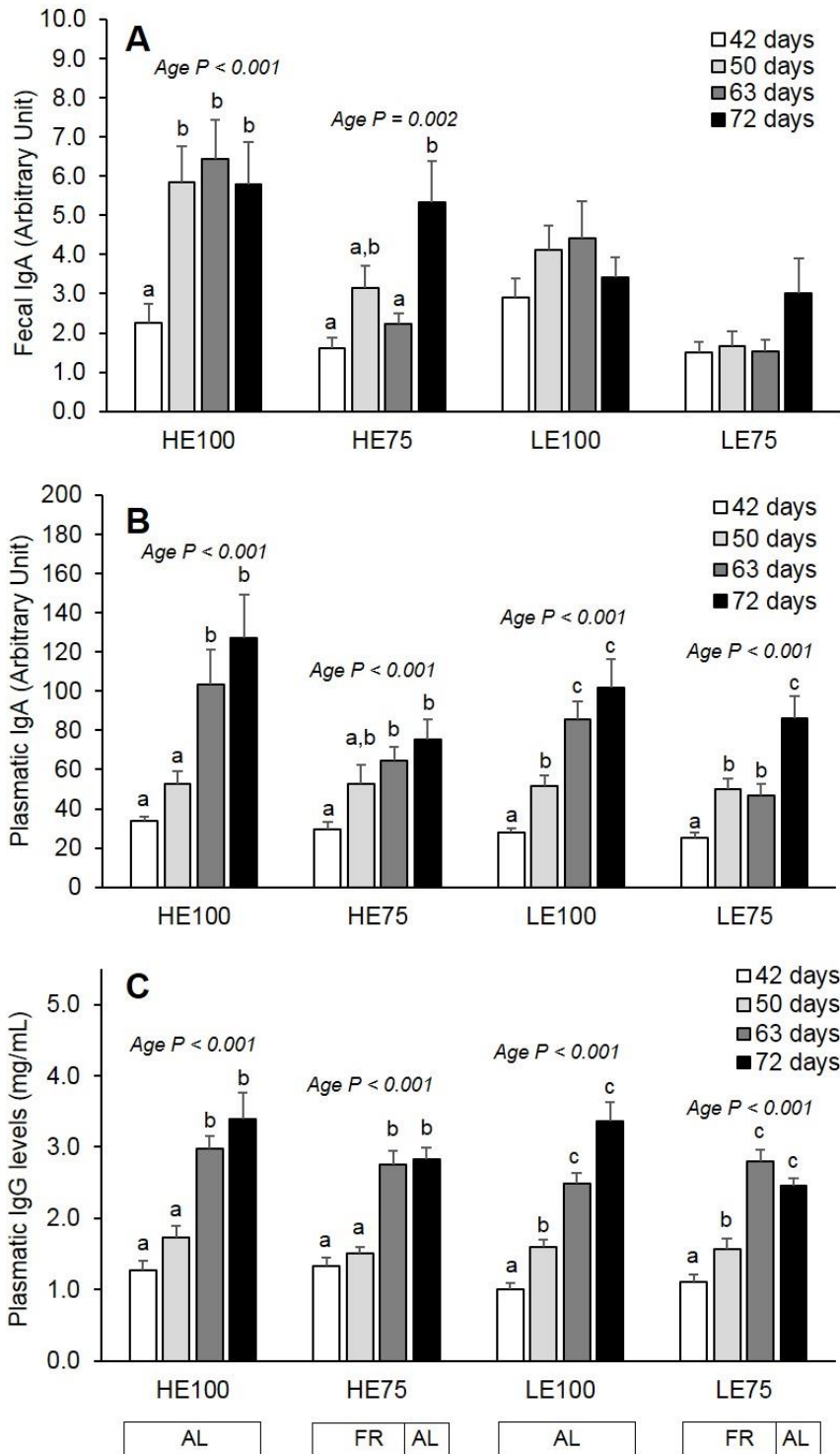
(1) Peng XX, Zhao RL, Song W, Chu HR, Li M, Song SY, Li GZ, Liang DC. Selection of Suitable Reference Genes for Normalization of Quantitative Real-Time PCR in Cartilage Tissue Injury and Repair in Rabbits. *Int J Mol Sci* 2012;13(11):14344-55.

Annexe 3 Effect of the age on the relative weight of the appendix and the spleen and the surface of the Peyer's patches according to the experimental treatment in growing rabbits.

Organ & treatment	Age				pooled SEM	P levels
	42 days	50 days	63 days	72 days		Age
Appendix (‰)						
HE100	0.279 ^a	0.324 ^{a,b}	0.353 ^b	0.279 ^a	0.008	<0.001
HE75	0.289 ^a	0.327 ^{a,b}	0.346 ^b	0.291 ^a	0.007	0.008
LE100	0.286 ^a	0.310 ^{a,b}	0.359 ^b	0.319 ^{a,b}	0.009	0.016
LE75	0.301	0.323	0.357	0.328	0.010	0.25
Spleen (‰)						
HE100	0.100 ^a	0.082 ^{a,b}	0.080 ^b	0.068 ^b	0.003	0.001
HE75	0.107 ^a	0.081 ^b	0.074 ^b	0.071 ^b	0.004	0.002
LE100	0.096 ^a	0.086 ^{a,b}	0.069 ^{b,c}	0.064 ^c	0.003	<0.001
LE75	0.100 ^a	0.086 ^{a,b}	0.071 ^{b,c}	0.062 ^c	0.003	<0.001
Peyer's Patch surface (cm²)						
HE100	1.10 ^a	1.44 ^b	1.43 ^{a,b}	1.62 ^b	0.05	0.002
HE75	1.00 ^a	1.22 ^{a,b}	1.23 ^{a,b}	1.41 ^b	0.04	0.002
LE100	1.07 ^a	1.26 ^{a,b}	1.45 ^{b,c}	1.72 ^c	0.05	<0.001
LE75	0.99 ^a	1.20 ^a	1.21 ^a	1.59 ^b	0.05	<0.001

¹Values are presented as means ± SEM, n = 10 per treatment and per age. Within each organ and treatment, means without a common letter differ, P<0.05.

Treatments: DE = Digestible Energy; HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group); SEM = Standard Error of the Mean.



Annexe 4 Effect of age the fecal (A) and plasma (B) IgA concentrations and the IgG plasma concentration (C) according to the experimental treatment in growing rabbits.

Values are presented as means \pm SEMs, $n = 10$ per treatment and per age. For a treatment, labeled means without a common letter differ, $P < 0.05$. HE100 (High Energy ad libitum fed group); HE75 (High Energy restricted fed group); LE100 (Low Energy ad libitum fed group); LE75 (Low Energy restricted fed group), AL (Ad libitum feeding), FR (Feed restriction).

II. UNE METHODE LPS POUR STIMULER LA REPONSE INFLAMMATOIRE DU LAPIN EN CROISSANCE

Article soumise à World Rabbit Science

Résumé:

Des indicateurs fiables sont nécessaires pour étudier la relation entre la réponse inflammatoire du lapin en croissance et les pratiques d'élevage, comme les stratégies alimentaires par exemple. Une stimulation LPS (Lipopolysaccharide) de la réponse inflammatoire est un modèle valide d'infection bactérienne chez les animaux de laboratoire. Cependant, aucune donnée n'a à ce jour été obtenue chez le lapin en croissance. Le but de notre étude était de déterminer la dose adéquate de LPS à administrer à un lapin en croissance afin d'obtenir une réponse inflammatoire mesurable en termes de concentrations plasmatiques de TNF α et d'augmentation de la température rectale. Trois protocoles ont été menés dans cette étude: deux protocoles de développement, le premier (n=18) testant 3 doses de LPS (2, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sur la concentration plasmatique de TNF α à 90 et 180 min post-injection, le deuxième (n=36) testant 4 doses de LPS (50, 75, 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sur la concentration plasmatiques de TNF α à 90 min post-injection et sur la température rectale. Le troisième protocole visait à appliquer la méthode mise au point sur un nombre plus important d'animaux (n=32) afin d'étudier l'effet de la restriction alimentaire et de la qualité nutritionnelle de l'aliment sur la réponse inflammatoire. Dans les deux protocoles de développement les animaux avaient des réponses mesurables en termes de TNF α pour des doses supérieures à 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 90 min post-injections, le nombre d'animaux répondant augmentant avec la dose. Une grande variabilité était observée sur la concentration en TNF α des animaux répondant (CV de 44 à 94%). Les animaux présentaient une augmentation de la température rectale quel que soit la dose administrée entre 50 et 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 90 min post-injection avec un pic de température à 180 min ($\Delta = 1,9 \pm 0,7$ °C). Nos observations nous ont conduits à choisir une dose de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS pour nos protocoles suivants. En effet, cette dose présentait les réponses les plus satisfaisantes en termes de température et de niveaux plasmatiques de TNF α . L'application de notre protocole d'injection LPS à notre essai nutritionnel nous a permis de valider ce protocole ($\Delta_{\text{Tr}} = 1,1 \pm 0,7$ °C à 180 min et 15/32 animaux répondant en termes de TNF- α). Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence d'effet du niveau d'ingestion ou de la qualité nutritionnelle de l'aliment sur la réponse inflammatoire à une stimulation LPS.

Mots clés: Lapin, réponse immunitaire, LPS, inflammation, TNF α .

An LPS based method to stimulate the inflammatory response in growing rabbits.

Knudsen C.^{1,2,3}, Combes S.^{1,2,3}, Mousavikhorshidi H.^{1,2,3}, Oswald I.^{4,5}, Gidenne T.^{1,2,3}

¹ INRA, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan,
France

² Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-
31326 Castanet-Tolosan, France

³ Université de Toulouse INPT ENVT, UMR1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-
31076 Toulouse, France

⁴ INRA, Toxalim, UMR 1331, 180, Chemin de Tournefeuille, Toulouse Cedex 931027, France

⁵ Université de Toulouse, INP, Toxalim, UMR 1331, 180, Chemin de Tournefeuille, Toulouse Cedex
931027, France

Running Head: Inflammatory response to LPS in growing rabbits

E-mail : thierry.gidenne@toulouse.inra.fr

Phone : (33) +5 61 28 51 03

ABSTRACT

Reliable indicators are needed to study the relationship between the inflammatory response of the growing rabbit and breeding factors, such as the feeding practices. A Lipopolysaccharide (LPS) stimulation of the inflammatory response is a valid model of a bacterial infection in laboratory animals, but no data has yet been obtained on the growing rabbit. The aim of our study was to determine an adequate dose of LPS to inject to growing rabbits in order to obtain a measurable inflammatory response in terms of plasmatic TNF- α and rise in rectal temperature. Three trials were carried out in this study: two development trials, the first (n=18) testing 3 doses of LPS (2, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on the plasmatic TNF- α concentration at 90 and 180 min post injections, and the second trial (n=36) testing 4 doses of LPS (50, 75, 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) on the TNF- α concentration 90 min post injections and the rectal temperature. The third trial was designed as an application of the method on a large number of animals (n=32) to study the effect of feed restriction and diets differing in nutritional values. In the development trials, animals had measurable TNF- α responses for doses higher than 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at 90 min post injections with an increase in the number of responsive animals with the dose. A high variability was observed in TNF- α concentrations in responsive animals (CV from 44 to 94%). Animals demonstrated an increase in rectal temperature for all doses injected in the range of 50-150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ from 90 min post injections with a peak at 180 min ($\Delta = 1.9 \pm 0.7$ °C). Our observations led us to choose a dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS for our following studies as the responses in terms of temperature and TNF- α were the most satisfactory. The application of our LPS injection protocol to our nutritional study enabled us to validate our protocol ($\Delta_{\text{Tr}} = 1.1 \pm 0.7$ °C at 180 min and 15/32 TNF- α responsive animals) even though we were not able to demonstrate any effect of the feeding level or the diet on the inflammatory response to an LPS injection.

Key words: Rabbit, immune response, LPS, inflammation, TNF- α .

1. INTRODUCTION

In a context of antibiotic use limitation, innovative solutions are being evaluated in order to preserve the young animal's health (Gallois et al., 2009). Classically, the immune response of a growing animal can be evaluated after a stimulation of its immune system through specific antigen administrations (ovalbumin, LPS...) (Meissonnier et al., 2008; Qiu et al., 2013). Lipopolysaccharide (LPS) is a structural component of the cell wall of Gram-negative bacteria and a potent inducer of the inflammatory response. It is widely recognized as a valid model of a bacterial infection (Redl et al., 1993), even though some authors contest its representativeness, as the inflammatory response can be significantly higher than in sepsis models (Granger et al., 2006). Intra-venous (i.v.) and intra-peritoneal (i.p.) injections of LPS are known to cause fever and a release of pro-inflammatory cytokines. Among those, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) plays a key role as a mediator of inflammation and septic shock and is implicated in the pathogenesis of fever (Mabika and Laburn, 1999). Thus, the measurements of temperature and TNF- α levels can be considered as adequate indicators of the inflammatory response to LPS injections in the adult rabbit (Ferrian et al., 2013; Huang et al., 2008). However, the dose used in order to obtain a measurable inflammatory response varies greatly according to the authors, from doses below 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Huang et al., 2008; Shibata et al., 2005) to doses above 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Brito et al., 1995; Ferrian et al., 2013). Even though the use of LPS has been studied in adult rabbits, no data has yet been obtained on growing rabbits. The aim of our study was to determine the adequate dose of LPS to inject to growing rabbits in order to obtain a measurable inflammatory response in terms of plasmatic TNF- α and rise in rectal temperature. We also wanted to determine the adequate time of measurement of the plasmatic concentrations of TNF- α in order to apply this protocol on a wider scale experiment using diets differing in nutritional values and different feeding levels, potentially impacting the inflammatory response.

2. MATERIALS AND METHODS

Three trials were carried out in this study: Trials 1 and 2 were set up to determine the adequate dose of LPS to inject to the rabbits and the optimal method of measurement of the subsequent inflammatory response. Trial 3 was designed as an application of the method to study the effect of feed restriction and diets differing in nutritional values.

2.1. Animals, housing and feeds

The three trials were conducted at the INRA UE PECTOUL (Castanet-Tolosan, France) breeding unit using healthy hybrid rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The rabbits were housed in collective cages of 3 to 6 animals (density: 10 rab./m², 18 rab./m² and 15 rab./m² respectively for trials 1, 2 and 3) in a closed unit where the environment (temperature, lighting and ventilation) was monitored and controlled.

Tableau 24 Ingredients and formulated chemical composition of the experimental diets.

	Trials 1 and 2	Trial 3	
		AM	FD
Ingredients (%)			
Wheat	0.00	9.00	12.40
Barley	7.00	15.00	2.00
Wheat bran	28.54	3.70	5.40
Rapeseed	0.00	2.00	2.20
Rapeseed meal	2.40	2.80	9.40
Sunflower meal	26.20	25.00	21.80
Alfalfa	8.00	11.10	2.00
Wheat straw	0.00	2.80	6.50
Sugarbeet pulp	16.60	12.90	25.00
Grape pulp	4.80	2.00	2.60
Apple pomace	0.00	6.30	5.30
Cane molasses	3.60	4.31	3.00
Rapeseed oil	0.30	0.50	0.50
Dicalcium phosphate	0.00	0.19	0.11
Calcium carbonate	1.01	0.00	0.00
Salt	0.65	0.00	0.00
Methionine 15%	0.00	0.30	0.15
L-Lysine 20%	0.00	0.75	0.55
Threonine 10%	0.00	0.35	0.09
Vitamin premix	0.90	1.00	1.00
Chemical composition (%)			
Crude protein	16.05	15.50	15.51
Starch	11.55	16.00	11.86
Cellulose	19.22	16.70	16.68
Crude fat	2.51	3.10	2.99
Digestible fibre ¹		17.00	22.00

¹: calculated according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002).

The animals in trials 1 and 2 were fed *ad libitum* a standard post-weaning diet without antibiotics (**Tableau 24**). Animals in trial 3 were fed one of two experimental diets (ST, rich in starch vs DF, rich in digestible fibres) according to their treatment. These experimental diets were formulated to meet the nutritional requirements of the growing rabbit (De Blas and Mateos, 2010) without any drug supplementation (antibiotics or coccidiostatics) (**Tableau 24**). The feeds were manufactured and pelleted at one time using one batch of raw material by Euronutrition SAS (Saint-Symphorien, France). All animals had free access to water and were handled according to the recommendations in animal care in experimentation in agreement with the French national legislation. The animals were weighed individually upon arrival, at 46 days of age in trial 1 and 35 days of age in trials 2 and 3, and before injections, at 52 days of age in trial 1 and 42 days of age in trials 2 and 3 (**Figure 30**). Health status was assessed through a clinical examination of the animals before injections. This consisted in controlling the animals for clinical signs of digestive disorders such as diarrhoea, caecal impaction, suspicion of ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy) or other pathologies (respiratory problems, injuries ...). Animals without clinical signs of illness, but presenting weight losses or very low growth (3 s.d. below the mean) were considered morbid and excluded from further analyses.

2.2. LPS preparation and administration.

For all trials lyophilized LPS (*Escherichia coli* O26:B6; Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) was dissolved in saline (0.9% NaCl) to working dilutions under sterile conditions. All rabbits then received an intra-peritoneal injection of 2.5 ml of solution per kg of live weight.

2.3. Experimental treatments (Figure 1).

Trial 1, development step one. At 52 days of age 18 rabbits were randomly allotted into 3 groups of 5 rabbits receiving different doses of LPS (2, 10 and 50 µg/kg) and a control group of 3 rabbits receiving a saline solution (0.9% NaCl). Special attention was given to obtain an equivalent mean weight of the rabbits between the groups.

Trial 2, development step two. At 42 days of age 36 rabbits were randomly allotted into 6 groups of equivalent mean weight. The two first groups received either a saline injection or an injection of 100 µg/kg of LPS. As the rabbits demonstrated a good recovery, 3 new doses were tested the following day (43 days of age). Thus, the 24 remaining rabbits were allotted into 4 groups of 6 animals receiving a saline injection, 50, 75 or 150 µg/kg of LPS.

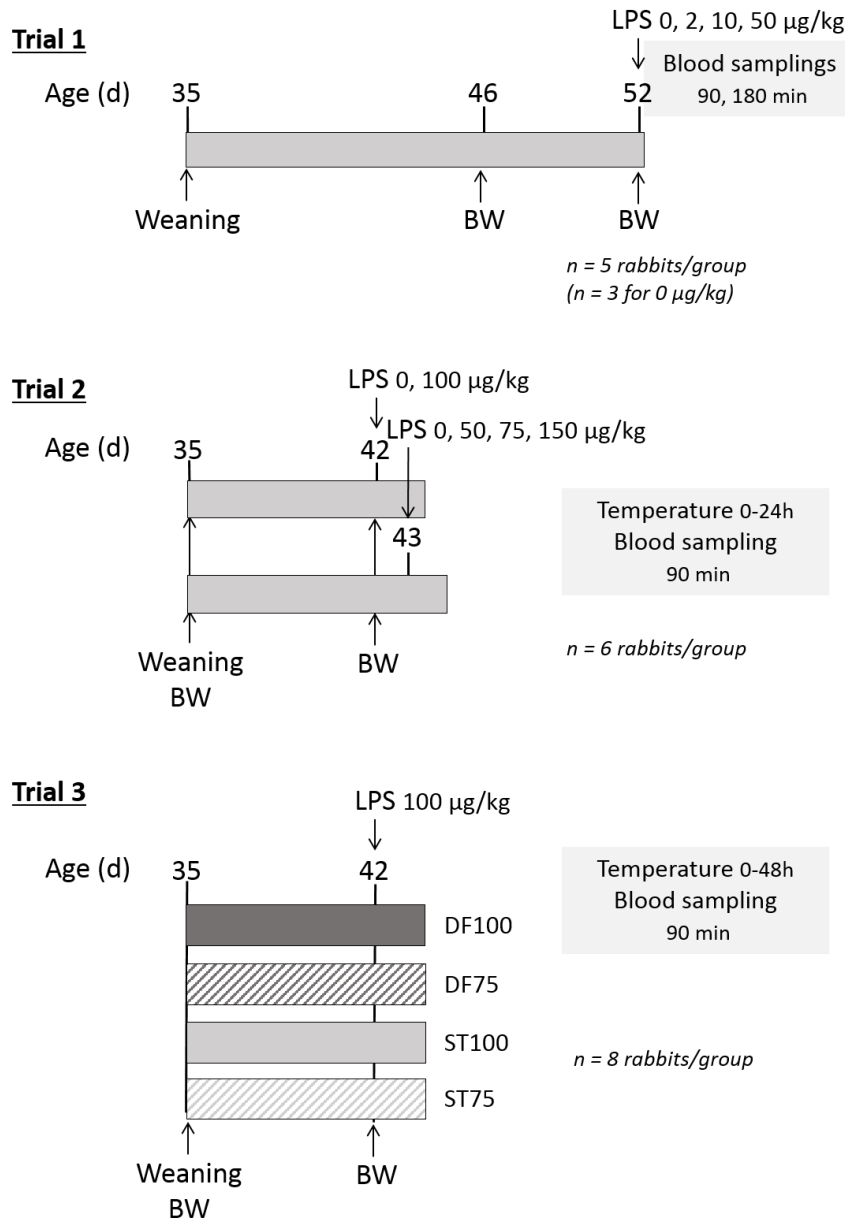


Figure 30 Experimental design of the 3 trials.

ST = Diet rich in starch; DF = Diet rich in digestible fibres; 100 = *Ad libitum* feeding; 75 = restricted feeding at 75% of the *ad libitum* intake.

Trial 3, application. 320 animals were divided at weaning, at 35 days of age, into four groups differing in dietary energy source (ST, rich in starch vs DF, rich in digestible fibres), and feeding level (*ad libitum* (100) or restricted at 75% (75)) according to a 2x2 experimental design. The amounts of feed distributed to the restricted animals were calculated on the basis of a theoretical *ad libitum* ingestion curve, and readjusted for each diet according to the real ingestion of the *ad libitum* fed groups (ST100 and DF100). Feed was given in a single distribution each day between 8:00 and 8:30. At 43 days of age 8 rabbits from each experimental treatment were selected and

injected with 100 µg/kg of LPS. The average weight and standard deviation of the rabbits selected and that of the remaining animals were equivalent in order to have a representative sample of the experimental animals.

2.4. Rectal temperature measurements (trials 2 and 3).

Rectal temperature was recorded with a digital thermometer (MT-403, Hangzhou Sojoy electronics & instruments co., China) every 30 minutes from the time of the injection until 180 min post-injection (3 hours), then the temperature was recorded at 6 h and 24h for all trials and 48h (only for trial 3).

2.5. Blood samplings.

Blood from all the injected rabbits was retrieved from the marginal ear vein 90 min post injection. Blood was also collected from the aorta at euthanasia at 180 min after LPS injections in trial 1. Blood was collected in heparinized tubes (Vacuette, 9ml NH Sodium Heparin; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and immediately transferred on ice until arrival at the laboratory. The tubes were then centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C. The plasmas were retrieved and stored at -20°C until further analysis.

2.6. Determination of plasma concentrations of TNF-α.

Concentrations of plasma TNF-α were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using specific anti-rabbit TNF-α antibodies (Rabbit TNF-α DuoSet, R&D Systems, Abingdon, UK) following the manufacturer's recommendations. Briefly, flat-bottom 96-well microtiter plates were coated with 100 µl/well of polyclonal mouse anti-rabbit TNF-α antibody diluted at 2 µg/ml in coating buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, and 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 – 7.4) and incubated overnight at room temperature. Plates were washed three times with PBS-Tween and blocked with 200µl/well of reagent diluent (1% BSA in PBS) for 1 hour at room temperature. Plates were then washed again three times and standard and samples were added followed by 2 hours of incubation at room temperature. Samples were analyzed in triplicates, appropriately diluted in reagent diluents. Plates were washed three times followed by the addition of 100 µl/well of biotinylated goat anti-rabbit TNF-α antibody diluted at 100 ng/ml in reagent diluent. After 2 hours of incubation at room temperature, the plates were washed again three times and 100 µl of Streptavidin-HRP, diluted at 1:200 in reagent diluent, was added to each well. The plates were

incubated for 20 min at room temperature in the dark. The plates were then washed 4 times and 100 µl of substrate solution (1:1 H₂O₂ – Tetramethylbenzidine) (Thermo Fisher Scientific) was added to each well. The plates were then incubated for 20 min in the dark until the desired coloration was obtained, which was followed by the addition of 50 µl/well of stop solution (2 N H₂SO₄). Optical density (OD) of each well was read at 540 nm and subtracted from the readings at 450 nm (Spectra thermo scan, Tecan) in order to correct for the optical imperfections in the plates. The mean OD of each sample was then calculated, and the mean value of the negative control was subtracted from all sample values. Sample TNF-α concentrations were then obtained thanks to the standard curve elaborated with the OD values of the diluted recombinant rabbit TNF-α standard of known concentration.

2.7. Data Analysis.

Temperature measurements were analysed using the MIXED procedure (SAS) with the dose and time as fixed effects in trial 2, and the feed intake level, the diet, the time and the interaction between intake level and diet as fixed effects in trial 3, whereas the rabbit was set as random effect. Mean comparisons were performed using the Bonferroni test. Weight, growth and TNF-α concentrations in trial 3 were compared using the MIXED procedure with the intake level, the diet and the interaction between the intake level and the diet as fixed effects. Finally, the occurrence of TNF-α responsive animals was analysed using a Chi-squared test. Pearson's correlation was performed to link TNF-α concentrations at 90 min post injections and maximal rectal temperature changes from baseline.

3. RESULTS

3.1. Growth measurements.

Among the different treatments the animals had similar growth and live weight prior to the injections in trials 1 and 2 (respectively 39.1 ± 19.4 g/day and 1613 ± 147 g at 52 days of age and 63.6 ± 7.4 g/day and 1523 ± 77 g at 42 days of age). In trial 3 the LPS injected animals submitted to feed restriction had a growth reduced by 44% and a weight at 42 days of age reduced by 12% compared to the animals fed *ad libitum* (**Tableau 25**). The diet (ST vs DF) did not affect the growth and the weight of the animals. Two animals in trial 1 (in the groups injected with 2 and 10 µg/kg) were excluded from the analysis as they manifested weight losses prior to the injections. None of the other animals used for the 3 trials presented clinical signs of illness. No mortality was observed 48h post LPS injections (trials 2 and 3).

Tableau 25 Effect of the diet and the feeding level on the growth and the plasmatic concentrations of TNF- α 90 min after an LPS injection of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in trial 3 (n=8 rabbits per group).

	Group ¹				P values		
	ST75	ST75	DF100	DF75	Diet	Intake level	Diet x level
Weight at 35 days of age (g)	1055 \pm 112	1041 \pm 122	1044 \pm 144	1036 \pm 131	ns	ns	ns
Weight at 42 days of age (g)	1419 \pm 136	1262 \pm 122	1414 \pm 168	1223 \pm 115	ns	0.001	ns
Daily Weight Gain (g)	51.9 \pm 7.7	31.5 \pm 4.3	52.9 \pm 6.3	26.8 \pm 7.3	ns	<0.001	ns
TNF- α n/ni ¹	4/8	3/8	3/8	5/8	ns	ns	ns
TNF- α (ng/ml)	1.64 \pm 1.69	3.47 \pm 4.16	0.42 \pm 0.01	4.32 \pm 5.35	ns	ns	ns

ST = Diet rich in starch; DF = Diet rich in digestible fibres; 100 = *Ad libitum* feeding; 75 = restricted feeding at 75% of the *ad libitum* intake.

¹: values are presented as means \pm sd.

3.2. Effect of the LPS injection on rectal temperature.

The rabbits had an average basal temperature of 38.9 \pm 0.4 $^{\circ}\text{C}$ (trials 2 and 3). In trial 2 fever was observed for all the doses injected 90 min after the injections. The fever was observed at earlier stages with the highest doses (at 30 min for 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 60 min for 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (**Figure 31 A,B**). From 90 min to 360 min post injections there were no significant differences in levels of fever between the different doses. The temperature rose for all groups until 180 min ($\Delta=1.9\pm 0.7$ $^{\circ}\text{C}$ on average for all groups corrected for their corresponding controls) and gradually decreased afterwards (**Figure 31 C**). After 24h there was no difference between the control groups and the groups injected with 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (**Figure 31 A,B**).

In trial 3 there was no effect of the diet or the feeding level on the rectal temperature in the animals injected with 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of LPS. However, for all the groups, as in trial 2, a fever was observed from 60 min post injection with a peak at 180 min ($\Delta=1.1\pm 0.7$ $^{\circ}\text{C}$). The temperature was back to basal levels after 48h for all groups (**Figure 32**).

3.3. Effect of the LPS injection on plasmatic TNF- α concentrations.

In trials 1 and 2, during the whole experimental period, none of the control animals presented detectable concentrations of TNF- α . Concerning the animals injected with LPS, according to the dose, a variable proportion of the animals injected with LPS presented a detectable concentration of TNF- α 90 min after the injections (**Tableau 26**). 180 min after injections only one animal in the group injected with 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ still presented a measurable concentration of plasmatic TNF- α (900

pg/ml, data not shown). Even though the number of animals responsive to the injection was numerically higher in the groups injected with 100 µg/kg and 150 µg/kg, there was no significant effect of the dose upon the number of responsive animals. Moreover, we observed a great variability of the TNF-α concentrations in the responsive animals (CV from 44 to 94%). Thus, no significant effect of the dose was observed on the TNF-α concentrations.

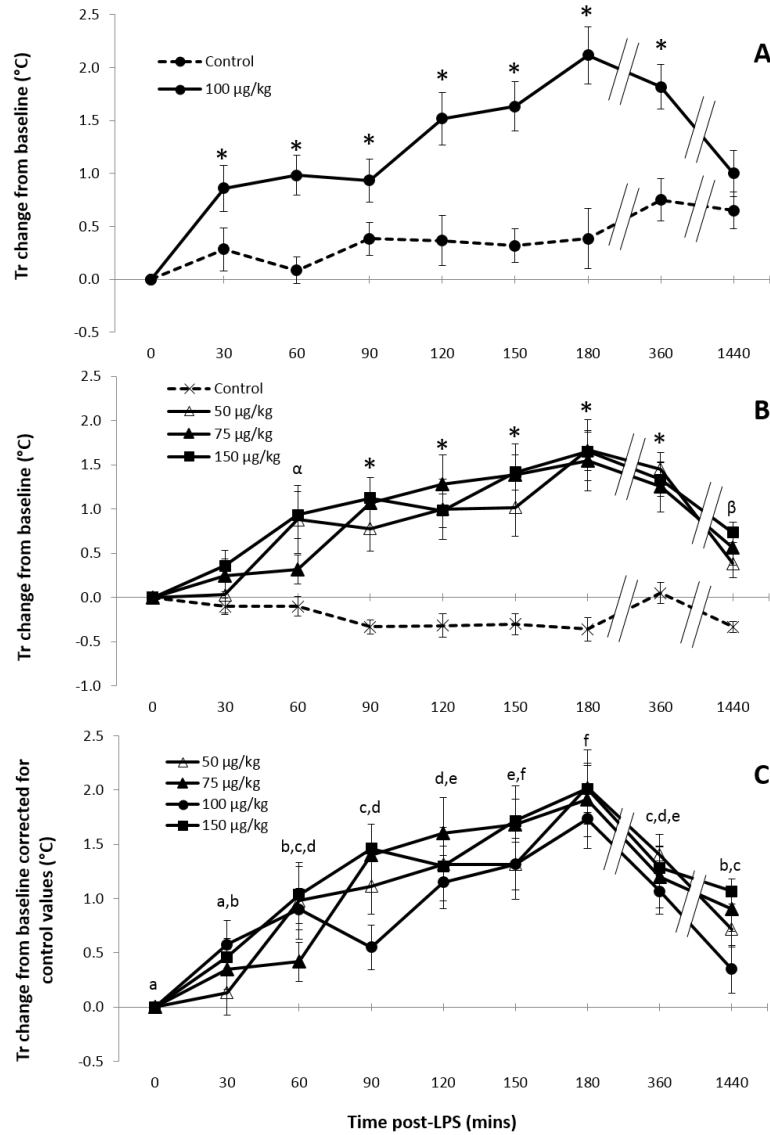


Figure 31 Effect of the dose of LPS injected on the mean rectal temperature change from baseline in trial 2 (n=6 rabbits per group).

