



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Institut National Polytechnique de Toulouse*
Discipline ou spécialité : *Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition*

Présentée et soutenue par *Moussa KIMSE*
Le 23-02-2009

Titre : *CARACTERISATION DE L'ECOSYSTEME CAECAL ET SANTE DIGESTIVE DU LAPIN:
CONTROLE NUTRITIONNEL ET INTERACTION AVEC LA LEVURE PROBIOTIQUE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

JURY

Directeur de thèse: T. GIDENNE
Rapporteur : L. MAERTENS
Président : D. MORGAVI
Examineur : JP MARDEN

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries*
Unité de recherche : *UMR 1289 TANDEM (Tissus, Animaux, Nutrition, Ecosystème, Métabolisme)*
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) à Auzeville (31)
Directeur(s) de Thèse : *T. GIDENNE (Directeur) & C. BAYOURTHE (Co-Directrice)*
Rapporteurs : *L. MAERTENS & D. MORGAVI*

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé à l'UMR 1289 TANDEM (Tissus, Animaux, Nutrition, Ecosystème, Métabolisme) l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) à Auzeville (31), et a bénéficié de la collaboration de SA LFA (Lesaffre Feed Additive) à Marcq-en Baroeul (59).

Je tiens dans un premier temps à rendre Grâce à Dieu pour m'avoir accordé la santé, le Moral et surtout sa bénédiction pour la réalisation de mes études jusqu'à cet aboutissement.

Je tiens aussi à remercier vivement les membres du jury de cette thèse :

L. MAERTENS (ILVO, Animal Science Unit Scheldeweg 68 9090 Melle-Belgium) et D. MORGAVI (INRA, Centre Clermont-Theix Unité de Recherche sur les Herbivores 63122 Saint-Genès-Champanelle) tous deux Rapporteurs

E. AUCLAIR (Lesaffre feed Additives A division of Société Industrielle Lesaffre 1, rue du Haut Touquet 59520 Marquette-Lez-Lille)

J'adresse mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ces travaux :

C. MARTIN, (Unité de Recherches sur les Herbivores Equipe Digestion Microbienne et Absorption INRA Centre de Clermont-Ferrand Theix 63122 Saint-Genès Champanelle), pour ces précieuses propositions pour l'avancement de la thèse

V. THEODOROU et toute son équipe (UMR1054 Neurogastroentérologie et nutrition NGN 180 chemin de Tournefeuille BP 93173, 31027 Toulouse Cedex 3) pour ses participations aux comités de thèse et la mise au point de la mesure de la MPO chez le lapin

T. GIDENNE, Directeur, C. BAYOURTHE co-Directrice et V. MONTEILS co-Encadrante de cette thèse, pour m'avoir accueillie dans l'unité, pour avoir encadré ces travaux et pour la confiance qu'ils m'ont témoignée au cours de ces 3 années.

C. LENOIR, Responsable laboratoire contrôle qualité SI Lesaffre et toute son équipe

JP. MARDEN, Responsable développement ruminant LFA.

J'exprime également toute ma reconnaissance à l'ensemble de l'équipe TANDEM, sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour :

Viviane BATAILLER et Véronique TARTIE, la première pour son aide administrative au cours de ces 3 années, mais aussi pour sa perpétuelle bienveillance et son aide précieuse apportée à la touche finale du document, et la seconde pour l'ensemble de toutes les « manips » très contraignantes à faire (analyses levure, sacrifices des animaux) et également pour sa contribution à la touche finale à la rédaction du document. Muriel SEGURA, Carole BANNELIER, Béatrice GABINAUD pour leur patience et leur motivation à m'enseigner les notions essentielles des analyses de laboratoire, pour leurs aides chaleureuses et leur bonne humeur. Laurence FORTUN-LAMOTHE pour ses conseils éclairés et sa capacité à expliquer et à faire comprendre ce qui semble au début incompréhensible grâce à sa grande pédagogie. Laurent CAUQUIL et Sylvie COMBES pour leurs aides notamment en microbiologie (SSCP), en Stat et en informatique. André LAPANOUSE, Patrick AYMARD, Jean DE DAPPER et Jacques DE DAPPER pour leur appui technique à l'élevage et lors des sacrifices des animaux. Michèle THEAU-CLEMENT pour ses encouragements et JM PEREZ. Aux stagiaires et thésards (collègues) pour le temps que nous avons passé ensemble ce sont Rory MICHELLAND, Mélanie MARTIGNON, Asma ZENED, Samer MOURE, Elena... à vous, je dirai ceci : *c'est dur la thèse, mais on arrive toujours à la fin ; courage !*

Je remercie particulièrement le Directeur de l'UMR X. FERNANDEZ et JF GRONGNET UMR-CENAH (Reine)

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement ma grande famille pour son soutien constant tout au long de mes études. Mes pensées vont vers mes deux charmantes filles (Ange Nsissa G.E KIMSE et Priscille A. KIMSE) et à leur mère Charlotte KAMENAN qui ont passées tout ce temps sans leur père. Je remercie sincèrement Mlle F. AKE à l'INAPG de Paris, Mes amis proches à Toulouse, JP. MONEY, M. NGUESSAN, H. AKIN, B. KOFFI, ERIC etc. et les Amis de la promotion 2000 de la filière Productions Animales de l'Université d'Abobo-Adjamé, pensée particulière à ceux qui nous ont quittés.

« Je pense que la vie est une chance ou une bénédiction divine ; utilisons donc chaque seconde, chaque minute et chaque jour pour rendre service à sa famille, sa communauté, son pays, son continent, au monde entier et si possible à l'univers tout entier... »

Yes,

I did it !

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1: COMPOSITION CHIMIQUE DES CAECOTROPHES ET DES FECES DURES EN %MS (GIDENNE & LEBAS, 2006).....	33
TABLEAU 2: COMPARAISON DES CARACTERISTIQUES CAECALES ENTRE LAPINS CONVENTIONNELS SAINS ET LAPINS DIARRHEIQUES (BENNEGADI, 2002).....	39
TABLEAU 3: PRINCIPALES TECHNIQUES D'ECOLOGIES MOLECULAIRES POUR L'ETUDE DE L'ECOSYSTEME MICROBIEN, AVANTAGES ET INCONVENIENTS (ZOETENDAL ET AL., 2004).....	41
TABLEAU 4: COMPOSITION CHIMIQUE D'UNE CELLULE DE LEVURE.....	48
TABLEAU 5: SYNTHÈSE DE TRAVAUX DE RECHERCHE SUR L'ACTION DES LEVURES PROBIOTIQUES CHEZ LE LAPIN.....	60
TABLEAU 6: SYNTHÈSE DES EFFETS DE LA LEVURE PROBIOTIQUE <i>S. CEREVISIAE</i> , UTILISÉE SEULE OU EN ASSOCIATION, SUR LES PERFORMANCES DE CROISSANCE DU LAPIN.....	64
TABLEAU 7: EFFET DE LA SUPPLÉMENTATION EN LEVURE SUR LA COMPOSITION SANGUINE DU LAPIN ÂGE DE 56 JOURS.....	70
TABLEAU 8: POTENTIELS DES ELECTRODES DE REFERENCE (mV) EN FONCTION DE LA TEMPERATURE ET DE LA CONCENTRATION DE CHLORURE DE POTASSIUM D'APRES (NORDSTORM, 1977).....	78
TABLEAU 9: DILUTION ET CONCENTRATION DE CHAQUE SOLUTION DANS LES TUBES*.....	91
TABLEAU 10: COMPOSITION CENTESIMALE ET CHIMIQUE DE L'ALIMENT SELON LE FOURNISSEUR (RABLO FORMAX SALINO).....	107
TABLEAU 11: ALIMENTS EXPERIMENTAUX: INGREDIENTS ET COMPOSITION CHIMIQUE THEORIQUE.....	112
TABLEAU 12: INGREDIENT DES MELANGES DE BASE (g/100g).....	116
TABLEAU 13: ALIMENTS EXPERIMENTAUX: INGREDIENTS ET COMPOSITION CHIMIQUE THEORIQUE.....	127
TABLEAU 14: EFFET DE LA METHODE ET DE LA PERIODE DE MESURE SUR LES VALEURS D'E _H , DE PH ET DE TEMPERATURE DU CONTENU CAECAL.....	137
TABLEAU 15: CARACTERISTIQUES DE L'ACTIVITE FERMENTAIRE CAECAL EN FONCTION DE LA METHODE ET DE L'HEURE DE LA MESURE.....	140
TABLEAU 16: TABLEAU CLINIQUE DES ANIMAUX DECEDES.....	146
TABLEAU 17: MORTALITE ET MORBIDITE EN FONCTION DU TYPE D'ALIMENT ENTRE 28 ET 56 JOURS D'AGE.....	147
TABLEAU 18: VARIATION DES PARAMETRES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU CAECUM EN FONCTION DE L'AGE ET DU REGIME DES LAPINS SAINS.....	151
TABLEAU 19: CORRELATION (R ²) ENTRE LES PARAMETRES DU BIOTOPE ET DU TAUX D'HAPTOGLOBINE.....	153
TABLEAU 20: CORRELATIONS ENTRE LA DIVERSITE ET LE BIOTOPE, ET ENTRE LES PROFILS CE-SSCP ET LE BIOTOPE.....	156
TABLEAU 21: VARIATION DE LA CONCENTRATION D'HAPTOGLOBINE SANGUINE ET DU BIOTOPE CAECAL EN FONCTION DES FIBRES ET DU STATUT SANITAIRE DU LAPIN.....	157
TABLEAU 22: TENEUR EN FIBRES (NDF) ET VARIATION DE LA TEMPERATURE DES ALIMENTS A LA SORTIE DE LA PRESSE AU COURS DE LA GRANULATION.....	168
TABLEAU 23: EVOLUTION DE LA TENEUR EN LEVURES (LOG UFC/g) DANS LES ALIMENTS EN FONCTION DE LA DOSE ET DU MOMENT DE PRELEVEMENT AU COURS DE LA GRANULATION.....	169
TABLEAU 24: CONCENTRATION EN LEVURES <i>S. CEREVISIAE</i> EN LOG (UFC/g) DANS LES PRELEVEMENTS DE CROTTES DURES, CAECOTROPHES ET CONTENU CAECAL TRAITES (GLY) OU NON TRAITES (NGLY) AU GLYCEROL EN FONCTION DE LA DUREE DE CONSERVATION.....	170
TABLEAU 25: CONCENTRATION EN LEVURES VIVANTES DANS L'ALIMENT AVANT ET APRES LA GRANULATION, ET TAUX DE SURVIE DANS LE TUBE DIGESTIF DU LAPIN.....	171
TABLEAU 26: EFFET DE L'ADDITION DE LEVURES <i>S. CEREVISIAE</i> SUR LE BIOTOPE CAECAL DU LAPIN AGE DE 7 SEMAINES.....	173
TABLEAU 27: EFFET DE L'ADDITION DE LEVURES <i>S. CEREVISIAE</i> SUR L'INGESTION ET LA DIGESTIBILITE DES NUTRIMENTS.....	173
TABLEAU 28: EFFET DE LA LEVURE SUR L'INGESTION, LE GAIN DE POIDS ET L'INDICE DE CONSOMMATION DES LAPINS SAINS*.....	176
TABLEAU 29: TABLEAU LESIONNEL DES LAPINS ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS.....	176
TABLEAU 30: IMPACT DE L'ADDITION DE LEVURE SUR LA SANTE DU LAPIN EN CROISSANCE.....	177
TABLEAU 31: COMPOSITION CHIMIQUE DES DEUX ALIMENTS AVANT L'ADDITION DE LA LEVURE.....	184
TABLEAU 32: RELEVÉ DES LÉSIONS SUR DES LAPINS AUTOPSIES, ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS.....	184
TABLEAU 33: DONNÉES SANITAIRES EN FONCTION DE LA TENEUR EN FIBRES DU REGIME ET EN FONCTION DE LA DOSE DE LEVURE.....	185
TABLEAU 34: MORTALITE, MORBIDITE ET RISQUE SANITAIRE ENREGISTRES PAR PERIODE EN FONCTION DU REGIME.....	186
TABLEAU 35: GMQ ET IC PAR PERIODE D'ELEVAGE EN FONCTION DE LA TENEUR EN FIBRES DU REGIME ET EN FONCTION DE LA DOSE DE LEVURE.....	188
TABLEAU 36: EFFET DE LA TENEUR EN FIBRES DU REGIME ET DE L'APPORT DE 1% DE LEVURE (<i>S. CEREVISIAE</i>) SUR LA CONCENTRATION D'HAPTOGLOBINE SERIQUE.....	189
TABLEAU 37: EFFET DE LA TENEUR EN FIBRES DU REGIME ET DE L'ADDITION DE LEVURE SUR LES PARAMETRES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU CONTENU CAECAL.....	190
TABLEAU 38: CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES LAPINS MORBIDES.....	194

TABLEAU 39: CORRELATION (R^2) BIOTOPE, BIOCENOSE ET HAPTOGLOBINE SERIQUE	195
TABLEAU 40: AVANTAGES ET LIMITES DES METHODES UTILISEES POUR ANALYSER L'ECOSYSTEME DIGESTIF DU LAPIN, ET LES INDICATEURS DE L'INFLAMMATION.....	205
TABLEAU 41: IMPACT DE L'ADDITION D'UNE MEME LEVURE <i>S. CEREVISIAE</i> Sc 47, SUR LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU LAPIN ET DE LA VACHE (VACHE TARIE ET VACHE LAITIERE), ET VARIATIONS DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU CONTENU CAECAL DU LAPIN EN FONCTION DU STATUT SANITAIRE	210
TABLEAU 42: PARAMETRES PHYSIQUES ET CHIMIQUES DU CAECUM EN FONCTIONS DE L'AGE ET DU REGIME, CHEZ LE LAPIN SAIN.	211
TABLEAU 43: CORRELATIONS (R^2) ENTRE LES PARAMETRES DU BIOTOPE ET DU TAUX D'HAPTOGLOBINE\$	218
TABLEAU 44: CORRELATIONS ENTRE BIOTOPE ET BIOCENOSE	219
TABLEAU 45: CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES LAPINS MORBIDES	220
TABLEAU 46: EFFET DE LA LEVURE PROBIOTIQUE SUR LES PARAMETRES ZOOTECHNIQUES* DU LAPIN	221

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: VUE DE L'IMPLANTATION DES DENTS CHEZ LE LAPIN (BARONE ET AL., 1973)	23
FIGURE 2: SCHEMA DU TUBE DIGESTIF CHEZ UN LAPIN AGE DE 12 SEMAINES (2,4KG PV) (LEBAS, 1996)	24
FIGURE 3: ÉVOLUTION NYCTHEMERALE DU PH CÆCAL CHEZ DE JEUNES LAPINS DE 5 SEMAINES ET CHEZ DES SUJETS ADULTES (18 SEMAINES). ALIMENTATION A VOLONTE - INGESTION DE CÆCOTROPHES OBSERVEE DE 4 H A 12 H CHEZ LES JEUNES, ET DE 8 H A 14 H CHEZ LES ADULTES (BELLIER, 1994)	26
FIGURE 4: SCHEMA DES DIFFERENTS ORGANES INTERVENANT DANS LA DIGESTION ENZYMATIQUE (GIDENNE, 1996.)	28
FIGURE 5: NATURE DES FIBRES ALIMENTAIRES ET METHODES DE DOSAGE	30
FIGURE 6: METABOLISME CAECAL DES PRINCIPAUX NUTRIMENTS (GIDENNE, 1997)	31
FIGURE 7: MOUVEMENT DES DIGESTA DANS LE SEGMENT CAECO-COLIQUE (GIDENNE, 1997)	33
FIGURE 8: INSTALLATION DE LA FLORE ET ACTIVITE FERMENTAIRE AU COURS DE LA CROISSANCE DU LAPIN (GIDENNE ET AL., 2008)	35
FIGURE 9: EVOLUTION DE L'ACTIVITE FERMENTAIRE CAECALE EN FONCTION DE L'AGE (FORTUN-LAMOTHE & GIDENNE, 2001)	37
FIGURE 10: ACTIVITE ENZYMATIQUE FIBROLYTIQUE DES BACTERIES DU CAECUM (GIDENNE ET AL., 2000)	38
FIGURE 11: EFFETS DES DIFFERENTES SOUCHES DE S. CEREVISIAE SUR LA POPULATION BACTERIENNE RUMINALE EN CULTURE MIXTE (ADAPTE DE (NEWBOLD & WALLACE, 1992))	53
FIGURE 12: EFFET DE LA LEVURE PROBIOTIQUE SUR LA TENEUR DE LACTATE DANS LE RUMEN APRES LE REPAS (WILLIAMS ET AL., 1991)	55
FIGURE 13: EVOLUTION DU PH RUMINAL CHEZ LA VACHE APRES UN REPAS COMPLEMENTE OU NON DE 4 G DE LEVURE S. CEREVISIAE (MARDEN, 2007)	56
FIGURE 14: EFFET D'UN APPORT DE 4 G DE LEVURE S. CEREVISIAE SUR LA CONCENTRATION EN AGV TOTAUX (MARDEN, 2007) ..	57
FIGURE 15: EFFET DE LA LEVURE S. CEREVISIAE SUR MATIERE SECHE INGEREE (MSI), LE GMQ ET L'IC CHEZ LES BOVINS VIANDE (MONCOULON & AUCLAIR, 2001)	58
FIGURE 16: DIGESTIBILITE DES NUTRIMENTS (MS, PB, CB) ET DE L'ENERGIE CHEZ LE LAPIN COMPLEMENTE OU NON DE 200 PPM DE LEVURE S. CEREVISIAE (P<0,05) (SHANMUGANATHAN ET AL., 2004)	61
FIGURE 17: VOIES DU METABOLISME GLUCIDIQUE (JOUANY, 1995)	75
FIGURE 18: DISPOSITIF DE MESURE DU E _h , PH ET DE LA TEMPERATURE DU CAECUM	88
FIGURE 19: PROTOCOLE DE DOSAGE DE L'HAPTOGLOBINE SANGUIN. *LA PLAQUE UTILISEE EN EXEMPLE EST DEJA PRETE POUR LA LECTURE	92
FIGURE 20: PROCEDURE D'EXTRACTION ET DE DOSAGE DE LA MPO (D'APRES UMR-1054-NGN, 2007)	94
FIGURE 21: EXTRACTION DE L'ADN PAR LE KIT QIAAMP® DNA STOOL (SOURCE: QIAAMP® DNA STOOL MINI KIT HANDBOOK 2001)	96
FIGURE 22: ÉTAPE DE DILUTION ET ENSEMENCEMENT AU COURS DU DENOMBREMENT DES LEVURES CONTENUES DANS DES ECHANTILLONS D'ALIMENT, DE DIGESTA OU D'EXCRETA	101
FIGURE 23: ORGANISATION DES PRELEVEMENTS (SYSTEME DE MARCHE EN AVANT)	103
FIGURE 24: SCHEMA EXPERIMENTAL UTILISE POUR LES MESURES DU E _h , PH ET TEMPERATURE DU CAECUM	107
FIGURE 25: SCHEMA EXPERIMENTAL ET CHRONOLOGIE DES EUTHANASIES	111
FIGURE 26: SCHEMA DU PROCESSUS DE GRANULATION ET D'ECHANTILLONNAGE	117
FIGURE 27: SCHEMA EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS DE CROTTES DURES, DE CAECOTROPHES ET DE CONTENU CAECAL	120
FIGURE 28: SCHEMA EXPERIMENTAL DE L'ETUDE DE RESISTANCE DE LA LEVURE A LA DIGESTION ET SON IMPACT SUR L'ECOSYSTEME CAECAL	122
FIGURE 29: SCHEMA EXPERIMENTAL ET CHRONOLOGIE DES EUTHANASIES	129
FIGURE 30: VARIATION DU POTENTIEL REDOX ET DU PH EN FONCTION DE LA DUREE DE MESURE (N = 3 LAPINS)	134
FIGURE 31: CINETIQUE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CONTENU CÆCAL SELON DE 2 METHODES DE MESURES : IN VIVO VS POST MORTEM	137
FIGURE 32: CINETIQUE DU PH DANS LE CONTENU CÆCAL SELON 2 METHODES DE MESURES : IN VIVO VS POST MORTEM	138
FIGURE 33: CINETIQUE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CONTENU CÆCAL SELON DE 2 METHODES DE MESURES : IN VIVO VS POST MORTEM	138
FIGURE 34: RELATION ENTRE LE E _h ET LE PH A LA STABILISATION (MOYENNE ENTRE 20 ET 35 MIN) DU CONTENU CAECAL A 10 SEMAINES D'AGE	139
FIGURE 35: COMPOSITION CHIMIQUE ET ENERGIE DIGESTIBLE DES ALIMENTS EXPERIMENTAUX	145
FIGURE 36: CROISSANCE† ET GAIN DE POIDS DES LOTS T ET DF DE LAPINS SAINS EN FONCTION DE L'AGE	148
FIGURE 37: INDICE DE CONSOMMATION DES 2 LOTS DE LAPINS SAINS EN FONCTION DE L'AGE	148
FIGURE 38: ENERGIE DIGESTIBLE INGEREE DES 2 LOTS DE LAPINS SAINS EN FONCTION DE L'AGE	149

FIGURE 39: CONCENTRATION COMPAREE D'HAPTOGLOBINE DES 2 LOTS DE LAPINS SAINS EN FONCTION DE L'AGE†	150
FIGURE 40: ANALYSE DES PROFILS CE-SSCP EN FONCTION DE L'AGE DES LAPINS (UN POINT REPRESENTE UN INDIVIDU)	154
FIGURE 41: SIMILARITE ENTRE LES PROFILS EN FONCTION DE L'AGE.....	155
FIGURE 42: ANALYSE DES PROFILS CE-SSCP EN FONCTION DE LA NATURE DU REGIME DES LAPINS	155
FIGURE 43: COMPARAISON DES PROFILS CE-SSCP 2 A 2 EN FONCTION DU REGIME	156
FIGURE 44: CONCENTRATION COMPAREE D'HAPTOGLOBINE PLASMATIQUE DE LAPINS SAINS ET DES LAPINS MALADES ENTRE LE SEVRAGE ET 59 JOURS D'AGE (P<0,05).....	158
FIGURE 45: CONCENTRATION EN LEVURES <i>S. CEREVISIAE</i> (LOG (UFC/G MS)) EN FONCTION DE LA DOSE INTRODUITE DANS L'ALIMENT.....	172
FIGURE 46: EFFET DE L'APPORT DE <i>S. CEREVISIAE</i> DANS L'ALIMENT SUR L'INDICE DE BIODIVERSITE (P=0,1 ; RMSE=0,5).....	174
FIGURE 47: EFFET DE LA DOSE* DE LEVURES SUR LA STRUCTURATION DU PROFIL MICROBIEN DU CONTENU CAECAL.....	174
FIGURE 48: SIMILARITE ENTRE LES PROFILS CE-SSCP EN FONCTION DU REGIME ET DE LA LEVURE A L'AIDE D'UN TEST-T.....	175
FIGURE 49: IMPACT DE LA TENEUR EN FIBRES DU REGIME SUR LES PROFILS CE-SSCP DU CONTENU CAECAL.....	192
FIGURE 50: IMPACT DE L'ADDITION DE LEVURE SUR LA DIVERSITE MICROBIOLOGIQUE CAECALE (P=0,07 ; Cvr=20%).....	192
FIGURE 51: IMPACT DE L'ADDITION DE LA LEVURE SUR LA STRUCTURE DU MICROBIOTE BACTERIEN DU CONTENU CAECAL CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE AGE DE 36 ET 58 JOURS.....	193
FIGURE 52: SIMILARITE ENTRE LES PROFILS MICROBIOLOGIQUES EN FONCTION DE LA TENEUR EN FIBRES ET DE L'APPORT DE LEVURE A L'AIDE D'UN TEST-T	193
FIGURE 53: STRUCTURE DE LA BIOCENOSE BACTERIENNE CAECALE EN FONCTION DU STATUT SANITAIRE (LAPINS MORBIDES ET DES LAPINS SAINS) ENTRE LE SEVRAGE ET 58 JOURS.....	195
FIGURE 54: APPROCHE METHODOLOGIQUE POUR CARACTERISER L'EFFET DE FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES SUR L'ECOSYSTEME CAECAL, ET QUELQUES PARAMETRES PHYSIOPATHOLOGIQUES ET ZOOTECHNIQUES CHEZ LE LAPEREAU.....	204
FIGURE 55: SIMILARITE ENTRE LES PROFILS BACTERIENS DES LAPINS DF ET DES TEMOINS T: VARIATION ENTRE 2 SERIES DE MESURE	213
FIGURE 56: EFFET LEVURE SUR LA SIMILARITE EN FONCTION DU STATUT NUTRITIONNEL.....	215
FIGURE 57: MECANISME D'ACTION DU STRESS ET L'APPORT DE LEVURE SUR L'ECOSYSTEME DIGESTIF DU LAPIN	223

LISTE DES PHOTOS

PHOTO 1: PHOTOGRAPHIES DE S. CEREVISIAE : A ET B VUE A L'ŒIL NU SUR BOITE DE PETRIE EN MILIEU GELOSE (B EST UNE COLONIE) ; C ET D VUE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE (D CELLULE ISOLEE)	49
PHOTO 2: PRELEVEMENT DE SANG A TRAVERS UNE ARTERE DE L'OREILLE	90
PHOTO 3: VUE GENERALE DU LAPIN ATTEINT DE DIARRHEE	146

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX	3
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES PHOTOS	7
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ABBREVIATIONS	16
INTRODUCTION GENERALE	19

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : FONCTIONNEMENT DIGESTIF CHEZ LE LAPIN..... **23**

I. DIGESTION CHEZ LE LAPIN	23
<i>I.A. rappel anatomique du système digestif</i>	23
I.A.1. L'estomac.....	24
I.A.2. L'intestin grêle.....	25
I.A.3. Le caecum.....	25
I.A.4. Le côlon.....	26
<i>I.B. digestion enzymatique chez le lapin</i>	27
I.B.1. Digestion stomacale.....	27
I.B.2. Digestion et absorption intestinale.....	28
I.B.3. Digestion caecale ou microbienne.....	30
I.B.4. Caecotrophie et crottes dures.....	32
II. CARACTERISATION DE L'ECOSYSTEME CAECAL	34
<i>II.A. Etude qualitative et quantitative</i>	34
II.A.1. Mise en place de la biocénose caecale chez le lapereau.....	35
II.A.2. Activités microbiote caecal.....	36
□ Activités fermentaires.....	37
□ Activités enzymatiques fibrolytiques	37
II.A.3. Caractérisation du biotope caecal.....	38
II.A.4. Techniques d'études de l'écosystème.....	40

CHAPITRE 2 : PROBIOTIQUES : CARACTERES GENERAUX ET IMPACT EN ALIMENTATION ANIMALE..... **43**

I. DEFINITION	43
II. CARACTERES GENERAUX DES BACTERIES PROBIOTIQUES	44
<i>II.A. Effet des bactéries probiotiques chez les monogastriques</i>	45
<i>II.B. Effet des bactéries probiotiques chez les ruminants</i>	46
III. ETUDE D'UNE LEVURE PROBIOTIQUE SACCHAROMYCES CEREVISIAE : GENERALITES	47
IV. SACCHAROMYCES CEREVISIAE CHEZ LES RUMINANTS	49
<i>IV.A. Impact de S. cerevisiae sur l'utilisation digestive de la ration chez les bovins</i>	50
IV.A.1. Digestibilité des constituants non azotés.....	50
IV.A.2. Digestibilité de la matière azotée (MAT).....	51
<i>IV.B. Impact de S. cerevisiae sur le profil de la biocenose ruminale</i>	52
IV.B.1. Effet des levures sur le nombre total de bactéries dans le rumen.....	53
□ Effets des levures sur les bactéries cellulolytiques du rumen.....	53
□ Effet des levures sur les bactéries utilisatrices de lactate du rumen.....	54
IV.B.2. Impact de S. cerevisiae sur le pH ruminal.....	55
IV.B.3. Impact de S. cerevisiae sur le profil fermentaire.....	56
IV.B.4. Impact de S. cerevisiae sur la croissance et la production laitière.....	57
V. SACCHAROMYCES CEREVISIAE CHEZ LE LAPIN	59

<i>V.A. Impact de S. cerevisiae sur l'utilisation digestive de la ration chez le lapin</i>	60
<i>V.B. Impact de S. cerevisiae sur le profil microbien du contenu caecal</i>	62
<i>V.C. Impact de S. cerevisiae sur la croissance</i>	62
<i>V.D. Impact de S. cerevisiae sur la santé des lapins</i>	65
<i>V.E. Effet de S. cerevisiae sur les paramètres sanguins du lapin</i>	67
V.E.1. Haptoglobine sanguine	67
V.E.2. La myéloperoxydase (MPO)	68
V.E.3. Impact de la levure sur les protéines de l'inflammation	69
CHAPITRE 3- MODE D'ACTION DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	71
I. ACTION DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE SUR LES PROTEINES DE L'INFLAMMATION DU TUBE DIGESTIF	71
II. ACTION DE LA LEVURE PROBIOTIQUE SUR L'ECOSYSTEME DIGESTIF	73
III. APPROCHE THERMODYNAMIQUE : EFFET SUR LE POTENTIEL REDOX ET LE pH	76
<i>III.A. Réaction d'oxydo-réduction et production d'ATP</i>	76
<i>III.B. Mesure du potentiel redox</i>	77
<i>III.C. Relations entre potentiel redox, pH et oxygène</i>	78
CONCLUSIONS BIBLIOGRAPHIQUES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL	81

MATERIELS ET METHODES

INTRODUCTION, HYPOTHESES ET OBJECTIFS	85
CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES COMMUNS	87
I. MESURE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CAECUM DU LAPIN	87
I.A. OBJECTIFS	87
I.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX	87
I.B.1. Schéma expérimental et dispositif de mesure	87
I.B.2. Animaux, logement et alimentation	88
I.C. Correction du potentiel redox (Eh), et calcul de la pression partielle d'oxygène (PPO)	88
II. METHODE DE MESURE ET DE CARACTERISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DIARRHEIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE: ANALYSE DU PROFIL CAECAL, ET MESURE DE L'INFLAMMATION GENERALE ET DIGESTIVE	89
II.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE	89
II.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX	89
II.B.1. Mesures et prélèvements réalisés sur les animaux	89
☐ Mesure du taux d'haptoglobine sanguin	89
☐ Mesure de la MPO	92
☐ Analyse de la diversité microbiologique	94
III. DENOMBREMENT DES CELLULES DE LEVURE REVIVIFIABLES DANS LES ALIMENT, LES DIGESTA ET LES EXCRETA	97
III.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE	97
III.A.1. Objectifs	98
III.A.2. Choix du modèle	98
III.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX	98
III.B.1. Matériel de mesure	98
☐ Matériels généraux	98
☐ Matériels spécifiques	99
III.B.2. Milieu, réactifs et prélèvements	99
☐ Milieu et « réactifs »	99
☐ Prélèvements	99
☐ Mode opératoire	100
III.C. Expression des résultats	102
III.C.1. Lecture	102
III.C.2. Calcul :	102

IV. RESUME ET CHRONOLOGIE DES MESURES ET PRELEVEMENTS	102
CHAPITRE 2 : MESURE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CÆCUM DU LAPIN: PREMIERS RESULTATS METHODOLOGIQUES	105
I. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE	105
<i>I.A. Objectifs.....</i>	<i>105</i>
<i>I.B. Choix du modèle</i>	<i>105</i>
II. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX.....	106
<i>II.A. Schémas expérimental et dispositif de mesure</i>	<i>106</i>
<i>II.B. Animaux, logement et alimentation.....</i>	<i>107</i>
<i>II.C. Mesures et prélèvements réalisés au cours des euthanasies.....</i>	<i>108</i>
<i>II.D. Analyses de la MS, des AGV et du NH₃.....</i>	<i>108</i>
<i>II.E. Analyses statistiques</i>	<i>108</i>
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DIARRHEIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE: CONSEQUENCES SUR L'ECOSYSTEME CAECAL, ET IMPACT POTENTIEL SUR LE NIVEAU D'INFLAMMATION GENERALE ET DIGESTIVE	109
I. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE	109
<i>I.A. Objectifs.....</i>	<i>109</i>
<i>I.B. Choix du modèle</i>	<i>109</i>
II. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX.....	110
<i>II.A. Schéma expérimental</i>	<i>110</i>
<i>II.B. Animaux, logement et alimentation.....</i>	<i>111</i>
II.B.1. Animaux et logement.....	111
II.B.2. Alimentation	111
<i>II.A. Contrôle de l'ingestion, de la croissance et de la mortalité.....</i>	<i>111</i>
<i>II.B. Mesures et prélèvements réalisés au cours des euthanasies</i>	<i>112</i>
II.B.1. Choix des lapins euthanasiés	112
□ Euthanasie des lapins « sains ».....	113
□ Euthanasie des animaux malades	113
II.B.2. Mesures prélèvements pour analyses chimiques.....	113
CHAPITRE 4 : STABILITE DE LA LEVURE PROBIOTIQUE A LA GRANULATION ET A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN	115
I. RESISTANCE DES LEVURES A LA GRANULATION	115
<i>I.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE</i>	<i>115</i>
I.A.1. Objectifs.....	115
I.A.2. Choix du modèle.....	115
<i>I.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX.....</i>	<i>116</i>
I.B.1. Formulation des aliments	116
I.B.2. Granulation et prélèvements.....	117
II. RESISTANCE DE LA LEVURE A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE	118
<i>II.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE</i>	<i>118</i>
II.A.1. Objectifs	118
<i>II.B. Choix du modèle.....</i>	<i>118</i>
<i>II.C. test préliminaire : conservation des échantillons de digesta et de feces en vue du denombrement des levures.....</i>	<i>119</i>
II.C.1. Animaux, logement et alimentation	119
II.C.2. Mesures et prélèvements réalisés.....	119
<i>II.D. etude de l'impact de la levure sur l'écosystème caecal et sur les paramètres zootechniques du lapin</i>	<i>120</i>

□ Animaux, logement et alimentation	121
□ Mesures et prélèvements réalisés	121
□ Animaux, logement et alimentation	122
□ Mesures zootechniques	123

CHAPITRE 5 : IMPACT D'UNE LEVURE PROBIOTIQUE SUR LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN ET SES PERFORMANCES, ET SUR QUELQUES PARAMETRES DE SA PHYSIOLOGIE: ETAT INFLAMMATOIRE GENERAL, BIOTOPE ET BIOCENOSE CAECALE 125

I. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE	125
<i>I.A. Objectifs.....</i>	<i>125</i>
<i>I.B. Choix du modèle</i>	<i>125</i>
II. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX.....	126
<i>II.A. Schémas expérimentaux.....</i>	<i>126</i>
<i>II.B. Animaux, logement et alimentation.....</i>	<i>126</i>
<i>II.C. Contrôle de l'ingestion, de la croissance et de la mortalité.....</i>	<i>127</i>
<i>II.D. Mesures et prélèvements réalisés au cours des euthanasies.....</i>	<i>127</i>
II.D.1. Choix des lapins.....	128
□ Euthanasie des lapins « sains ».....	128
□ Euthanasie des animaux malades	128
II.D.2. Dosage du niveau d'inflammation.....	129
II.D.3. Contrôle de la dose de levures ingérée	129
III. MESURES ZOOTECHNIQUES	130
<i>III.A. Objectifs.....</i>	<i>130</i>
<i>III.B. animaux et alimentation.....</i>	<i>130</i>

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 1 : MESURE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CÆCUM DU LAPIN: PREMIERS RESULTATS METHODOLOGIQUES 133

I. RESULTATS DES TRAVAUX PRELIMINAIRES	133
<i>I.A. Mesure in situ sur animal anesthésié.....</i>	<i>134</i>
I.A.1. Potentiel redox (E_h).....	134
I.A.2. pH	134
<i>I.B. Interrogations et Discussion.....</i>	<i>135</i>
I.B.1. E_h caecal	135
I.B.2. Pourquoi la grande variabilité du pH caecal ?.....	135
<i>I.C. Conclusion et perspectives.....</i>	<i>135</i>
II. MESURE IN SITU DU POTENTIEL REDOX DANS LE CÆCUM DU LAPIN, COMPARAISON DE DEUX METHODES : METHODE POST MORTEM VS METHODE IN VIVO	136
<i>II.A. Résultats.....</i>	<i>136</i>
II.A.1. Résultats méthodologiques	136
II.A.2. Effet de la méthode et de la période de mesure sur la température caecale	138
II.A.3. Relation entre E_h et pH dans le caecum	139
II.A.4. Effet de la méthode et de la période de mesure sur l'activité fermentaire caecale	139
<i>II.B. Discussion.....</i>	<i>140</i>
II.B.1. Effet de la caecotrophie : période de mesure	140
II.B.2. Effet de la méthode	141
II.B.3. Relation entre le E_h , pH et AGV.....	142
<i>II.C. Conclusions.....</i>	<i>143</i>

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DIARRHEIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE: CONSEQUENCES SUR L'ECOSYSTEME CAECAL, ET IMPACT POTENTIEL SUR LE NIVEAU D'INFLAMMATION GENERALE ET DIGESTIVE 145

I. RESULTATS	145
I.A. Symptômes et statut sanitaire	146
I.A.1. Observations cliniques	146
I.A.2. Statut sanitaire.....	147
I.B. Mesure sur les animaux sains	147
I.B.1. Mesures zootechniques : croissance et efficacité alimentaire	147
<input type="checkbox"/> Croissance	147
<input type="checkbox"/> Indice de consommation et énergie digestible ingérée	148
I.B.2. Indicateur de l'inflammation générale : haptoglobine.....	149
I.B.3. Indicateur d'inflammation localisée : Myélopéroxydase (MPO)	150
I.B.4. Indicateur du biotope caecal.....	150
<input type="checkbox"/> .Le potentiel redox (E_h) et le pH.....	150
<input type="checkbox"/> MS et NH_3	151
<input type="checkbox"/> Profil fermentaire	151
I.B.5. Corrélation entre les paramètres du biotope et l'haptoglobine	152
I.B.6. Profil bactérien et indice de biodiversité	152
<input type="checkbox"/> Rappels et définitions de quelques notions utilisées	152
<input type="checkbox"/> Profil bactérien.....	154
<input type="checkbox"/> Corrélation entre le biotope et la biocénose	156
I.C. Caractéristiques physiopathologiques des lapins sains et des malades atteints de troubles digestifs	156
I.C.1. Paramètres de l'inflammation	157
I.C.2. Caractéristiques du biotope caecal	158
I.C.3. Profil bactérien.....	159
I.D. Discussion	159
I.D.1. Statut sanitaire.....	159
I.D.2. Teneur du régime en fibres	161
I.D.3. Age du lapin.....	163
I.D.4. Relation entre les paramètres de l'écosystème et le taux d'haptoglobine sérique	165
I.E. Conclusions	165

CHAPITRE 3 : STABILITE DE LA LEVURE PROBIOTIQUE A LA GRANULATION ET A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN..... 167

I. RESISTANCE DE LA LEVURE A LA GRANULATION	167
I.A. Résultats et discussion	167
I.A.1. Effet de la teneur en fibres sur la température de granulation.....	167
I.A.2. Effet de la teneur en fibres et de la température finale de granulation sur la viabilité des levures	168
I.B. Conclusion	169
II. RESISTANCE DE LA LEVURE A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE	169
II.A. Méthodologie : dénombrement des levures dans les digesta et les fèces, impact du délai de conservation	169
II.A.1. Résultats et discussion	169
<input type="checkbox"/> Effet du mode de conservation.....	170
<input type="checkbox"/> Effet de la durée de conservation	170
II.A.2. Conclusion.....	170
II.B. Etude de la résistance de la levure à la digestion	170
II.B.1. Analyse du taux de survie des levures à la digestion, paramètres physico-chimiques et activité microbiologique du cæcum	171
<input type="checkbox"/> Taux de survie de la levure et paramètres physico-chimiques du caecum	171
<input type="checkbox"/> Caractérisation de la communauté bactérienne du caecum	173
II.B.2. Impact de la levure sur la croissance, l'ingestion et la santé digestive du lapin	175
<input type="checkbox"/> Effet de la levure sur la croissance et l'ingestion	175
<input type="checkbox"/> Effet de la levure sur la santé digestive	176
II.C. Discussion	177
II.C.1. Résistance de la levure	177
II.C.2. Impact de l'apport de levure sur l'écosystème caecal.....	178

II.C.3. Impact de l'apport de levure sur les performances zootechniques.....	179
II.D. Conclusion	180
CHAPITRE 4 : IMPACT D'UNE LEVURE PROBIOTIQUE SUR LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN ET SES PERFORMANCES, ET SUR QUELQUES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES: ETAT INFLAMMATOIRE GENERAL, BIOTOPE ET BIOCENOSE CAECALE	183
I. RESULTATS	183
I.A. Composition des aliments et concentration en levures dans le caecum	183
I.B. Statut sanitaire et observations générales	184
I.B.1. Effets du taux de fibres.....	186
I.B.2. Effets de la levure.....	187
I.C. Mesure zootechniques : croissance et efficacité alimentaire	187
I.C.1. Effets de la teneur en fibres du régime.....	188
I.C.2. Effets de l'addition levure.....	188
I.D. Effet de la levure et du niveau de fibres sur l'inflammation : taux d'haptoglobine	189
I.D.1. Effet de la teneur en fibres du régime.....	189
I.D.2. Effet de l'addition de levure.....	189
I.E. Effet de la levure et du niveau de fibres sur l'écosystème caecal	190
I.E.1. Impact sur le biotope.....	190
<input type="checkbox"/> Effet de la teneur en fibres du régime.....	190
<input type="checkbox"/> Effet de l'addition de levure.....	191
I.E.2. Impact sur la biocénose.....	191
<input type="checkbox"/> Effet de la teneur en fibres du régime.....	191
<input type="checkbox"/> Effet de l'addition de levure.....	192
<input type="checkbox"/> Similarité entre les profils.....	193
I.F. Caractéristiques physiopathologiques des lapins malades	194
I.G. Corrélation entre biotope, biocénose et haptoglobine	195
II. DISCUSSION	196
II.A. Caractéristiques physiopathologiques des lapins morbides	196
II.B. Impact de la réduction de la teneur en fibres de la ration	197
II.C. Impact de l'addition de levure <i>S. cerevisiae</i>	198
III. CONCLUSION	199

DISCUSSION GENERALE

APPROCHE METHODOLOGIQUE	204
I. ETUDE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU CONTENU CAECAL : PERTINENCE DE LA MESURE DU POTENTIEL REDOX.	205
II. ETUDE DU PROFIL MICROBIOLOGIQUE DU CONTENU CAECAL	206
III. ETUDE DE QUELQUES INDICATEURS DE L'INFLAMMATION	207
ECOSYSTEME CAECAL : INTERACTIONS FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES.....	208
I. FACTEUR ABIOTIQUE : EFFET DU STATUT NUTRITIONNEL SUR L'ECOSYSTEME	209
I.A. Effet du statut nutritionnel sur le biotope	210
I.B. Effet du statut nutritionnel sur la biocénose caecale	212
II. FACTEUR BIOTIQUE : EFFET DE LA LEVURE SUR L'ECOSYSTEME CAECAL ET RUMINAL	214
III. INTERACTIONS BIOTOPE BIOCENOSE	217
III.A. Interactions entre les paramètres du biotope	217
III.B. Interaction entre les paramètres du biotope et la biocénose	219
IV. PHYSIOPATHOLOGIE ET ECOSYSTEME DIGESTIF : IMPACT DE LA LEVURE SUR UN INDICATEUR DE L'INFLAMMATION GENERALE (HAPTOGLOBINE), LA SANTE DIGESTIVE, LA CROISSANCE ET L'EFFICACITE ALIMENTAIRE	219

V. MODES D'ACTION DE LA LEVURE PROBIOTIQUE – HYPOTHESES APPLICABLES AU CAS DE L'ECOSYSTEME CAECAL DU LAPEREAU	222
---	-----

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	227
-----------------------------------	-----

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	233
-----------------------------------	-----

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SE RAPPORTANT A LA THESE

Publications dans des revues à comité de lecture

- **M. Kimsé, V. Monteils, C. Bayourthe, T. Gidenne, 2009.** A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit cæcum: relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Science*, 17 :1-8

Communications dans des congrès

COMMUNICATION ORALE

- **M. Kimsé, T. Gidenne, C. Bayourthe, V. Monteils, 2007.** Mesure du potentiel redox dans le cæcum du lapin: premiers résultats méthodologiques. In : *12^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole*, 29-30 novembre, Le Mans, France, 1 : 81-84

POSTER

- **Kimsé M., Bayourthe C., Monteils V., Gidenne T., 2008.** Live yeast stability in the digestive tract of the rabbit: relationship with digestion, growth and digestive health. In : *9th WRSA – World Rabbit Congress*, Verona, Italy, June 10-13.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADF	Acid detergent fiber
ADL	Acid detergent lignin
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEB	Activités enzymatiques bactériennes
AGV	Acides gras volatils
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
<i>cf.</i>	<i>Confer</i>
CFU	Colonie formant unité
CVr	Coefficient de variation résiduelle
DO	Densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GMQ	Gain moyen quotidien
GLM	General linear models
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
Jx	x jours après la mise-bas
MAT	Matière azotée totale
MS	Matière sèche
NDF	Neutral detergent fiber
NH ₃	AMMONIAQUE
NS	Non significatif
PV	Poids vif
<i>vs.</i>	<i>Versus</i>

INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le rôle de microorganismes exogènes au microbiote digestif, tels que les probiotiques, sur le fonctionnement digestif fait actuellement l'objet de nombreuses études chez les animaux domestiques herbivores et monogastriques. Le mode d'action de ces probiotiques en particulier sur les écosystèmes microbiens digestifs reste néanmoins peu clair. Ainsi, dans le rumen, le mode d'action de la levure probiotique a été abordé, jusqu'à présent essentiellement par l'analyse des voies biochimiques. Toutefois, ces approches, bien qu'indispensables, n'ont pas été suffisantes pour comprendre le mode d'action de ce probiotique dans le rumen et encore moins de prédire son efficacité dans différentes conditions de pratiques alimentaires. Aucune ne permet de répondre de façon satisfaisante à la question suivante : *Comment les levures peuvent établir un nouvel état d'équilibre de l'écosystème ruminal ?* L'étude de la dynamique des populations microbiennes en relation avec l'apport de microorganismes exogènes probiotiques apparaît donc nécessaire.

L'objectif de ce travail est ici de réaliser une étude dans le caecum, puis de faire une approche comparative de l'effet d'un même probiotique dans deux écosystèmes microbiens différents: le caecum du lapin et le rumen de la vache, pour mieux décrire les mécanismes d'action d'une levure probiotique sur les relations biocénose-biotope. Il revêt une double importance. D'une part au plan cognitif, il s'agit de comprendre comment une espèce microbienne ajoutée peut modifier (ou non) la biocénose commensale et son retour à l'équilibre (notion de résilience/résistance). D'autre part, d'un plan plus finalisé, il faut analyser le rôle de ces microorganismes exogènes sur l'efficacité et la santé digestive. Sur ce dernier point, la compréhension des mécanismes d'action des probiotiques sur la résistance d'un écosystème microbien, ou sur sa meilleure stabilité, face à des pathogènes ou à des agressions externes, est d'une importance cruciale. Il s'agit en effet de trouver des **alternatives raisonnées** à l'emploi des antibiotiques en élevage, et de définir des stratégies nutritionnelles préventives.

Le rôle des levures sur l'écosystème ruminal a déjà fait l'objet de recherches. