



HAL
open science

Effet de la restriction alimentaire et de la dégradation de l'hygiène sur la réponse inflammatoire chez le lapin en post-sevrage

Marie Hauteclaire Furbeyre

► **To cite this version:**

Marie Hauteclaire Furbeyre. Effet de la restriction alimentaire et de la dégradation de l'hygiène sur la réponse inflammatoire chez le lapin en post-sevrage. Sciences agricoles. 2013. dumas-00958918

HAL Id: dumas-00958918

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00958918v1>

Submitted on 13 Mar 2014

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

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



AGROCAMPUS OUEST

CFR Rennes

65 rue de Saint-Brieuc CS
84215

35042 RENNES CEDEX

Université de Rennes 1

2 rue du Thabor

CS 46510

35065 RENNES CEDEX

INRA – UMR TANDEM

Chemin de Borderouge

31326 CASTANET-TOLOSAN CEDEX

INRA – UMR ToxAlim

180 Chemin de Tournefeuille

31027 TOULOUSE CEDEX 3

Mémoire de Fin d'Études

Master BIOLOGIE, AGRONOMIE, SANTE
Spécialité Sciences de l'animal pour l'élevage de demain
(SAED)

Année universitaire* : 2012 - 2013

**Effet de la restriction alimentaire et de la dégradation de l'hygiène sur la
réponse inflammatoire chez le lapin en post-sevrage**

Par : Hauteclaire FURBEYRE

*Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation**

Bon pour dépôt (version définitive)

Ou son représentant

Date ; .../.../... Signature

Autorisation de diffusion : Oui Non

Soutenu à Rennes, le 21/06/2013

Maîtres de stage : Thierry GIDENNE et Isabelle OSWALD

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*

Remerciements

Je tiens à remercier Thierry Gidenne et Isabelle Oswald pour m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'études dans leurs équipes et m'avoir encadré tout au long de mon travail.

Je remercie l'équipe NED de l'UMR TANDEM pour leur accueil et également toute l'équipe E05 à l'UMR ToxAlim, où j'ai passé la majeure partie de mon stage, qui m'ont accueilli, aidé et avec qui j'ai partagé d'agréables moments. Tout particulièrement Philippe Pinton, Pascal Gourbeyre, Alix Pierron, Anne-Marie Cossalter, Joëlle Lafitte pour leur gentillesse, le temps qu'ils m'ont accordé et leurs conseils précieux. Sans oublier les membres des autres équipes de ToxAlim, plus spécifiquement Yannick Lippi, Arnaud Polizzi, Pascal Martin, qui m'ont aidé dans la réalisation de la méthode de qPCR, le traitement de mes données et l'analyse statistique des résultats.

Sans oublier de remercier Vivianne Batailler et Jeannette Faramond aux UMR TANDEM et ToxAlim respectivement, pour l'organisation administrative et leur disponibilité.

Enfin, je remercie l'ensemble des stagiaires et thésards des deux équipes, ceux qui m'ont apporté leur aide, ceux qui m'ont apporté leur bonne humeur et ceux qui m'ont fait découvrir la belle ville de Toulouse.

Sommaire

| | |
|--|----|
| I. Introduction..... | 1 |
| II. Contexte | 2 |
| A. Le système immunitaire intestinal..... | 2 |
| 1. La défense immunitaire de l'intestin..... | 2 |
| 2. La maturation du système immunitaire | 6 |
| B. Intérêt du microbiote dans le développement de l'immunité..... | 6 |
| 1. Mise en place du microbiote intestinal | 6 |
| 2. Impact du microbiote intestinal sur le développement de l'immunité | 7 |
| C. L'étude du système immunitaire en prévention des troubles digestifs..... | 8 |
| III. Matériel et méthodes..... | 9 |
| A. Contexte expérimental..... | 9 |
| 1. Animaux..... | 10 |
| 2. Prélèvements..... | 10 |
| 3. Sélection des animaux..... | 10 |
| B. Mise au point méthodologique pour analyser la réponse inflammatoire chez le lapin en croissance | 11 |
| 1. Principe de RT-qPCR | 11 |
| 2. Mise au point de la méthode | 11 |
| C. Analyse de l'expression des cytokines inflammatoires par RT-qPCR..... | 13 |
| D. Analyse statistique des données..... | 14 |
| IV. Résultats..... | 14 |
| A. Test des couples d'amorces pour l'analyse des cytokines inflammatoires | 14 |
| B. Expression des cytokines inflammatoires dans les organes lymphoïdes..... | 14 |
| V. Discussion..... | 15 |
| A. Effet de la restriction alimentaire | 15 |
| B. Effet de la dégradation de l'hygiène | 16 |
| C. Interaction entre hygiène dégradée et restriction alimentaire | 17 |
| VI. Conclusion | 19 |
| VII. Perspectives | 20 |

Liste des annexes

Annexe 1 : Ingrédients et composition chimique de l'aliment expérimental.

Annexe 2 : Plan des salles expérimentales.

Annexe 3 : Mode opératoire de la mise en place du modèle hygiène du logement.

Annexe 4 : Sélection des animaux pour l'analyse de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

Annexe 5 : Protocole suivi pour le dessin des couples d'amorces.

Annexe 6 : Protocole d'extraction des ARN à partir d'échantillons de tissu d'iléon, de rate et d'appendice caecal.

Annexe 7 : Protocole de transcription inverse (RT).

Annexe 8 : Plan et composition des plaques stock pour qPCR sur plaque 384 puits.

Annexe 9 : Plan de plaque 384 puits pour la qPCR sur 32 échantillons et 6 gènes (une plaque pour chaque organe).

Liste des figures

Figure 1 : Récapitulatif des relations entre cellules de l'immunité et cytokines.

Figure 2 : Courbe de consommation théorique utilisée pour déterminer la quantité d'aliments à distribuer aux animaux restreints afin d'obtenir une restriction de 30%.

Figure 3 : Agents se liant à l'ADN double brin.

Figure 4 : Modèle graphique de la PCR quantitative où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles

Figure 4 : Expression relative des cytokines pro-inflammatoires IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α dans l'iléon, la rate et l'appendice caecal, exprimées en valeurs moyennes des $2^{\Delta\Delta Ct}$, avec SEM, en fonction du groupe restreint (R) ou ad libitum (L).

Figure 5 : Expression relative des cytokines pro-inflammatoires IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α dans l'iléon, la rate et l'appendice caecal, exprimées en valeurs moyennes des $2^{\Delta\Delta Ct}$, avec SEM, en fonction du groupe hygiène propre (P) ou dégradée (D).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces validées pour la qPCR des cytokines inflammatoires IL-6, IL-8, TNF α , IL-1 β , IL-17 sur la rate et l'iléon et concentrations d'amorces sélectionnées.

Tableau 2 : Synthèse des résultats obtenus au cours de l'expérimentation, sur les paramètres zootechniques, la santé, le microbiote, la réponse immunitaire systémique et la réponse inflammatoire du lapin, suivant les effets de restriction alimentaire à 70% de l'ad libitum et de dégradation de l'hygiène

I. Introduction

En élevage cunicole, les troubles digestifs représentent la première cause de mortalité du jeune lapin. Face à ces pertes économiques considérables, les éleveurs ont recours aux soins vétérinaires avec antibiothérapie curative ou préventive. Selon le rapport de l'ANSES sur les ventes d'antibiotiques en élevage, la filière cunicole représente 18% des ventes en 2007 alors qu'elle ne représente que 0,5% de la production carnée nationale (Office de l'élevage, 2008). Dans le cadre réglementaire actuel, les troubles digestifs chez le lapin soulèvent de nombreuses problématiques. En effet, le ministère de l'agriculture a pour but de diminuer de 25% l'utilisation des antibiotiques en élevage d'ici 2016; mais dès la fin de 2011 l'interprofession cunicole s'était déjà engagée dans une démarche volontaire de démédecation (CLIPP). La recherche d'alternatives, notamment préventives par modification des conduites d'élevage, est donc indispensable pour répondre aux nouvelles exigences réglementaires, tout en assurant la durabilité de la production cunicole. Les jeunes animaux ont besoin de temps pour développer un microbiote digestif complexe et pour acquérir un système immunitaire efficace et tout d'abord immature (Bauer *et al.*, 2006). Durant cette phase de mise en place, ces animaux sont sensibles à la présence de potentiels pathogènes dans le tube digestif. Par conséquent, stimuler le développement du système immunitaire chez le lapin est une des voies de recherche prioritaires pour diminuer l'incidence des troubles digestifs en post-sevrage. Les connaissances en matière d'immunité chez le lapin restent cependant faibles.

Des études ont déjà montré un effet bénéfique de la restriction alimentaire sur la mortalité du lapin en post-sevrage (Gidenne et Feugier, 2009; Gidenne *et al.* 2012), actuellement pratiquée dans les élevages. Les mécanismes physiologiques impliqués dans cet effet ne sont pas encore déterminés.

En production porcine, l'élevage des jeunes animaux dans une hygiène dégradée favoriserait le développement du système immunitaire et réduirait la colonisation du tube digestif par les pathogènes, du fait d'une modification du microbiote (Mulder *et al.*, 2009). Cette voie d'étude est donc considérée chez le lapin comme une solution possible à la prévention des troubles digestifs.

Comprendre les mécanismes immunitaires liés à ces différents stress (restriction alimentaire, dégradation de l'hygiène) est nécessaire pour élaborer des nouvelles méthodes de prévention des troubles digestifs en élevage cunicole. Dans le cadre du projet Nutrition Santé Monogastrique, porté par le département INRA-PHASE sur les espèces porc et lapin, les effets de l'hygiène de logement et du niveau d'alimentation sont étudiés sur les mécanismes immunitaires chez le lapin en croissance et le porcelet. Or, nous manquons de connaissances en matière d'immunité chez le lapin et sur la relation entre ces mécanismes et l'incidence des troubles digestifs. La première étape est donc la mise au point de nouveaux critères d'analyse de la réponse immunitaire et inflammatoire du lapin. Cette étude se réalise au sein de l'équipe NED (Nutrition et Ecosystème Digestif) de l'UMR TANDEM (Tissus Animaux, Nutrition, Digestion, Ecosystème et Métabolisme) et de l'UMR ToxAlim (Toxicologie Alimentaire).

L'expérimentation liée à cette étude a débuté en 2011, sous la coordination de Thierry Gidenne. Elle a permis d'obtenir des informations sur les performances zootechniques et physiologiques, ainsi que quelques paramètres de la réponse immunitaire systémique, spécifique et non spécifique.

Notre rapport rend compte des derniers résultats obtenus pour cette expérimentation, soit : la mise au point de nouveaux critères de mesure de la réponse inflammatoire, et leur variation face aux stress de restriction alimentaire et d'hygiène dégradée chez le lapin en fin de croissance.

II. Contexte

Le lapin, comme tous les mammifères, possède un système immunitaire organisé et une immunité spécifique au tube digestif, permettant de le protéger contre les agressions du milieu extérieur et contre les agents pathogènes. Cette protection, décrite dans ce chapitre, entretient un lien étroit avec la population microbienne intestinale, qui est indispensable à son bon fonctionnement.

A. Le système immunitaire intestinal

1. La défense immunitaire de l'intestin

Le tube digestif doit assurer l'absorption des nutriments tout en empêchant la translocation des micro-organismes, pathogènes ou non. Il doit également pouvoir différencier les micro-organismes non pathogènes, nécessaires à son bon fonctionnement, des micro-organismes pathogènes, qu'il doit éliminer (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

a. Défense non immunologique

La muqueuse intestinale est défendue contre les pathogènes par un grand nombre de facteurs. La défense non-immunologique est permise par la présence de jonctions serrées, apportant une cohésion de l'épithélium, ainsi que par le renouvellement permanent des cellules (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). De plus les cellules de l'épithélium, comme les cellules de Paneth ou les mucocytes, sécrètent des substances bactériolytiques ou antibiotiques, ou simplement apportent une protection de l'épithélium contre les agressions via la sécrétion de mucus (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Enfin, la présence d'une flore intestinale ancrée est défavorable à l'implantation de micro-organismes pathogènes.

b. Défense immunologique

Lorsque la défense non immunologique ne suffit pas à défendre l'organisme contre les agents pathogènes, l'immunité prend le relais.

- Organisation structurale du système immunitaire intestinal

La muqueuse digestive est associée à un tissu lymphoïde, le GALT qui assure la défense de l'hôte en neutralisant les agents pathogènes (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) est nécessaire au fonctionnement de la réponse immunitaire de l'animal, comme l'immunité des muqueuses et la tolérance orale (Rhee *et al.*, 2004). Chez le lapin, le GALT possède les mêmes caractéristiques que celles des autres mammifères, mais il est composé de deux structures supplémentaires, identifiées uniquement chez cette espèce : le « sacculus rotundus », situé au niveau de la jonction iléo-caecale et l'appendice vermiforme présent à l'extrémité caudale du cæcum (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

Il existe deux types d'immunité. D'une part, l'immunité innée, non spécifique, qui représente la première forme de défense contre les pathogènes, d'autre part l'immunité acquise, dirigée spécifiquement contre les éléments étrangers à l'organisme. Ces deux immunités agissent en synergie (d'après Drouet-Viard et Fortun-Lamotte, 2002). Dans les deux cas, la défense de l'organisme suit différentes étapes allant de la reconnaissance des micro-organismes étrangers à la neutralisation ou la destruction de ceux-ci. Ces étapes se déroulent à des sites distincts du tube digestif (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

Le système immunitaire de la muqueuse est composé d'un tissu organisé et d'un tissu diffus (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Dans le tissu organisé, les cellules lymphoïdes sont regroupées en follicules et situées le long de l'intestin. Les follicules sont composés de lymphocytes B ancrés avec des cellules dendritiques dans une matrice tissulaire (Fortun-

Lamothe et Boullier, 2007). Il existe également des agrégations particulières comme les plaques de Peyer, d'un effectif de 2 à 10 chez le lapin (Mage, 1998). Les plaques de Peyer sont composées d'un grand nombre de follicules en dôme, contenant des lymphocytes B produisant des IgM, ainsi que des macrophages et des lymphocytes T-CD4 (Ermak *et al.*, 1994). Les régions interfolliculaires, entre le dôme et le centre germinale, sont riches en lymphocytes T (Hein, 1999). Les deux structures, chez le lapin, appendice vermiforme et sacculus rotundus possèdent une composition similaire aux plaques de Peyer, contenant plusieurs centaines de follicules en dôme (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Le tissu diffus quant à lui est composé de nombreuses cellules lymphoïdes disséminées le long de l'intestin. La majorité de ces cellules sont des lymphocytes T (80 à 90%) et une quantité faible de lymphocytes B. Les autres cellules se situant dans le tissu conjonctif de la lamina propria, composé de lymphocytes T (40 à 80%) et de lymphocytes B sécrétant essentiellement des IgA (Abreu-Martin et Targan, 1996).

- Organisation fonctionnelle du système immunitaire intestinal

Les macrophages et les cellules dendritiques ont à la fois un rôle de sentinelle permettant de détecter les antigènes au niveau de la muqueuse intestinale et ils assurent également la capture des bactéries. Les cellules dendritiques pourraient également avoir un rôle dans l'expression des IgA par les lymphocytes B (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

Les structures, telles que les plaques de Peyer, le sacculus rotundus et l'appendice vermiforme, sont spécialisées dans la capture des macromolécules et des microorganismes dans la lumière intestinale et sont chargées de les transporter jusqu'aux cellules lymphoïdes. Les cellules M des follicules en dôme assurent la capture des antigènes par macro-pinocytose et les transfèrent jusqu'aux cellules dendritiques et macrophages (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Les lymphocytes T et B naïfs quant à eux vont être activés après présentation de l'antigène via les cellules présentatrices d'antigène ou par reconnaissance directe de celui-ci respectivement. Ils migrent vers les nodules lymphatiques mésentériques où ils vont mûrir et proliférer. Une fois activés, ils sont transportés jusqu'au tissu épithélial ou la lamina propria de la paroi intestinale. Les cellules B vont ensuite devenir des cellules plasmiques sécrétrices d'IgA, qui seront transportées vers la lumière intestinale via les entérocytes (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Ces cellules effectrices sont réparties le long du tractus intestinal et sont responsables de la réponse immunitaire de l'intestin (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

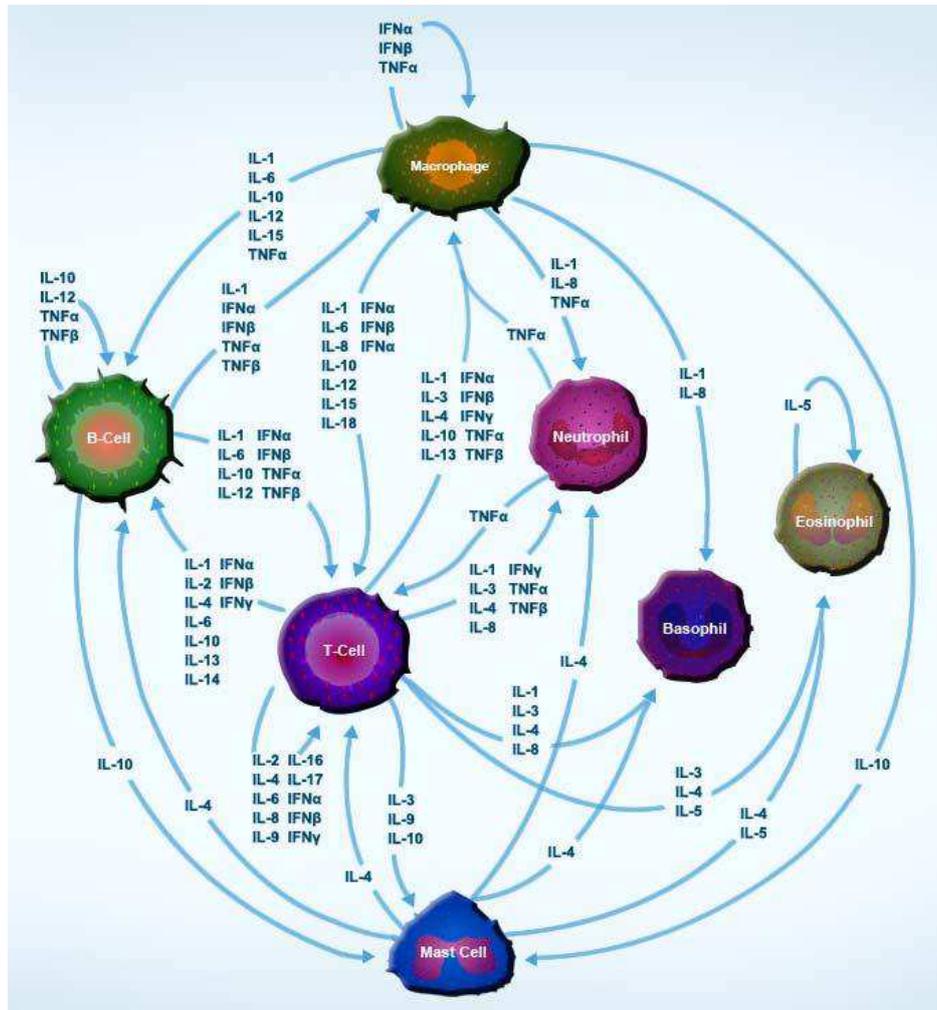


Figure 1 : Récapitulatif des relations entre cellules de l'immunité et cytokines

Source : Sino Biological Inc www.sinobiological.com – 2013.

c. Réponse inflammatoire

Pour que la réponse immunitaire soit effectivement établie, une réponse inflammatoire est nécessaire pour aider à ce processus (Feldmann et Saklatvala, 2004). La réponse inflammatoire locale dans l'intestin est assurée par les cytokines pro-inflammatoires, synthétisées par une grande variété de cellules liées à l'immunité telles que macrophages, lymphocytes ou fibroblastes. Ces cytokines sont produites très tôt dans la réponse aux stress et s'avèrent avoir une implication importante dans l'immunité innée et acquise (Feldmann et Saklatvala, 2004).

Les récepteurs membranaires des phagocytes permettent la reconnaissance des molécules d'origine microbienne et stimulent la production de médiateurs, tels que les cytokines pro-inflammatoires. Cette production favorise la phagocytose et la présentation de l'antigène par les cellules dendritiques. Les effets des cytokines sur le développement de la réponse immunitaire sont nombreux et variés. La figure 1 récapitule l'ensemble des mécanismes synergiques complexes qui lient les cytokines, notamment pro-inflammatoires, et les cellules de l'immunité. Parmi ces interactions, les cytokines IL-1, IL-6 et TNF sont reconnues comme stimulant la prolifération des lymphocytes (Feldmann et Saklatvala, 2004). Egalement, IL-8 est responsable de la migration et de l'activation des neutrophiles et d'autres types cellulaires tels que monocytes, lymphocytes, basophiles et éosinophiles vers les sites d'inflammation (Feghali et Wright, 1997). IL-17 est une cytokine nouvellement décrite qui fait partie des cytokines favorisant la réponse pro-inflammatoire par stimulation de IL-6 et IL-8 (Feghali et Wright, 1997).

Si elles jouent un rôle essentiel dans l'acquisition de l'immunité, de nombreuses études ont cependant montré qu'une inflammation en excès avait un effet négatif sur l'organisme. En effet, les cytokines pro-inflammatoires sont un groupe de cytokines capables d'induire une inflammation de l'hôte par sécrétion de produits tels que la lymphotoxine α (ou TNF β) ou certains ligands (Feldmann et Saklatvala, 2004). C'est le cas d'IL-6, IL-1 β et TNF α . Notamment, la forte production de TNF α et de IL-1 conduit directement vers des pathologies (Feldmann et Saklatvala, 2004).

2. La maturation du système immunitaire

Chez le jeune lapin, la première immunité est passive, apportée via les échanges placentaires et par la suite via le colostrum de la mère, qui permet de protéger son organisme contre les agressions de son environnement (Brambell, 1966 ; Wise *et al.*, 1971). Cette défense passive a pour conséquence de retarder la mise en place de sa propre immunité.

D'après Lanning *et al.* (2009), le développement de l'immunité se fait en trois étapes : il existe un premier développement néonatal par production de lymphocytes B dans les organes lymphoïdes primaires : le foie fœtal, le thymus, la moelle osseuse et l'appendice vermiforme chez le lapin. 4 à 8 semaines après la naissance, les lymphocytes migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, notamment dans le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT), via les vaisseaux sanguins et le système lymphatique (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Un répertoire d'antigènes est mis en place par une diversification du répertoire existant, grâce à un mécanisme de conversion/mutation des gènes somatiques dans le GALT. La diversité de ce répertoire « primaire » représente le stock définitif de cellules B de l'animal jusqu'à la fin de sa vie (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Le répertoire d'antigènes subit ensuite des modifications durant la vie adulte, liées aux réponses immunitaires spécifiques qui apparaissent (Lanning *et al.*, 2009), par mutation somatique des gènes dirigeant les immunoglobulines, créant ainsi le répertoire secondaire.

B. Intérêt du microbiote dans le développement de l'immunité

1. Mise en place du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal du lapin est composé en grande majorité de bactéries (Gouet et Fonty, 1979). Durant les deux premières semaines après la naissance, les proportions de bactéries aérobie et anaérobie sont similaires, avec une concentration d'environ 10^7 à 10^{10} bactéries par gramme de digestat caecal. Les bactéries anaérobie facultative, telles que *Escherichia Coli* et *Streptococcus sp.*, atteignent leur effectif maximal entre deux et trois semaines d'âge. La population de bactéries anaérobie facultative diminue ensuite pour atteindre une concentration négligeable au moment du sevrage. Les bactéries anaérobie stricte non sporulantes, tout particulièrement les bacilles à Gram négatif (bactéroïdes), sont les bactéries dominantes du microbiote caecal. Les bactéries sporulantes (*Clostridium*, *Endosporus*, *Acuformis*) sont en quantité 100 à 1000 fois moins importante que les bactéroïdes. C'est seulement après deux semaines d'âge, lorsque l'alimentation solide devient significative (notamment par l'ingestion de fibres), que les bactéries responsables de la dégradation des fibres se multiplient.

Dans les conditions normales de sevrage, l'activité fermentaire du caecum et la pratique de la caecotrophie débutent vers 18-20 jours d'âge et atteignent leur développement maximal vers 6 semaines (Gidenne, 2008). La flore cellulolytique du caecum atteint même son niveau maximal à la fin de 4 semaines d'âge (Gidenne, 2008). Une fois la mise en place terminée, on dénombre plus de 300 espèces de bactéries résidant dans l'intestin (Rhee *et al.*, 2004) à des concentrations de 10^{10} à 10^{11} bactéries par gramme de digesta (Savage, 1977; Mackie and White, 1997; Combes *et al.*, 2011).

2. Impact du microbiote intestinal sur le développement de l'immunité

Les bactéries interagissent entre elles et avec l'hôte, formant un écosystème complexe et créant une véritable relation symbiotique (Bauer *et al.*, 2006 ; Hooper and Gordon, 2001). Elles assurent notamment un rôle de barrière en permettant au tube digestif de résister à la colonisation par des microorganismes exogènes (Van der Waaij *et al.*, 1971; Berg, 1996).

a. Effet barrière

Un grand nombre de mécanismes sont liés à cet effet barrière. Les bactéries peuvent limiter l'expansion des espèces compétitrices par sécrétion de molécules antimicrobiennes ou microbicides (Shroff *et al.*, 1995; Stappenbeck *et al.*, 2002; Hooper, 2004 ; Rhee *et al.*, 2004). De même, la présence de bactéries non pathogènes adhérant à la paroi intestinale limite l'accès des bactéries pathogènes au niveau du tissu épithélial.

b. Développement du système immunitaire intestinal

La stimulation antigénique permise par le microbiote intestinal joue un rôle important dans la maturation du GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue) (Rhee *et al.*, 2004). Les lapins élevés dans un environnement sans germe possèdent une plus faible densité de cellules lymphoïdes dans la muqueuse intestinale, des plaques de Peyer de plus petite taille et des concentrations en immunoglobulines circulantes dans le sang plus faibles (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Par ailleurs, la colonisation du tube digestif entraîne une modification de la composition du GALT, avec une augmentation du nombre de lymphocytes intra-épithéliaux et de cellules productrices d'immunoglobulines, dans les follicules et la lamina propria (Guarner et Malagelada, 2003). Une étude a aussi montré que le caecum, conservé sans germe jusqu'à 4 semaines d'âge, est caractérisé par une absence de follicules de cellules B. Par la suite, l'administration de contenu caecal normal dans la lumière du caecum montre, au bout de 3 semaines, une importante prolifération des cellules B (Rhee *et al.*, 2004). L'acquisition d'antigènes est également liée à la population microbienne intestinale (Lanning *et al.*, 2009 ; Rhee *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré l'importance du microbiote dans l'acquisition

du premier répertoire d'anticorps (Lanning *et al.*, 2000 ; Vadjy *et al.*, 1998). De plus, il permet la diversification des Ig gènes des cellules B migrées dans le GALT (Rhee *et al.*, 2004).

Il a également été montré une importance des espèces bactériennes sur le développement du système immunitaire. Ainsi, deux combinaisons de bactéries (*B. Fragilis* + *B. Subtilis* et *B. Fragilis* + *B. Epidermidis*) présentes dans le contenu caecal s'avèrent être très importantes pour le développement du GALT (Bauer *et al.*, 2006). De même, Hamann *et al.* (1998) ont montré que les composants de la paroi bactérienne, notamment les lipopolysaccharides et le peptidoglycane, ont un rôle important dans l'activation du système immunitaire.

C. L'étude du système immunitaire en prévention des troubles digestifs

L'organisation du système digestif et la présence d'une fonction immunitaire locale apporte à l'animal une protection contre l'action des nombreux agents pathogènes. Cette défense immunitaire est fortement liée à la présence du microbiote intestinal, qui assure son développement et sa maturation et représente une barrière supplémentaire contre les colonisations par les bactéries indésirables. Les troubles digestifs constituant un enjeu économique considérable pour les élevages, il est indispensable de tenir compte de ce rôle crucial pour la défense de l'organisme. La recherche se tourne actuellement vers l'acquisition de connaissances sur cette relation étroite entre le microbiote intestinal et le développement immunitaire, visant à mettre en place des méthodes applicables en élevage pour prévenir les troubles digestifs. L'utilisation de probiotiques en complémentarité permet de renforcer le microbiote intestinal. D'autres alternatives en amont, comme l'impact de l'alimentation ou de l'hygiène de l'habitat, participent à la prévention des troubles digestifs. En effet, de nombreuses études ont montré l'impact de la composition alimentaire sur l'équilibre digestif du lapin. Egalement, la restriction alimentaire a montré des résultats positifs sur l'incidence des troubles intestinaux (Gidenne *et al.* 2012). Enfin, selon la théorie hygiéniste, l'exposition précoce des animaux à un environnement sanitaire dégradé pourrait promouvoir le développement du système immunitaire, augmentant leur résistance aux affections digestives autour du sevrage (Mulder *et al.*, 2009).

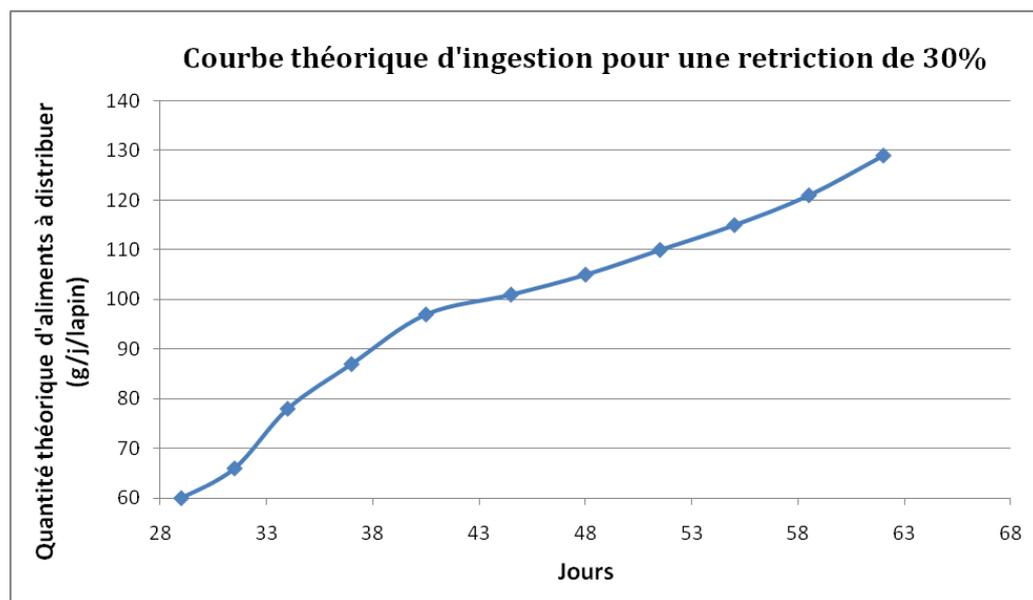


Figure 2 : Courbe de consommation théorique utilisée pour déterminer la quantité d'aliments à distribuer aux animaux restreints afin d'obtenir une restriction de 30%.

Source : Rapport de fin d'études, par Océane Martin, ENSAT - 2011.

Le projet Nutrition Santé Monogastrique, partiellement réalisé dans les UMR TANDEM et TOXALIM, a permis le lancement d'une étude de l'effet de la restriction alimentaire et le stress d'hygiène sur le jeune lapin. Cette étude permettra d'apporter des compléments d'information sur les mécanismes de digestion et d'immunité chez l'animal soumis à ces deux stress, qui constituent potentiellement des méthodes intéressantes pour limiter les affections digestives du lapin en post-sevrage.

III. Matériel et méthodes

A. Contexte expérimental

L'expérimentation animale s'est déroulée du 7 février au 16 mars 2011 sur un effectif de 420 lapins sevrés à 28 jours, logés par groupe de 7 lapins en cages collectives. Les animaux ont été répartis dans deux salles différentes, la première correspondant à la modalité « hygiène élevée » (HP) et la seconde à la modalité « hygiène dégradée » (HD). De plus, dans chaque salle, la moitié des animaux ont été nourris ad libitum (L) et la seconde moitié ont été restreints à 70% de l'ingestion libre (R). Au total, chaque lot (HPL, HPR, HDL et HDR) est composé de 105 animaux. Les suivis de l'ingestion, du poids, de la morbidité et de la mortalité ont été effectués hebdomadairement durant toute l'expérimentation. Dans le cadre d'une étude parallèle, 15 lapins par lot ont été immunisés à l'ovalbumine pour suivre l'effet de la restriction alimentaire et de l'hygiène sur la réponse vaccinale.

a. Alimentation

Un aliment expérimental a été élaboré afin d'assurer un apport précis et égal entre chaque animaux. Cet aliment est décrit en annexe 1. Les animaux nourris ad libitum (L) reçoivent une quantité d'aliment permettant de répondre à leurs besoins journaliers. La détermination des quantités d'aliment à distribuer chaque jour pour le groupe restreint à 70% (R) a été effectuée au départ selon une courbe théorique d'ingestion (figure 2), puis calculée grâce à la consommation moyenne des animaux ad libitum après 4 jours d'adaptation. L'aliment est distribué en quantité précise chaque matin. Pour les animaux restreints (R), la quantité d'aliment à apporter est recalculée par période de 3 ou 4 jours, selon l'ingéré du lot L.

b. Hygiène

Les animaux ont été élevés dans deux salles, une salle HD et une salle HP, dont le plan est décrit en annexe 2. L'hygiène a été définie selon les caractéristiques suivantes. La salle représentative d'une hygiène élevée (HP) a subi un nettoyage approfondi avant le début de l'expérimentation, ainsi que le matériel présent, tel que les cages, les mangeoires, les pipettes et les rampes d'abreuvement (annexe 3). Puis, au cours de l'expérimentation, les déjections ont été éliminées régulièrement. La salle représentative de l'hygiène dégradée (HD) quant à elle n'a subi aucun nettoyage préalable à l'arrivée des animaux, ni aucune élimination des déjections au cours de la phase expérimentale. La circulation entre les deux salles a été contrôlée afin d'éviter toute contamination. Des boîtes de contact ont été disposées dans les salles pour réaliser des contrôles d'ambiance, par prélèvements et dénombrements de la flore totale, des coliformes, des staphylocoques et des salmonelles. Ces prélèvements ont été effectués à J-7 et à J38, soit avant et après la phase expérimentale. De même des prélèvements d'air ambiant ont été réalisés sur ces mêmes dates. Les analyses des prélèvements ont été prises en charge par le laboratoire SOCSA.

1. Animaux

L'analyse de la réponse inflammatoire a été réalisée à partir de 72 lapereaux sevrés à 28 jours et élevés en cages collectives jusqu'à 64 jours d'âge, provenant de l'expérimentation animale principale. Au total, 18 animaux par lot (HPL, HPR, HDL et HDR) ont été présélectionnés pour la réalisation de cette étude.

2. Prélèvements

Les 72 animaux ont été euthanasiés à J36 (64 jours d'âge) au T61 (0,3 mL/kg de poids vif) en intracardiaque, après anesthésie avec 0,4 mL/kg de poids vif d'Imalgène 1000 en intramusculaire sur le râble. Ils ont ensuite été disséqués afin de prélever pour chaque animal les tissus lymphoïdes, soit la rate, l'appendice vermiforme et l'iléon. Le poids de chaque tissu a été relevé.

3. Sélection des animaux

Afin d'assurer un minimum de biais dans l'analyse des échantillons, les animaux ont été préalablement sélectionnés de manière à obtenir des lots homogènes en matière de poids de l'animal et de poids des tissus prélevés (poids moyen +/- 2 écarts-type). De même, seuls les animaux immunisés à l'ovalbumine ont été retenus afin d'éviter un effet de cette immunisation spécifique sur l'expression des cytokines. Au total, 8 animaux par lot et 3 tissus

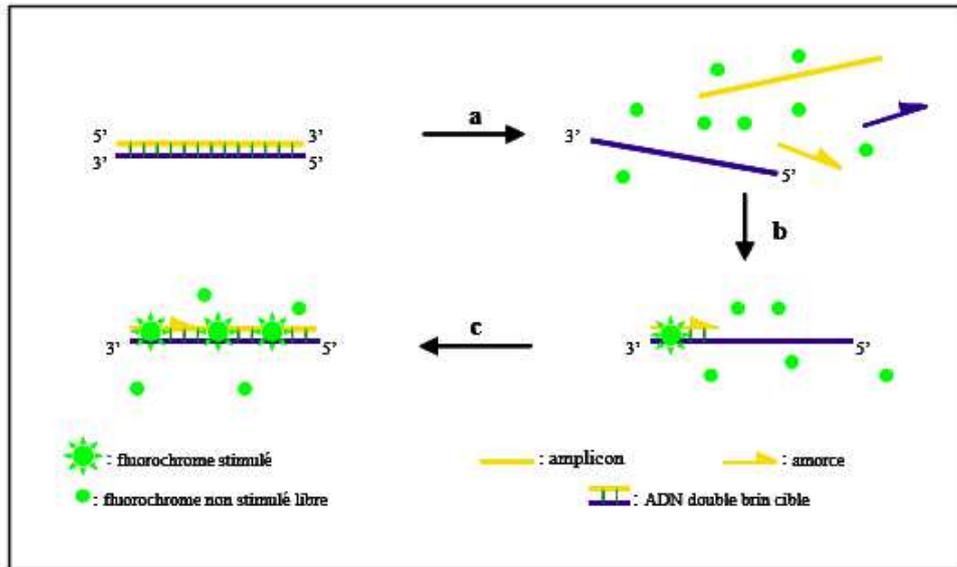


Figure 3 : Agents se liant à l'ADN double brin. Phase a : durant la dénaturation, le SYBR GREEN I libre exhibe peu de fluorescence. Phase b : à la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. Phase c : durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivie en temps réel. *Source : Poitras et Houde (2002).*

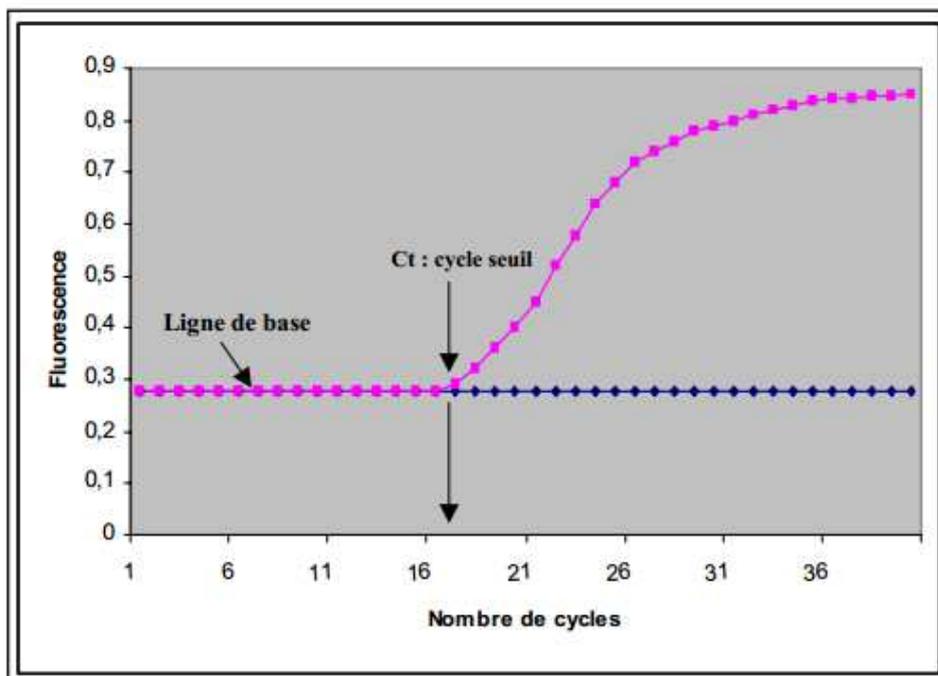


Figure 4 : Modèle graphique de la PCR quantitative où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons. Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement plus élevé que la ligne de base. *Source : Poitras et Houde, 2002.*

par animaux seront étudiés, soit 32 animaux par tissu et 96 échantillons au total. Les caractéristiques des animaux sélectionnés sont visibles en annexe 4.

B. Mise au point méthodologique pour analyser la réponse inflammatoire chez le lapin en croissance

La réponse inflammatoire des animaux a été analysée par quantification de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les tissus lymphoïdes, par la méthode de RT-qPCR. IL-6, IL-8, TNF α , IL-1 β et IL-17A ont été choisies parmi l'ensemble des cytokines pro-inflammatoires produites par l'organisme pour réaliser cette étude.

1. Principe de RT-qPCR

La RT-PCR est une technique destinée à quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle s'appuie sur deux techniques successives : la transcription inverse (RT) permettant de transcrire l'ARN de l'échantillon en ADNc, suivie d'une PCR quantitative permettant de mesurer le niveau d'expression d'un gène par quantification cinétique du nombre de transcrits. Le processus d'amplification peut être mesuré grâce à la fluorescence émise par les produits de PCR néoformés (figures 3 et 4). Le niveau d'amplification, reflétant la quantité d'ADNc correspondant au gène cible, est normalisé grâce à un calibrateur interne, appelé gène de ménage ou gène de référence.

2. Mise au point de la méthode

a. Choix du gène de référence

Une étude bibliographique concernant la quantification d'ARN chez le lapin a été réalisée afin de déterminer un gène de référence pour la réalisation de la qPCR. Le choix de GAPDH comme gène de référence a été réalisé car celui-ci est couramment utilisé chez le lapin, notamment dans la mesure de l'expression de cytokines pro-inflammatoires au niveau de l'iléon (Schnupf et Sansonetti, 2012) et de la rate (Griffiths *et al.*, 2002). Ce gène de référence va permettre de normaliser les données obtenues pour les cytokines.

b. Dessin des couples d'amorces

Les couples d'amorces GAPDH, TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-8 et IL-17A ont été préalablement dessinés pour permettre de réaliser l'amplification de ces gènes par qPCR. Le protocole suivi pour le dessin des couples d'amorces est détaillé en annexe 5. Les séquences d'ADNg et d'ARNm des cytokines (TNF α , IL6, IL1 β , IL8 et IL17A) et du gène de référence (GAPDH) ont été récupérées respectivement sur Ensembl et Pubmed. La totalité des ADNg des cytokines ont été obtenues chez le lapin (*Oryctolagus Cuniculus*) à l'exception du couple IL-8, non existant chez *Oryctolagus Cuniculus*, pour lequel la séquence utilisée fut obtenue

chez le cobaye (*Cavia Porcellus*) du fait de l'homologie importante entre les deux espèces pour ce gène. L'ADNg et l'ARNm ont ensuite été alignés par BLAST. Grâce à cet alignement, les positions des exons et des introns ont été identifiés. Les couples d'amorces ont été dessinés grâce au logiciel Primer express 2,0 (Applied Biosystems) et ont été choisis selon les critères suivants :

- Afin d'éviter l'amplification d'ADN génomique et donc d'assurer l'amplification des molécules d'ARN par qPCR, les amorces ont été sélectionnées sur deux exons différents séparés par un intron d'au moins 1 kb.

- Il n'y a pas d'homologie entre les séquences choisies et d'autres transcrits chez le lapin, nous assurant l'amplification réalisée correspond bien à celle du gène ciblé.

- Les amorces ne forment pas de dimères ou de structures secondaires du fait de leur composition nucléotidique, permettant une amplification du gène cible uniquement et évitant la quantification d'autres produits.

- Les deux amorces doivent avoir des Tm proches, permettant au couple d'agir ensemble, élément nécessaire à la réalisation de l'amplification.

Pour chaque cytokine et le gène de référence, les amorces ont été dessinées, vérifiées et commandées chez Sigma. Les amorces sont livrées sous forme de lyophilisat, à température ambiante. Elles sont immédiatement dissoutes dans de l'eau milliQ afin d'obtenir une solution à 100 µM, puis conservées à -20°C.

c. Test de l'efficacité des amorces dessinées

Les couples d'amorce dessinés ont ensuite été testés sur deux échantillons de rate et deux échantillons d'iléon de lapin, afin de confirmer leur efficacité et de déterminer les concentrations d'amorces nécessaires pour obtenir une amplification.

- *Extraction et quantification de l'ARN des tissus*

L'extraction de l'ARN a été réalisée d'après le protocole présenté en annexe 6. L'ARN extrait à la suite de ce protocole est ensuite quantifié et qualifié grâce au Nanodrop®. La connaissance de la quantité d'ARN calculée permettra de réaliser la PCR sur des échantillons égaux en quantité de matériel génétique.

- *Transcription inverse (RT)*

Afin de réaliser la qPCR, les ARN extraits sont transcrits en ADNc via la réalisation d'une transcription inverse ou reverse transcription (RT). Chaque échantillon d'ARN subit

une dilution afin d'avoir une quantité de 2000ng d'ARN à transcrire en ADNc. La transcription inverse s'effectue par ajout des constituants nécessaires à celle-ci, puis par conservation des échantillons à 25°C pendant 10 minutes, 37°C pendant 2 heures et 85°C pendant 5 minutes. Ce cycle de température est réalisé sur le PTC-200 (MJ Research). Le protocole de transcription inverse est développé en annexe 7. Les échantillons issus de la RT contiennent 2000ng d'ADNc et sont ensuite conservés à -80°C.

- Test des amorces

Les concentrations de 300 et 900 nM ont été testées pour chaque amorce, soit 300F/300R, 300F/900R, 900F/300R et 900F/900R. Le test a été réalisé par qPCR sur des plaques de 96 puits et sur Abiprism 7300 à l'UMR ToxAlim. La qualité des amorces est vérifiée si celles-ci ne forment effectivement pas de dimères et possèdent une amplification suffisante pour assurer une quantification de l'ADNc des échantillons après RT. La sélection des concentrations a été réalisée selon l'efficacité de la PCR associée et le niveau du cycle seuil (Ct le plus faible). Le résultat des tests des amorces est développé dans les résultats.

C. Analyse de l'expression des cytokines inflammatoires par RT-qPCR

Les 32 échantillons de chaque tissu ont subi une RT-qPCR sur les 6 gènes (gène de référence et gènes d'intérêt), grâce à des couples d'amorces dessinés lors de la mise au point (cf. B.) capables d'amplifier le gène cible. L'extraction de l'ARN des échantillons et la RT ont été réalisées selon la méthode développée en B.2.c., ayant permis de produire des échantillons d'ADNc disponibles pour l'étape de qPCR. Cette seconde technique a été effectuée sur la plateforme TRIX à l'UMR ToxAlim, sur des plaques de 384 puits sur l'appareil de qPCR ViiA7 (Applied Biosystems), système de détection de séquences avec utilisation du SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Les plaques 384 puits ont été remplies à l'aide du robot « Bravo » (Agilent Technologies) à partir de plaques stock composées des échantillons d'ADNc et du mix de qPCR. La composition des plaques stock est développée en annexe 8. Le plan des plaques de qPCR est décrit en annexe 9. Les manipulations d'extraction d'ARN, de purification, de transcription inverse et de qPCR, ont été réalisées de façon à éviter tout biais pouvant interférer avec les résultats obtenus : l'ensemble des groupes HDR, HDL, HPR et HPL ont subi les manipulations en simultané.

| | Gènes | Séquences | Concentrations d'amorces (en nM) | Efficacité PCR | Cycle seuil |
|--------------|--------------|--|----------------------------------|----------------|-------------|
| RATE | GAPDH | F : TCTACATGTTCCAGTATGATTCCACC R : TGACCGTGCCGTGGAAC | 300F/300R | 103,4 | 20,67 |
| | TNF α | F : GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA R : ATCTGGGCCACAGGGTTGA | 300F/300R | 98,6 | 26,21 |
| | IL-6 | F : TCCGGAGCATCCTGGAGAC R : TCATGGTCACACATCTCTTTCCTC | 900F/900R | 103,0 | 32,15 |
| | IL-1 β | F : CAAGTGGTGTCTCCATGAGTTTT R : CTTGTCGTTACTTTCTTCTCCTTGC | 300F/900R | 96,4 | 25,96 |
| | IL-8 | F : TGGCTCTCTTGGCAACCTTC R : CAGAACTGCAGCTTCACAAAGAGT | 900F/900R | 87,4 | 32,86 |
| | IL-17 | F : AAGGCCTTCAGACTACTACAATCGA R : CGGTGGAGAGTCCAAGGTGA | 900F/300R | 95,8 | 30,09 |
| ILEON | GAPDH | F : TCTACATGTTCCAGTATGATTCCACC R : TGACCGTGCCGTGGAAC | 900F/300R | 96,0 | 19,61 |
| | TNF α | F : GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA R : ATCTGGGCCACAGGGTTGA | 900F/300R | 80,1 | 29,39 |
| | IL-6 | F : TCCGGAGCATCCTGGAGAC R : TCATGGTCACACATCTCTTTCCTC | 900F/900R | 104,0 | 33,77 |
| | IL-1 β | F : CAACAAGTGGTGTCTCCAT R : GAGGTGCTGATGTACCAGT | 900F/300R | 82,3 | 27,86 |
| | IL-8 | F : TGGCTCTCTTGGCAACCTTC R : CAGAACTGCAGCTTCACAAAGAGT | 900F/900R | 75,3 | 30,33 |
| | IL-17 | F : AAGGCCTTCAGACTACTACAATCGA R : CGGTGGAGAGTCCAAGGTGA | 300F/900R | 91,1 | 31,09 |

Tableau 1 : Amorces validées pour la qPCR des cytokines inflammatoires IL-6, IL-8, TNF α , IL-1 β , IL-17 sur la rate et l'iléon et concentrations d'amorces sélectionnées. Les concentrations 300F/300R, 300F/900R, 900F/300R et 900F/900R ont été testées. F : Forward R : Reverse.

D. Analyse statistique des données

Les données de PCR en temps réel sont exprimées par nombre de cycles nécessaires pour obtenir une amplification (Ct ou threshold cycle). L'expression relative du gène d'intérêt a été calculée en rapportant le Ct du gène à celui du gène de référence (GAPDH). La méthode utilisée pour obtenir ce rapport est le calcul des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen, 2001). L'analyse statistique des données a été effectuée sous R 2.12.0, par une ANOVA à deux facteurs (hygiène et alimentation) et interaction (hygiène x alimentation). Ces données ont subi une transformation logarithmique pour suivre la loi normale (test de Shapiro-Wilk) et le test d'homogénéité des variances (test de Bartlett), nécessaires pour valider une analyse de variance.

IV. Résultats

A. Test des couples d'amorces pour l'analyse des cytokines inflammatoires

La mise au point de la mesure de l'expression des cytokines inflammatoires a été réalisée par dessin d'amorces spécifiques. Les résultats de cette étape préliminaire sont récapitulés dans le tableau 1. Les séquences sens et anti-sens (F et R respectivement) des couples d'amorces ont été définies lors du dessin et le test des concentrations développées en X.X. ont permis de définir les concentrations les plus efficaces pour la qPCR. Les concentrations d'amorces obtenant le cycle seuil le plus faible et le niveau d'efficacité le plus fort ont été sélectionnées pour la mesure de l'expression des cytokines sur l'ensemble des échantillons. Cette sélection est décrite dans le tableau 1.

B. Expression des cytokines inflammatoires dans les organes lymphoïdes

L'expression des cytokines pro-inflammatoires $TNF\alpha$, IL-1 β , IL-17, IL-6 et IL-8 a été quantifiée dans les organes lymphoïdes du tube digestif par PCR en temps réel. L'analyse statistique n'a pas révélé d'interactions significatives entre les deux facteurs, hygiène et restriction. Aussi, les expressions relatives moyennes sont présentées pour chaque facteur, dans les figures 5 et 6. Chez le lapin en fin de croissance, on observe un effet significatif de la restriction alimentaire sur l'expression de ces cytokines, plus ou moins prononcé en fonction de l'organe cible (figure 3). En l'occurrence, l'effet est particulièrement prononcé dans l'iléon, avec une diminution de 50% de l'expression de IL-1 β ($p < 0,001$) et de $TNF\alpha$ ($p < 0,01$), de 40% de l'expression de IL-6 ($p < 0,01$) et de 35% de l'expression de IL-8 ($p < 0,05$) chez les animaux restreints à 70%.

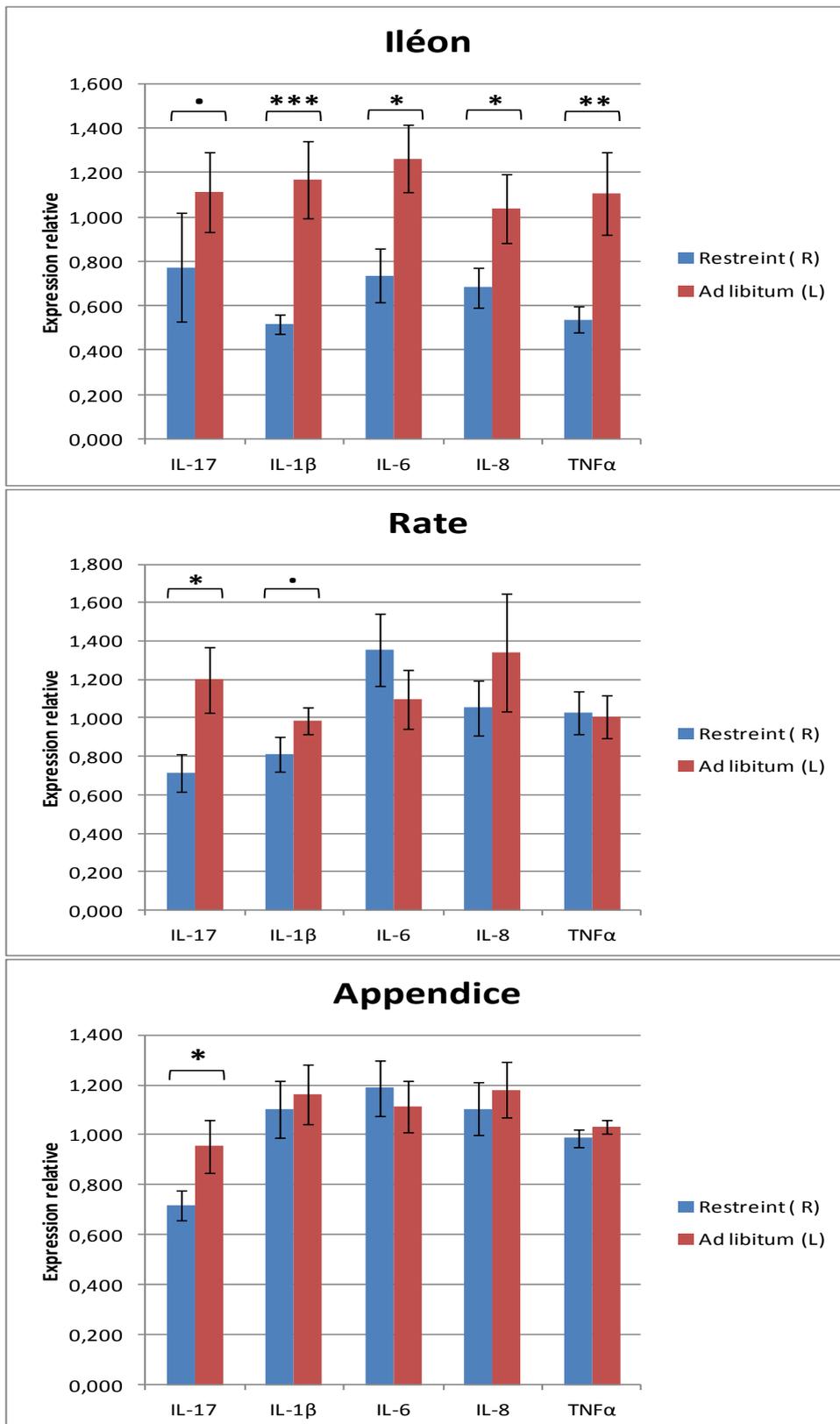


Figure 5 : Expression relative des cytokines pro-inflammatoires IL-17, IL-1β, IL-6, IL-8 et TNFα dans l'iléon, la rate et l'appendice caecal, exprimées en valeurs moyennes des $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec SEM, en fonction du groupe restreint (R) ou ad libitum (L). Seuils de significativité : . $p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

De même, on observe une tendance à la diminution de l'expression de 30% pour IL-17 ($p < 0,1$) pour ces mêmes animaux. Au niveau de la rate, l'expression de IL-17 est diminuée de 40% ($p < 0,05$) et l'expression de IL-1 β tend à être diminuée à hauteur de 30% ($p < 0,1$) chez les animaux restreints à 70%. Cependant aucune différence significative n'est observée pour les autres cytokines analysées. Au niveau de l'appendice caecal, on observe une diminution de 25% de l'expression de IL-17 ($p < 0,05$) mais aucune différence significative pour l'expression des autres cytokines. La dégradation de l'hygiène, quant à elle, n'a montré aucun effet significatif sur l'expression des cytokines dans les tissus lymphoïdes (figure 6).

V. Discussion

A. Effet de la restriction alimentaire

L'effet de la restriction alimentaire sur l'expression des cytokines inflammatoires et l'ensemble des paramètres analysés lors de cette expérimentation est récapitulé dans le tableau 2. La restriction alimentaire réduit l'expression des gènes liés à la production de cytokines pro-inflammatoires au niveau des tissus lymphoïdes, et plus particulièrement au niveau de l'iléon. Ainsi, le fait d'abaisser le niveau basal (chez l'animal sain) de la réponse inflammatoire pourrait limiter l'emballement de la réponse inflammatoire systémique lors d'infections digestives, comme cela a été montré chez le rat (Matsuzaki *et al.*, 2001). En parallèle, les résultats obtenus préalablement sur cette étude (Combes *et al.*, 2013) ont montré une réduction de 70% ($p < 0,05$) du taux de mortalité chez les lapins restreints, durant les 2 semaines qui suivent le sevrage (période 28-40j). De plus, une ingestion restreinte de 30% semble avoir un effet positif sur la défense immunitaire non spécifique, avec une légère augmentation (+ 2%) de la concentration sérique en IgG totales ($p < 0,05$).

En revanche, le microbiote caecal, analysé pour notre étude (Massip *et al.*, 2012) ne semble fortement pas modifié par la restriction alimentaire, au moins pour les familles bactériennes majoritaires.. Par conséquent, les effets obtenus sur les caractéristiques zootechniques et sur la réponse immunitaire et inflammatoire semblent peu corrélés à une modification du microbiote caecal. Une analyse statistique plus précise visant la mesure des corrélations entre ces paramètres serait néanmoins nécessaire pour valider complètement cette hypothèse.

La restriction alimentaire aurait un effet de réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Cela limiterait le stress provoqué par la réponse inflammatoire sur

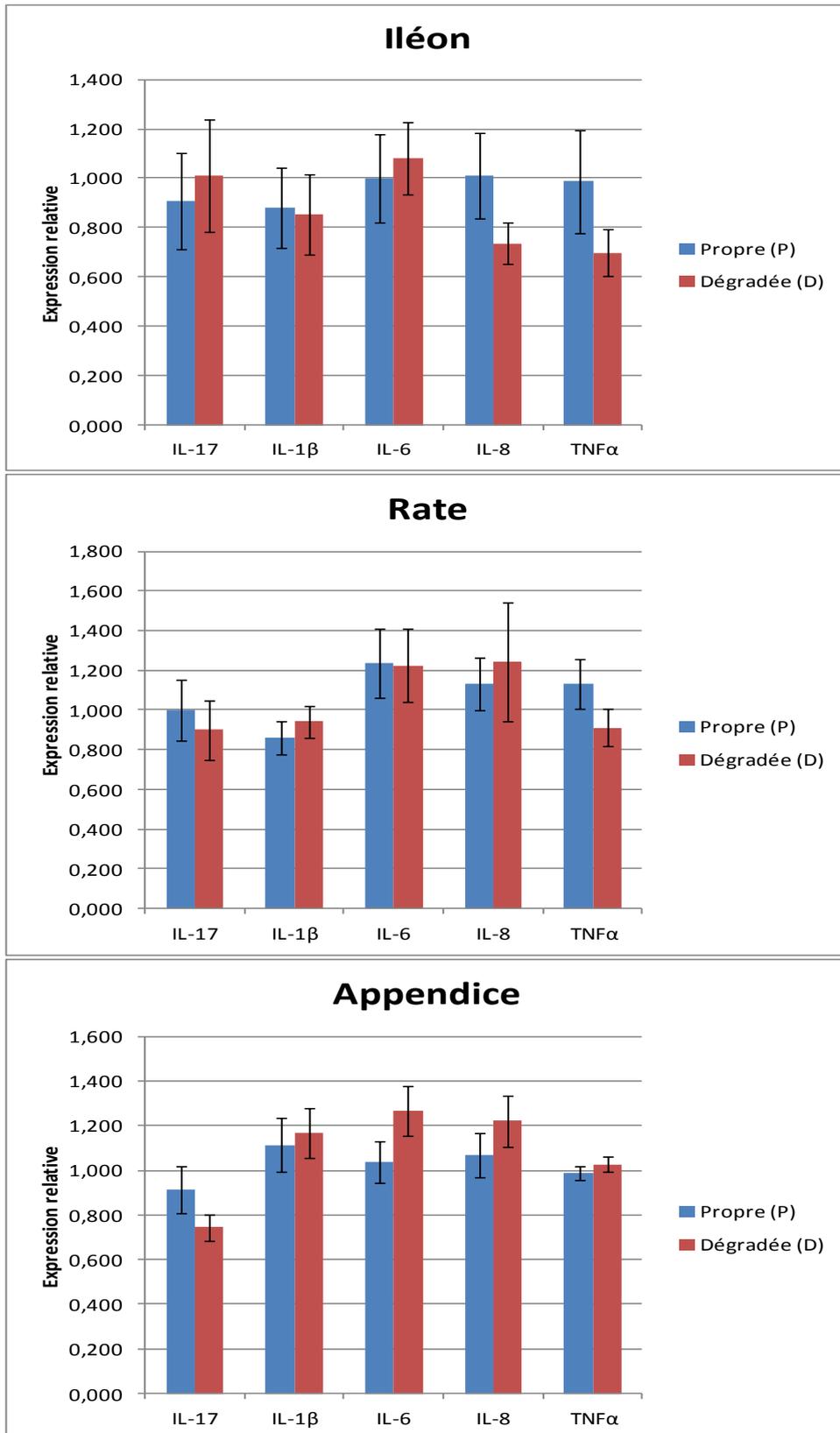


Figure 6 : Expression relative des cytokines pro-inflammatoires IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α dans l'iléon, la rate et l'appendice caecal, exprimées en valeurs moyennes des $2^{-\Delta\Delta Ct}$, avec SEM, en fonction du groupe hygiène propre (P) ou dégradée (D). Seuils de significativité : . $p < 0,1$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

l'organisme, expliquant ainsi l'effet favorable d'une ingestion restreinte sur la santé digestive du jeune lapin.

Etant donné les résultats zootechniques obtenus, on peut par ailleurs considérer l'hypothèse de l'allocation des ressources, selon laquelle il existe une compétition entre les voies métaboliques de l'organisme pour les différentes fonctions (croissance, immunité, etc.). En l'occurrence, ici, une diminution de l'activité immunitaire et inflammatoire serait liée à une augmentation de l'activité de digestion ainsi que cela a été observé chez le lapin restreint (Gidenne *et al.*, 2012), et qui se traduit ici par une meilleure efficacité alimentaire. La restriction alimentaire aurait donc un effet bénéfique sur l'activité digestive et son efficacité, en plus de limiter l'inflammation des tissus.

B. Effet de la dégradation de l'hygiène

L'effet de la dégradation de l'hygiène sur l'ensemble des paramètres de l'expérimentation sont récapitulés dans le tableau 2. Notre modèle de dégradation de l'hygiène n'entraîne pas d'effet majeur sur l'expression des cytokines inflammatoires, quelle que soit le tissu : rate, iléon ou appendice caecal.

En parallèle, rappelons qu'une hygiène dégradée avait un effet bénéfique surprenant sur la morbidité (-53% ; $p < 0.01$), alors que le taux de mortalité n'était pas affecté. De plus, la réponse immunitaire spécifique, mesurée grâce à la concentration plasmatique en IgG anti-ovalbumine, s'avère être diminuée (-11,5% à 45j et -4,1% à 63j ; $p < 0,05$) chez les animaux en hygiène dégradée (Combes *et al.*, 2013). Le microbiote caecal (Massip *et al.*, 2012) ne montre pas d'écart de densité de la population bactérienne, mais une modification de sa composition : on observe en effet une plus faible abondance en Lachnospiraceae (33,6% vs 38,2% ; $p < 0,05$) et un ratio Ruminococcaceae/Lachnospiraceae plus élevé (1,59 vs 1,25 ; $p < 0,05$). Cette modification du microbiote, quoique modérée, pourrait avoir un impact sur la défense non immunologique des animaux, permise par la « barrière microbienne ». En effet, le microbiote s'avère avoir un rôle important en assurant la compétition avec les espèces extérieures, susceptibles de causer des troubles au niveau digestif. Cette modification pourrait donc expliquer une réponse immunitaire spécifique plus faible chez les animaux en hygiène dégradée, liée à une intensification de l'effet barrière permis par le microbiote.

Egalement, il a été observé une tendance à l'effet de l'hygiène sur la croissance des animaux, avec une diminution de 8g/j du GMQ entre 28 et 42 jours d'âge, ce qui représente une diminution de moins de 2% ($p = 0,8$). Cette observation, bien que légère, confirme les

| | | Effet restriction | Effet dégradation de l'hygiène |
|---|-----------------------------|--|--|
| Résultats zootechniques | Croissance | R < L (-16,3%) | HD =< HP (<2% entre 28 et 42j) |
| | Efficacité alimentaire (IC) | R > L (-15% sur IC) | HD > HP (-2% sur IC) |
| Santé | Mortalité | R << L (-70%) | HD = HP |
| | Morbidité | R = L | HD < HP (-53%) |
| Microbiote | | R = L | HD ≠ HP |
| Réponse immunitaire systémique | IgG sériques totales | R > L (2%) | HD = HP |
| | IgG sériques anti-OVA | R = L | HD < HP (-11,5% à 45j; -4,1% à 63j) |
| Expression cytokines pro-inflammatoires | Iléon | R << L (30 à 50%) | HD = HP |
| | Rate | R =< L (30 et 40% pour IL-17 et TNFα) | HD = HP |
| | Appendice | R =< L (25% pour IL-17) | HD = HP |

Tableau 2 : Synthèse des résultats obtenus au cours de l'expérimentation, sur les paramètres zootechniques, la santé, le microbiote, la réponse immunitaire systémique et la réponse inflammatoire du lapin, suivant les effets de restriction alimentaire à 70% de l'ad libitum et de dégradation de l'hygiène. Sources : Combes et al., 2013 ; Massip et al., 2012.

résultats obtenus chez le porc, montrant un effet de la dégradation de l'hygiène sur les performances de croissance des animaux (Pastorelli *et al.*, 2013) avec une prise de poids diminuée chez les animaux en hygiène dégradée. Cette diminution de la croissance est corrélée avec une augmentation de l'efficacité alimentaire (-0,1 pt) (Combes *et al.*, 2013).

Les résultats du contrôle d'ambiance des salles au cours de l'expérimentation en 2011 avaient révélé une faible disparité entre la salle « propre » et la salle « dégradée » (Combes *et al.*, 2013), concernant la présence de coliformes, salmonelles et staphylocoques ainsi qu'en dénombrement de la flore totale au niveau du matériel et de l'air ambiant. Cette caractéristique expliquerait l'effet léger de la dégradation de l'hygiène d'un point de vue zootechnique et immunologique. Il est possible que les disparités, notamment en matière d'expression des cytokines pro-inflammatoires, auraient été plus élevées si la différence d'ambiance microbienne entre les salles HP et HD était plus nette.

C. Interaction entre hygiène dégradée et restriction alimentaire

Les résultats obtenus concernant l'expression des cytokines ne montrent aucune différence significative entre les lots HDR, HDL, HPR et HPL. En corrélation avec les résultats d'Océane Martin concernant la réponse immunitaire spécifique et non spécifique par dosage des IgG dans le sang au cours de l'expérimentation, l'interaction entre la restriction alimentaire et la dégradation de l'hygiène ne présente aucun effet particulier sur la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire. Etant donné la faible disparité entre les salles HD et HP, d'après les contrôles d'ambiance microbienne réalisés au cours de l'expérimentation, il est difficile d'évaluer l'interaction entre les deux stress.

Compte tenu du taux modéré de mortalité, on peut cependant considérer que les animaux ont été élevés dans un environnement peu contaminé en pathogènes, quelle que soit la salle. Dans notre étude, les contrôles d'ambiance des salles et les autopsies de trois animaux n'ont permis de détecter aucune infection par des pathogènes de type Coccidies, *E. coli* pathogène, *Clostridium piriforme* (Combes *et al.*, 2013). Par conséquent, la réponse inflammatoire chez les animaux témoins, nourris *ad libitum*, est probablement modérée comparée à des animaux qui auraient subi une infection expérimentale comme dans certaines études antérieures (Boisot *et al.*, 2003). Chez les animaux restreints, l'expression des cytokines pro-inflammatoires est diminuée de 30 à 50 % par rapport aux animaux *ad libitum*, dans l'iléon. Or, chez le lapin, il a été montré qu'une infection à *Shigella flexneri*, bactérie responsable de troubles intestinaux sévères, entraîne une forte réponse inflammatoire avec

une augmentation de l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires, 4 à 17 fois supérieure aux animaux sains, notamment pour IL-17A, IL-1 β , TNF α , IL-6 et IL-8 (Schnupf et Sansonetti, 2012). Ceci pose la question de l'impact sur le développement de l'immunité, étant donné le lien étroit entre l'expression des cytokines et la production de cellules de l'immunité (prolifération des lymphocytes et activation/migration des neutrophiles entre autres).

Ce point a également été évoqué chez d'autres espèces. A titre d'exemple chez la souris, si le blocage d'IL-6 par des anticorps s'avère assurer la survie de l'hôte dans le cas de septicémie péritonéale polymicrobienne (Riedemann *et al.*, 2003), il entraîne également une plus forte mortalité chez les animaux infectés par différents pathogènes tels que *E. coli* (Dalrymple *et al.*, 1996), *Klebsiella pneumonia* (Van Enkevort *et al.*, 2001) et *Streptococcus pneumonia* (Van der Poll *et al.*, 1997). Chez le porc, le sevrage précoce des animaux a montré une diminution de la réponse en cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF α) chez les animaux atteints d'une entéropathie induite par *E. coli*, ayant de graves répercussions sur les lésions au niveau du tube digestif et entraînant une mortalité plus importante (McLamb *et al.*, 2013). Un stress appliqué en période post-sevrage aurait donc un effet négatif sur le développement du système immunitaire du porcelet.

Pourtant, une étude réalisée chez le lapereau sur l'effet d'une restriction à 65 % de l'ingestion libre, de 30 à 50 jours d'âge, sur l'infection par *E. coli* (Boisot *et al.*, 2003), a montré une forte diminution de la mortalité chez les animaux restreints, en comparaison avec des animaux nourris ad libitum. Cette information suggère que le stress de restriction alimentaire appliqué au lapin affecte de façon bénéfique la défense spécifique à un pathogène donné, contrairement aux résultats obtenus chez le porc ou la souris. Il s'avère en fait, qu'une stratégie de limitation de l'ingéré de 20 à 30% chez le lapin ne correspond pas au même stress que chez le porcelet. En effet, alors que le porcelet consomme peu d'aliment sec avant le sevrage, le lapereau en consomme déjà une quantité importante (45 à 65 g/j). Ainsi, pour le lapin, le sevrage correspond surtout à un stress de séparation de la mère. Il semble donc difficile de comparer l'impact du rationnement post-sevrage chez ces 2 espèces.

En conclusion, l'effet favorable des stratégies de limitation de l'ingestion après le sevrage sur la réduction des troubles digestifs chez le lapin, semble provenir d'un effet favorable sur la défense immunitaire non spécifique, tout en limitant les risques d'une exacerbation de la réponse inflammatoire.

VI. Conclusion

La restriction alimentaire en post-sevrage a montré dans de nombreuses études son effet positif sur la santé du lapin. Elle s'avère d'ailleurs être une pratique couramment utilisée en élevage, réduisant fortement l'apparition de troubles digestifs et par conséquent la mortalité. Il était important de considérer les réponses immunitaires liées, afin de mieux comprendre les mécanismes induisant cette amélioration de la santé digestive du lapin. Les analyses précédemment réalisées sur cette étude par Combes *et al.* (2013) ont permis de confirmer des résultats déjà connus, tels que la diminution de la croissance et l'amélioration de l'efficacité alimentaire, mais également une légère augmentation de la réponse immunitaire systémique non-spécifique chez les animaux restreints. L'analyse de la réponse inflammatoire, originale chez le lapin, est étroitement liée au développement de l'immunité, et elle est réduite au niveau intestinal chez l'animal dont l'ingestion est réduite de 30% : avec une baisse de 30 à 50% de l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'iléon et de 40% et 25% de l'expression de IL-17 dans la rate et l'appendice caecal respectivement. La diminution des troubles digestifs chez le lapin restreint peut donc être mise relation avec une réponse inflammatoire plus faible. Ainsi, l'effet favorable de la restriction alimentaire sur la santé digestive du lapereau pourrait s'expliquer par une modulation du système immunitaire et inflammatoire..

Selon la théorie hygiéniste, la dégradation de l'hygiène de l'habitat permettrait un meilleur développement de l'immunité des animaux en les exposant à un milieu plus riches en microbes, pathogènes ou non. L'analyse de l'expression des cytokines ne nous a pas permis d'observer une quelconque modification de la réponse inflammatoire chez les animaux exposés à une hygiène dégradée. Cependant, les résultats précédemment obtenus sur cette expérimentation par Combes *et al.* (2013) et Massip *et al.* (2012) ont permis de remarquer une modification du microbiote et une diminution de la réponse immunitaire spécifique en hygiène dégradée, qui peut être expliquée par un « effet barrière » du microbiote intestinal plus fort.

VII. Perspectives

Les mécanismes immunitaires expliquant l'amélioration de la santé des animaux subissant une restriction alimentaire en post-sevrage ne restent que partiellement connus. En effet, la réponse immunitaire systémique pourrait être complétée d'une réponse immunitaire locale (dosage sérique d'IgA), qui permettrait une meilleure interprétation de la réponse inflammatoire locale. D'autre part, nous pouvons nous poser la question de l'impact à long terme d'un stress de restriction alimentaire sur la réponse immunitaire, du fait que celle-ci implique une plus faible expression des cytokines pro-inflammatoires.

En second lieu, les résultats obtenus entre les modalités hygiène dégradée et hygiène propre montrent un effet léger sur l'immunité et aucun effet significatif sur la réponse inflammatoire. Si la dégradation de l'hygiène diminue la morbidité des lapins en post-sevrage, il est difficile de les mettre en relation avec les mécanismes immunitaires associés. D'autres critères d'analyse de la réponse peuvent être évalués, tels que la réponse immunitaire locale et l'expression des cytokines anti-inflammatoires. De plus, étant donné la faible disparité en matière de microbisme ambiant dans les deux salles, il pourrait être intéressant d'accentuer la dégradation de l'hygiène, ce qui permettrait éventuellement de mieux observer les mécanismes immunitaires impliqués, de pouvoir corrélérer les deux paramètres (hygiène et rationnement) et de connaître les réponses associées dans le cas où les animaux seraient exposés à des pathogènes.

Références

Abreu-Martin M. T., Targan S. R. (1996). Regulation of immune responses of the intestinal mucosa. *Crit. Rev. Immunol.*, 16, pp. 277-309.

Bauer E., Williams B. A., Smidt H., Verstegen M. W. A., Mosenthin R. (2006). Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr. Issues Intestinal Microbiol.*, 7, pp. 35-52.

Berg R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.*, 4, pp. 430-435.

Boisot P., Licois D., Gidenne T. (2003). Une restriction alimentaire réduit l'impact d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. In *Proc. 10^{ème} J. Rech. Cunicoles Fr., G. Bolet (Ed.), Paris, ITAVI publ. Paris France, 19-20 nov.*, pp. 267-270.

Brambell, F. W. R. (1966). The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet, ii.*, pp. 1087-1093.

CLIPP. Plan de médication raisonnée. 8 décembre 2011., pp. 1-143.

Combes S., Cauquil L., Massip K., Martin O., Le FLoc'h-Burban N., Zemb O., Gidenne T. (2013). 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 limitation strategy. *Publication en cours.*

Dalrymple S. A., Slattery R., Aud D. M., Krishna M., Lucian L. A., Murray R. (1996). Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic Escherichia coli infection. *Infect. Immun.*, 64(8), pp. 3231-35.

Ermak T. H., Bhagat H. R., Pappo J. (1994). Lymphocyte compartments in antigen-sampling regions of rabbits mucosal lymphoid organs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50, pp. 14-28.

Feghali C. A., Wright T. M. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.*, 2, pp. 12-26.

Feldmann M., Saklatvala J. (2001). Proinflammatory cytokines. *Cytokine Ref.*, 1, pp. 291-305.

Fortun-Lamothe L., Drouet-Viard F. (2002). Review : II- Diet immunity : current state of knowledge and research prospects for the rabbit. *World Rabbit Science*, 10(1), pp. 25-39.

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 Sci.*, 107(1), pp. 1-18.

Gidenne T., Combes S., Licois D., Carabano R., Badiola I., Garcia J. (2008). The caecal ecosystem and the nutrition of the rabbit : Interaction with digestive health. *INRA Productions Animales*, 21, pp. 239-249.

Gidenne T., Feugier A. (2009). Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal*, 3(4), pp. 501-508.

Gidenne T., Combes S., Fortun-Lamothe L. (2012). Restreindre l'ingestion du jeune lapin : De nouvelles stratégies pour renforcer sa santé digestive et améliorer son efficacité alimentaire. *INRA Prod. Anim.*, 25, pp. 323-336.

Gouet P.H., Fonty G. (1979). Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, 19(3A), pp. 553-556.

Griffiths D. J., Voisset C., Venables P., Weiss R. A. (2002). Novel Endogenous Retrovirus in Rabbits Previously Reported as Human Retrovirus 5. *J Virol.*, 76(14), pp. 7094–7102.

Guarner F., Malagelada J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet.*, 361(9356), pp. 512-519.

Hamann L., El-Samalouti V., Ulmer A. J., Flad H. D., Rietschel E.T. (1998). Components of gut bacteria as immunomodulators. *Int. J. Food Microbiol.*, 41, pp. 141–154.

Hein WR. (1999). Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 236, pp. 1-15.

Hooper L.V., Gordon J.I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292, pp. 1115-1118.

Hooper L.V. (2004). Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.*, 12, pp. 129–134.

Lanning D., Zhu X., Zhai S. K., Knight K. L. (2000). Development of the antibody repertoire in rabbit: gut associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunol. Rev.*, 175, pp. 214–228.

Lanning D., Zhu X., Zhai S.K., Knight K.L. (2009). Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunological reviews*, 175(1), pp. 214-228.

Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25, pp. 402-408.

Mackie R. I., White B. A. (1997). Gastrointestinal Microbiology. *Chapman and Hall Microbiology series 1997. Chapman and Hall New York, NY.*

Mage R. G. (1998). Diversification of rabbit VH genes by gene-conversion-like and hypermutation mechanisms. *Immunol. Rev.*, 162, pp. 49-54.

Martin O., Réponses physiologiques et immunitaires du lapereau en situation d'ingestion limitée ou d'hygiène dégradée. France. 2011.

Massip K., Combes S., Cauquil L., Zemb O., Gidenne T. (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.

Matsuzaki, J., M. Kuwamura, R. Yamaji, H. Inui, and Y. Nakano. (2001). Inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed in 40% energy-restricted mice. *Journal of Nutrition*, 131, pp. 2139-2144.

McLamb B. L., Gibson A. J., Overman E. L., Stahl C., Moeser A. J. (2013). Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to Enterotoxigenic E. Coli challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *Plos One.*, 8(4), pp. 1-12.

Mulder I. E., Schmidt B., Stokes C. R., Lewis M., Bailey M., Aminov R. I., Prosser J. I., Gill B. P., Pluske J. R., Mayer C. D., Musk C. C., Kelly D. (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7, p 79.

OFFICE DE L'ELEVAGE. (2008). Le marché des produits laitiers, carnés et avicoles en 2008. *Office national interprofessionnel de l'élevage et de ses productions*.

Pastorelli H., Le Floc'h N., Merlot E., Meunier-Salaün M. C., Van Milgen J., Montagne L. (2012). Feed restriction applied after weaning has different effects on pig performance and health depending on the sanitary conditions. *J. of Anim. Sci.*, 90, pp. 4866-4875.

Poitras E., Houde A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2(2), pp. 2-11.

Rhee K. J., Sethupathi P., Driks A., Lanning D. K., Knight K. L. (2004). Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. *J. Immunol.*, 172(2), pp. 1118-1124.

Riedemann N. C., Neff T. A., Guo R. F., Bernacki K. D., Laudes I. J., Sarma J. V., Lambris J. D., Ward P. A. (2003). Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J. Immunol.*, 170, pp. 503-507.

Savage D. C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Microbiology*, 31, pp. 107-133.

Schnupf P., Sansonetti P. J. (2012). Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response: assessment of acute *Shigella flexneri* infection. *PLoS One*, 7(6), p 36446.

Shroff K. E., Meslin K., Cebra J. J. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.*, 63, p 3904.

Sino Biological Inc. (2013). Cytokine Network. <http://www.sinobiological.com/Cytokine-Network-a-1312.html>

Stappenbeck T. S., Hooper L. V., Gordon J. I. (2002). Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, p 15451.

Vajdy M., Sethupathi P., Knight K. L. (1998). Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits. *J. Immunol.*, 160, p 2725.

Van Enkevort F. H. J., Sweep C. G. J., Span P. N., Netea M. G., Hermus A. (2001). Reduced adrenal response and increased mortality after systemic *Klebsiella pneumoniae* infection in interleukin-6-deficient mice. *European Cytokine Network.*, 12, pp. 581–586.

VanderPoll T., Keogh C. V., Guirao X., Buurman W. A., Kopf M. (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*, 176, pp. 439–444.

Van der Waaij D., Berghuis-de Vries J. M., Lekkerkerk-van der Wees J. E. C. (1971). Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J. Hyg.*, 69, pp. 405-411.

Wise R. D., Lichter E. A., Dray S. (1971). Presence in rabbit colostrum of IgA autoantibodies to a gastric antigen. *J. Immunol.*, 107, pp. 47–55.

Annexe 1

Ingrédients et composition chimique de l'aliment expérimental

Ingrédients de l'aliment expérimental :

| Aliment type "mixte" | Matière première | % |
|----------------------|---|----------------|
| | Orge (2009/12/23) | 14.500 |
| | Blé tendre (2009/12/28) | 15.000 |
| | Tourteau de soja 46 ("48 profat" INRA 190) | 12.000 |
| | Tourteau de tournesol 28 (ENSO 07011) | 11.000 |
| | Pulpe de betterave (ENSO 061008) | 12.000 |
| | Luzerne déshydratée 15 (90171) "17LP" | 33.000 |
| | Sel (NaCl) | 0.500 |
| | 84V-INZO premix lapin croissance vit+minéraux (ex CL25) | 0.500 |
| | Carbonate Calcium | 0.800 |
| | Phosphate bicalcique | 0.600 |
| | L-Lysine HCL - 98% | 0.100 |
| | TOTAL | 100.000 |

Composition chimique analysée au laboratoire :

| | MS (%) | MM (%) | MO (%) | MAT (%N) | MAT (%PROT) | CB (%) | MG (%) |
|----------------|--------|--------|--------|----------|-------------|--------|--------|
| brut d'analyse | x | x | x | 2,95 | 18,43 | 16,05 | 1,38 |
| g/100gMS | 90,27 | 9,58 | 90,42 | 3,27 | 20,42 | 17,54 | 1,51 |
| g/100g Brut | 90,07 | 8,63 | 81,44 | 2,94 | 18,39 | 16,04 | 1,38 |

| | NDF (%) | ADF(%) | ADL(%) | Hcell(%) | cell(%) | Amidon |
|----------------|---------|--------|--------|----------|---------|--------|
| brut d'analyse | 30,69 | 18,41 | 5,81 | 12,28 | 12,60 | 17,21 |
| g/100gMS | 33,55 | 20,12 | 6,35 | 13,42 | 13,77 | 18,81 |
| g/100g Brut | 30,67 | 18,40 | 5,81 | 12,27 | 12,59 | 17,20 |

MS : Matières sèches
MM : Matières minérales
MO : Matières organiques
MAT : Matière azotées totales exprimées en % d'azote ou en % de protéines
CB : Cellulose brute
MG : Matières grasses totales

NDF : Détergents neutres des fibres
ADF : Détergents acides des fibres
ADL : Détergents acides de la lignine
Hcell : Hémicellulose
cell : cellulose

Composition chimique théorique :

| Nutriment | Apport |
|-------------------------------|---------------|
| Matière sèche | 89,27 |
| Cendres brutes | 8,45 |
| Protéine brute | 17,81 |
| Matière grasse | 2,25 |
| Cellulose Brute | 15,30 |
| NDF | 29,41 |
| ADF | 18,87 |
| ADL | 4,07 |
| Hémicellulose VS | 10,54 |
| WIP (Pectines insolubles) | 7,03 |
| Amidon | 16,40 |
| Sucres totaux | 3,96 |
| Lysine | 0,91 |
| Méthionine | 0,30 |
| Acides aminés Souffrés Totaux | 0,59 |
| Thréonine | 0,69 |
| Tryptophane | 0,24 |
| Calcium | 1,12 |
| Phosphore | 0,49 |
| Sodium | 0,24 |
| Chlore | 0,51 |
| Magnésium | 0,24 |
| Potassium | 1,24 |
| Prot. Digestible | 12,64 |
| Energie Digestible lapin | 2432 |
| Energie Métabolisable lapin | 2290 |
| Cellulose VS ADF-ADL | 14,80 |
| FD/ADF | 0,93 |
| PD/ED | 51,98 |

Annexe 2

Plan des salles expérimentales

| | | |
|-----|---|-----|
| 515 | | 516 |
| 514 | | 517 |
| 513 | | 518 |
| 512 | | 519 |
| 511 | | 520 |
| 510 | | 521 |
| 509 | | 522 |
| 508 | | 523 |
| 507 | ● | 524 |
| 506 | | 525 |
| 505 | | 526 |
| 504 | | 527 |
| 503 | | 528 |
| 502 | | 529 |
| 501 | | 530 |

SALLE 5 : Niveau d'hygiène élevé



| | | |
|-----|---|-----|
| 615 | | 616 |
| 614 | | 617 |
| 613 | | 618 |
| 612 | | 619 |
| 611 | | 620 |
| 610 | | 621 |
| 609 | | 622 |
| 608 | | 623 |
| 607 | ● | 624 |
| 606 | | 625 |
| 605 | | 626 |
| 604 | | 627 |
| 603 | | 628 |
| 602 | | 629 |
| 601 | | 630 |

SALLE 6 : Hygiène dégradée



Cages avec animaux restreints



Cages avec animaux ad-libitum



Contrôle de l'état sanitaire par boîtes de contact



7 animaux par cage
15 cages restreintes
15 cages ad-libitum

Annexe 3

Mode opératoire de la mise en place du modèle hygiène du logement

- Nettoyage approfondi de la salle 5 ayant un niveau d'hygiène élevé

| PRINCIPALES ETAPES | AVEC QUOI ? |
|--|--|
| 1- Cellule vidée de ses animaux | |
| 2- Racler les fosses | |
| 3- Brûler les bourres de poils | Chalumeau |
| 4- Sortir le matériel mobile et éventuellement les cages et trémies par le sas extérieur de la cellule | |
| 5- Couper l'électricité | |
| 6-Dépoussiérer les moteurs et les pales des ventilateurs | |
| 7- Nettoyer minutieusement les cages à l'aire de lavage ou dans la cellule | Karcher |
| 8- Nettoyer la totalité de la cellule, notamment : -plafond -murs -dessus du sas -les recoins permettant la fixation des cages -abreuvoirs -le sas -fosses -racleurs | Pistolet et /ou nettoyeur haute pression, branché dans une autre cellule |
| 9- Réintroduire les cages dans la cellule, à leur place | |
| 10- S'assurer de l'étanchéité de la cellule | |
| 11- Désinfecter la cellule et le matériel intérieur, en faisant fonctionner le nébulisateur | Nébulisateur Désinfectant type TH5 ou VIRKON |
| 12- Laisser la cellule fermée le plus longtemps possible | |
| 13- Eviter les entrées et sorties non indispensables | |
| 14- Nettoyer et désinfecter les tuyauteries d'abreuvement des animaux | Produits anti-algues et anti-tartre type ELVADEP et ELVATARTRE |
| 15- Remettre l'électricité | |
| 16- Noter sur le cahier de la cellule la date de désinfection | Enregistrement - Cahier de traçabilité- |

- Salle 6 modalité hygiène dégradée

Accumulation de fèces sur les deux bandes d'engraissement (soit 10 semaines au total).
Elimination des poils accumulés sur les cages pour permettre aux animaux de respirer.

Annexe 4

Sélection des animaux pour l'analyse de l'expression des cytokines pro-inflammatoires

| Animal | Cage | Lot | Hygiene | Ration | OVA | Pcaec_fr_g | pH_caec | P_rate (g) | P_append (g) | N° abattage |
|--------|------|-----|---------|--------|-----|------------|---------|------------|--------------|-------------|
| 2366 | 502 | TR | T | R | + | 148,85 | 5,46 | 1,54 | 8,03 | 1 |
| 2614 | 504 | TR | T | R | + | 130,38 | 5,7 | 1,77 | 7,95 | 2 |
| 3617 | 510 | TR | T | R | + | 165,68 | 5,54 | 1,36 | 7,11 | 25 |
| 3519 | 512 | TR | T | R | + | 135,12 | 5,28 | 1,55 | 5,81 | 26 |
| 2387 | 516 | TR | T | R | + | 176,89 | 5,31 | 1,58 | 7,18 | 38 |
| 2427 | 518 | TR | T | R | + | 141,06 | 5,48 | 1,38 | 5,21 | 49 |
| 2472 | 520 | TR | T | R | + | 148,1 | 5,35 | 2,01 | 5,8 | 50 |
| 3602 | 522 | TR | T | R | + | 191,22 | 5,7 | 1,58 | 6,76 | 61 |
| 2512 | 503 | TL | T | L | + | 134,95 | 5,68 | 1,62 | 5,27 | 7 |
| 3369 | 505 | TL | T | L | + | 159,43 | 5,75 | 1,96 | 6,87 | 8 |
| 2316 | 509 | TL | T | L | + | 143,08 | 5,84 | 1,93 | 8,36 | 19 |
| 3655 | 511 | TL | T | L | + | 186,19 | 5,69 | 1,59 | 6,52 | 20 |
| 3558 | 515 | TL | T | L | + | 185,91 | 5,92 | 1,78 | 5,94 | 32 |
| 2356 | 517 | TL | T | L | + | 128,91 | 5,51 | 1,68 | 9,15 | 43 |
| 2435 | 519 | TL | T | L | + | 165,05 | 5,69 | 2,18 | 8,99 | 44 |
| 2314 | 523 | TL | T | L | + | 196 | 5,61 | 2,22 | 7,48 | 56 |
| 3659 | 602 | HDR | HD | R | + | 175,09 | 5,42 | 1,57 | 6,4 | 4 |
| 3564 | 604 | HDR | HD | R | + | 166,72 | 5,8 | 1,9 | 5,09 | 5 |
| 3615 | 606 | HDR | HD | R | + | 153,4 | 5,47 | 1,19 | 5,29 | 16 |
| 3637 | 608 | HDR | HD | R | + | 203,5 | 5,7 | 1,29 | 6,02 | 17 |
| 2503 | 616 | HDR | HD | R | + | 167,97 | 5,4 | 1,8 | 6,72 | 41 |
| 3654 | 618 | HDR | HD | R | + | 142,82 | 5,78 | 1,7 | 5,55 | 52 |
| 2369 | 620 | HDR | HD | R | + | 178,53 | 5,49 | 1,67 | 5,47 | 53 |
| 2616 | 622 | HDR | HD | R | + | 171,63 | 5,41 | 1,73 | 5,51 | 64 |
| 3590 | 601 | HDL | HD | L | + | 154,68 | 5,93 | 1,23 | 8,55 | 10 |
| 2608 | 603 | HDL | HD | L | + | 191,63 | 5,55 | 2,5 | 7,02 | 11 |
| 3676 | 605 | HDL | HD | L | + | 159,57 | 5,42 | 1,46 | 7,01 | 22 |
| 2451 | 607 | HDL | HD | L | + | 163,55 | 5,45 | 2,49 | 5,93 | 23 |
| 2443 | 609 | HDL | HD | L | + | 157,46 | 5,53 | 1,57 | 7,41 | 34 |
| 3552 | 611 | HDL | HD | L | + | 185,43 | 5,49 | 1,87 | 6,47 | 35 |
| 696 | 613 | HDL | HD | L | + | 133,26 | 5,43 | 2,54 | 8,72 | 46 |
| 2357 | 617 | HDL | HD | L | + | 141,16 | 5,48 | 2,01 | 7,91 | 58 |

Lots homogènes (+/- 2*ET) : poids lapin, poids appx, poids rate, poids caec
Lot HDL hétérogène poids rate

Annexe 5

Protocole suivi pour le dessin des couples d'amorces

Bases théoriques :

Un bon couple d'amorces :

- Longueur des amorces : 18-30 bases
- Taille de l'amplicon < 150 pb
- Composition en bases : (G+C) : 40-60%
- T_m : 65°C

Eviter les complémentarités en 3' des primers forward (F) et reverse (R) de deux bases ou plus.

Eviter les complémentarités intra-primer (structures secondaires).

Optimum :

- Primers dessinés à cheval sur une jonction exon-exon : pas d'amplification d'ADN génomique.
- Primers dessinés sur des exons différents et incluant au moins un intron pour distinguer l'ADN génomique de l'ADN complémentaire.

Etapes du dessin :

- 1) Trouver la séquence de l'ARNm correspondant au gène étudié chez l'espèce cible dans la base de données Ensembl.
- 2) Idéalement, trouver la séquence d'ADN génomique correspondant au gène étudié dans cette même espèce sur GenBank.
- 3) Réaliser un alignement de la séquence d'ARNm et d'ADN génomique, afin de localiser les introns et exons (utiliser les données fournies par les bases de données GenBank et Ensembl, aligner sous MultAlin).
- 4) Sous Primer Express 2.0, débiter le dessin :
 - Menu File, New, TaqMan® Probe & Primer Design
 - Sous l'onglet Sequence, copier la séquence d'ARNm.
 - Laisser les paramètres par défaut (T_m entre 58 et 60°C) et différence entre les deux amorces F et R inférieure à 2°C, %GC=30-80, longueurs amorces = 9-40 bases (optimum de 20), amplicon = 50-150 bases et T_m<85°C.

- Menu, Options, Find Primers Now
- Choisir parmi les amorces proposées en fonction des caractéristiques mentionnées au début de ce document.
- Des ajustements manuels peuvent être effectués.
- Tester les dimères d'amorces (Forward vs Forward, Forward vs Reverse, Reverse vs Reverse) : dans le menu File, New, Primer Test Document.
- Copier les séquences 5'-3'.

Annexe 6

Protocole d'extraction des ARN à partir d'échantillons de tissu d'iléon, de rate et d'appendice caecal

Matériel et consommables :

- Fast-Prep® FP120, MP Biomedicals (AQM-INRA-31066-345)
- Tubes Lysing Matrice D, MP Biomedicals (réf : 9613-500)
- Centrifugeuse ThermoScientific HERAEUS Fresco21 (AQM-INRA-31066-345)
- Extract All Eurobio (réf : GEXEXT04-0W)
- Chloroforme RP Normapur/Prolabo
- Isopropanol Carlo Erba (réf : 414607)

Prévention et sécurité :

Instructions concernant le Fast-Prep® :

- L'appareil doit être placé sous une sorbonne (AQM-INRA-31066-95)

Instructions concernant les produits chimiques :

- Jusqu'à l'étape de reprise des culots avec de l'eau stérile, les tubes doivent être manipulés sous hotte, avec gants et vêtements de protection. Changer de gants régulièrement ou si contamination lors de l'utilisation de l'Extract All.
- Toujours manipuler les tubes avec des gants pour éviter les contaminations des tubes par des RNAses. Toujours maintenir les tubes dans la glace pour éviter la dégradation du matériel.
- Utiliser tout au long de l'expérience des cônes à filtre

Réalisation :

Le Fast-Prep permet le broyage de douze échantillons lors d'un même run.

J-1 : préparer les tubes à billes Lysing Matrice D la veille de l'extraction :

Identification des tubes correspondant aux échantillons, ajout de 1mL d'Extract All dans chaque tube à billes puis les laisser au frigo toute la nuit.

J0 : préparation du matériel avant le début de l'extraction :

- Nettoyer un ciseau et une pince à l'alcool. Nettoyer ensuite entre chaque échantillon.
- Placer des tubes stériles identifiés de 2mL dans la glace.
- Mettre la centrifugeuse à refroidir à 4°C

- 1) **Récupérer les échantillons** contenant les tissus intestinaux au -70°C, les transporter dans un cooler -20°C et les ranger immédiatement après dans un congélateur -20°C.
- 2) A l'aide du ciseau et de la pince, **couper** le plus rapidement possible un petit morceau de tissu (50-100mg) directement sur cooler -20°C, le mettre dans le tube à bille placé également dans le cooler, ranger l'échantillon au congélateur et laisser le tube à bille contenant le morceau de tissu dans la glace. Répéter l'opération pour chaque échantillon.
- 3) **Broyer** une fois au Fast-Prep vitesse 6 pendant 20 secondes. Puis faire un 2^{ème} run après avoir laissé les échantillons dans la glace 1 minute pour éviter une surchauffe lors du second run et donc une dégradation des ARN.
- 4) **Centrifuger** 10 secondes à 13000G, puis conserver les tubes sur glace. **Transférer** le lysat dans les tubes de 2mL préparés avant le début de l'extraction.
- 5) **Ajouter** au lysat 200µL de chloroforme, **agiter** vigoureusement une quinzaine de fois et laisser **décanter** 5 minutes à température ambiante.
- 6) **Centrifuger** 15 min, 13000G, 4°C.
- 7) 3 phases se distinguent :
 - Une phase colorée inférieure (phénol-chloroforme) : protéines
 - 1 interface blanchâtre : ADN
 - 1 phase aqueuse supérieure et incolore : ARN
- 8) **Ajouter** un volume identique d'isopropanol 100% à la phase aqueuse prélevée et mélanger par inversion. Laisser 10 minutes à température ambiante.
- 9) **Centrifuger** 10 min, 13000G, 4°C.
- 10) A l'aide de la pompe à vide, **éliminer le surnageant** en prenant garde de ne pas aspirer le culot. Eliminer toute trace liquide sur les parois du tube. Remettre le tube dans la glace dès que possible.
- 11) **Nettoyer le culot** avec 1mL d'une solution d'éthanol 75%/H₂O DEPC 25%. Décoller le culot en retournant le tube.
- 12) **Centrifuger** 5 min, 13000G, 4°C.
- 13) A l'aide de la pompe à vide, **éliminer le surnageant** en prenant garde de ne pas aspirer le culot. Eliminer toute trace de liquide sur les parois du tube. Remettre le tube dans la glace dès que possible.
- 14) **Reprendre le culot** dans de l'eau DEPC, environ 100-200 µL, à évaluer selon la taille du culot. Vortexer doucement et laisser les échantillons au frigo pendant 1 à 2 heures pour une dissolution totale. Si le culot se dissout mal, ajouter de l'eau.
- 15) **Estimer la concentration en ARN** et la qualité de l'extraction (ratios 260/280 et 260/230) au **spectrophotomètre Nanodrop®**.

Annexe 7

Protocole de transcription inverse (RT)

Transcription inverse d'ARNm et ADNc

Quantités à prévoir pour réalisation du Mix RT (en μl /échantillon) :

| | |
|---------------------------------------|-----|
| 10x RT buffer | 2 |
| 25x dNTP 100mM | 0,8 |
| 10x rdm primers | 2 |
| enzyme Multiscribe 50U/ μL | 1 |
| eau | 4,2 |

10 μl de Mix RT par puits + 10 μl ARN à 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

RT sur : Thermocycleur PTC-200 (MJ Research) avec programme RT-KIT

Cycle de température du programme RT-KIT :

10 min à 25°C
2 h à 37°C
5 min à 85°C
4°C à l'infini

Annexe 8

Plan et composition des plaques stock pour qPCR sur plaque 384 puits

qPCR 32 echantillons x 6 genes dans 5µl final

Mix Primers

Préparer 320 µl de chaque Mix
 Pour chacun des 6 mix, distribuer 77 µl
 dans les 4 puits correspondants

Mix : 50% SYBR GREEN
 10% Amorçe F
 10% Amorçe R
 30% H2O

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | Mix 1 | Mix 1 | Mix 2 | Mix 2 | Mix 3 | Mix 3 | Mix 4 | Mix 4 | Mix 5 | Mix 5 | Mix 6 | Mix 6 |
| B | Mix 1 | Mix 1 | Mix 2 | Mix 2 | Mix 3 | Mix 3 | Mix 4 | Mix 4 | Mix 5 | Mix 5 | Mix 6 | Mix 6 |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| | |
|-------|-------|
| Mix 1 | GAPDH |
| Mix 2 | TNFα |
| Mix 3 | IL-1β |
| Mix 4 | IL-17 |
| Mix 5 | IL-6 |
| Mix 6 | IL-8 |

Echantillons cDNA

distribuer au minimum (1µl x nbre gènes x niveau réplification) +10µl = 22µL

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|----|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 1 | 7 | 4 | 10 | | | | | | | | |
| B | 2 | 8 | 5 | 11 | | | | | | | | |
| C | 25 | 19 | 16 | 22 | | | | | | | | |
| D | 26 | 20 | 17 | 23 | | | | | | | | |
| E | 38 | 32 | 41 | 34 | | | | | | | | |
| F | 49 | 43 | 52 | 35 | | | | | | | | |
| G | 50 | 44 | 53 | 46 | | | | | | | | |
| H | 61 | 56 | 64 | 58 | | | | | | | | |

Volume réactionnel = 5 µl = 4µl Mix + 1µl cDNA

Annexe 9

Plan de plaque 384 puits pour la qPCR sur 32 échantillons et 6 gènes (une plaque pour chaque organe)

| Nom du gène | |
|-------------|-------|
| gène 1 | GADPH |
| gène 2 | TNFa |
| gène 3 | IL-1b |
| gène 4 | IL-17 |
| gène 5 | IL-6 |
| gène 6 | IL-8 |

| | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| A | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 |
| B | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 | 1 | 4 | 7 | 10 |
| C | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 |
| D | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 | 2 | 5 | 8 | 11 |
| E | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 |
| F | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 | 25 | 16 | 19 | 22 |
| G | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 |
| H | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 | 26 | 17 | 20 | 23 |
| I | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 |
| J | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 | 38 | 41 | 32 | 34 |
| K | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 |
| L | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 | 49 | 52 | 43 | 35 |
| M | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 |
| N | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 | 50 | 53 | 44 | 46 |
| O | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 |
| P | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 | 61 | 64 | 56 | 58 |

Plan de plaque avec coordonnées des puits et numéro de l'échantillon pour chaque puits
 Duplicats pour chaque couple échantillon/gène