Tr = rectal temperature. Values are presented as means ± SEM.

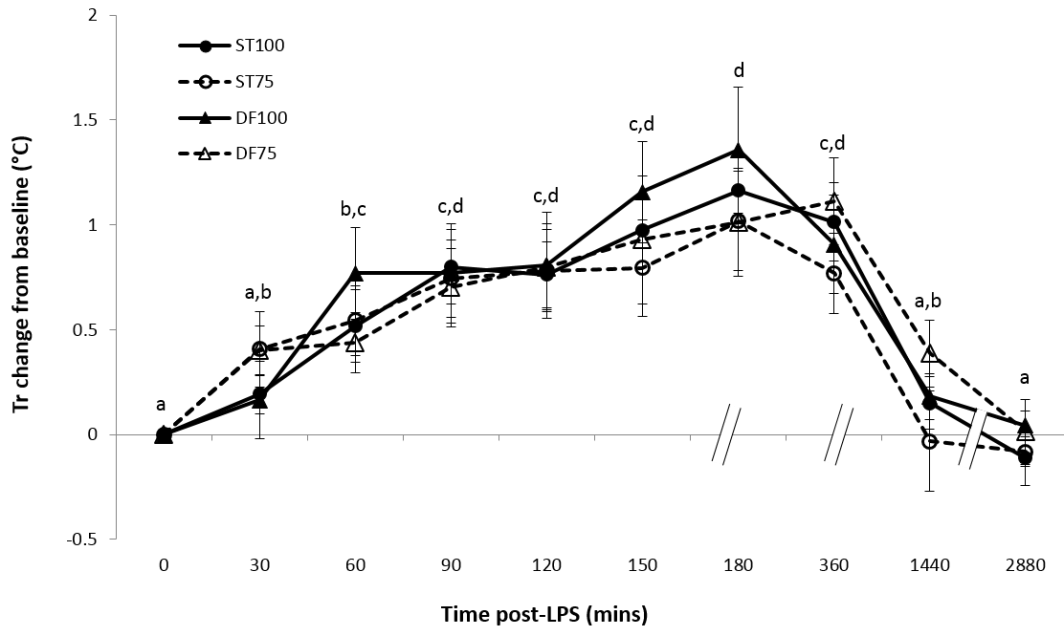


Figure 32 Effect of the diet and the feeding level on the mean rectal temperature change from baseline in animals injected with 100 µg/kg of LPS in trial 3 (n=8 rabbits per group).

Tr = rectal temperature. Values are presented as means ± SEM; ST = Diet rich in starch; DF = Diet rich in digestible fibres; 100 = *Ad libitum* feeding; 75 = restricted feeding at 75% of the *ad libitum* intake.

The means values for all groups presenting different letters differ at the level of 0.05 according to time.

In trial 3 there was no significant effect of the diet or the feeding level upon the TNF-α response to an injection of 100 µg/kg of LPS (**Tableau 25**). As in the development trials (trials 1 and 2), we observed a great variability of the TNF-α concentrations in the responsive animals (CV from 2% to 124%). Moreover, in both trials 2 and 3, no correlation was observed between the maximum elevation of temperature and the concentration of TNF-α measured in the responsive animals 90 min post injections ($r^2 = 0.074$) (**Figure 33**).

Tableau 26 Effect of the dose of LPS injected on the plasmatic concentrations of TNF-α 90 min after injection in trials 1 and 2.

	Group						
	Controls ¹	2 µg/kg	10µg/kg	50 µg/kg ¹	75 µg/kg	100 µg/kg	150 µg/kg
n/ni ²	0/15	0/5	1/4	4/11	1/6	5/6	6/6
TNF-α (ng/ml) ³	ND	ND	8233	4.38 ± 4.10	2.34	4.21 ± 1.86	5.04 ± 2.90

¹: animals from trials 1 and 2 combined; ²: number of animals presenting detectable concentrations of TNF-α on the total number of animals; ³: values are presented as means ± sd. ND = not detectable

4. DISCUSSION

LPS is a well-known and recognized inducer of the inflammatory response in laboratory animals (Redl et al., 1993). However, all studies to date in rabbits use small groups of adult individuals. Our study is therefore the first to adapt an LPS injection protocol to the growing rabbit.

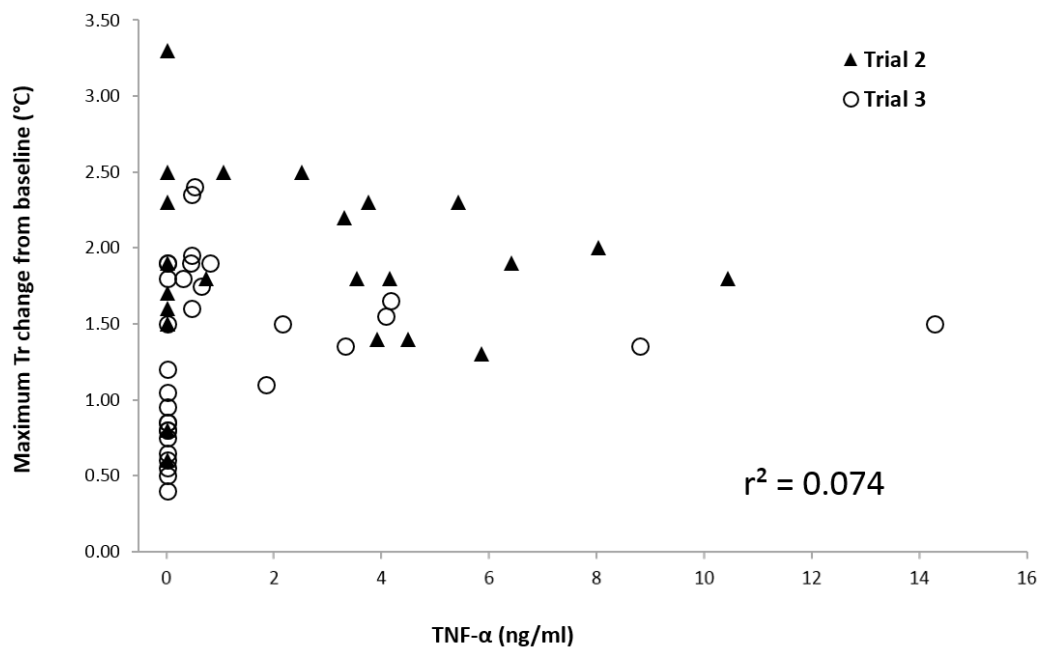


Figure 33 Correlation between the maximal rectal temperature changes from baseline and the TNF- α concentrations at 90 min post injections.

Tr = rectal temperature.

r^2 was calculated on the animals responsive in terms of TNF- α concentrations only.

4.1. A consistent fever in response to the LPS injections.

None of the animals used for all three trials presented clinical signs of illness. Thus, we could assume that the inflammatory reactions measured would be caused by the LPS injections. In the second development trial and the application trial, all animals injected with LPS presented an elevation of temperature compared to baseline and control groups, thus demonstrating a fever in response to the LPS injections. The fever was at its highest at 3h post injections confirming results obtained on male adult rabbits (Huang et al., 2008; Mabika and Laburn, 1999; Shibata et al., 2005) where the fever was at its highest between 180 and 200 min post injections. In the application trial the temperature for all groups was back to baseline 48h post-injection as observed in adult rabbits with a dose of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Ferrian et al., 2013). Few differences in fever were noticed for doses in the range 50-150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and no mortalities were observed in the 48h following the

injections. This was quite surprising as mortality has been reported in adult animals for doses higher than 100 µg/kg with a rapid increase of the occurrences with the dose (Brito et al., 1995). A 42% mortality rate was even observed at 48h post-injections for a dose of 50 µg/kg in lactating does (Ferriani et al., 2013). However, equivalent rises in temperatures were found in our experiments and in above mentioned studies. Thus, the reduced mortality in our study is not related to a reduced fever in growing rabbits. Fever is not the only element that triggers mortality, we could therefore hypothesise that the growing rabbit is more resistant to an LPS induced inflammation even though the fever is not reduced.

4.2. A highly variable TNF-α response to the LPS injections.

In the development studies, animals only had measurable TNF-α responses for LPS doses higher than 10 µg/kg. This was surprising as measurable concentrations of TNF-α were reported for adult individuals for LPS doses lower than 2 µg/kg (Huang et al., 2008; Shibata et al., 2005). This might be due to the chosen injection route or a response of the animals prior to the time of measurement. However, the highest concentrations of TNF-α in adult rabbits have been observed between 60 to 120 min post-LPS injections (Brito et al., 1995; Huang et al., 2008; Shibata et al., 2005), thus confirming the accuracy of our measurement time. Unlike previous studies in adult rabbits, using i.v. injections, an i.p. route was used in our study for the LPS administration as it has been demonstrated in mice and rats that the i.p. route is more adequate to mimic sepsis, inducing stable plasmatic levels of LPS for 2 to 5h with an increased mortality and cytokine production (Redl et al., 1993; Remick, 2004). Thus, our measured concentrations of TNF-α should have been higher than those previously observed by authors using i.v. injections. We could therefore hypothesize that the growing rabbit would be more resistant to an LPS based inflammation than the adult. Another hypothesis could be that the rabbit doesn't react like the mouse or the rat to the injection route and that the i.v. route would be favourable to trigger an inflammatory reaction in rabbits.

In both development trials the responsive animals had very variable responses to the LPS injections in terms of TNF-α concentrations. Other authors have observed a similar high variability in the concentrations of TNF-α (CV of 15 to 100%) in adult rabbits (Brito et al., 1995; Huang et al., 2008) thus indicating a high individual TNF-α specificity. Despite the important variability in responses, the number of reactive animals grew with the elevation of the injected dose as observed by Brito *et al.* (1995) in adult animals.

Interestingly, in the second development trial and the application trial the highest TNF-α concentrations were not correlated with the highest increases in body temperature. Likewise,

animals without detectable concentrations of TNF- α had fever. Accordingly, the correlation between TNF- α and fever seems more complex than previously expected as reported by Mabika and Laburn (1999).

4.3. A valid method on a large scale experiment.

Our observations led us to choose a high dose of LPS for further studies in order to obtain satisfactory responses in terms of rectal temperature increase or TNF- α concentrations. As similar results were obtained for the doses 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, we chose to use the lowest dose (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for our following studies. First, from an ethical point of view, the lowest efficient dose appeared to be the most reasonable. Secondly, Feuerstein et al. (1990) showed that the TNF- α response to LPS reached a plateau in rats for a dose superior to 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Even though adult rats are known to be less sensitive to LPS than adult rabbits (Redl et al., 1993), our observations in growing rabbits were coherent with Feuerstein's observations, thus leading us to choose the dose of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Finally, our observations in the first development study led us to measure TNF- α concentrations at 90 min post injections.

The application of our LPS injection protocol to our nutritional study enabled us to obtain results that were consistent with those obtained in our development trials, thus allowing us to validate our protocol. However we were surprised not to find any effect of feed restriction upon the inflammatory response to LPS. Indeed, post-weaning feed restriction strategies have proved to reduce mortality and morbidity, thus improving the health status of the growing rabbit (for review, Gidenne et al., 2012b). Moreover, it has been demonstrated in mice and rats that a four week feed restriction period reduced the inflammatory response to LPS through a reduced fever period and intensity (MacDonald et al., 2012; MacDonald et al., 2011) and a reduced concentration of TNF- α (Matsuzaki et al., 2001). However, in our study, animals were only feed restricted for one week, which might not be a sufficiently long period to induce a significant effect on the inflammatory response. The diet did not affect the inflammatory response to the LPS injection. Accordingly, the reduced incidence of digestive disorders observed with a higher ratio of digestible fibres on starch (Perez et al., 2000b) would not be related to a modulation of the inflammatory status. however, Pie *et al.* (2007) demonstrated an increased inflammatory response in weaning piglets fed a diet supplemented in fermentable carbohydrates. Despite the limited available information on the possible effects of the nutrient intake on the inflammatory response, the short period of time for which the animals were exposed to their new diet could also explain the lack of effect of the diets on the inflammatory response.

5. CONCLUSION

This study enabled us to elaborate an LPS injection protocol for the growing rabbit, validated on a large number of animals, using a dose of 100 µg/kg of LPS and measurements of rectal temperatures and TNF-α concentrations. The rectal temperature appears to be a simple and reliable criterion to evaluate the inflammatory status on a large number of rabbits, whereas the measurements of TNF-α concentrations remain highly variable and their interpretation can be difficult. Moreover, our study suggested that the inflammatory response in the growing rabbit follows the same pattern as in the adult even though the growing rabbit appears to have a higher resistance to an LPS induced inflammation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the GEC group (Groupe d'Experimentation Cunicole) and the CLIPP (Comité Lapin Interprofessionnel pour la Promotion des Produits) for their financial support. The authors would also like to thank the technicians implicated in the experiment at the INRA UE PECTOUL and J. Laffitte and A.M. Cossalter from the TOXALIM unit for their technical expertise in ELISA protocols.

REFERENCES

- Brito B.E., Romano E.L. and Grunfeld C. 1995. Increased lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor levels and death in hypercholesterolaemic rabbits. *Clinical and Experimental Immunology*, 101: 357-361.
- De Blas C. and Mateos G.G. 2010. Feed formulation. In: De Blas C. and Wiseman J. (ed). *Nutrition of the rabbit*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 222-232.
- Ferrian S., Blas E., Larsen T., Sanchez J.P., Friggens N.C., Corpa J.M., Baselga M. and Pascual J.J. 2013. Comparison of immune response to lipopolysaccharide of rabbit does selected for litter size at weaning or founded for reproductive longevity. *Research in Veterinary Science*, 94: 518-525.
- Feuerstein G., Hallenbeck J.M., Vanatta B., Rabinovici R., Perera P.Y. and Vogel S.N. 1990. Effect of gram-negative endotoxin on levels of serum corticosterone, TNF-alpha, circulating blood cells, and the survival of rats. *Circulatory Shock*, 30: 265-278.
- Gallois M., Rothkotter H.J., Bailey M., Stokes C.R. and Oswald I.P. 2009. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal*, 3: 1644-1661.

- Gidenne T., Combes S. and Fortun-Lamothe L. 2012. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal*, 6: 1407-1419.
- Granger J., Osuchowski M. and Remick D. 2006. Differential inflammatory response to LPS and sepsis. *Shock*, 25: 97-98.
- Huang W.T., Niu K.C., Chang C.K., Lin M.T. and Chang C.P. 2008. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *European Journal of Pharmacology*, 593: 105-111.
- Mabika M. and Laburn H. 1999. The role of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in fever and the acute phase reaction in rabbits. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 438: 218-223.
- MacDonald L., Radler M., Paolini A.G. and Kent S. 2011. Calorie restriction attenuates LPS-induced sickness behavior and shifts hypothalamic signaling pathways to an anti-inflammatory bias. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 301: 172-184.
- MacDonald L., Begg D., Weisinger R.S. and Kent S. 2012. Calorie restricted rats do not increase metabolic rate post-LPS, but do seek out warmer ambient temperatures to behaviourally induce a fever. *Physiology & Behavior*, 107: 762-772.
- Maertens L., Perez J.M., Villamide M., Cervera C., Gidenne T. and Xiccato G. 2002. Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. *World Rabbit Science*, 10: 157-166.
- Matsuzaki J., Kuwamura M., Yamaji R., Inui H. and Nakano Y. 2001. Inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed in 40% energy-restricted mice. *Journal of Nutrition*, 131: 2139-2144.
- Meissonnier G.M., Laffitte J., Raymond I., Benoit E., Cossalter A.M., Pinton P., Bertin G., Oswald I.P. and Galtier P. 2008. Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs. *Toxicology*, 247: 46-54.
- Perez J.M., Gidenne T., Bouvarel I., Arveux P., Bourdillon A., Briens C., Le Naour J., Messenger B. and Mirabito L. 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. *Annales de Zootechnie*, 49: 369-377.
- Pie S., Awati A., Vida S., Falluel I., Williams B.A. and Oswald I.P. 2007. Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *Journal of Animal Science*, 85: 673-683.

Qiu Y.S., Zhang J.W., Liu Y., Ma H.W., Cao F.Y., Xu J., Hou Y.Q. and Xu L.Y. 2013. The combination effects of acetaminophen and N-acetylcysteine on cytokines production and NF-kappa B activation of lipopolysaccharide-challenged piglet mononuclear phagocytes in vitro and in vivo. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152: 381-388.

Redl H., Bahrami S., Schlag G. and Traber D.L. 1993. Clinical detection of LPS and LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology*, 187: 330-345.

Remick D. 2004. The inflammatory response to intraperitoneal (IP) versus intravenous (IV) lipopolysaccharide (LPS). *Shock*, 21: 36-37.

Shibata M., Uno T., Riedel W., Nishimaki M. and Watanabe K. 2005. Transiently enhanced LPS-induced fever following hyperthermic stress in rabbits. *International Journal of Biometeorology*, 50: 67-74.

III. LE NIVEAU D'INGESTION ET LA CONCENTRATION ENERGETIQUE DE L'ALIMENT MODULENT DE MANIERE INDEPENDANTE LA COMPOSITION DE L'ECOSYSTEME CAECAL ET SON ACTIVITE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE

Article en préparation pour PlosOne

Résumé:

Les stratégies de restriction alimentaire de courte durée sont utilisées en élevage cynicole afin de réduire les troubles digestifs post-sevrage, mais peu de données sont disponibles sur l'implication de l'écosystème caecal dans ces effets bénéfiques. Cette étude visait à étudier les conséquences de la restriction quantitative et énergétique sur l'écosystème caecal et à corrélérer ces résultats aux paramètres immunitaires. Au sevrage 320 lapins ont été allotés en quatre traitements: HE100, HE75, LE100 and LE75, avec deux niveaux d'énergie digestible alimentaire (formulés à HE = 10.13 et LE = 9.08 MJ d'ED/kg) et deux niveaux d'ingestion (100 = à volonté et 75 = restreint à 75% de l'à volonté). Dix animaux par lot et âge étaient abattus à 42 et 50 jours d'âge. Le contenu caecal était prélevé et les concentrations en ammoniacque et en acides gras volatiles étaient mesurées. L'ADN bactérien était extrait et un séquençage 454 a été effectué afin d'évaluer la composition de la communauté bactérienne caecale. La restriction alimentaire modulait le profil fermentaire avec une augmentation de la proportion d'acétate (+2,8%, $P < 0,001$) et une diminution de celle en butyrate (2,4%, $P < 0,001$) alors que l'aliment HE réduisait le pH caecal (-0,14, $P < 0,001$). Le profil OTU des bactéries caecales, sa diversité et sa richesse n'étaient pas affectés par les traitements expérimentaux. L'abondance de 6 familles et 3 genres était cependant modulée de manière indépendante par le niveau d'ingestion et la concentration de l'aliment en énergie. De plus, l'utilisation d'une analyse sPLS a permis de mettre en évidence une corrélation potentielle entre les paramètres du GALT, la proportion d'acétate et la concentration en ammoniacque et trois OTU spécifiques affiliés à des bactéries non cultivables et appartenant aux familles Rikinellaceae, Rhodospirillaceae et Eubacteriaceae. Les concentrations en propionate étaient associées au poids relatif du caecum et à six OTU différents. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'identifier les OTU pouvant être des indicateurs fiables du développement du GALT ou de l'activité fermentaire de la communauté bactérienne caecale du lapin.

Mots clés: lapin, restriction alimentaire, ingéré énergétique, santé, écosystème caecal, microbiote.

Quantitative and caloric feed restriction independently modulate cecal ecosystem composition
and activity in the growing rabbit

Christelle Knudsen^{3,4,5}, Thierry Gidenne^{3,4,5*}, Laurent Cauquil^{3,4,5}, Géraldine Pascal^{3,4,5}, Christophe Briens⁶, Joël Duperray⁷, Gwenaël Rebours⁸, Jean-Marc Salaun⁹, Angélique Travel¹⁰, Delphine Weissman¹¹, Sylvie Combes^{3,4,5}

³ INRA, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan,
France

⁴ Université de Toulouse, INP, ENSAT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage),
F-31326 Castanet-Tolosan, France

⁵ Université de Toulouse, INP, ENVT, GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-
31076 Toulouse, France

⁶ CCPA, ZA du Bois de Teillay, F-35150 Janzé, France

⁷ Eivalis, Talhouet BP234, F-56006 Vannes, France

⁸ TECHNA, BP10, rte de St Etienne de Montluc, F-44220 Coueron, France

⁹ Sanders, Centre d'affaires l'Odyssée, ZAC Cicé Blossac, F-35170 Bruz, France

¹⁰ ITAVI, UMT BIRD, Centre INRA de Tours, BP1, F-37380 Nouzilly, France

¹¹ INZO, Rue de l'église, BP50019, F-02407 Chierry, France

RUNNING TITLE: Feed restriction modulates bacterial activity

* Corresponding author: Thierry Gidenne. Tel: (+33)5 61 28 51 03.

EM: thierry.gidenne@toulouse.inra.fr.

ABSTRACT

Short-term feed restriction strategies are used in rabbits to reduce post-weaning digestive disorders, but little is known about the implications of the cecal ecosystem in these beneficial effects. In the present study the consequences of feed and energy restriction on the cecal ecosystem were investigated and correlations with the immune system were assessed. At weaning 320 rabbits were allotted into four groups: HE100, HE75, LE100 and LE75, differing in dietary digestible energy concentrations (HE = 10.13 or LE = 9.08 MJ DE/kg, formulated values) and intake levels (100 = *ad libitum* or 75 = restricted at 75% of *ad libitum*). Ten animals per group and per age were killed at 42 and 50 days of age. Cecal content was collected for ammonia and volatile fatty acid concentration measurements. Bacterial DNA extractions and 454 sequencing were also performed in order to evaluate the cecal bacterial composition. Feed restriction modified the fermentative profile increasing the acetate proportion (+2.8%, $P < 0.001$) and decreasing that of butyrate (-2.4%, $P < 0.001$) while the HE diet mainly decreased the cecal pH (-0.14, $P < 0.001$). The cecal bacterial OTU profile, diversity and richness were not affected by experimental treatments. The abundance of 6 families and 3 genera were however modulated independently by the feed intake level and the dietary energy concentration. Moreover, using SPLS we evidenced a potential correlation between GALT parameters, acetate and ammonia levels and three particular OTU assigned to uncultured bacteria belonging to family levels Rikinellaceae, Rhodospirillaceae and Eubacteriaceae, while propionate concentrations were associated with the relative cecum weight and six OTU. Further studies are needed to determine if the identified OTU could be reliable indicators of GALT development or fermentative activity of the bacterial community in the rabbit cecum

Keywords: rabbit, feed restriction, energy intake, health, cecal ecosystem, microbiota.

Abbreviations used: ADFom (Acid Detergent Fiber correct for ash), AL (*Ad Libitum*), B2M (Beta-2 Microglobulin), DE (Digestible Energy), ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy), GEC (Groupe d'Experimentation Cunicole), HE (High Energy diet), LE (Low Energy diet), aNDFom (Neutral Detergent Fiber with amylolytic pretreatment and corrected for ash).

1. INTRODUCTION

In mammals, weaning generates important changes as the young animal shifts from milk to solid feed, and is often associated with various digestive disorders (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Lalles et al., 2004). In rabbits, these digestive disorders are characterized by an imbalance in the cecal microbiota, with an increase in cecal pH and a switch in fermentative patterns (Gidenne et al., 2010b). Short term feed restriction has been used in French rabbit breeding systems for over 10 years as an efficient method to reduce digestive disorders in the growing rabbit (for review, Gidenne et al., 2012b). Indeed, a reduction of the feed intake (below 20% of free intake) allows reducing the post-weaning mortality and morbidity (Gidenne et al., 2009b). Thus, these beneficial effects of feed restriction on health might be associated with a change in gut microbial composition and activity. However, the correlations between feed intake level and gut microbiota have been scarcely documented in the rabbit specie. Massip et al. did not find a significant impact of feed restriction on the major cecal bacterial communities in 9 weeks old rabbits (Massip et al., 2012). However, previous studies on rabbits have shown that the microbial community stabilizes between 49 and 63 days of age (Combes et al., 2011), thus indicating that an effect of feed restriction might occur before 49 days of age. Likewise, the short term effect of the dietary energy concentration on the cecal microbiota has, to our knowledge, not yet been studied in agricultural species. Thus, the present study was conducted to evaluate the impact of both short term quantitative feed restriction and dietary digestible energy concentration on cecal microbial composition and activity in the growing rabbit. Moreover, we investigated the relationships between cecal bacterial microbial composition, fermentative parameters and immunological parameters (previously published).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Experimental design, animals, housing and feeds.

The experiment was conducted at the INRA, UE PECTOUL (Castanet-Tolosan, France) breeding unit using healthy hybrid rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). A bifactorial design was used with two levels of feed intake, *ad libitum* feeding vs restricted feeding at 75% of *ad libitum* (respectively named 100 and 75), and two diets differing in digestible energy (DE) concentration, a “low” energy diet (LE) formulated with 9.08 MJ DE/kg, and a “high” energy diet (HE) formulated with 10.13 MJ DE/kg according to the EGRAN tables of Maertens *et al.* (2002). The diets were formulated to meet with the nutritional requirements of the growing rabbit, fed *ad libitum* or restricted, (De Blas and Mateos, 2010) without drug supplementation (antibiotics or coccidiostatics).

Tableau 27 Ingredients and chemical composition of the experimental diets.

Ingredients (g/kg)	LE		HE	
	Low energy	High energy	Low energy	High energy
Wheat	50	150	Dry matter	873 874
Barley	34	20	Crude ash	75 59
Wheat bran Milurex®	130	20	Crude protein (N X 6.25)	147 160
Pea	20	24	Starch	102 118
Rapeseed meal	32	110	Total sugars	65 58
Sunflower meal	157	223	Crude fat	28 37
Alfalfa	225	30	Crude fiber	176 171
Wheat straw	70	59	Neutral detergent fiber (aNDFom)	360 346
Sugarbeet pulp	108	208	Acid detergent fiber (ADFom)	227 218
Grape pulp	63	40	Digestible fiber ²	184 207
Apple pomace	20	50	Gross energy (MJ/Kg)	16.15 16.57
Cane molasses	60	30	Digestible energy (MJ/Kg) ²	9.08 10.13
Rapeseed oil	5	17		
Dicalcium phosphate	5	0		
Calcium carbonate	1	2		
Methionine 15%	3	1		
L-Lysine 25%	6	5		
Threonine 10%	1	2		
Vitamin premix ¹	10	10		

¹: Content (per kilogram of premix): vitamin A: 1 000 000 IU; vitamin D3: 100 000 IU; vitamin E: 5 000 UI; vitamin K3: 200 mg; vitamin B1: 200 mg; vitamin C: 25 000 mg ; Choline chloride: 20 000 mg; Cu (copper sulfate): 1 000 mg; Fe (iron carbonate): 10 000; Zn (zinc oxide): 5 000 mg; Mn (manganous oxide): 500 mg; I (potassium iodide): 20 mg; Co (cobalt carbonate): 10.4 mg and Se (sodium selenite): 20 mg.

²: calculated according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002).

ADFom = Acid Detergent Fiber corrected for ash, HE = High Energy diet; LE = Low Energy diet, aNDFom = Neutral Detergent Fiber with amylase pretreatment and corrected for ash.

A special attention was given to obtain a theoretical deviation of 1 MJ/kg of digestible energy between the diets, with the constraint of obtaining similar ratios of digestible fibers, starch and fat on digestible energy and starch on digestible fibers between the two diets. Moreover, both diets were formulated with equivalent concentrations of ADF (Acid detergent fiber) and NDF (Neutral detergent fiber) (**Tableau 27**). The feeds were manufactured and pelleted (3 mm in diameter, 1 cm in length) using one batch of raw materials by Euronutrition SAS (Saint-Symphorien, France). Four treatments were consequently formed: LE100, LE75, HE100 and HE75. 80 animals per treatment were housed in collective cages of 5 animals (density of 15 rabbits/m²) in a closed unit where the environment (temperature, lighting and ventilation) was monitored and controlled. Animals of both sexes were allotted at weaning (35 days of age) according to their weaning weight and litter of origin. Thus, litters were spread over the four treatments, and weight was standardized between treatments. The animals were then fed freely or restricted according to their experimental treatment. The amounts of feed distributed to the restricted groups were calculated on the basis of a theoretical *ad libitum* ingestion curve, and readjusted for each diet according to the real ingestion of the *ad libitum* fed groups (LE100 and HE100) for periods of 3 to 4 days. Feed was given daily in a single distribution between 8:00 and 8:30 and water was provided *ad libitum*. Animals were handled according to the recommendations in animal care in experimentation in agreement with the French national legislation (Journal Officiel de la République Française 0278, 2009).

Animals were weighed individually at weaning (35 days of age) and after one and two weeks of feed restriction (42 and 50 days of age). Health status of the animals was assessed through a control of clinical signs of digestive disorders such as diarrhoea, cecal impaction, suspicion of ERE (Epizootic Rabbit Enteropathy) or other pathologies (respiratory problems, injuries ...).

2.2. Killings and samplings.

10 healthy animals per treatment were killed at 42 and 50 days of age. The average weight and standard deviation of the rabbits selected for samplings and that of the remaining animals were equivalent in order to have a representative sample of the experimental animals. Immediately after electrical stunning, the rabbits were killed by exsanguination. Blood was collected from the aorta at euthanasia in heparinized tubes (Vacuette, 9ml NH Sodium Heparin; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and immediately stored on ice. After centrifugation, the plasmas were stored at -20°C until further analysis. The full cecum and the lymphoid organs (spleen and vermiform appendix) were quickly removed and weighed individually. 200 mg of cecal content

were sampled under sterile conditions for each individual, transferred on ice, and stored at -80°C until further analysis of the cecal microbiota. The pH was measured in the cecum using a glass pH “Unitrode” electrode (Pt1000/B/2/3MKCl; Metrohm™). Dry matter of the cecal content was determined by heating a 10 g sample at 103 °C for 24 h. Two samples of 1 g of fresh cecal content were diluted in storage solutions: one in HgCl₂ (2 mL, 2%w/v) and one in H₂SO₄ (3 mL, 2%w/v), for further analysis of VFA and NH₃, respectively. The cecum was then emptied, dried and weighed. Feces were collected in the rectum of the euthanized animals and transferred in dry tubes on ice until arrival at the laboratory where the samples were stored at -20°C until further analysis. A 5 cm long section of the ileum was collected 10 cm from the ileo-cecal junction, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. The first Peyer’s patch encountered from the ileo-cecal junction was isolated, the ileum was cut up and a picture of the patch was taken alongside a ruler. Images were analyzed using the software ImageJ (Schneider et al., 2012) in order to evaluate the surface of the patches.

2.3. DNA extractions and analysis of the bacterial community.

The microbial DNA was extracted from 200 mg of frozen cecal content according to the method of Combes et al. (Combes et al., 2011). Briefly, total DNA was extracted combining a mechanical lysis with a FastPrep instrument (MP Biomedicals, Illkirch, France) and a chemical lysis with the QIAamp DNA stool minikit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. The quality and quantity of DNA extracts were checked using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The DNA samples were then sent to a molecular research laboratory (Lubbock, TX, USA) for FLX 454 pyrosequencing using the 339F (CTCCTACGGGAGGCAGCAG) and 815R (TTGTGCGGGCCCCGTC AATT) primers targeting the V3 to V4 hypervariable regions of 16S rRNA genes (460 bp on *E. coli*) (Dowd et al., 2008).

2.4. Ammonia (NH₃) and Volatile Fatty Acid (VFA) concentration measurements.

VFA were measured by automated gas chromatography (Chrompack CP 9000 gas chromatograph, Chrompack B.V., Middleburg, the Netherlands) according to Playne (Playne, 1985) and ammonia concentrations were determined by a colorimetric method by a Continuous Flow Analyzer (SAN11, Skalar, Norcross, Georgia, USA) as previously described by Verdouw (Verdouw et al., 1977).

2.5. Immunological parameter measurements.

Methods for determination of fecal and plasmatic IgA levels, plasmatic IgG levels and ileal cytokine expressions used for sPLS calculations (see statistical analysis section), have been described in detail in a companion paper (Knudsen *et al.* 2014). Briefly, for fecal IgA extractions, a small amount of fecal matter (200-600 mg) was diluted at 50 mg/ml in cold PBS. The samples were dispersed for 10 seconds on ice (T25 Ultra-Turax, IKA Laborotechnik, Staufen, Germany) and centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C. The supernatants were then collected and stored at -20°C until analysis. Concentrations of plasma immunoglobulin G (IgG) were measured by ELISA as already described (Accensi *et al.*, 2006). Goat anti-rabbit IgG (Fc fragment specific), were used as capture antibodies (Bethyl Laboratories, Interchim, Montluçon, France) and horseradish peroxidase (HRP) labeled goat anti-rabbit IgG were used as detection antibodies in conjunction with a TMB substrate (1:1 H₂O₂ – Tetramethylbenzidine) (Thermo Fisher Scientific). Concentrations of plasmatic and fecal immunoglobulin A (IgA) were quantified using specific anti-rabbit IgA antibodies (Bethyl Laboratories). Ileum tissue RNA was processed as previously described (Grenier *et al.*, 2011). The sequences of primers used in PCR are detailed in **Annexe 5** and were purchased from Sigma. Real-time quantitative PCR were performed in 384 well plates using SYBR green as reporter. qRT-PCR data were expressed as $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ and normalized using Beta-2 microglobulin (*B2M*) as housekeeping gene. Gene expression was expressed relative to the LE100 group.

2.6. Sequence analysis.

A total of 646716 16SrDNA sequences were sorted based on their respective barcodes representing the 80 collected cecal samples. Sequences were filtered removing sequences that did not match the proximal PCR primer sequences (with 2 mismatches allowed), with a short sequencing length (less than 400 nucleotides), with at least one ambiguous base or with a long homopolymer (greater than 8). Chimeric DNA sequences were detected using UCHIME and removed (Edgar *et al.*, 2011). After trimming barcodes and adaptor sequences the average read length was 507 ± 25 nucleotides. A total of 561707 reads were retained corresponding to 7021 ± 5307 reads per sample. Reads were clustered into Operational Taxonomic Unit (OTU) using SWARM (Mahé *et al.*, 2014). OTU taxonomic assignment was performed using the SILVA SSU Ref NR 115 database (Pruesse *et al.*, 2007) using the BLAT algorithm (Kent, 2002). Raw sequences were deposited with SRA under study accession number SRP048886.

2.7. Statistical analysis.

Two animals were removed from all analyses due to physiological signs of illness (liquid cecal content, high pH and inflammation): one from the LE100 group at 42 days of age and one from the LE75 group at 50 days of age. All physiological measurements were analyzed using the GLM procedure (SAS) with the feed intake level, the diet, the age and the interactions between those three factors as fixed effects. Mean comparisons were performed using the Bonferroni test.

Analysis of the bacterial community was performed using R version 3.0.2 (R Development Core Team., 2013). OTU taxonomic assignments to Phylum, Family and Genus were considered with a cutoff of 80% for coverage and respectively 90%, 92% and 95% for identity. Diversity, richness and taxonomic relative abundances at OTU, phylum, family and genus levels were analyzed with a linear model with the feed intake level, the diet, the age and the interactions between those three factors as fixed effects. To stabilize variance, a square root transformation was applied to bacterial community taxonomic data when necessary. Mean comparisons were performed using the Tuckey test. In order to analyze relationships between the bacterial community and physico-chemical parameters of the cecum and immunological parameters, an sPLS (sparse Partial Least Squares) analysis was carried out using the package mixOmics (Le Cao et al., 2008). Values presented in the tables and text are means \pm SEM.

3. RESULTS

3.1. Growth and Cecal Fermentative microbial activity

The feed intake of the animals fed *ad libitum* averaged 109 g/day from 35 to 50 days of age. The feed intake of the restricted animals was slightly above the level of 75% initially planned (respectively 79% and 77% for the LE and the HE diet, from 35 to 50 days of age). As expected, feed restriction reduced the growth rate (-29%, $P < 0.001$), mainly between 35 and 42 days of age, leading to a reduced weight of the restricted animals regardless of age (-12%, $P < 0.001$), whereas the LE diet slightly impaired the growth (-12%, $P < 0.05$) without impacting on the weight of the animals (**Tableau 28**). Conversely, feed restriction led to a lighter cecal wall weight (-7%, $P < 0.05$) without impacting on the cecal content weight or dry matter percentage. However, when corrected for live weight no significant effect was found between groups or ages (average cecal wall relative weight = $1.47 \pm 0.03\%$ and average cecal content relative weight = $6.20 \pm 0.14\%$). An expected increase in VFA level associated with a decreased pH with age was observed (respectively +14% $P < 0.01$ and -0.09 , $P < 0.05$, **Tableau 29**).

Tableau 28 Digestive parameters at 42 and 50 days of age according to the diet level and the feeding level.

	Live weight (g)	Daily weight gain during the week priori killing (g/day)	Cecum wall weight (g)	Cecal content weight (g)	Dry matter of cecal content (%)
<i>42 days of age</i>					
LE100 ¹	1246	49.5 ^a	17.0	77.5	22.8
LE75 ¹	1088	27.8 ^b	16.4	67.0	23.0
HE100 ²	1204	51.7 ^a	17.2	68.5	21.7
HE75 ²	1090	32.0 ^b	16.8	71.4	22.8
<i>50 days of age</i>					
LE100 ¹	1578 ^{a,b}	43.5 ^{a,b}	23.1	99.8	21.6
LE75 ¹	1405 ^a	40.9 ^a	21.1	90.4	21.7
HE100 ²	1674 ^b	55.2 ^b	22.9	89.3	21.6
HE75 ²	1419 ^a	41.9 ^a	20.5	88.7	21.8
RMSE ³	176	8.5	2.9	16.6	1.6
P-values					
Age	***	**	***	***	*
Intake level	***	***	*	ns	ns
Diet	ns	*	ns	ns	ns
Age x intake level	ns	**	ns	ns	ns

¹ LE = Low Energy diet.² HE = High Energy diet.³ RMSE = Root Mean Square Error.

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

a,b Means in the same row for a same age with unlike superscripts differ (P<0.05).

Tableau 29 Fermentative microbial activity at 42 and 50 days of age according to the diet and the feeding level.

	pH	total VFA ¹ concentration (mmol/l)	Acetate, C2 (%)	Propionate, C3 (%)	Butyrate, C4 (%)	Valeric acid, C5 (%)	Ammonia (mmol/l)
<i>42 days of age</i>							
LE100 ²	5.44	77.7	82.3 ^{a,b}	4.4	12.8 ^{a,b}	0.43	8.0 ^a
LE75 ²	5.45	84.0	84.1 ^{a,b}	3.6	11.8 ^{a,b}	0.45	13.8 ^b
HE100 ³	5.33	89.8	80.2 ^a	4.4	14.9 ^a	0.42	6.4 ^a
HE75 ³	5.42	76.6	85.5 ^b	4.4	9.6 ^b	0.53	14.7 ^b
<i>50 days of age</i>							
LE100 ²	5.47 ^a	88.4	81.2	5.3 ^a	13.1	0.44	4.2
LE75 ²	5.40 ^{a,b}	96.2	83.6	3.8 ^b	12.2	0.35	3.7
HE100 ³	5.15 ^b	99.0	80.7	3.7 ^b	15.2	0.32	5.0
HE75 ³	5.29 ^{a,b}	91.6	82.2	4.4 ^{a,b}	13.0	0.41	6.8
RMSE ⁴	0.17	15.4	2.8	0.8	2.8	0.14	3.7
P-values							
Age	*	**	ns	ns	ns	*	***
Intake level	ns	ns	***	*	***	ns	***
Diet	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Age x intake level	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
Age x diet	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
Intake level x diet	ns	*	ns	***	*	*	ns

¹ VFA = Volatile Fatty Acid.² LE = Low Energy diet.³ HE = High Energy diet.⁴ RMSE = Root Mean Square Error.

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

a,b Means in the same row for a same age with unlike superscripts differ (P<0.05).

The HE diet was associated with a reduced pH regardless of the age (-0.14, P<0.001), while a significant interaction between diet and feeding level indicated that feed restriction decreased the VFA level with the HE diet while it increased it with the LE diet regardless of age. Concerning the fermentative profile, feed restriction increased acetate (C2) proportions (+2.8%, P<0.001) while decreasing that of butyrate (C4, -2.4%, P<0.001). Due to a significant interaction between feeding level and diet the effect of feed restriction was strongest with the HE diet on butyrate proportions (P<0.05) and feed restriction decreased propionate (C3) and valeric acid (C5) proportions with the LE diet while increasing them with the HE diet (respectively P<0.001 and P<0.05). Finally, ammonia levels (NH₃) were drastically decreased with age (-54%, P<0.001) and increased with feed restriction (+72%, P<0.001), even though, due to a significant interaction between age and feeding level (P<0.001), the effect of feeding level was only effective at 42 days of age.

3.2. Taxonomical Profiles, Richness, and Diversity of Cecal Bacterial Community

Richness e.g. the number of species in the ecosystem, evaluated by ACE and Chao1 estimators, was not affected by experimental treatments or age. However, the diversity, evaluated by the Shannon index, decreased with the HE diet (-0.26, P<0.01, **Tableau 30**).

Tableau 30 Estimators of diversity according to the diet and the feeding level.

	Groups				SEM ³	P levels			
	LE100 ¹	LE75 ¹	HE100 ²	HE75 ²		age	diet	intake level	diet x intake
No. Sequences	6249	6816	6757	7928	593	ns	ns	ns	ns
No. OTU ⁴	512	559	509	465	38	ns	ns	ns	ns
Good's estimated coverage	94.9 ^a	95.2 ^a	95.5 ^a	96.4 ^b	0.1	ns	***	*	ns
Chao1	1182	1266	1207	1110	98	ns	ns	ns	ns
ACE	1205	1292	1233	1120	101	ns	ns	ns	ns
Shannon Index	2.98 ^{a,b}	3.08 ^a	2.80 ^{a,b}	2.73 ^b	0.04	ns	**	ns	ns

¹ LE = Low Energy diet.

² HE = High Energy diet.

³ SEM = Standard Error of the Mean.

⁴ OTU = Operational Taxonomic Unit.

** P<0.01; * P<0.05.

a,b Means in the same line with unlike superscripts differ (P<0.05).

When taxonomic assignment was performed using the SILVA SSU Ref NR 115 database, 96% of the sequences obtained for the 78 analyzed samples were affiliated to a phylum. 11 bacterial phyla were observed, however 5 of these represented the great majority of the microbial abundance (>99.8% of the affiliated sequences). Our experimental treatments did not affect the relative abundance of the phyla. The relative abundance of Firmicutes increased of 4.8% with age

($P < 0.001$) whereas that of Bacteroidetes and Actinobacteria decreased of 3.2% ($P < 0.05$) and 0.8% ($P < 0.01$) respectively (**Tableau 31**). Due to a great variability, the ratio of Firmicutes to Bacteroidetes was not affected by age and averaged $232/1 \pm 60/1$. Other phyla ($< 0.2\%$ of the total affiliated bacterial community), such as Cyanobacteria, Tenericutes, Acidobacteria, Deferribacteres, Synergistetes and Candidate division TM7 were not consistently present in all the cecal samples.

91% and 5.8% of sequences were assigned to family and genus levels, respectively. On the whole sample set, 41 families and 65 genera were detected. The predominant bacterial families belonged to Clostridia (Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Christensenellaceae and Eubacteriaceae) and Bacteroidia classes (Bacteroidaceae, Rikenellaceae, and Porphyromonadaceae; **Tableau 32**). Actinobacteria were mostly represented by Coriobacteriaceae, Verrucomicrobia by Verrucomicrobiaceae and Proteobacteria by Desulfovibrionaceae. **Tableau 33** indicates the relative abundances of genera representing more than 0.1% of total sequences per sample. *Bacteroides* was the most abundant identified genus followed by *Ruminococcus* and *Akeermansia*.

The separate analysis of each family's relative abundance showed a decrease with age of three bacterial families: Coriobacteriaceae (-0.87%, $P < 0.001$), Rikenellaceae (-0.86%, $P < 0.01$), and Porphyromonadaceae (-0.35%, $P < 0.01$) and an increase with age of Eubacteriaceae (+2.02%, $P < 0.05$, **Tableau 32**); all other family abundances were unaffected by age. The use of an HE diet increased the abundance of Bacteroidaceae (+1.6%, $P < 0.01$) whereas it decreased the abundance of Christensenellaceae (-3.5%, $P < 0.001$). Feed restriction increased the abundance of Eubacteriaceae (+3.4%, $P < 0.01$) and Peptococcaceae (+0.06%, $P < 0.05$) and reduced the abundance of Erysipelotrichaceae (-0.12%, $P < 0.05$) and, due to a significant interaction between feed intake level and diet, this reduction was only effective with the LE diet. Likewise, feed restriction reduced the abundance of Lachnospiraceae only with the LE diet.

The separate analysis of each genus' relative abundance showed a decrease with age of two genus: *Ruminococcus* (-0.35%, $P < 0.05$) and *Alistipes*; (-0.12%, $P < 0.05$,). The use of an HE diet increased the abundance of *Bacteroides* (+1.5%, $P < 0.01$) and decreased the abundance of *Coprococcus* (-0.08%, $P < 0.01$) whereas feed restriction decreased the abundance of *Acetivomaculum* (-0.21%, $P < 0.001$).

Tableau 31 Effect of age and intake level on the bacterial core phylum relative abundance (%) in the cecum of the growing rabbits.

	Age (days)		Intake level		SEM ¹	P levels			
	42	50	75	100		age	diet	intake level	diet x intake
Firmicutes	86.84	91.67	89.62	88.87	0.76	***	ns	ns	ns
Bacteroidetes ²	5.45	2.25	3.48	4.24	0.73	*	ns	ns	ns
Actinobacteria	2.47	1.64	1.88	2.25	0.14	**	ns	ns	ns
Verrucomicrobia ²	0.75	0.63	0.76	0.62	0.08	ns	ns	ns	ns
Proteobacteria	0.44	0.36	0.45	0.35	0.03	ns	ns	ns	ns

¹SEM = Standard Error of the Mean; ²A square root transformation was applied for the statistical analysis.

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

Tableau 32 Effect of age, intake and dietary energy level on the bacterial core family relative abundance (%) in the cecum of the growing rabbits.

	Age		Groups				SEM ³	P levels			
	42	50	LE100 ¹	LE75 ¹	HE100 ²	HE75 ²		age	diet	intake level	diet x intake
Ruminococcaceae ⁴	51.07	51.71	50.73	50.82	54.32	49.62	1.09	ns	ns	ns	ns
Lachnospiraceae	19.72	22.60	25.14 ^a	17.71 ^b	19.33 ^{a,b}	22.49 ^{a,b}	1.02	ns	ns	ns	**
Christensenellaceae ⁴	6.47	5.66	7.15 ^a	8.58 ^a	4.05 ^b	4.65 ^b	0.38	ns	***	ns	ns
Eubacteriaceae ⁴	5.67	7.69	3.89 ^a	8.75 ^b	6.02 ^{a,b}	8.02 ^b	0.56	*	ns	**	ns
Coriobacteriaceae	2.38	1.51	2.06	2.09	2.14	1.50	0.14	***	ns	ns	ns
Bacteroidaceae	2.37	0.75	1.09 ^{a,b}	0.37 ^a	3.05 ^b	1.65 ^b	0.54	ns	**	ns	ns
Rikenellaceae	1.06	0.20	0.40	0.74	0.42	0.94	0.13	**	ns	ns	ns
Verrucomicrobiaceae	0.74	0.62	0.49	0.66	0.72	0.85	0.08	ns	ns	ns	ns
Porphyromonadaceae	0.56	0.21	0.32	0.36	0.38	0.47	0.07	**	ns	ns	ns
Desulfovibrionaceae ⁴	0.31	0.29	0.27	0.31	0.23	0.38	0.03	ns	ns	ns	ns
Peptococcaceae ⁴	0.17	0.15	0.13 ^a	0.23 ^b	0.12 ^a	0.15 ^{a,b}	0.01	ns	ns	*	ns
Erysipelotrichaceae	0.14	0.11	0.29 ^a	0.08 ^b	0.09 ^b	0.06 ^b	0.03	ns	ns	*	*
Clostridiaceae	0.05	0.08	0.21	0.02	0.03	0.01	0.03	ns	ns	ns	ns

¹ LE = Low Energy diet; ² HE = High Energy diet; ³ SEM = Standard Error of the Mean; ⁴ A square root transformation was applied for the statistical analysis.

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05; a,b Means in the same line with unlike superscripts differ (P<0.05).

Tableau 33 Effect of age, intake and dietary energy level on the bacterial core genus relative abundance (%) in the cecum of the growing rabbits.

	Age		Groups				SEM ³	P levels			
	42	50	LE100 ¹	LE75 ¹	HE100 ²	HE75 ²		age	diet	intake level	diet x intake
Bacteroidaceae <i>Bacteroides</i> ⁴	2.26	0.72	1.06 ^{a,b}	0.35 ^a	2.93 ^b	1.54 ^b	0.53	ns	**	ns	ns
Ruminococcaceae <i>Ruminococcus</i> ⁴	1.39	1.04	1.28	1.36	1.08	1.14	0.10	*	ns	ns	ns
Verrucomicrobiaceae <i>Akkermansia</i> ⁴	0.74	0.62	0.49	0.65	0.71	0.85	0.08	ns	ns	ns	ns
Porphyromonadaceae <i>Barnesiella</i> ⁴	0.42	0.18	0.27	0.31	0.32	0.29	0.05	ns	ns	ns	ns
Desulfovibrionaceae <i>Desulfovibrio</i>	0.30	0.26	0.25	0.31	0.21	0.35	0.03	ns	ns	ns	ns
Lachnospiraceae <i>Acetitomaculum</i> ⁴	0.29	0.37	0.52 ^a	0.23 ^b	0.35 ^{a,b}	0.22 ^b	0.03	ns	ns	***	ns
Ruminococcaceae <i>Anaerotruncus</i> ⁴	0.23	0.18	0.30	0.17	0.15	0.19	0.02	ns	ns	ns	ns
Rikenellaceae <i>Alistipes</i> ⁴	0.18	0.06	0.05	0.14	0.21	0.08	0.03	*	ns	ns	ns
Lachnospiraceae <i>Coproccoccus</i>	0.18	0.16	0.23 ^a	0.20 ^{a,b}	0.15 ^{a,b}	0.11 ^b	0.02	ns	**	ns	ns
Lachnospiraceae <i>Anaerostipes</i>	0.17	0.07	0.02	0.19	0.04	0.23	0.06	ns	ns	ns	ns
Lachnospiraceae <i>Roseburia</i> ⁴	0.16	0.11	0.18	0.11	0.08	0.17	0.02	ns	ns	ns	ns
Lachnospiraceae <i>Blautia</i>	0.12	0.11	0.16	0.10	0.11	0.10	0.01	ns	ns	ns	ns
Coriobacteriaceae <i>Enterorhabdus</i> ⁴	0.12	0.07	0.11	0.08	0.12	0.05	0.01	ns	ns	ns	ns

¹ LE = Low Energy diet.² HE = High Energy diet.³ SEM = Standard Error of the Mean.⁴ A square root transformation was applied for the statistical analysis.

*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05.

a,b Means in the same line with unlike superscripts differ (P<0.05).

3.3. sPLS analysis: relationship between bacterial taxonomic profiles and cecal and immunological parameters

We studied the relationships between the fermentative parameters measured in the cecum, the immunological parameters and OTU profile of the microbiota by sPLS. According to the leave-one-out process, to compute the Mean Square Error of Prediction, two components were computed and one projection plane (components 1 and 2) was considered. **Figure 34** is a graphical representation of the selected OTU on the first two sPLS dimensions. The selected OTU and the cecal and immunological parameters are projected onto correlation circles where highly correlated variates cluster together (within a data set or between the two data sets).

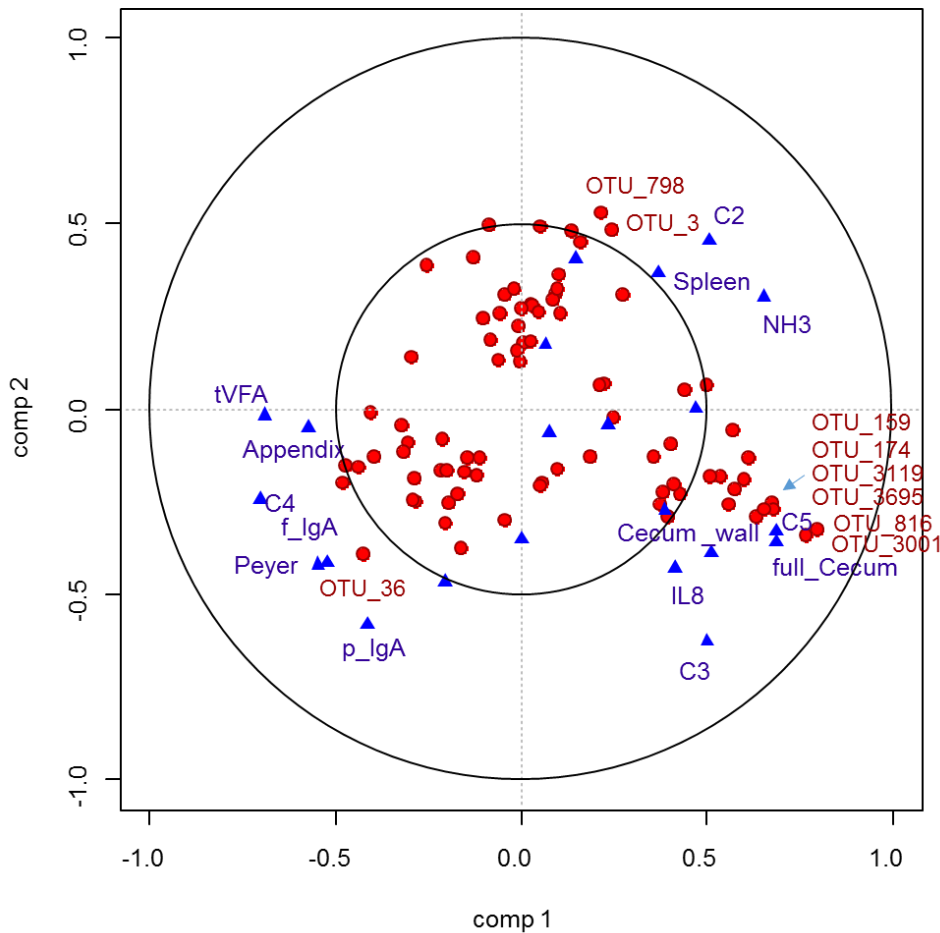


Figure 34 sPLS variables representation of the physicochemical parameters (blue) and the selected bacterial OTU (red) on the first two sPLS dimensions.

Variable lying outside the small correlation circle are highly correlated. Variables that cluster together are correlated. f_IgA = fecal IgA levels; p_IgA = plasmatic IgA levels; C2: Relative cecal proportion of acetate; C3 = relative cecal proportion of propionate; C4 = relative cecal proportion of butyrate; C5 = relative cecal proportion of valeric acid. NH3 = cecal ammonia concentration; Appendix = relative weight of the appendix; Spleen = relative weight of the spleen; full_Cecum = relative weight of the full cecum; Cecum_wall = relative weight of the cecum wall; tVFA = total Volatile Fatty Acid concentration in the cecum; Peyer = surface of the Peyer’s Patch; IL8 = Interleukin-8.

The first component opposed total VFA, butyrate, appendix relative weight, Peyer’s patch surface and both fecal and plasmatic IgA levels to acetate, propionate, valeric acid, ammonia and IL-8 levels, spleen, full cecum and cecum wall relative weights. The second axis opposed acetate and ammonia levels and spleen relative weight to the other physiological parameters. Physical and immunological parameters cluster in 3 groups: GALT parameters (appendix relative weight, fecal and plasmatic IgA levels and Peyer’s patch surface) cluster together with butyrate and total VFA levels and were opposed to acetate and ammonia levels while cecum wall, and full cecum relative weights, propionate, valeric acid and IL8 levels had an orthogonal positioning indicating an independence of this later group of variable relatively to the two first clusters.

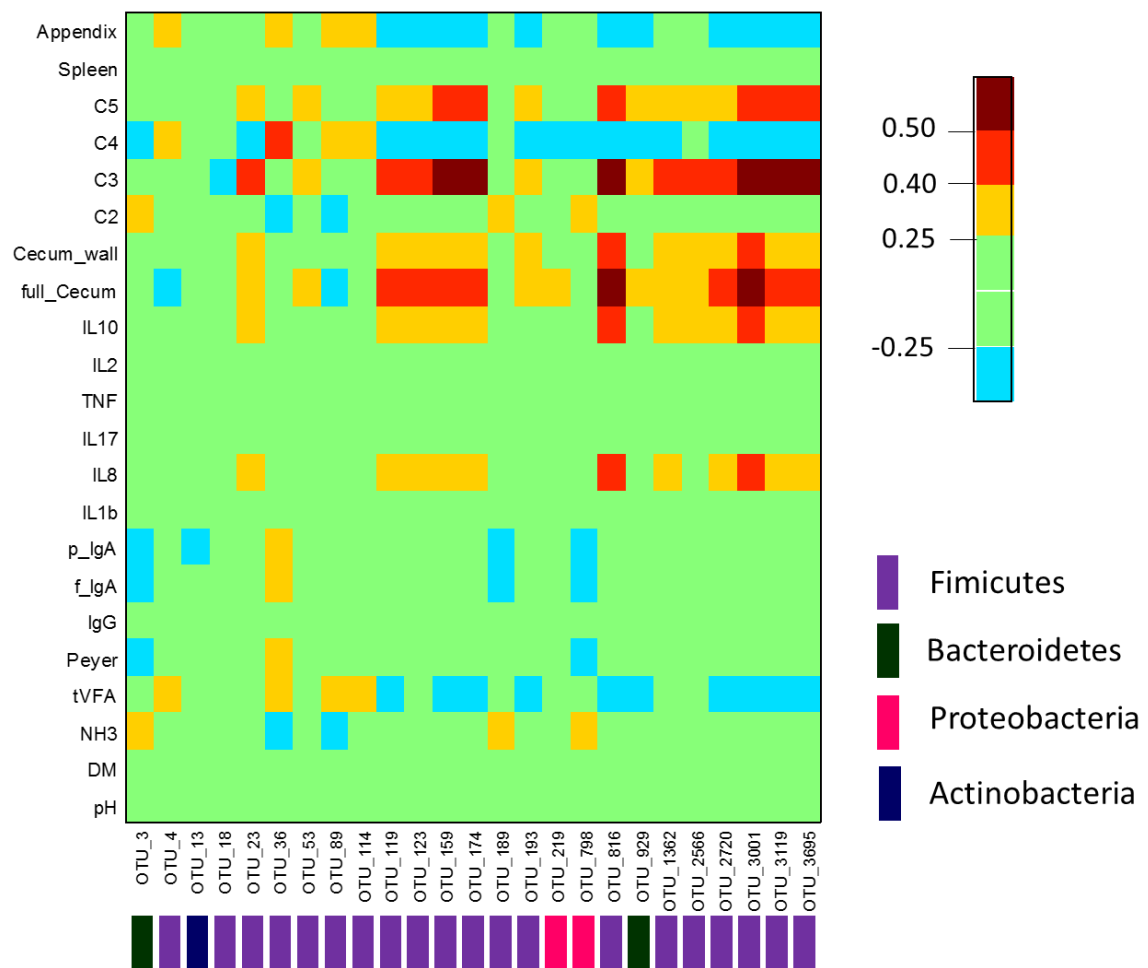


Figure 35 Heatmap representation of the similarities between the OTU and the immune and fermentative parameters.

Appendix = relative weight of the appendix; Spleen = relative weight of the spleen; C5 = relative cecal proportion of valeric acid; C4 = relative cecal proportion of butyrate; C3 = relative cecal proportion of propionate; C2: Relative cecal proportion of acetate; Cecum_wall = relative weight of the cecum wall; full_Cecum = relative weight of the full cecum; IL10 = Interleukin-10; IL2 = Interleukin-2; TNF = Tumor Necrosis Factor alpha; IL17 = Interleukin-17; IL8 = Interleukin-8; p_IgA = plasmatic IgA levels; f_IgA = fecal IgA levels; IgG = plasmatic IgG levels; Peyer = surface of the Peyer’s Patch; tVFA = total Volatile Fatty Acid concentration in the cecum; NH3 = cecal ammonia concentration; DM = cecal Dry Matter content (%); pH = pH of the cecal content.

Considering the OTU, latent variates of 25 of them were highly correlated to component variates 1 and 2 (lying outside the smallest circle) and were related to the variability of physiological parameters. 20 of them belonged to Firmicutes, (all were of the Clostridiales order), two to Bacteroidetes, one to Actinobacteria and one to Proteobacteria. **Figure 35** shows the correlations between the projections of the main bacterial OTU and those of physiological parameters. Only coefficients greater than 0.5 are discussed. sPLS analysis revealed that high levels of propionate were associated with high occurrence of 6 particular OTU, 4 of them belonging to Ruminococcaceae and 2 of them belonging to Lachnospiraceae. Only OTU_174 could be assigned to genera level: Anaerotruncus. Great relative weight of the full cecum was associated with high occurrence of 2 OTU belonging to the Ruminococcaceae and Lachnospiraceae families.

Finally sPLS analysis allowed also to identify a cluster of OTU exhibiting a similar pattern of variation. Among them 4 OTU could be assigned to genera Blautia, Anaerotruncus and Bacteroides. Three OTU lied orthogonally to this cluster: OTU 3, 798 and 36 that were assigned to family levels Rikinellaceae (dgA11 gut group), Rhodospirillaceae and Eubacteriaceae respectively.

4. DISCUSSION

The present study aimed to analyze the effects of the intake level (ad libitum or 25% restricted) and dietary energy concentration on the cecal microbiota of the growing rabbit. We demonstrated that the microbial composition could explain, at least in part, variations in the physiological parameters measured. Moreover, through sPLS analysis we managed to make novel correlations between the cecal ecosystem and the immune system of the rabbit.

4.1. Effect of the feed intake level

As expected (for review, Gidenne et al., 2012b), feed restriction decreased the overall growth without significantly impacting on the relative cecal growth. Ammonia levels were considerably higher in feed restricted rabbits one week after weaning, whereas this effect was no longer visible two weeks after weaning. As demonstrated by Martignon (2010), feed restricted animals have an altered intake behavior and consume their daily feed portion over a very short period of time (<7 hours) leading to a greater digestive nitrogen flow over that time period. This might lead to an overload of protein in the cecum, as the pancreatic enzymatic activity is not fully mature before 42 days of age (Scapinello et al., 1999), thus leading to higher ammonia levels. The fermentative profile was also modified when the intake level was lowered, with an increase in acetate compensated by a decrease in butyrate proportions. Interestingly similar switches occur with an

increased fibrous fraction of the diet (Trocino et al., 2013) associated with a decrease in digestive disorders (Gidenne, 2003). Thus, the beneficial effects of feed restriction upon health might be associated with modifications in the cecal fermentative parameters. Despite the notable effect of feed restriction on the cecal biotope, the cecal bacterial community remained relatively stable as the overall OTU profile, diversity and richness of the bacterial community were not affected by the intake level confirming the results observed after 4 weeks of feed restriction (Massip et al., 2012). The proportion of some species can however be decreased as a consequence of a reduced substrate availability, leading to an increased proportion of other species better adapted to the available nutrients (Cardinale et al., 2002; Zoetendal et al., 2004). In the present study feed restriction increased the proportion of Eubacteriaceae and Peptococcaceae, mainly represented by OTU unaffiliated to any known genera. Moreover, the proportions of Lachnospiraceae and Erysipelotrichaceae were decreased with feed restriction only with the use of the low energy diet. The abundance of the *Acetivomaculum* genus belonging to the Lachnospiraceae family was decreased with a lower intake level. Increases in this bacterial genus are usually identified in ruminant species in association with acidosis (Petri et al., 2013). Moreover, in the two animals removed from the study due to physiological signs of illness, very high proportions of this genus were observed (21% and 0.5%). Thus, decreased proportions of *Acetivomaculum* could be associated with the improved health observed with feed restriction.

4.2. Effect of the dietary energy level

Growth was improved with an increased dietary energy level as previously demonstrated in our companion paper (Knudsen et al., 2014). The pH was decreased with the high energy diet, possibly due to the higher proportion of digestible fibers in that diet (Trocino et al., 2013). Curiously, this decrease in pH was not associated with an increase in VFA levels as previously reported with increasing levels of digestible fibers (Trocino et al., 2013). Propionate levels were decreased by feed restriction with the low energy diet, whereas the feeding level did not impact on the propionate levels with the high energy diet. Diversity was decreased with the use of a high energy diet. This might be associated with the increased proportion of fibers, possibly inducing a dominance of some better adapted bacteria in the cecal community. However, this shift did not impact on the bacterial community OTU profile. Surprisingly, the proportions of Bacteriaceae, and its corresponding genus *Bacteroides*, were increased with the use of a high energy diet. This could be associated with a delay in gut maturation as the proportion of Bacteriaceae is dramatically decreased with age (Combes et al., 2014; Combes et al., 2011). Previous studies in humans have shown decreased proportions of these bacteria with increased caloric intakes (Kelder et al., 2014).

The taxonomic profile of humans is however highly different for the rabbit's. The proportion of Christensenellaceae was decreased with the high energy diet. This Gram-negative anaerobic family has recently been identified (Morotomi et al., 2012) and only contains one identified genus *Christensenella* that was scarcely represented in our samples. Thus, the association between the increased abundance of this family with increased energy intake remains to be explained. Finally, the abundance of the *Coprococcus* genus belonging to the Lachnospiraceae family was decreased with the use of the high energy diet. A similar decrease in this genus is observed in human patients with Inflammatory Bowels Disease (Chen et al., 2014) or morbid obesity associated with type II diabetes (Graessler et al., 2013) possibly indicating a negative effect of the high energy diet on the digestive health. However, we did not evidence such a negative effect on health in our companion paper (Knudsen et al., 2014). Finally, reduced abundances in the *Coprococcus* genus have been associated with reduced growth performances in pigs (He et al., 2014), which was not the case in our study.

4.3. Correlation between fermentative and immunological variables and the cecal microbiota

Independently from the effects of our treatments, the correlations between the cecal microbiota and fermentative and immunological parameters were studied with an sPLS analysis. This analysis aimed to maximize the covariance between two datasets and allowed us to study the relationships within the fermentative and immunological dataset (as would a PCA), within OTU relative abundances and finally between the two datasets. Our results evidenced three clusters of variables, one corresponding the measurements of the GALT. This cluster also comprised the butyrate levels and was negatively correlated to the acetate. Thus, butyrate and acetate levels could, be used as indicators of the development of the GALT. This hypothesis is supported by our previous statement that similar patterns in butyrate and acetate levels have been observed with high fiber diets, thus potentially having a protective effect on health. However, increased Acetate levels and decreased butyrate levels are not always associated with an improved health (Trocino et al., 2013), thus our hypothesis remains to be verified.

We identified 25 OTU that were correlated to fermentative and immunological parameters. The majority of those belonged to the Firmicute phylum and the highest correlations were observed between propionate levels and a couple of OTU. GALT parameters seemed to be related to three particular OTU assigned to family levels Rikinellaceae, Rhodospirillaceae and Eubacteriaceae. However similarities between the projections of GALT parameters remained low and further

studies could be undertaken to ascertain these three OTU as potential biomarker of GALT development.

5. CONCLUSION

The present study demonstrated that the feed intake level and dietary energy concentration affect in an independent manner the cecal biotope and the cecal bacterial community. Altogether our results indicated that quantitative intake level and the energy intake level act differently on the microbial composition and activity. Conclusions regarding correlations between the modifications observed and the beneficial effects of feed restriction upon health are still delicate to make. However, we managed to make a preliminary evaluation of the possible correlations between the cecal ecosystem and immunological parameters.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the CLIPP (Comité Lapin Interprofessionnel pour la Promotion des Produits) for their financial support. The authors would also like to thank the technicians implicated in the experiment at the INRA UE PECTOUL and B. Gabinaud from the GENPHYSE unit and the S. Dowd for the 454 pyro sequencing.

REFERENCES

1. Lalles JP, Boudry G, Favier C, Le Floc'h N, Lurona I, et al. (2004) Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Animal Research* 53: 301-316.
2. Fortun-Lamothe L, Boullier S (2007) A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livestock Science* 107: 1-18.
3. Gidenne T, Garcia J, Lebas F, Licois D (2010) Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology. In: De Blas C, Wiseman J, editors. *Nutrition of the Rabbit*. Wallingford, UK: CABI. pp. 179-199.
4. Gidenne T, Combes S, Fortun-Lamothe L (2012) Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal* 6: 1407-1419.

5. Gidenne T, Combes S, Feugier A, Jehl N, Arveux P, et al. (2009) Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3: 509-515.
6. Massip K, Combes S, Cauquil L, Zemb O, Gidenne T. High throughput 16S-DNA sequencing for phylogenetic affiliation of the caecal bacterial community in the rabbit – impact of the hygiene of housing and of the intake level; 2012; Clermont-Ferrand, France. pp. 57.
7. Combes S, Michelland RJ, Monteils V, Cauquil L, Soulie V, et al. (2011) Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *Fems Microbiology Ecology* 77: 680-689.
8. Maertens L, Perez JM, Villamide M, Cervera C, Gidenne T, et al. (2002) Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. *World Rabbit Sci* 10: 157-166.
9. De Blas C, Mateos GG (2010) Feed formulation. In: De Blas C, Wiseman J, editors. *Nutrition of the Rabbit*. Wallingford, UK: CABI. pp. 222-232.
10. Journal Officiel de la République Française 0278 (2009) Arrêté du 30 novembre 2009 modifiant l'arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux. 20652.
11. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9: 671-675.
12. Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeehan T, et al. (2008) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *Bmc Microbiology* 8.
13. Playne MJ (1985) Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 638-644.
14. Verdouw H, Van Echteld CJA, Dekkers EMJ (1977) Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12: 399-402.
15. Accensi F, Pinton P, Callu P, Abella-Bourges N, Guelfi JF, et al. (2006) Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. *Journal of Animal Science* 84: 1935-1942.
16. Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Lucioli J, Pacheco GD, Cossalter AM, et al. (2011) Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Molecular Nutrition & Food Research* 55: 761-771.

17. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.
18. Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M (2014) Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ PrePrints* 2:e386v1: <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.7386v7281>.
19. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig WG, et al. (2007) SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35: 7188-7196.
20. Kent WJ (2002) BLAT - The BLAST-like alignment tool. *Genome Research* 12: 656-664.
21. R Development Core Team. (2013) R: A language and environment for statistical computing, <http://www.R-project.org>. In: R Foundation for Statistical Computing, editor. Vienna, Austria.
22. Le Cao K-A, Rossouw D, Robert-Granie C, Besse P (2008) A Sparse PLS for Variable Selection when Integrating Omics Data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 7.
23. Martignon MH (2010) Conséquences d'un contrôle de l'ingestion sur la physiopathologie digestive et le comportement alimentaire du lapin en croissance. Toulouse: Université de Toulouse. 194 p.
24. Scapinello C, Gidenne T, Fortun-Lamothe L (1999) Digestive capacity of the rabbit during the post-weaning period, according to the milk/solid feed intake pattern before weaning. *Reproduction Nutrition Development* 39: 423-432.
25. Trocino A, Garcia J, Carabano R, Xiccato G (2013) A meta-analysis on the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. *World Rabbit Science* 21: 1-15.
26. Gidenne T. Fibres alimentaires et prévention des troubles digestifs chez le lapin en croissance: rôles respectifs des fibres digestibles et peu digestibles. In: Bolet G, editor; 2003 19-20 nov.; Paris, France. ITAVI. pp. 3-11.
27. Cardinale BJ, Palmer MA, Collins SL (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* 415: 426-429.
28. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *Journal of Nutrition* 134: 465-472.
29. Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, et al. (2013) Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. *Plos One* 8.

30. Knudsen C, Combes S, Briens C, Coutelet G, Duperray J, et al. (2014) Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. *Livestock Science*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.1008.1015>.
31. 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* 92: 652-665.
32. Kelder T, Stroeve JHM, Bijlsma S, Radonjic M, Roeselers G (2014) Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. *Nutrition & Diabetes* 4.
33. Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y (2012) Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 144-149.
34. Chen LP, Wang W, Zhou R, Ng SC, Li J, et al. (2014) Characteristics of Fecal and Mucosa-Associated Microbiota in Chinese Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Medicine* 93.
35. Graessler J, Qin Y, Zhong H, Zhang J, Licinio J, et al. (2013) Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenomics Journal* 13: 514-522.
36. He B, Li T, Zhu Y, Zhou T, Dai Z, et al. (2014) Differential analysis of intestinal microflora in pigs with different growth performance. *Chinese Journal of Animal Nutrition* 26: 2327-2334.
37. Pinheiro V, Cunha LFE, Mourao JL, Gidenne T (2013) Effect of substitution of wheat starch by potato starch on the performance, digestive physiology and health of growing rabbits. *Animal* 7: 974-982.

Annexe 5 Nucleotide sequences of primers for qRT-PCR.

Gene Symbol	Gene Name	Primer Sequences	GenBank accession number
<i>B2M</i> ¹	Beta-2-Microglobulin	F : AACGTGGAACAGTCAGACC R : AGTAATCTCGATCCCATTTC	XM002717921.1
<i>TNFα</i>	Tumor Necrosis Factor alpha	F : GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA R : ATCTGGGCCACAGGGTTGA	E08303
<i>IL-1β</i>	Interleukin 1 beta	F : CAAGTGGTGTCTCCATGAGTTTT R : CTTGTCGTTACTTTCTTCTCCTTGC	M26295.1
<i>IL-8</i>	Interleukin 8	F : TGGCTCTCTTGGCAACCTTC R : CAGAACTGCAGCTTCACAAAGAGT	NM1082293
<i>IL-2</i>	Interleukin 2	F : TCCAGGATGCTCACATTCAA R : GCACTTCCTCCAGAGGTTTG	DQ852342.1
<i>IL-10</i>	Interleukin 10	F : AGAACCACAGTCCAGCCATC R : TTTTCACAGGGGAGAAATCG	AF068058.1

¹ Primer sequences were obtained from Peng *et al.* (1).

DISCUSSION

GENERALE

En élevage cunicole, les stratégies de restriction alimentaire permettent de réduire la mortalité et la morbidité après le sevrage, elles sont ainsi des alternatives intéressantes à l'antibiothérapie. Cependant, malgré une amélioration de l'efficacité alimentaire, ces stratégies réduisent sensiblement la vitesse de croissance ainsi que le rendement à l'abattage. Par ailleurs, les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire sont mal connus. Enfin, selon les études, l'effet sur l'efficacité alimentaire varie de manière importante, probablement en lien avec la composition nutritionnelle des aliments, rendant l'optimisation de ces stratégies plus complexe.

Ainsi, les travaux présentés dans cette thèse visaient à répondre à deux objectifs principaux : i) Optimiser les performances zootechniques des lapins soumis à une restriction alimentaire via une modulation de la composition chimique des aliments ; ii) Expliquer les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire.

Nos résultats nous ont conduits à formuler des recommandations alimentaires pour le lapin restreint en vue d'optimiser sa croissance, et nous ont permis d'avancer des hypothèses quant aux mécanismes physiologiques impliqués dans les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé digestive du lapin en croissance.

Dans une première partie les stratégies expérimentales et méthodologiques utilisées seront analysées, en évaluant leurs pertinences, intérêts et limites pour atteindre nos objectifs. Dans un second temps les voies d'améliorations avérées et potentielles des performances dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire seront discutés. Enfin les phénomènes physiologiques sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité digestive seront discutés avant de finir sur une évaluation économique des différents systèmes alimentaires étudiés.

I. INTERETS ET LIMITES DE NOS STRATEGIES EXPERIMENTALES ET METHODOLOGIQUES

L'originalité de notre étude est basée sur la pluridisciplinarité de nos approches (**Figure 20**). En effet, sur la base d'un schéma expérimental identique nous avons pu mesurer des paramètres zootechniques sur un grand nombre d'animaux, et sur plusieurs sites expérimentaux, et en parallèle analyser des paramètres physiologiques sur un nombre plus réduit d'animaux afin de répondre à nos deux objectifs : optimiser les stratégies de restriction alimentaire et contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques d'une limitation de l'ingestion sur la santé et l'efficacité alimentaire.

I.A. STRATEGIES EXPERIMENTALES GENERALES

Afin d’avoir des résultats intra et inter études comparables, notre stratégie expérimentale a été basée sur l’application d’un même schéma expérimental pour les deux études mises en place pour tous les sites utilisés (Figure 36) et durant la même saison (printemps 2012 et 2013). De même, afin de créer un trait d’union entre nos deux études, une même concentration en énergie digestible (ED) a été choisie pour l’aliment énergétique (HE) de la première étude et les aliments de la deuxième étude. Dans la première étude nous avons veillé à ce que les sources d’apports énergétiques soient équivalents entre nos deux aliments, afin d’étudier exclusivement l’effet du niveau énergétique et non celui de la source de l’apport (Figure 37). Dans la deuxième étude, le ratio fibre digestibles sur amidon a été choisi comme critère de modulation de l’énergie pour trois raisons principales : i) l’amélioration possible de l’état sanitaire avec l’aliment riche en fibres digestibles, via une stimulation de l’activité microbienne caecale, et sans dégradations majeures de la croissance ; ii) La possibilité de formuler des aliments iso-ADF, avec des variations des taux d’incorporations de fibres et d’amidon (les lipides apportant beaucoup d’énergie pour un apport quantitatif faible cette modulation aurait été plus complexe) ; iii) Afin d’avoir des aliments représentatifs de ceux utilisés en élevages commerciaux, sachant qu’il est peu courant d’incorporer des lipides dans les aliments de type "croissance".

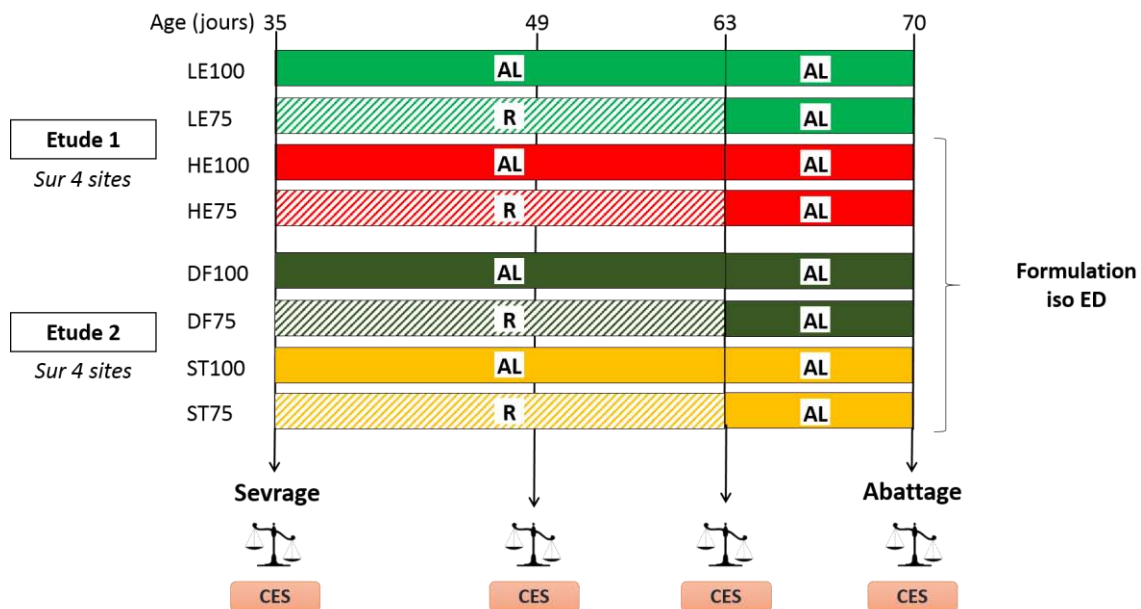


Figure 36 Un schéma expérimental commun à nos deux études.

Abréviations : LE : Low Energy (Aliment à ED faible) ; HE : High Energy (aliment à ED élevée) ; DF : Digestible Fiber (aliment riche en fibres digestibles) ; ST : Starch (aliment riche en amidon) ; AL : *Ad libitum* ; R : Restreint ; ED : Energie digestible ; CES : Contrôle d’Etat Sanitaire ; balance : pesée.

Enfin, nous avons choisi de soumettre les animaux à une même stratégie de restriction (4 semaines avec un ingéré réduit de 25% suivies, sans transition, d'une semaine d'alimentation à volonté pour tous les animaux) pour deux raisons principales : i) afin de profiter de la croissance compensatrice observée lors du retour à volonté; ii) afin de pouvoir comparer les résultats de nos études avec les études antérieures du GEC, menées avec cette même stratégie. Le niveau alimentaire de 75% a été choisi relativement bas afin de mettre en évidence les effets bénéfiques de la restriction sur la santé, observables en deçà de 80%, (Gidenne et al., 2009b). Cependant, notre stratégie ne peut être représentative de la grande diversité des stratégies de restriction employées en élevage commercial et qui dépendent principalement de la situation sanitaire mais aussi du matériel disponible. Ainsi, dans un élevage commercial avec un bon historique sanitaire, le niveau de restriction choisi sera peu élevé (10 à 20%) et le retour à une alimentation à volonté plus rapide (après 2 à 3 semaines de restriction) afin de maximiser la croissance. A l'inverse, si l'historique sanitaire est peu favorable le niveau de restriction peut être plus élevé (25 à 40%) et la période de restriction plus longue (3 à 5 semaines) voire ininterrompue jusqu'à la vente des animaux.

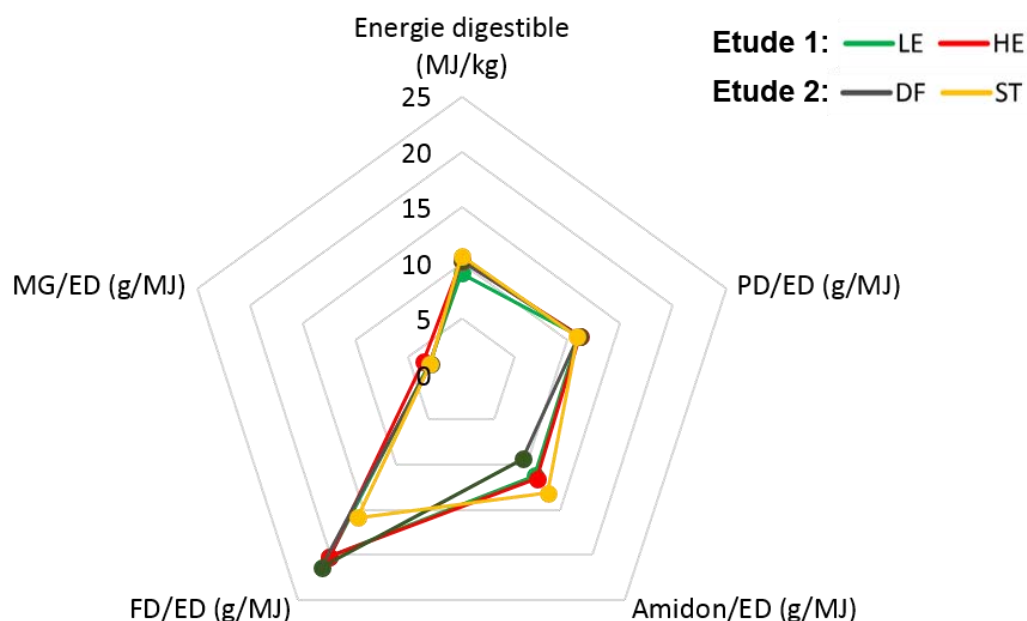


Figure 37 Qualité nutritionnelle des aliments utilisés dans nos deux études chez les animaux nourris à volonté.

LE : Low Energy (Aliment à ED faible) ; HE : High Energy (aliment à ED élevée) ; DF : Digestible Fiber (aliment riche en fibres digestibles) ; ST : Starch (aliment riche en amidon) ; PD : Protéines digestibles ; ED : Energie digestible ; FD : Fibres digestibles ; MG : Matière grasse ; Les données exactes (y compris pour les animaux restreints) sont présentées en **Annexe 7**.

Pour chaque étude, le protocole de mesure des paramètres zootechniques a été répété sur quatre sites différents. Le principal intérêt d'un tel dispositif est l'augmentation du nombre d'individus mis en essai, et donc une augmentation de la puissance statistique de nos mesures. Ce dispositif est particulièrement intéressant pour les mesures du statut sanitaire (mortalité et morbidité) dont on peut estimer la variabilité. De plus, d'une station expérimentale à une autre, les paramètres d'ambiance et les conduites d'élevage sont différents, ce qui induit une variabilité des réponses zootechniques et sanitaires. **Ceci nous a permis d'appréhender la variabilité des réponses zootechniques dans les élevages commerciaux, et de mesurer les effets de nos traitements de manière reproductible dans différentes situations.** Cependant, cette variabilité des réponses constitue également une limite de notre dispositif. En effet, il peut être difficile d'évaluer l'effet de nos traitements lorsque les réponses diffèrent fortement entre sites et nécessitent alors le classement des sites par catégories (diminution des effectifs par unité statistique) comme cela a été le cas pour l'analyse du statut sanitaire. De plus, les mesures de rendement et de qualité de carcasses sont très sensibles aux variations de temps de transport et d'attente des animaux avant abattage (Combes et al., 2007). Or cette durée variait de 30 min à 9h selon la distance séparant la station expérimentale et l'abattoir. Ainsi, malgré un effort d'homogénéisation des pratiques lors des abattages (pas de mise à jeun préalable, sexe ratio de 50 :50, poids dans la moyenne intra lot,...), nous avons observé une forte variabilité inter-sites des rendements (de 55,3 à 58,5% en moyenne) principalement en lien avec ce facteur temps. Enfin, tous les lapins utilisés étaient de souche génétique Hyplus, à l'exception de ceux utilisés sur un site expérimental pour les mesures « zootechniques » et toutes les mesures « physiologiques » utilisant une souche INRA (lignée mâle : 1001 x lignée femelle : (1777x2066)). Cependant, ces deux souches étant relativement proches nous avons émis l'hypothèse que les résultats observés sur la souche INRA étaient extrapolables à la souche commerciale Hyplus.

Enfin, l'application d'un schéma expérimental identique entre nos protocoles "zootechniques" et "physiologiques" nous a permis de pouvoir extrapoler les résultats des uns aux autres, comme cela a notamment été fait pour relier les analyses de digestibilité et les résultats zootechniques (**Article 1**, p.102) ou immunologiques (**Article 3**, p.150).

I.B. METHODES D'ANALYSES PHYSIOLOGIQUES

Afin d'étudier les mécanismes sous-jacents aux effets bénéfiques d'une ingestion restreinte sur la santé digestive et l'efficacité alimentaire nous avons choisi d'évaluer deux éléments importants de la santé du jeune mammifère : le système immunitaire et le microbiote digestif. En effet, le

système immunitaire est un acteur primordial dans le maintien de la santé digestive, alors que le microbiote permettrait à la fois de moduler la santé et l'efficacité digestive comme présenté en bibliographie (p.67 et p.52). De plus ces deux éléments sont en interaction permanente au sein de la sphère digestive.

I.B.1. Méthodes d'analyse de la réponse immunitaire

Les organes lymphoïdes secondaires ont été mesurés afin d'évaluer leur croissance relative dans le cadre de stratégies de restriction alimentaire. Deux approches ont ensuite été utilisées afin d'analyser la réponse innée et humorale des lapins, **sans et avec stimulation (Tableau 34)**. Sans stimulation préalable nous avons étudié la réponse humorale, digestive et systémique, avec des dosages d'immunoglobulines fécales (IgA) et plasmatiques (IgG et IgA) par ELISA, et nous avons étudié la réponse digestive innée via des mesures d'expression des gènes de cytokines iléales par qRT-PCR. Nous avons ensuite effectué deux type de stimulations : i) à l'ovalbumine (OVA) pour mesurer la réponse humorale systémique via le dosage d'IgG plasmatiques spécifiques anti-OVA par ELISA ; ii) au LPS (lipopolysaccharide) pour mesurer la réponse innée via des relevés de température rectale et des dosages de TNF α plasmatique par ELISA.

Tableau 34 Mesures de la réponse immunitaire.

Réponse immunitaire étudiée		Elément mesuré	Techniques
Immunité Humorale	Sans stimulation	Digestive	IgA fécaux
		Systémique	IgG et IgA plsm
	Avec stimulation (OVA)	Digestive	
		Systémique	IgG plsm anti-OVA
Immunité Innée	Sans stimulation	Digestive	Cytokines iléales
		Systémique	qRT-PCR
	Avec stimulation (LPS)	Digestive	
		Systémique	TNF α plsm Fièvre
			ELISA Prise de température

Plsm = plasmatique.

Le but de notre étude était d'avoir une image globale des effets d'une ingestion réduite sur la réponse immunitaire. Les paramètres mesurés ont donc été choisis selon leur pertinence et leur facilité de mesure. Notre travail contribue ainsi à identifier des pistes pertinentes de recherche quant aux mécanismes physiologique sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire de courte durée.

Nous avons dosé les immunoglobulines par ELISA, car c'est une technique fiable, peu coûteuse et relativement aisée à mettre en place. Cependant, chez le lapin, la principale difficulté est la faible disponibilité d'anticorps reconnaissant des protéines de lapin pour une utilisation en ELISA. En effet, le lapin est souvent sollicité pour la production d'anticorps de détection, mais peu utilisé en tant qu'animal de laboratoire pour des études immunologiques. Dès lors, afin d'évaluer l'effet de nos traitements sur une large gamme de cytokines nous avons eu recours à la qRT-PCR qui nous a permis de mesurer l'expression (ARNm) des gènes de quelques cytokines dans l'iléon. Le principal avantage de cette technique réside dans la multitude de cibles mesurables, sa principale limite étant une mesure de l'expression d'un gène et non de la quantité de protéine réellement produite. Dans nos études, nous faisons donc le postulat initial que la traduction en protéine n'est pas régulée de manière différentielle selon les cytokines mesurées et selon les traitements expérimentaux (restriction, composition chimique de l'aliment).

Nous avons mesuré l'expression des cytokines au niveau de l'épithélium iléal car il représente la plus grande surface de l'intestin en contact avec le bol alimentaire. Cependant, ce choix présente deux inconvénients : i) l'épithélium n'est pas une structure uniforme comme cela peut apparaître à l'œil nu, ainsi des follicules lymphoïdes isolés peuvent être présents à sa surface comme nous l'avons présenté dans notre bibliographie. La réponse mesurée peut donc être sujette à une grande variabilité que nous ne sommes pas en mesure de contrôler ; ii) le système immunitaire n'y est pas très développé, contrairement à ce que l'on peut observer au niveau des plaques de Peyer par exemple.

Enfin, nous avons choisi de stimuler le système immunitaire avec deux techniques classiquement utilisées en immunologie : l'ovalbumine pour la réponse humorale et le LPS pour la réponse innée. Cependant, aucune étude n'avait, à notre connaissance, mis en place une procédure de stimulation LPS chez le lapin en croissance. Or, la réponse au LPS en termes d'inflammation est très variable selon la dose utilisée, le mode d'administration et surtout l'espèce étudiée. Nous avons donc mis en place une procédure de stimulation intrapéritonéale chez le lapin en croissance afin d'obtenir une réponse inflammatoire mesurable en termes de fièvre et de niveaux plasmatiques de TNF α (**Article 4**, p.175). De plus, cette technique nous a permis d'induire une réponse inflammatoire de type « bactérienne » sans avoir recours à la bactérie entière vivante, qui nécessite la mise en place de techniques de prophylaxie spécifiques afin d'éviter une contamination des parties adjacentes de l'installation expérimentale. L'utilisation d'une inoculation de souches pathogènes d'*E.coli* (EPEC) par exemple aurait cependant permis d'avoir des données plus précises sur la réponse physiologique du lapin restreint à une inflammation bactérienne classiquement observée en élevage. Ce type de stimulation avait été mis en place par

Martignon (2010), mais l'EPEC choisi était faiblement pathogène et n'avait pas permis de mettre en évidence un effet significatif de la restriction alimentaire sur la réponse immunitaire. L'utilisation d'un EPEC ayant une pathogénicité suffisante pour entraîner une inflammation et une fréquence de morbidité significative serait donc à envisager.

I.B.2. Méthode d'analyse du microbiote caecal

Afin d'évaluer l'activité du microbiote caecal nous avons eu recours à des techniques classiques de dosages des AGV et de l'ammoniac. Pour étudier la composition de la communauté bactérienne caecale nous avons choisi d'utiliser une approche moléculaire de séquençage haut débit, le séquençage 454. Il s'agit d'une méthode basée sur l'analyse des séquences d'ADN d'un gène marqueur de la diversité microbienne (ADNr 16S) qui permet d'étudier les espèces dominantes du microbiote en s'affranchissant des techniques culturales. En effet, l'absence de connaissances relatives à la physiologie de la grande majorité des bactéries recensées dans le caecum ne permet pas de les cultiver *in vitro*. Cette absence de connaissance constitue également une limite à l'analyse du microbiote chez le lapin. En effet, aucune affiliation taxonomique n'est possible jusqu'au genre ce qui rend les interprétations fonctionnelles de données difficiles.

II. OPTIMISATION DES STRATEGIES DE RESTRICTION ALIMENTAIRE

II.A. AMELIORER LES PERFORMANCES DE CROISSANCE ET DE RENDEMENT DES ANIMAUX RESTREINTS VIA UNE MODULATION DE LA QUALITE NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT

Dans le cadre de nos deux études, la restriction alimentaire à 75% de l'à volonté induisait, durant son application, une réduction de la croissance de 12 à 15%. Cette réduction de la croissance est nettement moins importante que la réduction théorique de 21% obtenue via les courbes de prédiction (**Figure 38**) de Gidenne et al. (2012b).

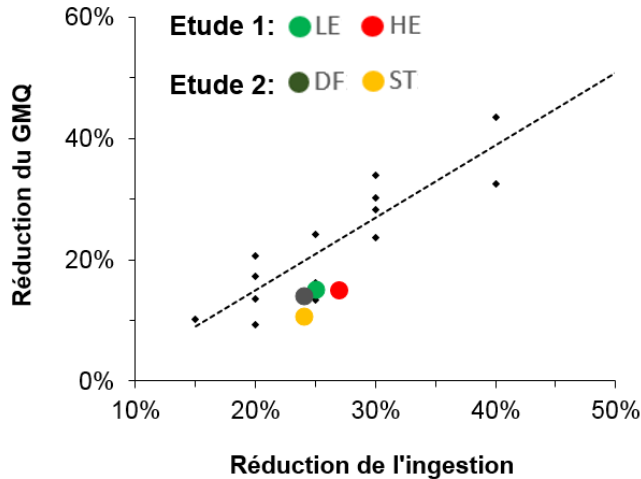


Figure 38 Diminution de la croissance selon le niveau de restriction alimentaire - comparatif de notre étude avec les études précédentes. Les points en noir représentent les études antérieures menées sur la restriction alimentaire (données issues de Gidenne et al 2012b).

Ceci est à corrélérer à l'utilisation d'aliments à forte concentration énergétique de nos deux études. En effet, l'utilisation d'un aliment énergétique a permis d'améliorer la croissance quel que soit le niveau d'ingestion (+2,6%, **Article 1**, p.102). Durant la période de restriction alimentaire, la croissance était très fortement corrélée à la quantité d'énergie digestible ingérée ($R^2=0,9$, **Figure 39**) et permet donc une meilleure prédiction de la croissance que le type d'aliment ou le niveau d'ingestion seul.

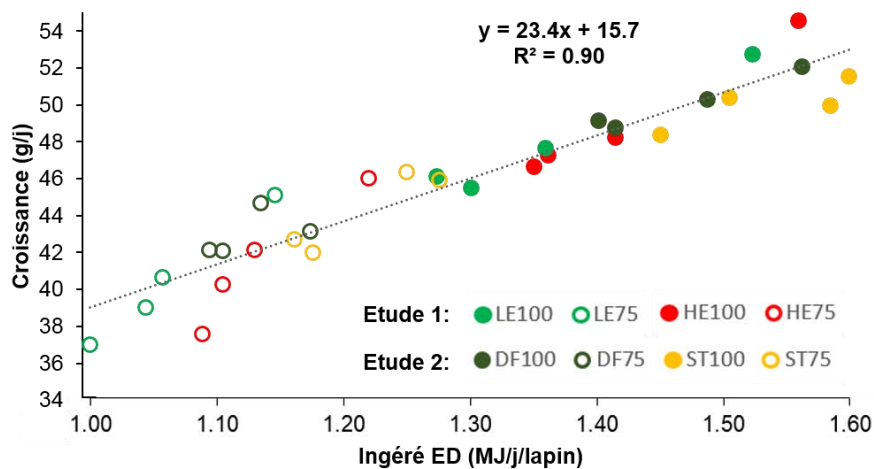


Figure 39 Effet de la quantité d'énergie digestible ingérée sur la croissance durant la période de restriction alimentaire (sevrage – 63/64 jours). Un point est équivalent à un lot pour un site (n=32).

La source de l'apport énergétique en revanche n'affecte que très modérément les performances de croissance durant l'application de la restriction alimentaire. La baisse de croissance induite par la restriction alimentaire est en effet accrue avec une augmentation du ratio fibres digestibles sur amidon (**Article 2**, p.127). L'amidon étant digéré en grande partie au niveau intestinal sa digestion profite entièrement à l'hôte. En revanche, la digestion des fibres digestibles s'effectue

principalement au niveau caecal via le microbiote commensal. On pourrait donc supposer que dans un contexte de restriction alimentaire, une plus grande part des nutriments d'un aliment riche en fibres digestible profite au microbiote plutôt qu'à l'hôte, induisant aussi des pertes énergétiques liées aux fermentations et donc une diminution de la croissance. De plus, malgré un effort de formulation à niveaux d'ED équivalents entre les trois aliments énergétiques, la mesure de la concentration en ED indique que l'aliment avec le plus faible ratio de fibres digestibles sur amidon était le plus concentré en ED. Les effets du ratio fibres digestibles sur amidon sont donc confondus avec le niveau d'ED et les conclusions sur l'effet de la source énergétique sur la croissance seraient à confirmer (**Article 2**, p.127).

Enfin, quel que soit l'aliment consommé, lors du retour à volonté les animaux restreints expriment une forte croissance compensatrice de l'ordre de 25 à 30% associée à une surconsommation de 14 à 17%. La forte concentration en ED induit une croissance compensatrice largement supérieure à celle observée dans des études antérieures (+20% en moyenne) avec des niveaux de restriction équivalents (Gidenne et al., 2012b). Malgré cette croissance compensatrice, la restriction alimentaire est associée à une réduction du poids en fin d'engraissement de 4 à 5%, quel que soit l'aliment utilisé. L'utilisation d'un aliment énergétique permet une augmentation du poids en fin d'engraissement de 1,5% (**Article 1**, p.102) alors que la source énergétique ne semble pas affecter le poids final. L'augmentation du ratio de fibres digestibles sur amidon est cependant associé à un accroissement du poids relatif du tractus digestif induisant une surestimation de la croissance réelle (**Article 2**, p.127). **L'ensemble de nos résultats suggère un impact à la fois de la quantité et de la qualité de l'apport d'énergie. Ainsi un aliment énergétique à base d'amidon permet d'optimiser les performances de croissance dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire suivie d'un retour à volonté.**

Comme attendu (Xiccato, 1999), la restriction alimentaire réduit le rendement à l'abattage de 0,7 à 1,1 points (**Article 1**, p.102 et **Article 2**, p.127). Ceci est en partie due à l'augmentation du poids relatif du tractus digestif de 1 à 1,5 points chez les animaux restreints comme observé par de nombreux auteurs (Bovera et al., 2008a; Ledin, 1984a; Perrier, 1998), pénalisant ainsi le rendement, malgré une diminution du poids relatif de la peau d'environ 1 point (Metzger et al., 2009; Perrier, 1998). L'augmentation du poids relatif du tractus digestif chez les animaux restreint s'explique par la surconsommation de 14 à 17% lors du retour à volonté. La limitation de l'ingestion réduit également l'adiposité des carcasses de 10 à 27% comme précédemment observé (Bovera et al., 2008a; Foubert et al., 2008; Perrier, 1998). L'augmentation du niveau énergétique de l'aliment permet d'augmenter le rendement quel que soit le niveau d'ingestion, et produit des

carcasses plus grasses. Des tests hédoniques pourraient être effectués afin d'évaluer la qualité des carcasses obtenues et leur acceptabilité auprès des consommateurs. Enfin, le rendement est pénalisé avec l'augmentation du ratio fibres digestibles sur amidon. En effet, le poids relatif du tractus digestif est augmenté avec l'utilisation d'aliments riches en fibres digestibles (**Article 2**, p.127) (Garcia et al., 1993) alors que le niveau d'ingestion reste équivalent. **Afin d'optimiser le rendement dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire, l'utilisation d'un aliment énergétique riche en amidon serait donc à préconiser.**

*Nos travaux démontrent ainsi que dans le **cadre d'une stratégie d'alimentation restreinte suivie d'un retour à volonté** un aliment riche en énergie digestible permet d'optimiser la croissance et le rendement à l'abattage, mais ne permet pas de rattraper entièrement le retard de croissance induit par la restriction alimentaire. De plus, un aliment riche en amidon serait favorable à la vitesse de croissance et, en particulier au rendement carcasse, de ces animaux.*

II.B. AMELIORATION DE L'EFFICACITE ALIMENTAIRE DES ANIMAUX RESTREINTS VIA UNE MODULATION DE LA QUALITE NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT

Le lapin régule son ingestion en partie en fonction de la concentration en énergie digestible de l'aliment (Gidenne et al., 2010c). En effet, nous avons montré que l'ingestion spontanée était réduite de 9% lorsque le niveau d'énergie digestible alimentaire était augmenté de 12,5%, induisant une augmentation de l'ingéré en énergie digestible de l'ordre de 4% (**Article 1**, p.102). La régulation de l'ingéré ne serait donc pas parfaitement proportionnelle. Cette hypothèse a pu être validée dans notre deuxième étude où un écart d'énergie digestible de 4% entre nos deux aliments n'induisait pas de diminution de l'ingestion (**Article 2**, p.127). Comme nous avons pu le montrer précédemment, la croissance est fortement corrélée à l'ingestion d'énergie digestible (**Figure 39**). L'utilisation d'aliments hauts en énergie induit donc une croissance accrue, associée à une consommation réduite, conduisant à une réduction de l'indice de consommation de 11%. De façon analogue, la réduction de croissance induite par la restriction alimentaire étant plus faible que la réduction de l'ingestion, l'indice de consommation est réduit de 12% avec la restriction alimentaire par rapport à l'ingestion à volonté dans le cadre de nos deux études, confirmant les résultats obtenus dans les études antérieures sur la restriction alimentaire (Gidenne et al., 2012b). Lors du retour à volonté, les animaux précédemment restreints expriment une forte croissance compensatrice de l'ordre de 25 à 30% associée à une surconsommation de 14 à 17% induisant une réduction de l'indice de consommation pour les animaux précédemment

restreints de 11% par rapport aux animaux nourris à volonté. **L'utilisation d'un aliment énergétique dans le cadre de stratégies de restriction alimentaire permettrait donc d'améliorer l'efficacité alimentaire alors que l'origine de l'apport énergétique ne semble pas l'affecter.**

II.C. AMELIORATION DES PERFORMANCES DES ANIMAUX RESTREINTS VIA UNE MODULATION DE LA QUALITE NUTRITIONNELLE DE L'ALIMENT SANS PENALISER LES PARAMETRES SANITAIRES

Après sevrage, une ingestion réduite de 20% permet de diminuer la mortalité par troubles digestifs, alors que la morbidité ne serait diminuée qu'à partir d'une ingestion réduite de 30% (Gidenne et al., 2009b). Ces effets bénéfiques sur la santé sont cependant très variables d'une étude à une autre, selon les conditions sanitaires, les pathologies rencontrées et la composition chimique des aliments (pour synthèse, Gidenne et al., 2012b). Notre dispositif expérimental a mis en évidence cette variabilité (**Figure 40**). Nous avons ainsi analysé de manière séparée les effets de nos stratégies alimentaires selon les conditions sanitaires des stations expérimentales. Les conditions sanitaires étaient considérées comme favorables lorsque la mortalité était inférieure à 2% et la morbidité à 6%, alors qu'elles étaient considérées comme défavorables lorsque la mortalité était comprise entre 10 et 25% et la morbidité entre 11 et 25%.

Dans des conditions sanitaires défavorables, la restriction alimentaire n'a pas affecté la mortalité ou la morbidité dans le cadre de notre première étude (**Article 1**, p.102) alors que la mortalité était réduite de plus de la moitié dans notre deuxième étude (**Article 2**, p.127). Cette différence peut être corrélée à la fréquence de suspicion d'EEL qui était plus importante dans le cadre de la deuxième étude (26% vs 5%). En effet, la restriction alimentaire permet de réduire les troubles digestibles induits par l'EEL lors de son inoculation expérimentale (Boisot et al., 2005; Boisot et al., 2003) ou lors d'infections spontanées (Gidenne et al., 2009b). L'efficacité de la restriction alimentaire envers les diarrhées colibacillaires serait moindre, bien que cela n'ait jamais été démontré expérimentalement. Dans de bonnes conditions sanitaires en revanche, la restriction alimentaire n'affectait pas la mortalité quel que soit l'étude alors que la morbidité était réduite de près de la 70% dans la première étude (**Article 1**, p.102). L'analyse conjointe des résultats de nos deux études a permis d'augmenter l'échantillonnage et d'accéder à la variabilité de la mesure des paramètres sanitaires. Dans des conditions sanitaires défavorables la restriction alimentaire permet ainsi de réduire la **mortalité** d'un tiers environ alors que dans de bonnes conditions sanitaires seule la **morbidité** serait réduite par le biais de la restriction alimentaire de l'ordre de 40% (**Figure 40**). **Dans les deux cas de figure, la restriction alimentaire permet de réduire l'index**

de risque sanitaire (-46% dans de bonnes conditions sanitaires et -16% dans de mauvaises conditions sanitaires).

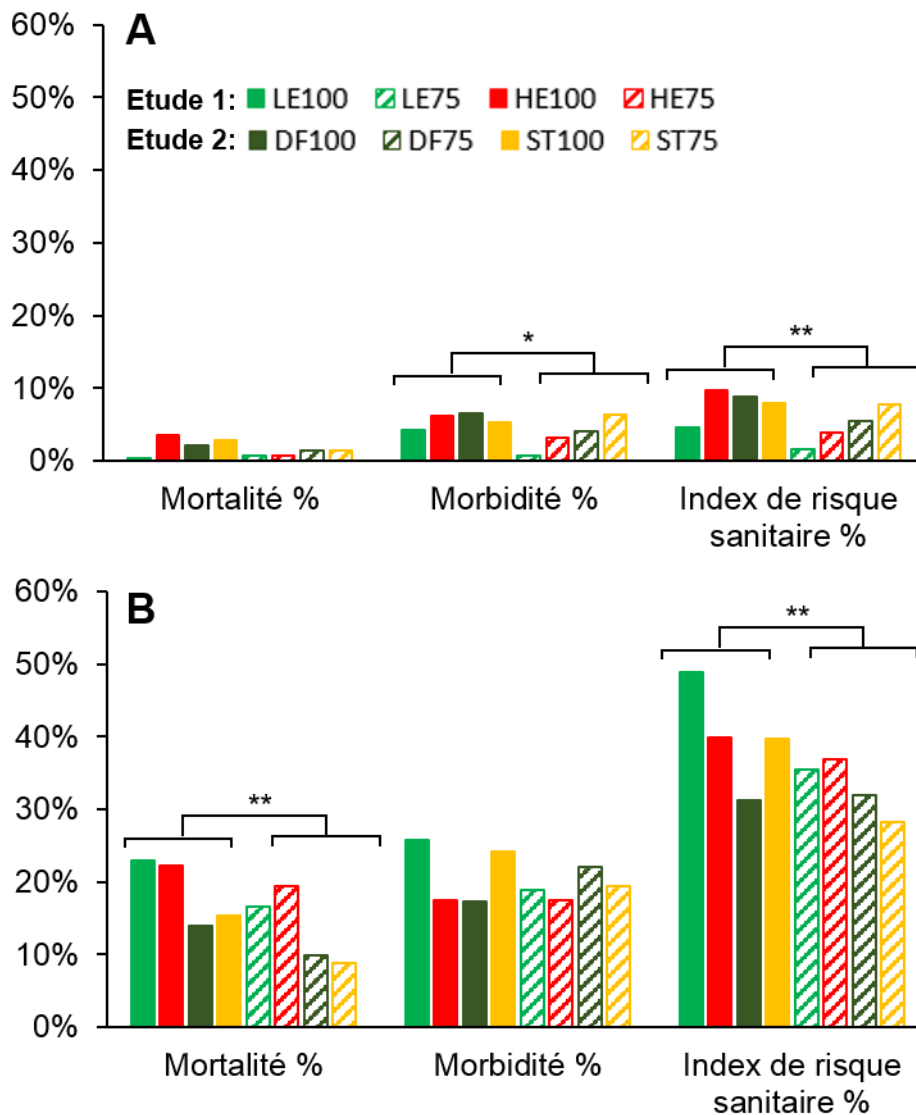


Figure 40 Résultats sanitaires sur la période totale d'engraissement selon le niveau d'ingestion et l'aliment sur les sites avec des conditions sanitaires favorables (A) ou défavorables(B). Résultats par lots pour les deux études (n = 2 sites/étude/statut sanitaire). Différence entre les lots nourris à volonté et restreints: ** P<0.01; * P<0.05.

L'utilisation d'un aliment à forte concentration en ED n'affecte pas la mortalité ou la morbidité dans des conditions sanitaires défavorables, alors qu'elle augmente la morbidité de près de la moitié dans de bonnes conditions sanitaires (Article 1, p.102). Cependant, aucune corrélation entre l'ingéré d'ED et les paramètres sanitaires n'a pu être mise en évidence durant la période de restriction alimentaire dans le cadre de nos deux études (Figure 41). Ce n'est donc pas la

réduction de la quantité d'énergie digestible ingérée qui est à l'origine des effets bénéfiques de la restriction alimentaire mais bien la réduction quantitative d'aliment ingéré.

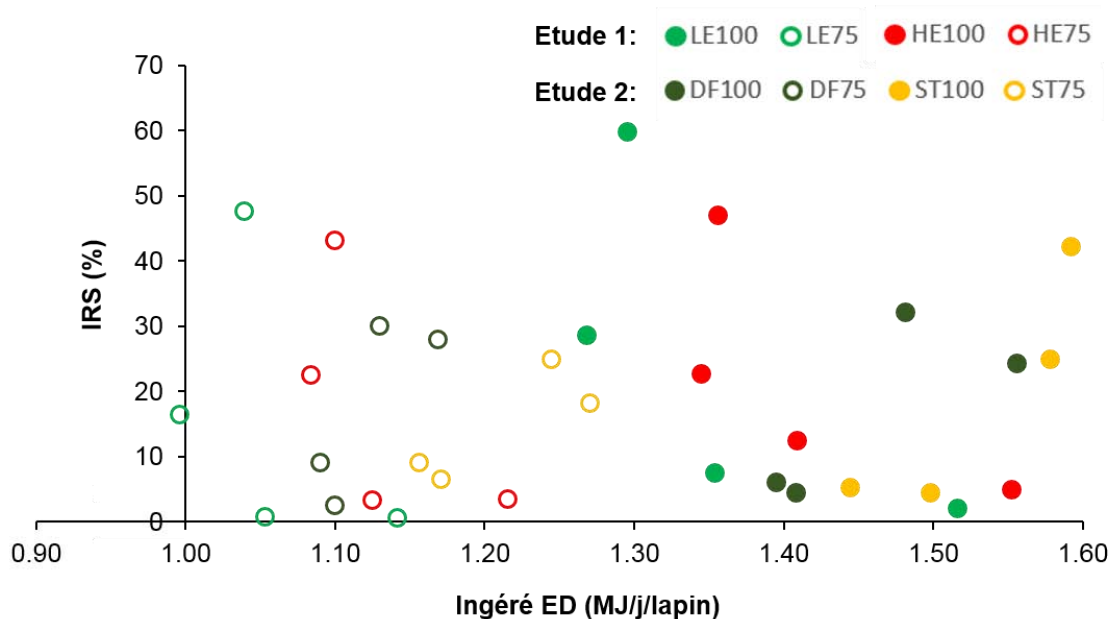


Figure 41 Effet de la quantité d'énergie digestible ingérée sur l'index de risque sanitaire durant la période de restriction alimentaire (sevrage – 63/64 jours). Un point est équivalent à un lot pour un site (n=32).

La source de l'apport énergétique semble en revanche affecter les paramètres sanitaires. En effet, l'augmentation du ratio fibres digestibles sur amidon réduit la morbidité dans le cadre d'une ingestion à volonté alors qu'il ne l'affecte pas avec une alimentation restreinte à 75% de l'à volonté (**Article 2**, p.127). Les effets bénéfiques sur la santé digestive de la restriction alimentaire et d'un aliment riche en fibres digestibles ne semblent donc pas pouvoir s'additionner. Une hypothèse serait que ces deux leviers agiraient de manière similaire sur certains paramètres de la santé digestive, via une modulation de la population et de l'activité microbienne par exemple, résultant en des effets semblables et non additifs. Cette hypothèse sera développée dans la partie III. Enfin, la mortalité due aux troubles digestifs est numériquement moindre avec l'aliment riche en fibres digestibles. (87% vs 96% des cas de mortalité). **Une diminution du ratio fibres digestibles sur amidon semble augmenter les troubles digestifs chez les animaux nourris à volonté, comme mis en évidence par d'autres auteurs (Jehl and Gidenne, 1996; Perez et al., 2000b) alors que celui-ci ne semble pas affecter les paramètres sanitaires chez les animaux restreints. L'utilisation d'un aliment riche en amidon, mais respectant les apports recommandés en ADF, serait donc envisageable chez des animaux restreints sans pénaliser les paramètres sanitaires.**

Ces résultats nous permettent d'avancer l'hypothèse que, dans un contexte de pathologies digestives (diarrhées aiguës et EEL), les effets bénéfiques d'une stratégie de restriction alimentaire sur la santé seraient principalement induits par la baisse de la masse d'aliment ingéré et non une diminution de l'ingéré énergétique.

*De plus, dans le cadre **d'une stratégie d'alimentation restreinte suivie d'un retour à volonté** un aliment énergétique riche en amidon (sans diminuer les apports en ADF) permet d'optimiser la croissance et le rendement sans pénaliser les paramètres sanitaires.*

Compte tenu de ces résultats de nouvelles stratégies d'alimentation peuvent d'ores et déjà être envisagées. En effet, la période critique pour les troubles digestifs se situe dans les deux premières semaines post-sevrage. Il serait donc envisageable d'appliquer une stratégie de restriction alimentaire sur cette période uniquement, avec un retour à volonté plus précoce afin de favoriser la croissance et le rendement à l'abattage. De plus, la concentration en énergie digestible de l'aliment n'ayant pas eu d'effets délétères sur le statut sanitaire, une augmentation supplémentaire de celle-ci serait également envisageable. L'objectif serait alors de tracer la courbe réponse permettant de définir l'intervalle des valeurs d'énergie digestible optimale à la croissance et à la santé digestive dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire. Une augmentation du niveau énergétique de l'aliment permettrait en outre de préciser notre équation de prédiction de la croissance selon l'ingéré en énergie digestible pour des fortes valeurs d'énergie digestible, afin d'obtenir des niveaux d'ingestion énergétiques équivalents à ceux obtenus avec une alimentation à volonté.

III. PHENOMENES PHYSIOLOGIQUES SOUSJASCENTS AUX EFFETS BENEFIQUES DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LA SANTE ET L'EFFICACITE ALIMENTAIRE

III.A. STRATEGIES ALIMENTAIRES ET MODULATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE DU LAPIN EN CROISSANCE

Notre étude n'a pas montré d'effet de la restriction alimentaire quantitative sur la croissance des organes lymphoïdes secondaires, à savoir la rate, l'appendice caecale et les plaques de Peyer, comme précédemment montré chez la souris (Rogers et al., 2008). Martignon (2010) avait mis en évidence une croissance légèrement pénalisée de l'appendice caecale avec la restriction alimentaire, alors que celle de la rate et des plaques de Peyer n'était pas affectée. De manière

analogue, dans notre étude, la concentration énergétique de l'aliment n'affectait pas la croissance de ces organes (**Article 3**, p.150). **Le développement des organes lymphoïdes ne serait donc pas, ou peu, pénalisé par des réductions modérées de la masse d'aliment ingérée ou de sa concentration en énergie digestible.**

L'inflammation constitue un élément important de la première ligne de défense de l'organisme : la réponse innée. La fièvre et les cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1 β , IL-6 et IL-8 et anti-inflammatoires telles que IL-10 en sont des marqueurs reconnus. Nos études ne nous ont pas permis de mettre en évidence d'effets significatifs du niveau d'ingestion ou d'énergie digestible de l'aliment sur la réponse inflammatoire, avec ou sans stimulation (**Article 3**, p.150 et **Article 4**, p.175).

En effet, sans stimulation de l'inflammation, l'expression de cytokines pro (TNF α , IL-1 β et IL-8) et anti-inflammatoires (IL-10), au niveau de l'iléon, était très faiblement affectée par le niveau d'ingestion ou d'énergie digestible de l'aliment. Ces résultats contrastent avec ceux de Lara-Padilla et al. (2011) et Kurki et al. (2012) qui ont montré une régulation de l'expression des cytokines avec la restriction alimentaire dans le duodénum et le tissu adipeux de la souris. Leurs résultats n'indiquent cependant pas une réorientation claire vers une réaction pro ou anti-inflammatoire. En effet, Lara-Padilla et al. (2011) et Kurki et al. (2012) ont montré une augmentation conjointe de l'expression de TNF α et IL-10 avec la restriction alimentaire, deux cytokines aux effets, a priori, opposés. **Le niveau d'ingestion ou d'énergie digestible de l'aliment ne semble donc pas avoir un effet constant sur l'inflammation en absence de stimulation extérieure.**

Lors d'une stimulation de l'inflammation via une injection de LPS, le niveau d'ingestion ne semble pas affecter la réponse inflammatoire en termes de fièvre ou de niveaux plasmatiques de TNF α (**Article 4**, p.175). MacDonald et al (2012; 2011) ont cependant montré chez la souris et le rat une nette diminution de l'intensité et de la durée de la fièvre post-injection de LPS avec une restriction alimentaire de 25 à 50%. De façon analogue, Matsuzaki et al. (2001) ont montré une réduction de la concentration plasmatique en TNF α avec une restriction alimentaire de 40% chez la souris. Il semblerait donc que les effets de la restriction alimentaire sur la réponse inflammatoire ne soient pas analogues entre les rongeurs et les lagomorphes. **Dans une situation d'infection "simulée", l'effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la santé ne serait pas dû à une réduction de l'inflammation.**

Il est cependant important de noter que les lignées de souris utilisées en expérimentation animale ont un haut niveau de consanguinité, réduisant la variabilité interindividuelle. Ceci n'est pas le cas

chez le lapin, ou la variabilité de réponse mesurée (température et TNF α plasmatique) était très élevée. L'utilisation d'effectifs plus importants permettrait donc de confirmer ou infirmer nos conclusions.

Enfin, notre étude a montré que la restriction alimentaire ainsi que le niveau d'énergie digestible de l'aliment modulent la réponse immunitaire spécifique du lapin en croissance (**Article 3**, p.150). La réduction de l'ingéré et de l'énergie digestible réduit ainsi la concentration en IgA fécaux confirmant les résultats obtenus précédemment chez la souris soumise à une restriction alimentaire de longue durée (Lara-Padilla et al., 2011; Muthukumar et al., 2000). Dans le cadre d'une restriction longue, la diminution des sécrétions d'IgA serait due à une diminution du nombre de cellules productrices d'IgA et non à une réduction du transport vers le lumen (Lara-Padilla et al., 2011). Notre étude est cependant la première à mettre en évidence un effet de la restriction alimentaire de courte durée sur les niveaux d'IgA fécaux. On observe également une corrélation entre l'ingéré énergétique moyens et les niveaux d'IgA fécaux moyens à 50 et 63 jours d'âge (**Article 3**), ce qui suggère que **la sécrétion d'IgA serait d'abord modulée par la quantité d'énergie digérée, et donc potentiellement assimilée, et non par la masse d'aliment ingéré.**

Les IgA constituent la première ligne de défense de l'épithélium digestif. Une diminution de leur concentration n'est donc pas intuitivement associée à un effet bénéfique sur la santé digestive. Muthukumar et al (2000) ont cependant montré que la réduction en IgA sous-mandibulaires induite par la restriction alimentaire était associée à une diminution de l'apparition de maladies chez les souris auto-immunes. Ceci pourrait donc indiquer un effet positif sur la santé de la réduction des IgA fécaux. Cette hypothèse reste cependant à valider, les effets bénéfiques de la restriction alimentaire pouvant aussi se manifester malgré, et non pas grâce à, la réduction des sécrétions d'IgA digestifs.

Notre étude a montré que la restriction alimentaire réduit également la réponse immunitaire systémique après 4 semaines d'application pour les IgA et lors du retour à volonté pour les IgG. Ceci semble indiquer que la réduction de l'ingestion affecte tout d'abord l'immunité digestive locale, puis la réponse systémique de façon plus tardive, comme l'indique également les travaux de Zhu et al. (2013). De plus, comme indiqué par Metcalfe et al. (2001), la croissance compensatrice observée lors du retour à volonté peut avoir des conséquences délétères sur d'autres paramètres physiologiques. On peut donc émettre l'hypothèse que la proportion de

l'énergie ingérée allouée à l'immunité systémique est réduite lors du retour à volonté au profit de la croissance. Enfin, la réponse spécifique à un antigène donné (ici l'ovalbumine) est fortement réduite par la réduction de l'ingestion après quatre semaines d'application. Une réduction similaire avait été observée avec une restriction alimentaire de 30% par Martin et al. (2007) chez les souris immunisée au KLH (Keyhole limpet hemocyanin). **Ces résultats semblent donc indiquer que la réponse et la mémoire immunitaire sont des processus coûteux en énergie.** En effet, les besoins énergétiques d'entretien seraient augmentés de 30% chez la souris pour répondre à un challenge type KLH ou ovalbumine (Lochmiller and Deerenberg, 2000).

Tableau 35 Besoins moyens d'entretien durant la période de restriction alimentaire (sevrage - 63/64 jours d'âge).

	A volonté				Restreints			
	LE100	HE100	DF100	ST100	LE75	HE75	DF75	ST75
Poids vif moyen (kg)	1.716	1.7315	1.7495	1.746	1.604	1.6145	1.6465	1.668
Ingestion ED (kJ/J/lapin)	1368	1424	1469	1539	1063	1135	1129	1217
% ED pour l'entretien	47	46	45	42	58	54	55	52
Ingestion PD (g/j/lapin)	15.2	16.0	16.3	16.8	12.0	12.8	13.0	13.3
% PD pour l'entretien	29	27	27	26	35	32	33	32

Les besoins énergétiques d'entretien du lapin en croissance ont été estimés à 430 kJ d'ED/kg PV^{0,75} alors que les besoins protéiques ont été estimés à 2,9 g de PD/kg PV^{0,75} (Xiccato and Trocino, 2010). Comme attendu (Xiccato and Trocino, 2010), dans nos deux études, durant les quatre premières semaines post-sevrage, chez les lapins nourris à volonté les besoins d'entretiens représentaient 45% en moyenne de l'ingestion d'énergie digestible et 27% de celle en protéines digestibles. Chez les lapins restreints (à 75% de l'à volonté) cette proportion allouée aux besoins d'entretien était augmentée d'environ 10% pour l'énergie et 6% pour les protéines (**Tableau 35**). Les animaux soumis à une restriction alimentaire modérée ne sont donc pas en forte carence protéique ou énergétique. Cependant, la proportion d'énergie et de protéines allouée aux besoins d'entretien étant augmentée, celle destinée à la croissance est diminuée, expliquant ainsi la diminution de croissance observée avec la restriction alimentaire. Dans nos études, les aliments avaient également été formulés pour couvrir les besoins en acides aminés essentiels et en vitamines du lapin en croissance quel que soit son niveau d'ingestion (**Annexe 6**). Les teneurs réelles des aliments en ces éléments n'ayant pas été mesurées, nous ne pouvons pas déterminer si les besoins ont réellement été couverts chez les animaux restreints. Enfin, la balance entre immunité et croissance n'est pas clairement établie (Brzek and Konarzewski, 2007; Lochmiller and Deerenberg, 2000). La réponse immunitaire pourrait donc être pénalisée par la restriction alimentaire malgré une bonne couverture des besoins d'entretien.

Le développement d'une réponse inflammatoire représente un coût équivalent au développement d'une réponse spécifique (Lochmiller and Deerenberg, 2000) et nous n'avons pas pu mettre en évidence de diminution de l'inflammation avec la restriction alimentaire suite à une stimulation LPS. Une autre hypothèse serait alors une action indirecte de la restriction alimentaire, via des variations en nutriments ou signaux métaboliques, sur la réponse spécifique. En effet, la restriction alimentaire provoque chez le lapin en croissance une consommation de sa ration en un temps limité (Martignon, 2010), induisant une augmentation de la durée du jeûne et la sensation de faim et par conséquent une modification des sécrétions hormonales. La leptine, par exemple, est une hormone produite en proportion de l'ingéré responsable de la sensation de satiété. En conditions de restriction alimentaire son taux va diminuer, engendrant une réduction des dépenses métaboliques, mais aussi une réduction de la production des cytokines Th1 (IFN γ , IL-2 et TNF β) et de la prolifération des cellules T naïves (Demas and Sakaria, 2005; Kau et al., 2011; Matarese and La Cava, 2004). De façon analogue des hormones comme la ghréline ou l'insuline modulent aussi la réponse immunitaire (Matarese and La Cava, 2004; Xia et al., 2004). Il a ainsi été montré chez la souris que la ghréline, sécrétée durant le jeûne, permettait de réduire l'inflammation du tractus digestif lors d'un épisode diarrhéique (Gonzalez-Rey et al., 2006). Ces éléments nous donnent une piste supplémentaire pour expliquer l'effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la santé digestive, mais ils restent à étudier chez le lapin en croissance afin de mieux comprendre les relations entre restriction alimentaire et immunité.

III.B. STRATEGIES ALIMENTAIRES ET MODULATION DU MICROBIOTE CAECAL ET DE SON ACTIVITE FERMENTAIRE

Nous avons mis en évidence des variations des paramètres physico-chimiques du biotope caecal et une modulation de l'activité microbienne associées à la limitation de l'ingestion (**Article 5**, p.193 et **Figure 42**).

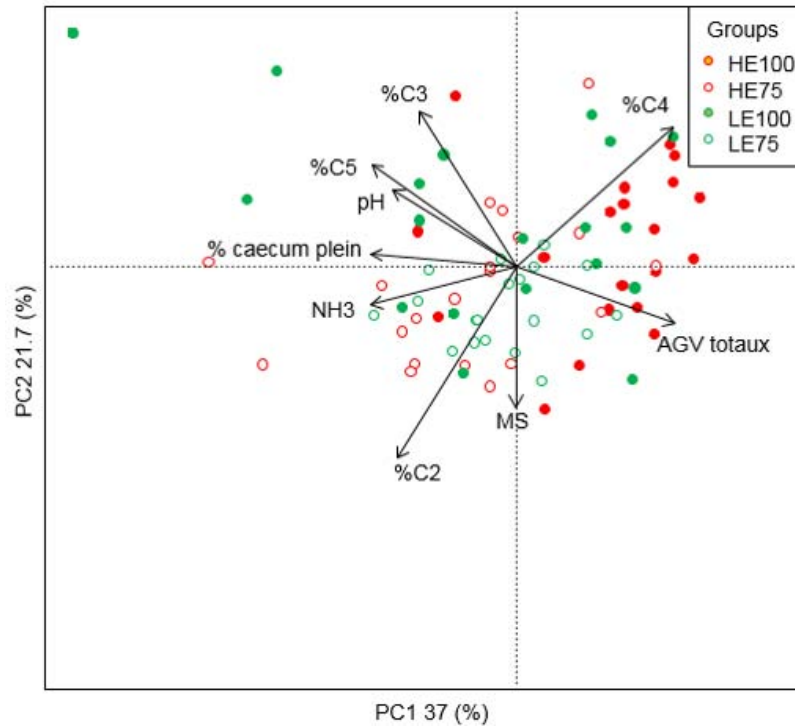


Figure 42 Approche ACP des paramètres du biotope caecal chez les lapins âgés de 42 et 49 jours d'âge

Chaque point représente un individu. L'ACP (Analyse en composantes principales) permet d'expliquer plus de 58% de la variabilité du jeu de données. Les flèches représentent les variables explicatives (plus la flèche est longue plus la variable est explicative). Les animaux restreints (ronds vides) semblent ainsi se distinguer des animaux nourris à volonté (ronds pleins) par les axes 1 et 2 corrélés principalement aux pourcentages de C2 (acétate) et C4 (butyrate).

La restriction alimentaire est associée à une augmentation de la concentration caecale en ammoniac une semaine après le sevrage alors que ces effets semblent se dissiper avec l'âge. Or, la restriction alimentaire modifie le rythme d'ingestion du lapin avec une consommation rapide de l'aliment en un temps limité (<7 heures) (Martignon, 2010). Ceci conduit à un flux d'azote important sur une courte période, alors que le système digestif n'est pas encore complètement mature, et pourrait conduire à un flux plus élevé d'azote au niveau caecal, induisant une augmentation du niveau d'ammoniac. Martignon (2010) a également pu observer cet effet de la restriction alimentaire à 50 jours d'âge. La restriction alimentaire modifie également le profile fermentaire avec une augmentation de la proportion d'acétate et une diminution de celle en butyrate sans modification du pH caecal ou de la concentration en AGV totaux. L'application d'une restriction alimentaire avec un aliment peu énergétique diminuerait également la proportion de propionate. Comme pour la concentration en ammoniac, la modification du rythme d'ingestion pourraient être responsable des modifications de profils fermentaires. Cependant, Martignon (2010) a pu observer des effets similaires de la restriction alimentaire sur le profil fermentaire avec une distribution de l'aliment en 1 ou 13 fois sur la

journée. Ceci semble donc indiquer que les paramètres caeaux sont modifiés par la quantité totale journalière ingérée, et ne seraient pas liés à la durée du jeûne. De plus, les modifications de profils fermentaires observés avec la restriction alimentaire sont analogues à ceux observées avec une augmentation du taux d'incorporation de fibres alimentaires (Trocino et al., 2013) induisant une réduction des troubles digestifs chez le lapin en post sevrage (Gidenne, 2003). L'effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la santé digestive pourrait donc être associé à une modification de l'activité microbienne. En revanche, la concentration en ED de l'aliment affecte uniquement le pH qui est réduit avec un aliment énergétique. Cette réduction est potentiellement associée au fort taux d'incorporation de fibres digestibles dans cet aliment, qui seraient rapidement fermentées et pourraient entraîner une plus forte acidité (Trocino et al., 2013). **L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la modulation de l'activité microbienne caecale par la restriction alimentaire serait liée à la masse d'aliment ingérée sur la journée, et non à la quantité d'énergie digérée ou à la durée du jeûne.**

Malgré une modulation de l'activité microbienne caecale, la structure, la diversité et la richesse des populations bactériennes majoritaires de l'écosystème caecal ne semblent pas affectées par la restriction alimentaire, confirmant les résultats obtenus précédemment chez des lapins de 52 (Martignon et al., 2010) et 63 jours d'âge (Massip et al., 2012). La restriction alimentaire n'induirait donc pas de modifications de la vitesse de maturation du microbiote digestif. La diversité serait quant à elle réduite avec un aliment énergétique. Toutefois, ceci pourrait être corrélé à la plus haute concentration en fibres digestibles et fibres solubles de cet aliment, pouvant moduler la composition de la communauté bactérienne, comme cela est le cas avec une modulation de la teneur en ADF (Michelland et al., 2011). La proportion de certaines familles et genres est toutefois modifiée par la restriction alimentaire et la concentration énergétique de l'aliment (**Article 5**, p.193). Ces modifications sont difficiles à corréler aux effets de nos traitements. En effet, peu d'informations sont disponibles sur les fonctions de ces bactéries, d'autant plus qu'au sein d'une même famille ou genre plusieurs fonctions coexistent. De plus, la restriction alimentaire et la concentration énergétique de l'aliment peuvent affecter le microbiote digestif de manière directe ou indirecte (disparition d'une bactérie minoritaire, modification d'un signal métabolique,...) (Willing et al., 2011). Nous pouvons cependant formuler trois hypothèses quant à l'effet de la restriction alimentaire et du niveau énergétique de l'aliment sur la composition du microbiote caecal : i) Celle-ci pourrait être modulée via une réduction de la quantité, ou une modification de la qualité, des nutriments disponibles. En effet, la modification des substrats disponibles pourrait favoriser ou défavoriser certaines espèces bactériennes ; ii) Nos traitements peuvent avoir modifié

le métabolisme de l'hôte qui à son tour modulerait l'activité du microbiote caecal et sa composition ; iii) Nos traitements induisent une modification des paramètres physico-chimiques du caecum créant ainsi une niche écologique plus ou moins favorable au développement de certaines espèces bactériennes. Cet effet pourrait également être une conséquence secondaire de la modulation de la qualité et de la quantité de nutriments disponibles au niveau caecal.

Enfin, nos études ne nous ont pas permis de corrélérer de façon précise les modifications d'abondances de certaines familles ou genres par la restriction alimentaire et ses effets bénéfiques sur la santé digestive puisque seuls les animaux sains ont été prélevés. Nous avons cependant pu noter la réduction de l'abondance du genre *Lachnospiraceae Acetitomaculum* avec la restriction alimentaire. Une forte abondance de ce genre est associée à des phénomènes d'acidose chez les ruminants (Petri et al., 2013), et a été observée chez les deux animaux malades écartés de notre étude. La réduction de l'abondance d'*Acetitomaculum* avec la réduction de l'ingestion serait donc potentiellement corrélée à une amélioration de la santé digestive. Les modifications des paramètres caecaux étant principalement induits par la masse d'aliment ingérée sur la journée, et non par la quantité d'ED digérée ou la durée du jeûne, on pourrait supposer qu'il en aille de même pour les modifications de composition du microbiote. Dans le cadre de la restriction, la quantité d'énergie et de protéines disponibles est d'autant plus réduite au niveau caecal que la digestion intestinale est plus importante, ainsi que cela a été montré chez le poulet (chez le poulet, Duarte et al., 2011; Gilbert et al., 2008), et comme on peut le suspecter chez le lapin. On peut ainsi avancer l'hypothèse qu'au niveau caecal, l'énergie serait disponible uniquement sous forme de fibres et d'endogène. Comparativement aux bactéries commensales, les bactéries pathogènes seraient ainsi défavorisées, au plan "nutritionnel" moins adaptées, et auraient de plus grandes difficultés à s'implanter, conduisant à une réduction de la fréquence des troubles digestifs avec la restriction alimentaire. En parallèle, signalons que chez le lapin adulte, la faible fréquence de troubles digestifs pourrait aussi s'expliquer par cette hypothèse: En effet, la maturité digestive serait optimale chez l'adulte, recentrant donc les apports énergétique pour le microbiote caecal aux apports de fibres et d'endogènes, favorisant un microbiote commensal bien adapté et résistant à l'implantation de populations microbiennes pathogènes. Enfin, l'étude du microbiote caecal par séquençage 454 ne nous a permis « que » d'évaluer l'effet de nos traitements sur l'abondance des taxons majoritaires, sans indication de leur activité. Des études récentes du microbiote humain (D'Auria et al., 2013) ont montré l'importance d'analyser les populations bactériennes actives, à savoir les bactéries produisant de l'ARN. En effet, ces auteurs ont montré une grande dissemblance de distribution taxonomique entre l'évaluation des populations actives et celle de la population bactérienne totale. De plus, jusqu'à 20% de la

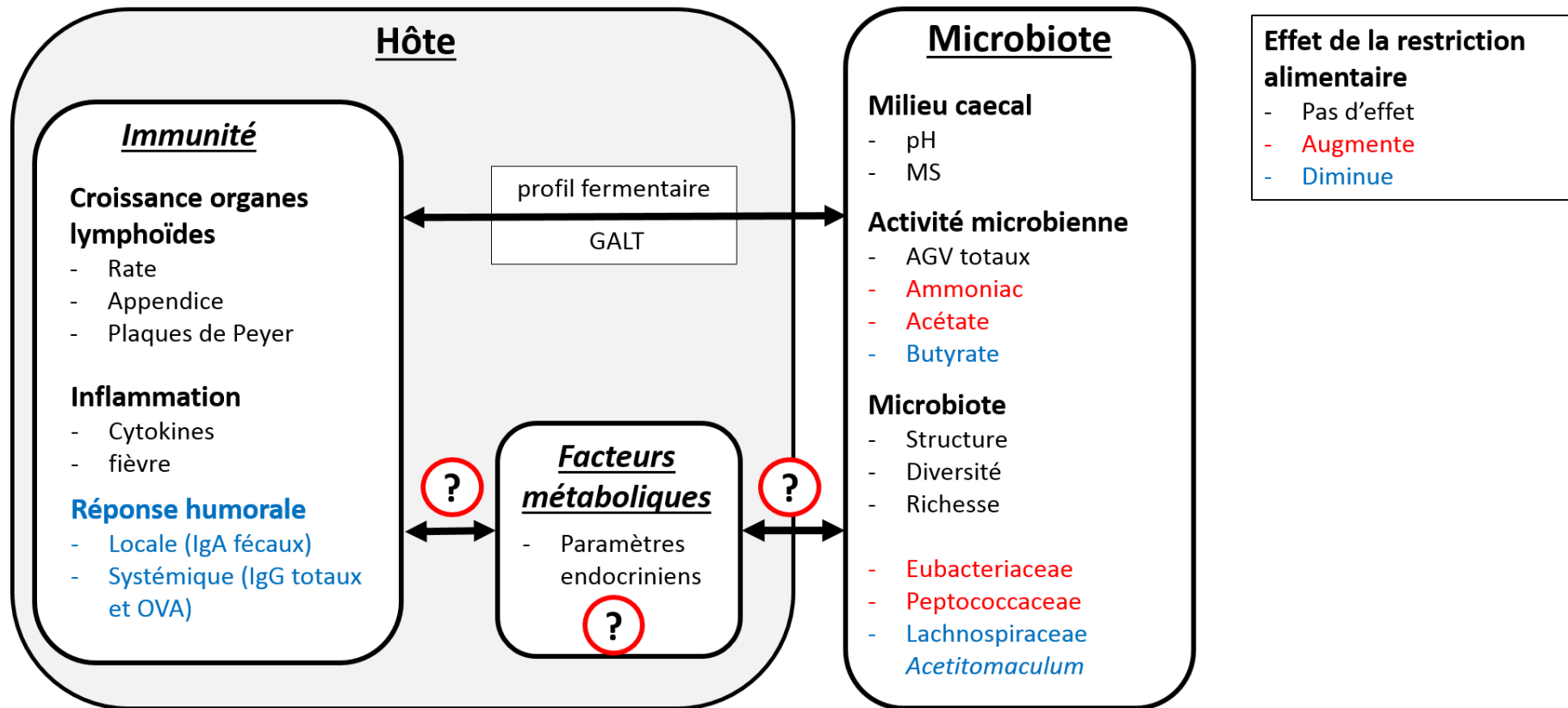
population active serait représentée par des taxons minoritaires (abondance relative <1%), dont la diversité est masquée par les taxons majoritaires dans le cadre de nos analyses. Une étude des populations actives, et donc par la même occasion des taxons minoritaires, pourrait donc apporter une meilleure visibilité sur l'effet de la restriction alimentaire sur l'écosystème caecal.

Indépendamment de nos traitements, nous avons pu corrélérer la composition du microbiote caecal, son activité et les paramètres immunitaires mesurés (**Article 5**, p.193). Dès lors, les paramètres mesurés du GALT (IgA fécaux, taille des plaques de Peyer et poids relatif de l'appendice caecale) seraient corrélés positivement à la quantité d'AGV et à la proportion de butyrate et négativement à la proportion d'acétate. Une hypothèse serait que le profil fermentaire pourrait être un bon indicateur du développement du GALT, d'autant plus qu'une augmentation de la proportion d'acétate et une diminution de celle en butyrate serait associée à une amélioration du statut sanitaire. La combinaison de l'utilisation d'outils de mesure plus performants et à plus large spectre (puce d'expression, RNAseq) des paramètres immunitaires digestifs sur les sites effecteurs (plaque de Peyer par exemple) permettrait de confirmer ces résultats.

*Les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé digestive seraient liés à la diminution de la masse d'aliment ingérée, et non à une diminution de l'ingéré énergétique. Il semblerait en revanche que l'immunité humorale soit plus affectée par le niveau d'ingéré énergétique. La restriction alimentaire réduirait la production d'IgA intestinaux et inhiberait également l'immunité systémique via une réduction des IgA et IgG circulants alors que la réponse inflammatoire ne serait pas affectée par le niveau d'ingestion (**Figure 43**).*

Les relations entre les mesures physiologiques et les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé digestive ne sont cependant pas claires. En effet, des paramètres métaboliques, comme la ghréline ou leptine, pourraient intervenir comme médiateur entre le niveau d'ingestion et les paramètres mesurés.

L'activité du microbiote caecal est quant à elle modulée par la masse d'aliment ingérée, et non par la quantité d'énergie digérée ou la durée du jeune. La structure, la diversité et la richesse du microbiote caecal ne semblent pas modifiées par la restriction alimentaire, mais elle module l'abondance de certaines familles et certains genres, ayant un impact important potentiel sur la santé de son hôte.



Effet de la restriction alimentaire

- Pas d'effet
- Augmente
- Diminue

Figure 43 Effets physiologiques de la restriction alimentaire chez le lapin en croissance.

Nos études nous ont permis de montrer une diminution de la réponse humorale avec la restriction alimentaire alors que la croissance des organes lymphoïdes et la réponse inflammatoire ne semblent pas affectées par le niveau d'ingestion. L'activité du microbiote caecal est modulée avec une modification du profil fermentaire (↑acétate et ↓ butyrate) alors que la structure du microbiote ne semble pas affectée malgré une modulation de l'abondance de certaines familles et genres bactériens. Nous avons également pu montrer une corrélation positive entre le GALT la proportion de butyrate, corrélés négativement à la proportion d'acétate. En revanche nos études ne nous ont pas permis d'étudier les effets de la restriction alimentaire sur les facteurs métaboliques (paramètres endocriniens tels que la ghréline et la leptine notamment) et ses interactions avec le microbiote et l'immunité, et restent donc à étudier.

III.C. STRATEGIES ALIMENTAIRES ET MODULATION DE L'EFFICACITE DIGESTIVE

La limitation de l'ingestion permet d'améliorer l'efficacité digestive des nutriments (énergie et protéines principalement). Cependant, comme suggéré dans le travail de synthèse de Gidenne et al. (2012b) cette amélioration est sujette à de très fortes variations. L'aliment utilisé impact fortement sur la digestibilité. En effet, l'amélioration de la digestibilité est augmentée avec l'utilisation d'un aliment haut en énergie digestible, confirmant les résultats obtenus par Gidenne et al. (2009a). De manière équivalente, la digestibilité des fibres est améliorée lorsque le ratio fibres digestibles sur amidon est augmenté, en accord avec Gidenne et Perez (2000). L'amélioration de la digestibilité associée à la restriction alimentaire était nettement supérieure dans notre première étude que dans la deuxième (**Article 1**, p.102 et **Article 2**, p.127) alors que les formulations alimentaires étaient proches. La différence de composition alimentaire à elle seule n'explique donc pas les différences observées entre nos deux études. De nombreux autres facteurs, tels que la qualité de l'eau, pourraient aussi moduler la digestibilité des nutriments (Cowieson, 2014).

L'amélioration de la digestibilité avec la restriction alimentaire et la concentration énergétique de l'aliment permet donc d'expliquer partiellement l'amélioration de l'efficacité alimentaire.

Celle-ci ne serait pas due à une modification de la physiologie intestinale. La surface d'échange ne serait pas amplifiée avec la restriction alimentaire (Martignon et al., 2010). L'activité des enzymes intestinales et l'efficacité de l'absorption intestinale étant augmentés chez la souris (Ferraris et al., 2001) et chez le poulet (Duarte et al., 2011; Gilbert et al., 2008), il serait intéressant de vérifier si ces phénomènes sont également observables chez le lapin afin d'évaluer si la restriction alimentaire améliore la dégradation et l'absorption intestinale des nutriments. Enfin, chez le lapin en croissance, la restriction alimentaire augmente le temps de rétention des aliments dans le segment caeco-colique (Gidenne and Feugier, 2009; Ledin, 1984a) et l'activité motrice du caecum et de l'intestin est augmentée (Fioramonti and Ruckebusch, 1974). Ces modifications de motricité et de vitesse de transit pourraient affecter la digestibilité des nutriments via une augmentation de la durée de contact des enzymes endogènes et microbiennes avec l'aliment mais aussi via un meilleur brassage du bol alimentaire. La modification de la composition et de l'activité du microbiote caecal pourrait elle aussi permettre d'expliquer l'amélioration de l'efficacité digestive. Ces différentes hypothèses restent cependant à vérifier, et des études complémentaires permettraient d'évaluer à quels niveaux du tube digestif les améliorations de la digestibilité s'opèrent.

L'amélioration de la digestibilité ne serait pas le seul mécanisme permettant l'amélioration de l'efficacité alimentaire. En effet, lors du retour à volonté, les niveaux d'ingestions antérieurs n'affectent plus la digestibilité, malgré une amélioration forte de l'efficacité alimentaire chez les animaux auparavant restreints. De plus, des améliorations équivalentes de l'efficacité alimentaire ont été obtenues pour nos deux études alors que l'efficacité digestive était très variable. D'autres mécanismes rentrent donc en ligne de compte dans l'amélioration de l'efficacité alimentaire induite par la restriction alimentaire. En effet, l'énergie digérée ne correspond pas à l'énergie disponible pour les besoins de l'animal, une partie de l'énergie étant perdue dans les urines et l'extra-chaueur (**Figure 18**). Une hypothèse serait alors que l'amélioration de l'efficacité alimentaire serait également d'origine métabolique avec une meilleure absorption des AGV ou une réduction de l'extra-chaueur comme montré chez la souris par MacDonald et al. (2011).

IV. IMPACTS ECONOMIQUES DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE ET DE LA MODULATION DE LA QUALITE ENERGETIQUE DES ALIMENTS

Bien que la restriction alimentaire soit aujourd'hui reconnue comme une méthode économiquement intéressante, très peu de données chiffrées sont disponibles sur les impacts économiques de cette pratique et aucune étude n'a, à notre connaissance, effectué d'analyses statistiques sur ces données (p.41). Dans le cadre de nos deux études nous avons pu effectuer des estimations relativement précises des impacts économiques de nos traitements. Cependant, ces données analysées indépendamment par étude ne nous permettaient pas d'émettre de conclusions générales statistiquement fondées. Nous avons donc effectué une analyse commune des données des deux études.

Les conditions sanitaires étant variables selon les sites, nous avons choisi d'analyser de manière séparée l'effet de la restriction alimentaire dans des conditions sanitaires favorables (<2% de mortalité et 6% de morbidité) et défavorables (10 à 25% de mortalité et 11 à 25% de morbidité). Une stratégie de limitation de l'ingestion avec retour à volonté en fin d'engraissement permet ainsi d'augmenter fortement la marge économique lorsque les conditions sanitaires sont défavorables (0.13 vs 0.03 €/kg) alors que dans des conditions sanitaires favorables la marge, bien que numériquement plus élevée (0.27 vs 0.25 €/kg), n'est pas significativement différente de celle obtenue avec une alimentation à volonté (**Figure 44**). **Ces données chiffrées nous permettent dès lors de confirmer l'intérêt économique de notre stratégie de restriction alimentaire dans des conditions sanitaires défavorables, alors qu'elle constitue une mesure préventive et économiquement non pénalisante dans des conditions sanitaires favorables.**

L'effet du niveau d'énergie digestible sur la marge économique est difficile à établir. En effet celui-ci est très sujet aux variations du coût de l'aliment, et donc des matières premières. Ceux-ci sont en perpétuelle évolution. A titre indicatif, les principales matières premières utilisées en alimentation cunicole (blé, tournesol, luzerne, son et betterave) ont subi une augmentation de 40 à 80% du prix à la tonne en 2012. Les formules alimentaires sont ainsi modifiées en conséquence afin de limiter l'impact sur le prix de l'aliment tout en conservant les mêmes propriétés nutritionnelles.

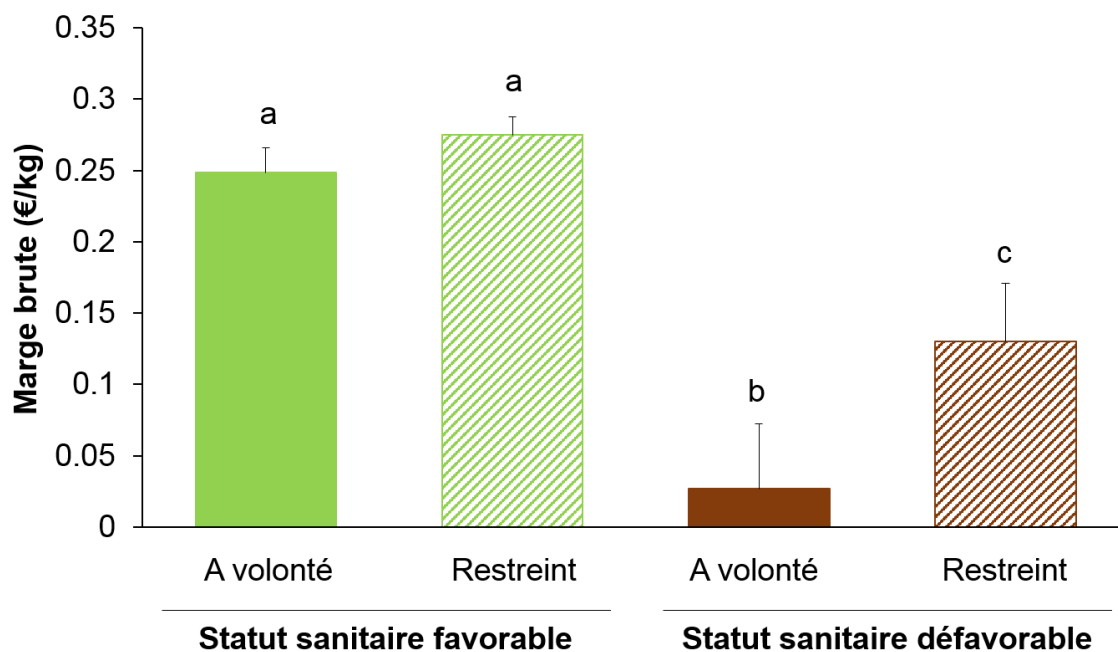


Figure 44 Impact économique de la restriction alimentaire selon le statut sanitaire.

Les valeurs présentées sont les moyennes \pm SEM pour les deux études menées (n=6/niveau d'ingestion/statut sanitaire). Le coût des aliments a été évalué à prix de matières premières constant (Novembre 2011).

Les moyennes affecté d'une lettre différente différent ($P < 0.05$) dans des conditions sanitaires favorables (<2% de mortalité et 6% de morbidité) et défavorables (10 à 25% de mortalité et 11 à 25% de morbidité).

Dans le cadre de notre estimation, les dépenses médicamenteuses n'ont pas été mesurées, le bénéfice de la restriction alimentaire est donc probablement sous-estimé. La réduction des dépenses médicamenteuses a en effet été estimée à 15 centimes d'euros par IA (Insémination Artificielle) en moyenne (Lebas, 2007). Le coût supplémentaire lié à la mise en place de la restriction alimentaire (temps de travail ou mise en place d'une chaîne d'alimentation automatique) n'a pas non plus été évalué. Enfin, dans le cadre de nos deux études les prix des

aliments étaient peu variables (écart maximal de 6.75€/T) par rapport aux variations observées sur les aliments commerciaux sur l'année 2011 (jusqu'à 25€/T) (Coutelet, 2012) et une seule stratégie de restriction alimentaire a été testée avec un niveau de restriction unique. Une analyse plus fine des impacts économiques des différentes pratiques de restriction mises en place dans les élevages commerciaux dans différents contextes économiques mériterait dès lors d'être effectuée afin d'élaborer des recommandations plus précises pour les éleveurs. Des simulations de l'impact économique des différentes pratiques selon les différents contextes économiques sont cependant déjà élaborées au sein des firmes service afin d'aider les éleveurs à mettre en place les stratégies les plus favorables dans leurs élevages.

Il est également important de préciser que ce type de stratégie alimentaire a un impact économique favorable dans le contexte français, et ne peut être extrapolé directement aux autres pays producteurs. En effet, le poids, et donc l'âge à l'abattage varie fortement d'un pays à un autre, engendrant des contraintes particulières. Par exemple, en Espagne, les lapins sont abattus plus jeunes (1,9 kg à l'abattage contre 2,5 kg en France) (Corrent, 2002), ce qui amplifie l'impact négatif de la restriction sur le rendement à l'abattage. De plus, comme la durée d'engraissement est un peu plus courte, et afin de ne pas pénaliser la croissance, la restriction alimentaire doit être plus brève ou moins sévère, au risque de ne pas bénéficier des effets positifs sur les paramètres sanitaires. A l'inverse, en Italie, les lapins sont abattus plus tardivement (2,6 kg à l'abattage). Aussi, pour abattre les animaux à poids équivalents, les stratégies de restrictions alimentaires imposent une durée d'élevage plus longue, pénalisant la durée du vide sanitaire déjà courte dans le système en bande Italien. Les stratégies de restrictions alimentaires doivent donc être adaptées au contexte d'élevage du pays étudié.

Enfin, dans un contexte de recherche de systèmes d'élevages durables, il convient d'évaluer l'impact environnemental de nos différentes stratégies d'alimentation. Il a été montré que l'alimentation et les effluents sont les postes contribuant le plus aux impacts environnementaux. Or, la restriction alimentaire permet de réduire ces deux postes (Gidenne et al., 2011). Une analyse de cycle de vie a ainsi permis de démontrer une réduction des impacts environnementaux (-11% de potentiel d'eutrophisation, -12% d'acidification et -10% d'occupation des surfaces agricoles notamment) avec les stratégies de restriction alimentaire liée principalement à l'amélioration de l'efficacité du système (Zened et al., 2013). Il convient également d'évaluer les matières premières utilisées comme sources d'énergie. En effet, l'utilisation de coproduits de l'industrie agro-alimentaire (marc de pomme, pulpe de raisin) serait à favoriser face à des matières premières en concurrence avec la consommation humaine (céréales, ...). L'efficacité globale du système ainsi

que l'origine des matières premières est également à prendre en compte. Il convient ainsi de privilégier des matières premières locales afin de limiter les impacts environnementaux et économiques liés au transport.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de notre travail était d'optimiser les performances zootechniques des lapins soumis à une restriction alimentaire via une modulation de la composition chimique des aliments sans pénaliser les paramètres sanitaires. Pour répondre à cet objectif nous nous sommes focalisés sur la modulation de la concentration et de la qualité énergétique des aliments.

Nos résultats conduisent à proposer des recommandations alimentaires plus précises en termes de quantité et de qualité de l'énergie digestible, en vue d'optimiser la croissance après le sevrage. Ainsi, dans le cadre d'une stratégie de limitation de l'ingestion, la distribution d'un aliment riche en énergie digestible permet d'optimiser la croissance, le rendement à l'abattage et l'efficacité alimentaire sans pénaliser les paramètres sanitaires. En dépit de la croissance compensatrice permise par un retour à une ingestion à volonté, le gain de croissance n'est toutefois pas suffisant pour rattraper le retard de croissance induit par la restriction alimentaire. La nature de l'apport énergétique peut également être considéré comme un levier supplémentaire d'optimisation des performances de croissance et d'abattage, notamment via des apports sous forme d'amidon plutôt que de fibres digestibles, avec un taux de lignocellulose conforme aux recommandations.

Largement utilisées en élevage commercial, nous montrons que les stratégies de limitation de l'ingestion présentent un intérêt économique quel que soit le contexte sanitaire bien que ce dernier soit un facteur de variation important. L'amélioration des performances économiques permise par les stratégies de limitation de l'ingestion s'explique principalement par la réduction du coût alimentaire sous-jacent à l'amélioration de l'efficacité alimentaire. Dans un contexte de volatilité des prix des matières premières, cet intérêt pourrait être accru selon les options de formulations retenues.

Compte tenu de ces résultats, de nouvelles stratégies d'optimisation peuvent d'ores et déjà être envisagées. En effet, la période critique pour les troubles digestifs se situe dans les deux premières semaines post-sevrage. Il serait donc envisageable d'appliquer une stratégie de restriction alimentaire sur cette période uniquement, avec un retour à volonté plus précoce afin de favoriser la croissance et le rendement à l'abattage. De plus, la concentration en énergie digestible de l'aliment n'ayant pas eu d'effets délétères sur le statut sanitaire, une augmentation supplémentaire de celle-ci serait également envisageable. L'objectif serait alors de tracer la courbe réponse permettant de définir l'intervalle des valeurs d'énergies digestibles optimales à la croissance et à la santé digestive. Ceci permettrait en outre de préciser notre équation de prédiction de la croissance selon l'ingéré en énergie digestible pour des fortes valeurs d'énergie digestible similaires à celles d'une alimentation à volonté mais dans le cadre d'une stratégie de limitation de l'ingestion.

Nous avons également pour objectif d'expliquer les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire. La concentration énergétique de l'aliment n'affectant pas les paramètres sanitaires, nous avons pu avancer l'hypothèse que, dans un contexte de pathologies digestives (diarrhées aiguës et EEL), les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé seraient principalement induits par la baisse de la masse d'aliment ingéré et non une diminution de l'ingéré énergétique.

L'analyse globale de l'ensemble des paramètres immunitaires suggère que la restriction alimentaire réduirait la réponse humorale digestive et inhiberait également l'immunité systémique alors que la réponse inflammatoire ne serait pas affectée. Il semblerait cependant que l'immunité humorale, en particulier les IgA intestinaux, soit plus affectée par le niveau d'ingéré énergétique que la masse ingérée. Ceci pourrait suggérer que les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé ne seraient pas corrélés à des modifications de la réponse humorale. Si l'influence de la restriction et de la concentration énergétique de l'aliment reste modeste sur l'activité et la composition du microbiote, notre analyse intégrative des données montre pour la première fois chez le lapin un lien entre des paramètres immunitaires intestinaux et la composition de la communauté bactérienne caecale. La combinaison de l'utilisation d'outils de mesure plus performants et à plus large spectre (puce d'expression, RNAseq) des paramètres immunitaires digestifs sur les sites effecteurs (plaque de Peyer) permettrait de confirmer ces résultats. Par ailleurs concernant les mécanismes sous-jacents à l'amélioration de l'efficacité alimentaire nos travaux suggèrent que les modifications de composition et d'activité de la communauté bactérienne caecale pourraient contribuer à l'amélioration de l'efficacité alimentaire par le biais d'une augmentation du transfert des métabolites fermentaires vers l'hôte. D'autres mécanismes, tels qu'une amélioration du rendement d'utilisation de l'énergie par le biais d'une réduction de l'extra-chaaleur, peuvent également être envisagés.

Nous avons ainsi réussi à répondre à notre premier objectif d'optimisation des performances de croissance et de rendement à l'abattage avec une stratégie de restriction alimentaire. Nous avons par ailleurs apporté certains éléments de réponse qu'en aux phénomènes physiologiques sous-jacents aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé et l'efficacité alimentaire, mais plusieurs autres pistes restent à explorer.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

A.O.A.C. 1995a. AOAC official method 978.10. Fibre (crude) in animal feed. Fritted glass crucible method. In: P. A. Cunniff and W. Horwitz (eds.) AOAC Official Methods of Analysis No. Chap. 4. p 19-20, AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

A.O.A.C. 1995b. Official Methods of Analysis No. Chap. 4, 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

A.O.A.C. 2005. Official Methods of Analysis No. Chap. 4, 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.

Abecia, L. et al. 2005. Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum. *Fems Microbiology Letters* 244: 111-115.

Abreu-Martin, M. T., and S. R. Targan. 1996. Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Critical Reviews in Immunology* 16: 277-309.

Abt, M. C., and D. Artis. 2013. The dynamic influence of commensal bacteria on the immune response to pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 16: 4-9.

Accensi, F. et al. 2006. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological, biochemical, or immune responses of piglets. *J Anim Sci* 84: 1935-1942.

AFNOR (Association Française de Normalisation). 1994. Viandes de lapin : Production et transformation du lapin de chair domestique. Norme Française NF V47-001: 1-18.

Alstin, F., and M. Nilsson. 1990. The Soxtec® hydrolysis system improves the official methods for determining total fat content. *Industries Alimentaires et Agricoles* 107: 1271-1274.

Anonymous. 2009. Commission Regulation (EC) No. 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Official Journal of the European Union L 54*: 1-130.

B

Badiola, I. et al. 2005. Characterization of the microbial diversity of rabbit intestinal tract by restriction fragment length polymorphism.

Barton, M. D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews* 13: 279-299.

Bennegadi, N., T. Gidenne, and L. Licois. 2001. Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit. *Anim Res* 50: 401-413.

Bennegadi, N., G. Fonty, L. Millet, T. Gidenne, and D. Licois. 2003. Effects of age and dietary fibre level on caecal microbial communities of

conventional and specific pathogen-free rabbits. *Microbial Ecology in Health and Disease* 15: 23-32.

Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4: 430-435.

Bertin, C., X. Rouau, and J. F. Thibault. 1988. Structure and properties of sugar beet fibers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 44: 15-29.

Björnhag, G. 1972. Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swed. J. Agric. Res.* 2: 125-136.

Blanco, J. E. et al. 1997. Prevalence and characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* with the eae gene in diarrhoeic rabbits. *Microbiology and Immunology* 41: 77-82.

Blas, E., J. Fernández-Carmona, and C. Cervera. 1988. Effect of digestive activity and starch intake on amylase activity and pancreatic juice of rabbit. In: *Proc. 4th Congress of the World Rabbit Science Association*, Budapest, Hungary. p 68-73.

Blas, E., C. Cervera, and J. Fernandez Carmona. 1994. Effect of two diets with varied starch and fibre levels on the performances of 4-7 weeks old rabbits. *World Rabbit Science* 2: 117-121.

Blas, E., and T. Gidenne. 2010. Digestion of sugars and starch. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the Rabbit*. p 19-38. CABI, Wallingford, UK.

Blasco, A., and J. Ouhayoun. 1993. Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.* 4: 93-99.

Boisot, P., D. Licois, and T. Gidenne. 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. In: *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France. p 267-270.

Boisot, P., J. Duperray, and A. Guyonvarch. 2005. Intérêt d'une restriction hydrique en comparaison au rationnement alimentaire en bonnes conditions sanitaires et lors d'une reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du lapin (EEL) *Proc. 11èmes Journées de la Recherche Cunicole*. p 133-136. ITAVI, Paris, France.

Boucher, S., and L. Nouaille. 1996. *Maladies des lapins*. l'imprimerie Landais, Noisy-le-Grand, France.

Bouvet, J. P., and V. A. Fischetti. 1999. Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infection and Immunity* 67: 2687-2691.

Bovera, F., G. Piccolo, S. D'Urso, A. Nizza, and M. I. Cutrignelli. 2008a. Feed restriction

C

during summer: effect on rabbit carcass traits and meat quality. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy. p 1325-1330.

Bovera, F., G. Piccolo, S. D'Urso, A. Nizza, and M. I. Cutrignelli. 2008b. Feed restriction during summer: effect on rabbit growth performance. In: Proc. 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy. p 567-572.

Bracarense, A.-P. F. L. et al. 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. *Br. J. Nutr.* 107: 1776-1786.

Brito, B. E., E. L. Romano, and C. Grunfeld. 1995. Increased lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor levels and death in hypercholesterolaemic rabbits. *Clinical and Experimental Immunology* 101: 357-361.

Brown, E. M., M. Sadarangani, and B. B. Finlay. 2013. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology* 14: 660-667.

Brzek, P., and M. Konarzewski. 2007. Relationship between avian growth rate and immune response depends on food availability. *J. Exp. Biol.* 210: 2361-2367.

Butler, S. T. 2014. Nutritional management to optimize fertility of dairy cows in pasture-based systems. *Animal* 8: 15-26.

Caccavo, D. et al. 2002. Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *Journal of Endotoxin Research* 8: 403-417.

Candau, M., B. Bertrand, and J. Fioramonti. 1978. Variation de la digestibilité des constituants de la ration chez le lapin. *CR Séances Soc. Biol.* 172: 554-559.

Carabaño, R. et al. 2009. New concepts and objectives for protein-amino acid nutrition in rabbits: a review. *World Rabbit Science* 17: 1-14.

Carabaño, R., J. Piquer, D. Menoyo, and I. Badiola. 2010. The digestive system of the rabbit. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the Rabbit.* p 1-18. CABI, Wallingford, UK.

Cardinale, B. J., M. A. Palmer, and S. L. Collins. 2002. Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* 415: 426-429.

Carré, B., and J. M. Brillouet. 1989. Determination of water-insoluble cell-walls in feeds : interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72: 463-467.

Chardon, H., and H. Brugere. 2014. Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes, Centre d'information des viandes, Paris, France.

- Chauvin, C. et al. 2011. Utilisation des antibiotiques en filière cunicole: enquête en élevages 2009-2010. In: Proc. 14èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans. p 143a-143d.
- Chen, L. P. et al. 2014. Characteristics of Fecal and Mucosa-Associated Microbiota in Chinese Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Medicine* 93.
- Chen, Y. J. et al. 2012. Effect of Protein and Starch Level in Practical Extruded Diets on Growth, Feed Utilization, Body Composition, and Hepatic Transaminases of Juvenile Grass Carp, *Ctenopharyngodon idella*. *J. World Aquacult. Soc.* 43: 187-197.
- Chevance, A., and G. Moulin. 2013. Suivie des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2012.
- Combes, S. et al. 2007. Evaluation de la qualité des carcasses de trois lots de lapins commerciaux (standard, certifié et Label) en abattoir industriel par 41 mesures physico-chimiques simples, rapides et peu coûteuses. In: 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France. p 199-202.
- Combes, S. et al. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *Fems Microbiology Ecology* 77: 680-689.
- Combes, S., L. Fortun-Lamothe, L. Cauquil, and T. Gidenne. 2013. Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. *Animal* 7: 1429-1439.
- Combes, S., T. Gidenne, L. Cauquil, O. Bouchez, and L. Fortun-Lamothe. 2014. Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status. *J Anim Sci* 92: 652-665.
- Corrent, D. E. 2002. An examination of rabbit production in Spain and Italy. *Regard sur les filieres en Espagne et Italie. Cuniculture (Paris):* 62-70.
- Corring, T., and A. Rérat. 1983. Digestion and absorption of nutrients. In: H. Bickel and Y. Schutz (eds.) *A survey of enzymatic digestion in simple-stomached animals.* p 9-26, Bern, Suisse.
- Corthesy, B., and J. P. Kraehenbuhl. 1999. Antibody-mediated protection of mucosal surfaces. *Defense of Mucosal Surfaces: Pathogenesis, Immunity and Vaccines* 236: 93-111.
- Corthesy, B. 2007. Roundtrip ticket for secretory IgA: Role in mucosal homeostasis? *J. Immunol.* 178: 27-32.
- Corthier, G. 2011. *Bonnes bactéries et bonne santé*, Versailles.
- Coutelet, G. 2012. *Gestion technico-économique des éleveurs de lapin de chair -*

RENACEB (Reseau National Cunicole d'Elevage en Bandes) et RENALAP (Reseau National Lapin) - résultats 2012. ITAVI (Institut Technique de l'Aviculture).

Cowieson, A. 2014. Recent advances in exogenous enzyme application for monogastric nutrition. In: 65th EAAP Annual Meeting, Copenhagen. p 171.

Cunliffe, R. N. 2003. alpha-Defensins in the gastrointestinal tract. *Molecular Immunology* 40: 463-467.

D

D'Auria, G. et al. 2013. Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. *Scientific Reports* 3: 1-9.

Davies, R. R., and J. A. E. R. Davies. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice* 6: 139-153.

De Blas, C., and G. G. Mateos. 2010. Feed formulation. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the Rabbit*. p 222-232. CABI, Wallingford, UK.

De Blas, J. C., E. Pérez, M. J. Fraga, M. Rodriguez, and G. J.F. 1981. Effect of diet on feed intake and growth of rabbits from weaning to slaughter at different ages and weights. *J Anim Sci* 52: 1225-1232.

De Blas, J. C. 2013. Nutritional impact on health and performance in intensively reared rabbits. *Animal* 7: 102-111.

Demas, G. E., and S. Sakaria. 2005. Leptin regulates energetic tradeoffs between body fat and humoral immunity. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 272: 1845-1850.

Denigris, S. J., M. Hamosh, D. K. Kasbekar, T. C. Lee, and P. Hamosh. 1988. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 959: 38-45.

Di Meo, C., F. Bovera, S. Marono, N. Vella, and A. Nizza. 2007. Effect of feed restriction on performance and feed digestibility in rabbits. *Ital. J. Anim. Sci.* 6: 765-767.

Diaz Arca, F., L. M. Perez Alba, and M. Perez Hernandez. 1999. Digestibility and energy retention by young rabbits fed different levels of intake. *Annales de Zootechnie* 48: 289-295.

Dowd, S. E. et al. 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *Bmc Microbiology* 8.

Drogoul, C., R. Gadour, M. M. Joseph, and R. Jussiau. 2004a. *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage - Tome 2: L'alimentation des monogastriques et des polygastriques*, Paris.

Drogoul, C. et al. 2004b. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage - Tome 1 : Les bases théoriques de l'alimentation et les principes de raisonnement, Paris.

Duarte, C. R. A., M. L. M. Vicentini-Paulino, J. Buratini, A. C. S. Castilho, and D. F. Pinheiro. 2011. Messenger ribonucleic acid abundance of intestinal enzymes and transporters in feed-restricted and refeed chickens at different ages. *Poultry Science* 90: 863-868.

Duerkop, B. A., S. Vaishnava, and L. V. Hooper. 2009. Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity* 31: 368-376.

Duperray, J., and A. Guyonvarch. 2013. Interest of a fasting period to improve growth performances of fattening rabbits. In: Proc. 15èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans. p 43-46.

E - F

Edgar, R. C., B. J. Haas, J. C. Clemente, C. Quince, and R. Knight. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.

EGRAN (European Group on Rabbit Nutrition). 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. *World Rabbit Sci.* 9: 57-64.

El Maghraby, M. M. A. 2011. Effect of restricted access to drinking water on growth,

feed efficiency and carcass characteristics of fattening rabbits *Asian Journal of Animal Sciences* 5: 136-144.

Erickson, R. H., and Y. S. Kim. 1990. Digestion and absorption of dietary protein. *Annual Review of Medicine* 41: 133-139.

Farm Animal Welfare Council. 1992. FAWC updates the five freedoms. *Veterinary Record* 17: 357.

Fassbinder-Orth, C. A., and W. H. Karasov. 2006. Effects of feed restriction and realimentation on digestive and immune function in the leghorn chick. *Poultry Science* 85: 1449-1456.

Ferraris, R. P., Q. X. Cao, and S. Prabhakaram. 2001. Chronic but not acute energy restriction increases intestinal nutrient transport in mice. *J Nutr* 131: 779-786.

Ferrian, S. et al. 2013. Comparison of immune response to lipopolysaccharide of rabbit does selected for litter size at weaning or founded for reproductive longevity. *Res. Vet. Sci.* 94: 518-525.

Feuerstein, G. et al. 1990. Effect of gram-negative endotoxin on levels of serum corticosterone, TNF-alpha, circulating blood cells, and the survival of rats. *Circulatory Shock* 30: 265-278.

Fioramonti, J., and Y. Ruckebusch. 1974. La motricité caecale chez le lapin. 2) Variations

d'origine alimentaire. *Ann. Rech. Vet.* 5: 201-212.

Fonty, G., and P. Gouet. 1989. Fibre-degradating microorganisms in the monogastric digestive tract. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23: 91-107.

Forsythe, S. J., and D. S. Parker. 1985. Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit. *Journal of Applied Bacteriology* 58: 363-369.

Fortun-Lamothe, L., and S. Boullier. 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livest Sci* 107: 1-18.

Foubert, C., J. Duperray, and A. Guyonvarch. 2008. Intérêt d'un aliment fibreux concentré en énergie chez le lapin de chair rationné. In: *Proc. Journée Nationale ITAVI – Elevage du lapin de chair, Pacé, France.* p 1-8.

FranceAgriMer, u. P. a., pêche et aquaculture. 2012. Les produits carnés, avicoles et laitiers - Données statistiques 2011, FranceAgriMer, Montreuil-sous-Bois, France.

Froy, O. 2007. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28: 61-71.

G

Gaboriau-Routhiau, V., and M. C. Moreau. 1996. Gut flora allows recovery of oral

tolerance to ovalbumin in mice after transient breakdown mediated by cholera toxin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Pediatric Research* 39: 625-629.

Gallois, M., H. J. Rothkotter, M. Bailey, C. R. Stokes, and I. P. Oswald. 2009. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal* 3: 1644-1661.

Garcia, A. I., J. C. de Blas, and R. Carabano. 2004. Effect of type of diet (casein-based or protein-free) and caecotrophy on ileal endogenous nitrogen and amino acid flow in rabbits. *Animal Science* 79: 231-240.

Garcia, G., J. F. Galvez, and J. C. Deblas. 1993. Effect of substitution of sugarbeet pulp for barley in diets for finishing rabbits on growth performance and energy and nitrogen efficiency. *J Anim Sci* 71: 1823-1830.

Garcia, J., T. Gidenne, L. Falcao-E-Cunha, and C. de Blas. 2002. Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits. *Anim Res* 51: 165-173.

Gidenne, T. 1987. Utilisation digestive de rations riches en lignines chez le lapin en croissance : mesures de flux et de transit dans différents segments digestifs. *Annales de Zootechnie* 36: 95-108.

Gidenne, T. 1992. Effect of fibre level, particle size and adaptation period on digestibility

and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbit. *Br. J. Nutr.* 67: 133-146.

Gidenne, T. 1994. Estimation of volatile fatty acids and of their energetic supply in the rabbit caecum: effect of the dietary fibre level. In: *Proc. 6èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris. p 293-299.

Gidenne, T. 1996. Conséquences digestives de l'ingestion de fibres et d'amidon chez le lapin en croissance: vers une meilleure définition des besoins. *INRA Prod. Anim.* 9: 243-254.

Gidenne, T. 1997. Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science* 51: 73-88.

Gidenne, T. 2000. Recent advances and perspectives in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. *World Rabbit Sci.* 8: 23-32.

Gidenne, T., and J. M. Perez. 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. I. Effects on digestion, rate of passage and retention of nutrients. *Annales de Zootechnie* 49: 357-368.

Gidenne, T., V. Pinheiro, and L. Falcao e Cunha. 2000. A comprehensive approach of the rabbit digestion : consequences of a

reduction in dietary fibre supply. *Livestock Production Science* 64: 225-237.

Gidenne, T., P. Arveux, and O. Madec. 2001a. The effect of the quality of dietary lignocellulose on digestion, zootechnical performance and health of the growing rabbit. *Anim. sci.* 73: 97-104.

Gidenne, T. et al. 2001b. An increase of dietary ratio "digestible fibre/ crude protein" doe not affect the performances of the growing rabbit but reduce enteritis incidence: preliminary results of a multi-site study. In: *9ème J. Rech. Cunicoles*, Paris, France. p 65-68.

Gidenne, T. 2003. Fibres alimentaires et prévention des troubles digestifs chez le lapin en croissance: rôles respectifs des fibres digestibles et peu digestibles. In: *10èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France. p 3-11.

Gidenne, T., R. Carabaño, I. Badiola, J. Garcia, and D. Licois. 2007. L'écosystème caecal chez le lapin domestique: impact de la nutrition et de quelques facteurs alimentaires – conséquences sur la santé digestive du lapereau. In: *12èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Le Mans, France. p 59-71.

Gidenne, T. et al. 2008. Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau - premiers

resultats d'une etude concertee du reseau GEC (Groupe d'Experimentation Cunicole). In: Proc. Journée Nationale ITAVI – Elevage du lapin de chair, Pacé. p 33-40.

Gidenne, T., C. Bannelier, S. Combes, and L. Fortun-Lamothe. 2009a. Interaction between the energetic feed concentration and the restriction strategy - impact on feeding behaviour, growth and health of the rabbit Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole. p 63-66. ITAVI, Le Mans, France.

Gidenne, T. et al. 2009b. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3: 509-515.

Gidenne, T., and A. Feugier. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal* 3: 501-508.

Gidenne, T. et al. 2009c. Ingestion restreinte et mode de distribution de la ration. Conséquences sur le comportement alimentaire, la digestion et la qualité de la carcasse. In: 13ème J. Rech. Cunicoles, Le Mans, France. p 43-46.

Gidenne, T., R. Carabaño, J. Garcia, and C. de Blas. 2010a. Fibre Digestion. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the Rabbit*. p 66-82. CABI, Wallingford, UK.

Gidenne, T., J. Garcia, F. Lebas, and D. Licois. 2010b. Nutrition and feeding strategy:

interactions with pathology. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the Rabbit*. p 179-199. CABI, Wallingford, UK.

Gidenne, T., F. Lebas, and L. Fortun-Lamothe. 2010c. Feeding behaviour of rabbits. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the rabbit*. p 233-252. CABI.

Gidenne, T. et al. 2011. Ingestion restreinte et concentration protéique de l'aliment: impact sur la digestion et les rejets azotés chez le lapin en croissance Proc. 14èmes Journées de la Recherche Cunicole. p 21-24. ITAVI, Le Mans, France.

Gidenne, T. et al. 2012a. Intake limitation strategy and dietary protein concentration: effect on rabbit growth performance and health, from a large-scale study in a french network of experimental units (GEC). In: Proc. of the 10th World Rabbit Congress, Sharm El Sheik, Egypt. p 597-601.

Gidenne, T., S. Combes, and L. Fortun-Lamothe. 2012b. Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal* 6: 1407-1419.

Gidenne, T., S. Combes, and L. Fortun-Lamothe. 2013a. Protein replacement by digestible fibre in the diet of growing rabbits. 1: Impact on digestive balance, nitrogen excretion and microbial activity. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183: 132-141.

Gidenne, T. et al. 2013b. Protein replacement by digestible fibre in the diet of growing rabbits: 2-Impact on performances, digestive health and nitrogen output. *Anim. Feed Sci. Technol.* 183: 142-150.

Gilbert, E. R., H. F. Li, D. A. Emmerson, K. E. Webb, and E. A. Wong. 2008. Dietary protein quality and feed restriction influence abundance of nutrient transporter mRNA in the small intestine of broiler chicks. *J Nutr* 138: 262-271.

Gill, N., M. Wlodarska, and B. B. Finlay. 2011. Roadblocks in the gut: barriers to enteric infection. *Cellular Microbiology* 13: 660-669.

Gomez-Conde, M. S. et al. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J Anim Sci* 85: 3313-3321.

Gomez-Conde, M. S. et al. 2009. Effect of neutral detergent soluble fibre on digestion, intestinal microbiota and performance in twenty five day old weaned rabbits. *Livest Sci* 125: 192-198.

Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, and M. Delgado. 2006. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology* 130: 1707-1720.

Gouet, P., and G. Fonty. 1979. Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Annales De Biologie Animale Biochimie Biophysique* 19: 553-566.

Graessler, J. et al. 2013. Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes: correlation with inflammatory and metabolic parameters. *Pharmacogenom. J.* 13: 514-522.

Granger, J., M. Osuchowski, and D. Remick. 2006. Differential inflammatory response to LPS and sepsis. *Shock* 25: 97-98.

Grenier, B. et al. 2011. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. *Mol Nutr Food Res* 55: 761-771.

Griffiths, M., and D. Davies. 1963. The role of the soft pellets in the production of lactic acid in the rabbit stomach. *The Journal of nutrition* 80: 171-180.

Guarner, F., and J. R. Malagelada. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512-519.

H - I - J

Hall, M. B., B. A. Lewis, P. J. Van Soest, and L. E. Chase. 1997. A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 74: 441-449.

Hamann, L., V. El-Samalouti, A. J. Ulmer, H. D. Flad, and E. T. Rietschel. 1998. Components of gut bacteria as immunomodulators. *International Journal of Food Microbiology* 41: 141-154.

- Hangalapura, B. N. et al. 2005. Severe feed restriction enhances innate immunity but suppresses cellular immunity in chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Science* 84: 1520-1529.
- He, B. et al. 2014. Differential analysis of intestinal microflora in pigs with different growth performance. *Chinese Journal of Animal Nutrition* 26: 2327-2334.
- Heczko, U., A. Abe, and B. B. Finlay. 2000. Segmented filamentous bacteria prevent colonization of enteropathogenic *Escherichia coli* O103 in rabbits. *Journal of Infectious Diseases* 181: 1027-1033.
- Hooper, L. V., D. R. Littman, and A. J. Macpherson. 2012. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science* 336: 1268-1273.
- Hoover, W. H., and R. N. Heitmann. 1972. Effects of dietary fiber levels on weight gain, cecal volume and volatile fatty acid production in rabbits. *J Nutr* 102: 375-379.
- Hornicke, H., G. Ruoff, B. Vogt, W. Clauss, and H. J. Ehrlein. 1984. Phase relationship of the circadian rhythms of feed intake, cecal motility and production of soft and hard feces in domestic rabbits. *Laboratory Animals* 18: 169-172.
- Huang, W. T., K. C. Niu, C. K. Chang, M. T. Lin, and C. P. Chang. 2008. Curcumin inhibits the increase of glutamate, hydroxyl radicals and PGE2 in the hypothalamus and reduces fever during LPS-induced systemic inflammation in rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 593: 105-111.
- Isolauri, E., Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi, and S. Salminen. 2001. Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 444S-450S.
- Jacquier, V., S. Combes, I. Oswald, C. Rogel-Gaillard, and T. Gidenne. 2013. Incorporation of rapidly fermentable fibres in a diet around weaning: impact on digestion, growth and health of the rabbit. In: Proc. 15èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans. p 55-58.
- Jehl, N., and T. Gidenne. 1996. Replacement of starch by digestible fibre in feed for the growing rabbit .2. Consequences for microbial activity in the caecum and on incidence of digestive disorders. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61: 193-204.
- Jerome, N., J. L. Mousset, B. Messenger, I. Deglaire, and P. Marie. 1998. Influence de différentes méthodes de rationnement sur les performances de croissance et d'abattage du lapin. In: J. M. Perez (ed.) 7èmes Journées de la Recherche Cunicole. p 175-178. ITAVI, Lyon.
- Jones, W. J., D. P. Nagle, and W. B. Whitman. 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiological Reviews* 51: 135-177.

Journal Officiel de la République Française 0278. 2009. Arrêté du 30 novembre 2009 modifiant l'arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation de pratiquer des expériences sur les animaux. 20652.

K - L

Kagnoff, M. F. 1993. Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterology* 105: 1275-1280.

Kau, A. L., P. P. Ahern, N. W. Griffin, A. L. Goodman, and J. I. Gordon. 2011. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 474: 327-336.

Kelder, T., J. H. M. Stroeve, S. Bijlsma, M. Radonjic, and G. Roeselers. 2014. Correlation network analysis reveals relationships between diet-induced changes in human gut microbiota and metabolic health. *Nutrition & Diabetes* 4.

Kent, W. J. 2002. BLAT - The BLAST-like alignment tool. *Genome Research* 12: 656-664.

Kimse, M., V. Monteils, C. Bayourthe, and T. Gidenne. 2009. A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit caecum: relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Science* 17: 63-70.

Kimse, M. et al. 2012. Live yeast stability in rabbit digestive tract: Consequences on the caecal ecosystem, digestion, growth and

digestive health. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173: 235-243.

Knudsen, C. et al. 2014. Increasing the digestible energy intake under a restriction strategy improves the feed conversion ratio of the growing rabbit without negatively impacting the health status. *Livest Sci:* <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.1008.1015>.

Ksiazek, A., and M. Konarzewski. 2012. Effect of Dietary Restriction on Immune Response of Laboratory Mice Divergently Selected for Basal Metabolic Rate. *Physiol. Biochem. Zool.* 85: 51-61.

Kubo, C., N. K. Day, and R. A. Good. 1984. Influence of early or late dietary restriction on life-span and immunological parameters in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5831-5835.

Kudsk, K. A. 2002. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *American Journal of Surgery* 183: 390-398.

Kurki, E., S. Jin, E. Martonen, P. Finckenberg, and E. Mervaala. 2012. Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice. *Nutr Metab* 9: 10.1186/1743-7075-1189-1164.

Lalles, J. P. et al. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res* 53: 301-316.

- Landers, T. F., B. Cohen, T. E. Wittum, and E. L. Larson. 2012. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports* 127: 4-22.
- Lanning, D., P. Sethupathi, K. J. Rhee, S. K. Zhai, and K. L. Knight. 2000a. Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol.* 165: 2012-2019.
- Lanning, D., X. C. Zhu, S. K. Zhai, and K. L. Knight. 2000b. Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunological Reviews* 175: 214-228.
- Laplace, J. P. 1978. Le transit digestif chez les monogastriques 3) Comportement (prise de nourriture, caecotrophie), motricité et transit digestif et pathogénie des diarrhées chez le lapin. *Annales de Zootechnie* 27: 225-265.
- Lara-Padilla, E. et al. 2011. Caloric restriction reduces IgA levels and modifies cytokine mRNA expression in mouse small intestine. *J. Nutr. Biochem.* 22: 560-566.
- Le Cao, K.-A., D. Rossouw, C. Robert-Granie, and P. Besse. 2008. A Sparse PLS for Variable Selection when Integrating Omics Data. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 7.
- Lebas, F., P. Coudert, H. De Rochambeau, and R. G. Thébault. 1996. Nutrition et alimentation. In: FAO (ed.) *Le lapin : Elevage et pathologie*. p 21-50, Rome, Italy.
- Lebas, F. 2000. Vitamins in rabbit nutrition: literature review and recommendations. *World Rabbit Science* 8: 185-192.
- Lebas, F. 2007. L'utilisation de la restriction alimentaire dans la filière cunicole et les différents modes de contrôle utilisés sur le terrain. Table ronde 2007 de l'Association Scientifique Française de Cuniculture tenue à l'occasion des 12èmes JRC, au Mans. Accessed Date Accessed. | doi:DOI|
- Lebman, D. A., and R. L. Coffman. 1994. Cytokines in the mucosal immune system. In: P. L. Ogra et al. (eds.) *Handbook of mucosal immunology*. p 243–249. Academic Press, San Diego.
- Leborgne, M. C. 2013. L'alimentation des porcs. In: N. Ardouin (ed.) *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage - tome 2 : L'alimentation des monogastriques et des polygastriques*. p 8-27. Educagri editions, Dijon.
- Ledin, I. 1984a. Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth and organ growth in rabbit. *Ann. Zootech.* 33: 33-50.
- Ledin, I. 1984b. Effect of restricted feeding and realimentation on growth, carcass composition and organ growth during the

first seven days of realimentation in rabbit. *Acta Agriculturae Scandinavica* 34: 54-66.

Lee, S. C., L. Prosky, and J. W. Vries. 1992. Determination of total, soluble, and insoluble dietary fiber in foods-enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer: collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.* 75: 395-416.

Lelkes, L., and C. L. Chang. 1987. Microbial dysbiosis in rabbit mucoid enteropathy. *Laboratory Animal Science* 37: 757-764.

Licois, D. 2007. Etude in vivo de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4, inoculum utilisé pour la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin In: 12ème J. Rech. Cunicoles, Le Mans, France. p 217-220.

Licois, D., and D. Marlier. 2008. Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Productions Animales* 21: 257-267.

Lochmiller, R. L., and C. Deerenberg. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88: 87-98.

M

Mabika, M., and H. Laburn. 1999. The role of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in fever and the acute phase reaction in rabbits. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 438: 218-223.

MacDonald, L., M. Radler, A. G. Paolini, and S. Kent. 2011. Calorie restriction attenuates LPS-induced sickness behavior and shifts hypothalamic signaling pathways to an anti-inflammatory bias. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: 172-184.

MacDonald, L., D. Begg, R. S. Weisinger, and S. Kent. 2012. Calorie restricted rats do not increase metabolic rate post-LPS, but do seek out warmer ambient temperatures to behaviourally induce a fever. *Physiology & Behavior* 107: 762-772.

Maertens, L. et al. 2002. Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. *World Rabbit Sci.* 10: 157-166.

Maertens, L. 2010. Feeding systems for intensive production. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the Rabbit*. p 253-266. CABI, Wallingford, UK.

Mage, R. 1998. Immunology of lagomorphs. In: P. Griebel, P. P. Pastoret, H. Bazin and A. Govaerts (eds.) *Handbook of vertebrate immunology*. p 673. Academic Press Limited.

Mahé, F., T. Rognes, C. Quince, C. de Vargas, and M. Dunthorn. 2014. Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ PrePrints* 2:e386v1: <http://dx.doi.org/10.7287/peerj.preprints.7386v7281>.

- Marlier, D. et al. 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. *Ann. Med. Vet.* 147: 385-392.
- Marounek, M., S. J. Vovk, and V. Skrivanova. 1995. Distribution of the activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *Br. J. Nutr.* 73: 463-469.
- Martignon, M. H., S. Combes, and T. Gidenne. 2009. Role du mode distribution de l'aliment dans une stratégie de rationnement : conséquences sur le profil d'ingestion, la croissance et la santé digestive du lapin In: 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France. p 39-42.
- Martignon, M. H. 2010. Conséquences d'un contrôle de l'ingestion sur la physiopathologie digestive et le comportement alimentaire du lapin en croissance, Université de Toulouse, Toulouse.
- Martignon, M. H., S. Combes, and T. Gidenne. 2010. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* 156: 156-162.
- Martignon, M. H. et al. 2011. Conséquences d'une restriction alimentaire sur le comportement et le bien-être des lapins en engraissement. In: Proc. 14èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans. p 25-28.
- Martin, L. B., K. J. Navara, Z. M. Weil, and R. J. Nelson. 2007. Immunological memory is compromised by food restriction in deer mice *Peromyscus maniculatus*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R316-R320.
- Martin, L. B. et al. 2008. Food restriction compromises immune memory in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) by reducing spleen-derived antibody-producing B cell numbers. *Physiol. Biochem. Zool.* 81: 366-372.
- Martinsen, T. C., K. Bergh, and H. L. Waldum. 2005. Gastric juice: A barrier against infectious diseases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96: 94-102.
- Marty, J., and M. Vernay. 1984. Absorption and metabolism of the volatile fatty acids in the hindgut of the rabbit. *Br. J. Nutr.* 51: 265-277.
- Massip, K., S. Combes, L. Cauquil, O. Zemb, and T. Gidenne. 2012. High throughput 16S-DNA sequencing for phylogenetic affiliation of the caecal bacterial community in the rabbit – impact of the hygiene of housing and of the intake level. In: 8th INRA-RRI Symposium on Gut Microbiology. Gut microbiota: friend or foe?, Clermont-Ferrand, France. p 57.
- Matarese, G., and A. La Cava. 2004. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol.* 25: 193-200.

- Mateos, G. G., P. G. Rebollar, and C. de Blas. 2010. Minerals, vitamins and additives. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 119-150. CABI, Wallingford, UK.
- Matsuzaki, J., M. Kuwamura, R. Yamaji, H. Inui, and Y. Nakano. 2001. Inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed in 40% energy-restricted mice. *J Nutr* 131: 2139-2144.
- McGee, D. W., and D. N. McMurray. 1988. Protein malnutrition reduces the IgA immune response to oral antigen by altering B-cell and suppressor T-cell functions. *Immunology* 64: 697-702.
- Meissonnier, G. M. et al. 2008. Subclinical doses of T-2 toxin impair acquired immune response and liver cytochrome P450 in pigs. *Toxicology* 247: 46-54.
- Merchant, H. A. et al. 2011. Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42: 3-10.
- Metcalfe, N. B., and P. Monaghan. 2001. Compensation for a bad start: grow now, pay later? *Trends Ecol. Evol.* 16: 254-260.
- Metzger, S. et al. 2009. Effect of energy restriction in interaction with genotype on the performance of growing rabbits: II. Carcass traits and meat quality. *Livest. Sci.* 126: 221-228.
- Michelland, R. J. et al. 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* 16: 61-65.
- Michelland, R. J. et al. 2011. Rapid adaptation of the bacterial community in the growing rabbit caecum after a change in dietary fibre supply. *Animal* 5: 1761-1768.
- Montagne, L., J. R. Pluske, and D. J. Hampson. 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108: 95-117.
- Monteils, V., L. Cauquil, S. Combes, J. J. Godon, and T. Gidenne. 2008. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum. *Fems Microbiology Ecology* 66: 620-629.
- Montessuy, S., S. Reys, G. Rebours, and N. Mascot. 2009. Effet du niveau énergétique de l'aliment sur les performances zootechniques des lapins en engraissement et conséquences sur le coût alimentaire du kilogramme de croît. Proc. 13èmes Journées de la Recherche Cunicole. p 22-25. ITAVI, Le Mans, France.
- Moreau, H., Y. Gargouri, D. Lecat, J. L. Junien, and R. Verger. 1988. Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochimica Et Biophysica Acta* 959: 247-252.

Morel-Saives, A., and A. Limet. 2007. Evaluation de l'impact technico-économiques des maladies digestives chez le lapin en engraissement. Intérêt de la mise en place d'un traitement. In: 12ème J. Rech. Cunicoles, Le Mans, France. p 239-242.

Morishita, Y. 1995. Effect of food restriction on cecal microbiota and short-chain fatty-acid concentrations in rats. *Microbial Ecology in Health and Disease* 8: 35-39.

Morotomi, M., F. Nagai, and Y. Watanabe. 2012. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 144-149.

Mowat, A. M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology* 3: 331-341.

Muthukumar, A. R., C. A. Jolly, K. Zaman, and G. Fernandes. 2000. Calorie restriction decreases proinflammatory cytokines and polymeric Ig receptor expression in the submandibular glands of autoimmune prone (NZB X NZW)F-1 mice. *J Clin Immunol* 20: 354-361.

N - O - P

Nicodemus, N. et al. 2004. Effect of level of fibre and level of ground of fibre sources on

digestión and ileal and caecal characterization of microbiota of early weaned rabbits. In: 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. p 928-929.

Nieddu, D. et al. 2000. Electron microscopy detection of viral agents in rabbits with enteropathy during the period 1982-1999 in Italy. In: 7th World Rabbit Congress, Valencia, Spain. p 325-335.

OpenStax College. OpenStax CNX. 21 juin 2013. Digestive Systems. <http://cnx.org/contents/39eb2d7f-4604-401d-a5ed-ca159c04cc80@6@6>. Accessed October 7th 2014.

Pappo, J. 1989. Generation and characterization of monoclonal antibodies recognizing follicle epithelial M cells in rabbit gut associated lymphoid tissues. *Cellular Immunology* 120: 31-41.

Peck, M. D., G. F. Babcock, and J. W. Alexander. 1992. The role of protein and calorie restriction in outcome from salmonella infection in mice. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 16: 561-565.

Perey, D. Y., M. D. Cooper, and R. A. Good. 1968. The mammalian homologue of the avian bursa of Fabricius. I. Neonatal extirpation of Peyer's patch-type lymphoepithelial tissues in rabbits: methods and inhibition of development of humoral immunity. *Surgery* 64: 614-621.

- Perez-Berezo, T. et al. 2011. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 55: S56-S66.
- Perez, J. M. et al. 1995. European reference method for in-vivo determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci.* 3: 41-43.
- Perez, J. M. et al. 2000a. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. *Annales de Zootechnie* 49: 369-377.
- Perez, J. M. et al. 2000b. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. *Ann. Zootech.* 49: 369-377.
- Perrier, G. 1998. Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse. *Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole.* p 179-182. ITAVI, Lyon, France.
- Pestka, J. J. 2003. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol. Lett.* 140: 287-295.
- Petri, R. M. et al. 2013. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. *PLoS One* 8.
- Pickard, W. D., and C. E. Stevens. 1972. Digesta flow through the rabbit large intestine. *Am J. Physiol.* ,222, 1161-1166
- Pie, S. et al. 2007. Effects of added fermentable carbohydrates in the diet on intestinal proinflammatory cytokine-specific mRNA content in weaning piglets. *J Anim Sci* 85: 673-683.
- Pinheiro, V., L. F. E. Cunha, J. L. Mourao, and T. Gidenne. 2013. Effect of substitution of wheat starch by potato starch on the performance, digestive physiology and health of growing rabbits. *Animal* 7: 974-982.
- Playne, M. J. 1985. Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic and succinic acids in fermentation liquids by gas chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36: 638-644.
- Proskey, L., N. G. Asp, T. Schweizer, J. Vries, and I. Furda. 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in foods and foods products: interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 1017-1023.
- Prud'hon, M., M. Cherubin, J. Goussopoulos, and Y. Carles. 1975. Evolution au cours de la croissance des caractéristiques de la consommation d'aliments solides et liquides du lapin domestique nourri ad libitum. *Annales de Zootechnie* 24: 289-298.

Pruesse, E. et al. 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research* 35: 7188-7196.

Q - R - S

Qiu, Y. S. et al. 2013. The combination effects of acetaminophen and N-acetylcysteine on cytokines production and NF-kappa B activation of lipopolysaccharide-challenged piglet mononuclear phagocytes in vitro and in vivo. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 152: 381-388.

R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing, <http://www.R-project.org>. In: R Foundation for Statistical Computing (ed.), Vienna, Austria.

Ramirez, M., L. Amate, and A. Gil. 2001. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development* 65: S95-S101.

Ramsay, S. W., and N. J. Stewart. 1889. *Illustrations of zoology: invertebrates & vertebrates*. Y. J. Pentland, London, UK.

Rantzer, D., J. Svendsen, and B. Westrom. 1996. Effects of a strategic feed restriction on pig performance and health during the post-weaning period. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science* 46: 219-226.

Redl, H., S. Bahrami, G. Schlag, and D. L. Traber. 1993. Clinical detection of LPS and LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology* 187: 330-345.

Remick, D. 2004. The inflammatory response to intraperitoneal (IP) versus intravenous (IV) lipopolysaccharide (LPS). *Shock* 21: 36-37.

Renouf, B., and A. Offner. 2007. Effet du niveau énergétique des aliments et de leur période de distribution sur la croissance, la mortalité et le rendement à l'abattage chez le lapin Proc. 12èmes Journées de la Recherche Cunicole No. 12. p 101-104. ITAVI, Le Mans, France.

Robinson, F. E., J. L. Wilson, M. W. Yu, G. M. Fasenko, and R. T. Hardin. 1993. the relationship between body weight and reproductive efficiency in meat-type chickens. *Poultry Science* 72: 912-922.

Rogers, C. J. et al. 2008. Energy restriction and exercise differentially enhance components of systemic and mucosal immunity in mice. *J Nutr* 138: 115-122.

Romero, C., S. Cuesta, J. R. Astillero, N. Nicodemus, and C. De Blas. 2010. Effect of early feed restriction on performance and health status in growing rabbits slaughtered at 2kg live-weight. *World Rabbit Sci.* 18: 211-218.

- Ruckebusch, Y., and H. Hörnicke. 1977. Motility of the rabbit's colon and caecotrophy. *Physiol. Behav.* 18: 871-878.
- Salaün, J. M., B. Renouf, A. Bourdillon, A. Picot, and A. Perdriau. 2011. Comparaison d'un accès nocturne à la mangeoire à un rationnement progressif et à une alimentation *ad libitum* sur les composantes du rendement carcasse des lapins en engraissement. In: Proc. 14èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans. p 101-104.
- Salses, A., and P. Raynaud. 1977. Effet nutritionnel de la perfusion intra-caecale d'urée, chez le lapin nourri avec un régime aprotéique. *Bull Acad Vet de France* 50: 109-115.
- Salzman, N. H. 2011. Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Current Opinion in Microbiology* 14: 99-105.
- SAS Institute Inc. 2012. SAS 9.4, Cary, NC, USA.
- Scapinello, C., T. Gidenne, and L. Fortun-Lamothe. 1999. Digestive capacity of the rabbit during the post-weaning period, according to the milk/solid feed intake pattern before weaning. *Reprod Nutr Dev* 39: 423-432.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.
- Schroder, J. M. 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology* 57: 121-134.
- Schwartz, G., S. Enomoto, C. Valiquette, and J. P. Lund. 1989. Mastication in the rabbit: a description of movement and muscle activity. *Journal of Neurophysiology* 62: 273-287.
- Serfilippi, D., and R. M. Donaldson. 1986. Production and secretion of intrinsic factor by isolated rabbit gastric mucosa. *American Journal of Physiology* 251: G287-G292.
- Shibata, M., T. Uno, W. Riedel, M. Nishimaki, and K. Watanabe. 2005. Transiently enhanced LPS-induced fever following hyperthermic stress in rabbits. *International Journal of Biometeorology* 50: 67-74.
- Simecka, J. W. 1998. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Advanced Drug Delivery Reviews* 34: 235-259.
- Snipes, R. L., and H. Snipes. 1997. Quantitative investigation of the intestines in eight species of domestic mammals. *International Journal of Mammalian Biology* 62: 359-371.
- Sommer, M. O. A., and G. Dantas. 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* 14: 556-563.
- Stepankova, R., F. Kovaru, and J. Kruml. 1980. Lymphatic tissue of the intestinal tract of

germ-free and conventional rabbits. *Folia Microbiologica* 25: 491-&.

Sudo, N. et al. 1997. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J. Immunol.* 159: 1739-1745.

Szendro, Z. et al. 2008. Effect of energy restriction in interaction with genotype on the performance of growing rabbits I: Productive traits. *Livest. Sci.* 118: 123-131.

T - U - V

Tazzoli, M., L. Carraro, A. Trocino, D. Majolini, and G. Xiccato. 2009. Replacing starch with digestible fibre in growing rabbit feeding. *Ital. J. Anim. Sci.* 8: 148-150.

Thomson, A. B. R., C. Schoeller, M. Keelan, L. Smith, and M. T. Clandinin. 1993. Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71: 531-555.

Trocino, A., M. Fragkiadakis, D. Majolini, R. Carabano, and G. Xiccato. 2011. Effect of the increase of dietary starch and soluble fibre on digestive efficiency and growth performance of meat rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165: 265-277.

Trocino, A., J. Garcia, R. Carabano, and G. Xiccato. 2013. A meta-analysis on the role of

soluble fibre in diets for growing rabbits. *World Rabbit Science* 21: 1-15.

Tumova, E. et al. 2007. Digestibility of nutrients, organ development and blood picture in restricted and ad libitum fed broiler rabbits. *Archiv Fur Geflugelkunde* 71: 6-12.

Umesaki, Y., and H. Setoyama. 2000. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes and Infection* 2: 1343-1351.

Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.

Verdelhan, S., A. Bourdillon, A. Morel-Saives, and E. Audoin. 2004. Effect of a limited access to water on mortality of fattening rabbits. In: 8th World Rabbit Congress, Puebla, Mexico. p 1015-1021.

Verdouw, H., C. J. A. Van Echteld, and E. M. J. Dekkers. 1977. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res* 12: 399-402.

Vernay, M., and P. Raynaud. 1975. Répartition des acides gras volatils dans le tube digestif du lapin domestique. 1) Lapins alimentés en luzerne et en avoine. *Annales de Recherches Vétérinaires* 6: 357-368

Villamide, M. J., L. Maertens, and C. de Blas. 2010a. Feed Evaluation. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 151-162. CABI, Wallingford, UK.

Villamide, M. J., N. Nicodemus, M. J. Fraga, and R. Carabaño. 2010b. Protein digestion. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 39-55. CABI, Wallingford, UK.

W - X - Y - Z

Warner, A. C. I. 1981. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. Nutrition Abstracts and Reviews, B 51: 789-820.

Willing, B. P., S. L. Russell, and B. B. Finlay. 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. Nature Reviews Microbiology 9: 233-243.

Woof, J. M., and M. W. Russell. 2011. Structure and function relationships in IgA. Mucosal Immunology 4: 590-597.

Wright, E. M., M. G. Martin, and E. Turk. 2003. Intestinal absorption in health and disease-sugars. Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology 17: 943-956.

Xia, Q. et al. 2004. Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice. Regulatory Peptides 122: 173-178.

Xiccato, G., M. Cinetto, and A. Dalle Zotte. 1992. Effect of feeding plane and category of

rabbit on digestive efficiency and nitrogen balance. Zootecnia e Nutrizione Animale 181: 35-43.

Xiccato, G. 1999. Feeding and meat quality in rabbits: a review. World Rabbit Sci. 7: 75-86.

Xiccato, G. 2010. Fat digestion. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 56-65. CABI, Wallingford, UK.

Xiccato, G., and A. Trocino. 2010. Energy and protein metabolism and requirements. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the Rabbit. p 83-118. CABI, Wallingford, UK.

Xu, D. L., X. Y. Liu, and D. H. Wang. 2011. Food Restriction and Refeeding Have No Effect on Cellular and Humoral Immunity in Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). Physiol. Biochem. Zool. 84: 87-98.

Zened, A. et al. 2013. Conséquences d'une restriction alimentaire chez le lapereau sevré sur les impacts environnementaux de la production de viande de lapin. In: Proc. 15èmes journées de la Recherche Cunicole, Le Mans. p 141-144.

Zhu, Y. L. et al. 2013. Effects of dietary fiber and starch levels on the non-specific immune response of growing rabbits. Livest Sci 155: 285-293.

Zoetendal, E. G., C. T. Collier, S. Koike, R. I. Mackie, and H. R. Gaskins. 2004. Molecular

ecological analysis of the gastrointestinal
microbiota: A review. J Nutr 134: 465-472.

ANNEXES

Annexe 6 Ingrédients et composition chimique des quatre aliments utilisés dans nos deux études expérimentales.

	Etude 1		Etude 2			Etude 1		Etude 2	
	LE	HE	ST	DF		LE	HE	ST	DF
Ingrédients (g/kg)					Composition chimique (g/kg)				
Ble	50	150	90	124	Matière sèche	873	874	869	867
Orge	34	20	150	20	Cendres	75	59	62	63
Son de blé (Milurex)	130	20	37	54	Amidon	102	118	141	96
Graines de pois	20	24			Sucres	65	58	58	56
Graines de Colza			20	22	Matières grasses	28	37	32	30
Tourteau de Colza	32	110	28	94	Cellulose brute	176	171	174	173
Tourteau de Tournesol	157	222.8	250	218	TDF	413	407	368	408
Luzerne	224.8	30	111	20	NDF	360	346	326	350
Paille	70	59	28	65	ADF	227	218	216	219
Pulpe de Bettrave	108	208	129	250	ADL	71	66	64	66
Pulpe de Raisin	63	40	20	26	Fibres digestibles	184	207	170	220
Marc de Pomme	20	50	63	53	Fibres solubles (TDF-NDF)	11	27	15	19
Melasse de Canne	60	30	43.1	30	Energie brute (MJ/kg)	16.15	16.57	16.6	16.32
Huile de Colza	5	17	5	5					
Phosphate bicalcique	5.1		1.9	1.1	Composition en acides aminés limitants formulés (g/kg)				
Carbonate de Calcium	1.1	1.6			Méthionine	2.89	3.04	3.27	3.13
Méthionine 15%	3.1	1	3	1.5	Méthionine + Cystéine	5.29	5.91	5.9	5.9
L-Lysine 25%	6	5.1			Lysine	6.87	7.53	7.43	7.55
L-Lysine 20%			7.5	5.5	Thréonine	5.3	5.91	5.9	5.9
Threonine 10%	0.9	1.5	3.5	0.9					
Premix vitaminique	10	10	10	10					

Abréviations: LE : Low Energy (Aliment à ED faible) ; HE : High Energy (aliment à ED élevée) ; ST : Starch (aliment riche en amidon) ; DF : Digestible Fiber (aliment riche en fibres digestibles) ; TDF: Total dietary Fibre; NDF: Neutral Detergent Fibre; ADF: Acid Detergent Fibre; ADL: Acid Detergent Lignin.

Annexe 7 Valeurs nutritives des quatre aliments utilisés dans nos deux études expérimentales.

	Etude 1				Etude 2			
	LE		HE		ST		DF	
	A volonté	Restreint	A volonté	Restreint	A volonté	Restreint	A volonté	Restreint
Valeurs nutritives durant la période de restriction alimentaire								
Energie digestible (MJ/kg)	9.1	9.55	10.23	11.13	10.69	11.06	10.27	10.45
Protéines digestibles (g/kg)	101	107	115	126	117	121	114	120
PD/ED (g/MJ)	11.1	11.2	11.2	11.3	10.9	10.9	11.1	11.5
Amidon/ED (g/MJ)	11.2	10.7	11.5	10.6	13.2	12.7	9.3	9.2
FD/ED (g/MJ)	20.2	19.3	20.2	18.6	15.9	15.4	21.4	21.1
MG/ED (g/MJ)	3.1	2.9	3.6	3.3	3.0	2.9	2.9	2.9
Valeurs nutritives durant la période de retour à volonté								
Energie digestible (MJ/kg)	9.41	9.44	10.65	10.43	nc	nc	nc	nc
Protéines digestibles (g/kg)	107	106	123	120	nc	nc	nc	nc
PD/ED (g/MJ)	11.4	11.2	11.5	11.5	nc	nc	nc	nc
Amidon/ED (g/MJ)	10.8	10.8	11.1	11.3	nc	nc	nc	nc
FD/ED (g/MJ)	19.6	19.5	19.4	19.8	nc	nc	nc	nc
MG/ED (g/MJ)	3.0	3.0	3.5	3.5	nc	nc	nc	nc

Abréviations: LE : Low Energy (Aliment à ED faible) ; HE : High Energy (aliment à ED élevée) ; ST : Starch (aliment riche en amidon) ; DF : Digestible Fiber (aliment riche en fibres digestibles) ; PD: Protéines digestibles; Ed: Energie digestible; FD : Fibres digestibles ; MG : Matière grasse.

ABSTRACT

With the reduction in antibiotic use new strategies are required in order to preserve animal health, particularly around weaning. In rabbit breeding feed restriction strategies allow for the reduction of post-weaning digestive disorders and improve feed efficiency, but are inevitably responsible for a reduced growth and carcass yield at slaughter. This work aimed to optimize the growth performances and slaughter yield of restricted fed rabbits through a modulation of the dietary energy concentration and quality. The second objective of this work was to explain the physiological mechanisms underlying the beneficial effects of feed restriction upon health and feed efficiency. We demonstrated that, under a restriction strategy, a diet rich in digestible energy increased growth (+2%), slaughter yield (+0.6 points) and feed efficiency (+11%), through an improved digestive efficiency, without penalizing the sanitary parameters. The reduced growth induced by feed restriction was however only partially compensated for (-3% in final weight compared to the *ad libitum* fed animals). A diet rich in starch induced a higher growth and slaughter yield and did not penalize the sanitary parameters under a restriction strategy. Feed restriction and, to a lesser extent, the dietary energy concentration, modulated the immune response through a reduced humoral response at the digestive (fecal IgA) and systemic (plasmatic IgA and IgG) levels without modifying the inflammatory response. The cecal microbial activity was modulated by the amount of feed ingested while the cecal bacterial community profile, diversity and richness were not affected by the feed intake level. However, the relative abundance of certain families (Eubacteriaceae, Peptococcaceae and Christensenellaceae) and genera demonstrated specific variations according to the feed intake level and the dietary energy concentration. These results indicate that the relationship between the physiological measurements and the beneficial effects of feed restriction upon health remain complex and suggest the implication of other metabolic parameters that weren't measured. Complementary work hypothesis must therefore be considered. This work however enabled us to establish the economic advantage of feed restriction strategies regardless of the sanitary status and demonstrated the beneficial effects of a high energy diet on growth parameters. Our study opens the door to new complementary research projects regarding the optimization of the feeding strategies through for instance the modulation of the restriction length and the dietary energy quality.

Keywords: rabbit, nutrition, digestive immunity, digestive ecosystem, cecal microbiota, feed restriction, digestible energy.

RESUME

Dans un contexte de limitation de l'utilisation des antibiotiques, de nouvelles stratégies doivent être mises en place pour préserver la santé des animaux, en particulier lors du sevrage. En cyniculture, les stratégies de limitation de l'ingestion permettent de réduire les troubles digestifs en post sevrage et améliorent l'efficacité alimentaire, mais induisent inévitablement un retard de croissance et une baisse du rendement à l'abattage. Ce travail de thèse avait pour objectif d'une part d'optimiser les performances de croissance et de rendement à l'abattage des animaux soumis à une restriction alimentaire via une modulation de la quantité et de la qualité énergétique des aliments et d'autre part d'expliquer les mécanismes physiologiques sous-jacents aux effets bénéfiques d'une ingestion restreinte sur la santé et l'efficacité alimentaire. Nous avons démontré que dans le cadre d'une stratégie de restriction alimentaire un aliment riche en énergie digestible permet d'optimiser la croissance (+2%), le rendement à l'abattage (+0,6 points) et l'efficacité alimentaire (+11%), via notamment une amélioration de l'efficacité digestive, sans pénaliser les paramètres sanitaires, mais ne permet de rattraper que partiellement le retard de croissance induit par la restriction alimentaire (-3% de poids à l'abattage par rapport aux animaux nourris à volonté). Un aliment riche en amidon était favorable à la croissance de ces animaux et en particulier au rendement à l'abattage et n'avait pas d'effet délétère sur les paramètres sanitaires. La restriction alimentaire et la concentration énergétique alimentaire dans une moindre mesure, modulaient la réponse immunitaire via une réduction de la réponse humorale digestive (IgA intestinaux) et systémique (IgA et IgG circulants) sans modification de la réponse inflammatoire. L'activité du microbiote caecal était quant à elle modulée par la masse d'aliment ingérée alors que le profil de la communauté bactérienne caecale, sa diversité et sa richesse ne semblaient pas modifiés par la restriction alimentaire. Toutefois l'abondance relative de certaines familles (Eubacteriaceae, Peptococcaceae et Christensenellaceae) et genres montraient des variations spécifiques à la restriction ou à la concentration énergétique de l'aliment. L'ensemble de ces résultats indiquent que les relations entre les mesures physiologiques et les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur la santé digestive restent complexes et suggèrent l'implication d'autres paramètres métaboliques non évalués. Des hypothèses complémentaires de travail doivent ainsi être envisagées. Toutefois nos travaux établissent l'intérêt économique de la restriction alimentaire, quel que soit le contexte sanitaire, et celui de l'utilisation d'aliments à haute valeur énergétique sur les performances zootechniques. Notre étude ouvre dès lors des perspectives de recherches complémentaires d'optimisation des stratégies alimentaires via une modulation de la durée de restriction alimentaire et de la qualité énergétique des aliments.

Mots clés : lapin, nutrition, immunité digestive, écosystème digestif, microbiote caecal, restriction alimentaire, énergie digestible.