

Effets de la teneur en énergie et en protéines de l'aliment sur la composition du microbiote caecal chez le lapereau

T. READ^{1,2,3,4}, L. FORTUN-LAMOTHE^{1,2,3}, T. GIDENNE^{1,2,3}, N. DESTOMBES⁴, L. GRENET⁴,
E. BALMISSE⁵, P. AYMARD⁵, D. LABATUT⁵, S. COMBES^{1,2,3}

¹ INRA, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France;

² Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France;

³ Université de Toulouse INPT ENVT, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage, F-31076 Toulouse, France;

⁴ Terrena, La Noëlle - BP 20199, F-44150 Ancenis, France

⁵ INRA PECTOUL, F-31326 Castanet-Tolosan, France

Résumé – L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de la densité nutritionnelle de l'aliment: haute (aliment H : 10,37 MJ ED/kg et 102 g PD/kg) ou basse (aliment B : 9,63 MJ ED/kg et 95 g PD/kg), sur l'évolution des communautés microbiennes du caecum entre 18 et 49 jours d'âge. Nous avons utilisé 366 lapereaux qui ont été répartis en 2 lots (H et B) à 18 jours d'âge (J18), différant par l'aliment consommé entre J18 et J49. A 18, 28, 35, 43 et 49 jours, 10 lapereaux par lot ont été sacrifiés et le contenu caecal prélevé. L'analyse phylogénétique des communautés bactériennes caecales a été réalisée par pyroséquençage de gènes codant pour l'ARNr 16S. Nos résultats montrent qu'une augmentation de la densité nutritionnelle de l'aliment a un effet sur les abondances relatives de 6 genres bactériens. Les abondances relatives étaient plus élevées pour les genres *Shuttleworthia*, *Anaerostipes*, *dgA11 gut group* et *Odoribacter*, et inférieure pour le genre *Oxalobacter* et un genre non classé de la famille *S24-7* dans le lot H que dans le lot de B ($P < 0,05$). La composition du microbiote était moins variable et tendait vers la stabilité plus rapidement dans le lot H par rapport au lot B. La santé animale n'a pas été affectée par le régime alimentaire ($P = 0,51$). En conclusion, notre étude montre que l'implantation du microbiote digestif peut être modulée par la densité nutritionnelle de l'aliment et qu'un aliment plus riche en énergie et en protéine semble plus favorable à la mise en place d'un écosystème stable.

Abstract – **Effects of dietary energy and protein content on caecal microbiota composition in young rabbits.** The aim of this work was to evaluate the effect of nutrient density of feeds: high (feed H: 10.37 MJ DE/kg and 102 g DP/kg) or low (feed B: 9.63 MJ DE/kg DM and 95 g DP/kg DM), on the evolution of caecal microbial communities between 18 and 49 days of age. A total of 366 rabbits were divided into 2 groups (H and B) at 18 days of age (18d), differing only in the feed received between 18 and 49 days of age. At 18, 28, 35, 43 and 49 days of age, 10 rabbits per group were sacrificed and caecal contents were collected. Phylogenetic analysis of bacterial communities was carried out by pyrosequencing genes encoding 16S rRNA. Our results show that increasing the nutrient density of feed has an effect on the relative abundances of 6 bacterial genera. The relative abundances were higher for the genera *Shuttleworthia*, *Anaerostipes*, *dgA11 gut group* and *Odoribacter*, and lower for the genus *Oxalobacter* and an unclassified genus of the *S24-7* family in the group H compared to the group B ($P < 0.05$). The microbiota composition was more homogenous and tended towards stability more quickly in the group H compared to group B. Animal health was not affected by diet ($P = 0,51$). In conclusion, this study shows that the implantation of gastrointestinal microbiota can be modulated by the nutrient density of feed and that a feed rich in energy and protein seems to be more favorable to the establishment of a stable ecosystem.

Introduction

Les troubles digestifs chez les jeunes lapins sont un problème majeur dans les systèmes d'élevage cynicoles conduisant à une réduction des performances, via augmentation de la mortalité et une baisse de la croissance, induisant donc des pertes économiques. Les communautés bactériennes présentes dans le tube digestif des lapins, en particulier dans le caecum, jouent un rôle important dans la santé intestinale (Carabaño et al, 2006). Les recherches récentes ont montré que ce microbiote a de nombreux rôles physiologiques : hydrolyse et

fermentation des nutriments, régulation du système immunitaire, et action de barrière contre les agents infectieux. La composition et la qualité de l'aliment distribué aux jeunes lapins avant sevrage affecte la physiologie digestive et l'écosystème digestif, et en conséquence module leurs performances (Gidenne et Fortun-Lamothe, 2002). L'aliment, substrat pour les microorganismes, module les conditions physico-chimiques du milieu (le biotope), le transit digestif et la motilité intestinale (Gidenne et al., 2008).

Cette étude a pour objectif d'évaluer l'influence de la « densité nutritionnelle » de l'aliment (teneurs en

énergie et en protéines) distribué dès 18 jours d'âge, sur les communautés bactériennes dans le caecum et la santé digestive des lapereaux entre 18 et 49 jours d'âge.

1. Matériel et méthodes

L'expérimentation a été réalisée à la station expérimentale INRA UE PECTOUL (Toulouse, France).

1.1. Les aliments expérimentaux

Deux aliments expérimentaux, ne contenant ni anticoccidiens ni antibiotiques, et différant par leur densité nutritionnelle ont été utilisés : l'aliment H (haute densité) et l'aliment B (faible densité). Comparé à l'aliment B, l'aliment H était plus riche en amidon (112 vs 70 g/kg), en énergie digestible (ED ; 10,37 vs 9,63 MJ/kg) et en protéines digestibles (PD : 102 vs 95 g/kg ; Tableau 1). Les deux aliments ont été formulés pour avoir un rapport PD/ED similaire, une teneur en amidon modérée (<120 g/kg), et des teneurs en fibres élevées (ADF > 200 g/kg) pour limiter l'apparition des troubles digestifs (tableau 1).

Tableau 1: Composition chimique des aliments expérimentaux distribués aux lapereaux.

g/kg	B	H
Energie digestible (MJ/kg)	9,63	10,37
Protéine digestible	95	102
Amidon	70	112
Matières Grasses	25	29
Fibres digestibles ¹	260	240
ADF	222	200
NDF	386	350
ADL	70	60
PD/ED ratio	9,86	9,83

¹Correspond à la somme (NDF-ADF) et pectines insolubles dans l'eau selon les tables d'ingrédients (Maertens et al., 2002).

1.2. Les animaux et les mesures

Un total de 366 lapereaux provenant de 38 portées (INRA 1077 x Hyplus) a été réparti en 2 lots homogènes à la naissance (allotement en fonction du poids de la lapine, de sa parité et de la taille de la portée). Les portées ont été égalisées à 10 lapereaux/portée 3 jours après la naissance (J0). Après le sevrage (J35), les lapins ont été élevés en cages collectives de 5 lapins par cage provenant de la même portée.

L'essai a eu lieu entre 18 et 49 jours d'âge, et correspond à la distribution de l'aliment H ou B selon le lot éponyme. Entre J18 et le sevrage, les animaux ont été nourris à volonté. En dehors de cette période, ils ont reçus quotidiennement une quantité connue d'aliment (63g et 84g par jour entre 35 à 42 et 42 à 49 jours d'âge, respectivement). Dans les deux lots, les lapines ont reçu pendant toute l'expérimentation un

aliment répondant aux besoins nutritionnels des femelles en reproduction (10.57 MJ ED/kg ; 130 g PD/kg).

Les lapereaux ont été pesés à J18, J28, J35, J43 et J49. La mortalité a été notée quotidiennement et l'état sanitaire a été évalué au moment des pesées. Un lapin présentant des signes de diarrhées, des ballonnements ou un poids anormalement faible (moyenne moins 2 écarts types) était déclaré malade.

1.3 La composition du microbiote caecal

À 18, 28, 35, 43 et 49 jours d'âge, 10 lapins de chaque traitement ont été sacrifiés après éthernarcose et exsanguination. Les animaux sacrifiés avaient un poids représentatif de leur portée (avant sevrage à 35 jours d'âge) ou de leur cage (après le sevrage), et étaient en bonne santé. Les échantillons de contenu caecal ont été prélevés et stockés à -80°C. L'analyse phylogénétique des communautés bactériennes caecales a été réalisée par pyroséquençage de gènes codant pour l'ARN 16S (région V3-V4) par Miseq (illumina).

1.4. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec la version 3.0.3 du logiciel R. La dissimilarité entre les communautés bactériennes a été représentée par nMDS (non Metric Dimensional Scaling, distance de Bray-Curtis) et la valeur ANOSIM a permis de quantifier la dissimilarité (0 non différent, 1 totalement différent). La variabilité de la communauté bactérienne intra-âge et entre deux âges consécutifs ont été évaluées par la distance euclidienne à partir des coordonnées nMDS. Les abondances relatives des genres majoritaires ont été analysées selon un modèle linéaire mixte avec le lot et l'âge comme effets fixes et la portée comme effet aléatoire après transformation et correction des faux positifs. Les individus à J18 n'ont pas été pris en compte dans le modèle linéaire ; bien qu'affectés à un lot, ils ne différaient pas d'un point de vue expérimental (la distribution d'aliment démarrait à J18). Les moyennes par lot ont été comparées en utilisant le test de Tukey. Les pourcentages de mortalité et de morbidité ont été comparés par un test du Khi².

2. Résultats et discussion

2.1 Composition de la communauté bactérienne

Un total de 49 genres a été détecté dans les échantillons caecaux, mais 29 genres représentent à eux seuls 99,5% des séquences totales (tableau 2). La composition des communautés bactériennes, aux niveaux du phylum et de la famille, est conforme à celle trouvée précédemment (Combes et al., 2014). Seulement 5 des 29 genres prédominants ont une abondance relative différente entre les deux lots. Le *dgA11 gut group* de la famille *Rikenellaceae*, présente une abondance plus élevée chez les lapins du lot H que chez ceux du lot B (3,56 vs 2,30%, respectivement, $P < 0,05$).

Les études précédentes suggèrent que ces bactéries sont spécifiques du tractus digestif, mais leur fonctionnement reste inconnu (Graf, 2014). Les genres *Shuttleworthia* et *Anaerostipes*, de la famille *Lachnospiraceae*, ont une abondance relative plus élevée chez les lapereaux du lot H que chez ceux du lot B (0,18% vs. 0,09%, $P < 0,01$; 0,50% vs. 0,08%, $P < 0,05$ respectivement). Ceci pourrait être lié à la teneur en matière grasse plus élevée de l'aliment H. En effet, des souris nourries avec un régime plus riche en matière grasse ont eu une proportion de *Lachnospiraceae* deux fois plus élevée que des souris nourries avec un régime pauvre en matière grasse (Evans et al., 2014). La matière grasse aurait un effet inverse sur l'abondance relative de la famille S24-7 chez les souris, ce qui soutient nos observations (0,31% vs 0,56% pour un genre non classé de la famille S24-7 pour les lots H et B, respectivement, $P < 0,05$).

2.2 Maturation du microbiote

Le microbiote caecal évolue très fortement avec l'âge (figure 1 et tableau 2), comme observé précédemment par Combes et al. (2011). Parmi les 29 genres prédominants, l'âge a un impact très fort sur 19 genres. On observe plus particulièrement une forte restructuration entre J18 et J28 (ANOSIM J18 vs J28 = 0,79 $P < 0,001$), la période qui correspond au début de l'ingestion d'aliment solide (figure 1).

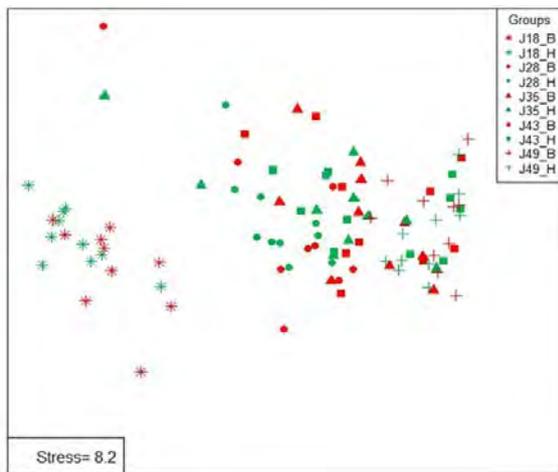


Figure 1: Représentation nMDS des profils des communautés bactériennes caecales des lapins des lots H (vert) et B (rouge) entre 18 et 49 jours d'âge. Chaque point représente un individu, plus les points sont éloignés, plus les communautés bactériennes sont distinctes.

La composition du microbiote caecal est plus variable dans le lot B par rapport au lot H à J28 ($P < 0,05$; figure 2). La diminution de la variabilité est plus marquée dans le lot H ($P < 0,01$) que le lot B ($P < 0,05$) entre 43 et 49 jours. Dans le lot H, la composition du microbiote tend vers la stabilité plus rapidement (figure 3). L'utilisation d'un aliment plus riche en énergie et en protéine avant le sevrage permettrait d'atteindre plus rapidement un écosystème stable.

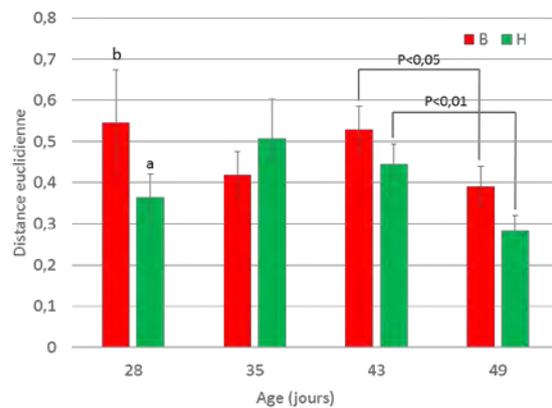


Figure 2: La variabilité intra-lot des profils bactériens. Plus les valeurs sont élevées, plus la communauté bactérienne est variable (a,b $P < 0,05$).

2.3 Etat sanitaire

La mortalité des lapereaux a été très faible tout au long de l'étude ($n = 8$ pour les deux traitements), et similaire entre les deux lots ($P = 0,51$). Les troubles digestifs ne sont la cause de la mort que d'un seul lapereau dans chaque lot. Les autres cas n'ont pas eu une cause définie. La morbidité (9,5%, $P = 0,5$) et l'index de risque sanitaire (11,4% ; $P = 0,3$) étaient similaires entre les deux lots. Les relations entre santé et composition du microbiote caecal sont donc difficiles à mettre en évidence en raison de l'état sanitaire satisfaisant dans cette étude et similaire entre les lots et les stades étudiés

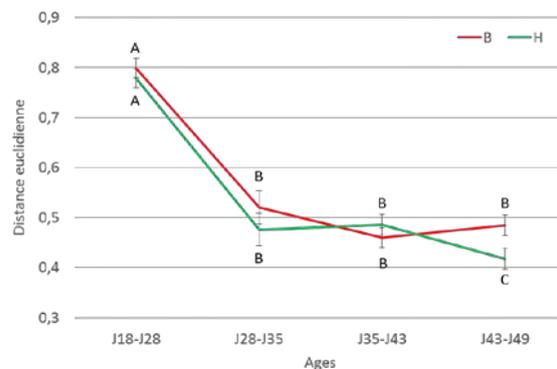


Figure 3: La variabilité des profils bactériens entre deux âges consécutifs intra-lot. Plus les valeurs sont élevées, plus la variation est importante d'un âge à l'autre. (A,B,C $P < 0,1$).

Conclusions

Nos résultats démontrent que l'alimentation a un effet sur la maturation et la composition des communautés bactériennes caecales chez le lapereau. Toutefois, le passage de l'alimentation lactée à l'alimentation solide semble avoir un effet beaucoup plus marqué que celui de la composition de l'aliment solide, qui a eu ici un effet modéré. Toutefois, nos résultats suggèrent que la stratégie d'alimentation avant le sevrage influence la maturation du microbiote caecal.

De plus amples recherches sur le rôle des genres présents au sein de la communauté bactérienne caecale des lapins sont nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension de leur lien avec la santé et les performances des animaux.

Remerciements

Nous remercions B. Gabineau pour les analyses de laboratoire, et L. Cauquil et G. Pascal pour le traitement des données.

Références

CARABAÑO, R., BADIOLA, I., LICOIS, D., GIDENNE T. 2006. The digestive ecosystem and its control through nutritional or feedings strategies. Dans: Recent advances in rabbit sciences (Maertens, L., Coudert, P., ed.). Ilvoa, Merelbeke, Belgium, pp. 211 – 227.
 COMBES, S., MICHELLAND, R.J., MONTEILS, V., CAUQUIL, L., SOULIE, V., TRAN, N.U., GIDENNE, T., FORTUN-LAMOTHE, L. 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. FEMS Microbiology Ecology 77, 680 – 689.

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.
 EVANS, C.C., LEPARD, K.J., KWAK, J.W., STANCIUKAS, M.C., LASKOWSKI, S., DOUGHERTY, J., MOULTON, L., GLAWE, A., WANG, Y., LEONE, V., ANTONOPOULOS, D.A., SMITH, D., CHANG, E.B., CIANCIO, M.J. 2014. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. PLOS One 9, 1 – 14.
 GIDENNE, T., FORTUN-LAMOTHE, L. 2002. Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. Animal Science 75, 169 – 184.
 GIDENNE, T., COMBES, S., LICOIS, D., CARABAÑO, R., BADIOLA, I., GARCIA, J. 2008. Ecosystème caecal et nutrition du lapin : interactions avec la santé digestive. INRA Production Animal 21, 239 – 250.
 GRAF, J. 2014. The Family Rikenellaceae. In The Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg, 2014, pages 857 – 859.
 MAERTENS, L., PEREZ, J.M., VILLAMIDE, M., CERVEREA, C., GIDENNE, T., XICATTO, G. 2002. Nutritive value of raw materials for rabbits : EGRAN tables 2002. World Rabbit Science 10, 157 – 166.

Tableau 2: L'influence de l'aliment sur l'abondance relative bactérienne des genres majoritaires (en %) dans le caecum de lapins âgés de 28 à 49 jours d'âge

	Lot		SEM	Pr > F		
	B	H		Lot 28 – 49J	Age 28 – 49J	Lot x Age
Lachnospiraceae <i>Blautia</i>	15,47	14,64	0,91	ns	<0,01	ns
<i>L. possible genus Sk018</i>	2,21	2,39	0,22	ns	<0,001	ns
<i>L. Coprococcus</i>	1,76	2,42	0,20	ns	ns	ns
<i>L. Marvinbryantia</i>	0,71	1,08	0,09	0,059	<0,001	<0,05
<i>L. Acetitomaculum</i>	0,45	0,46	0,03	ns	<0,001	ns
<i>L. Roseburia</i>	0,25	0,26	0,02	ns	ns	ns
<i>L. Syntrophococcus</i>	0,12	0,15	0,02	ns	<0,001	ns
<i>L. Shuttleworthia</i>	0,08	0,18	0,03	<0,01	<0,001	ns
<i>L. Anaerostipes</i>	0,08	0,47	0,09	<0,05	ns	0,057
<i>L. uncultured</i>	3,62	2,78	0,22	ns	ns	ns
<i>L. Incertae Sedis</i>	1,55	1,33	0,16	ns	<0,05	ns
Ruminococcaceae <i>Ruminococcus</i>	8,94	8,17	0,43	ns	ns	ns
<i>R. Subdoligranulum</i>	2,76	2,83	0,30	ns	<0,001	ns
<i>R. Anaerotruncus</i>	0,24	0,18	0,03	ns	<0,001	ns
<i>R. Oscillibacter</i>	0,22	0,20	0,05	ns	<0,01	ns
<i>R. Papillibacter</i>	0,10	0,10	0,01	ns	0,059	ns
<i>R. uncultured</i>	26,3	25,7	0,90	ns	<0,01	ns
<i>R. Incertae Sedis</i>	6,94	6,44	0,52	ns	<0,05	ns
Rikenellaceae <i>Alistipes</i>	2,70	3,16	0,34	ns	<0,01	ns
<i>R. dgA11 gut group</i>	2,30	3,56	0,32	<0,05	<0,05	ns
Desulfovibrionales <i>Desulfovibrio</i>	0,19	0,15	0,03	ns	ns	ns
Porphyromonadales <i>Odoribacter</i>	0,08	0,18	0,02	<0,05	<0,001	ns
Family XIII. <i>uncultured</i>	0,17	0,15	0,02	ns	ns	ns
Defluviitaleaceae <i>Incertae Sedis</i>	2,99	2,50	0,17	ns	ns	ns
Bacteroidaceae <i>Bacteroides</i>	10,4	11,3	1,35	ns	<0,001	ns
Campylobacteraceae <i>Campylobacter</i>	0,29	0,26	0,04	ns	<0,001	ns
Christensenellaceae <i>uncultured</i>	6,42	6,28	0,36	ns	<0,05	ns
vadinBB60 <i>unclassified</i>	1,51	1,81	0,16	ns	<0,001	ns
S24-7 <i>unclassified</i>	0,57	0,31	0,08	<0,05	ns	ns

ns: non significatif (P>0,1)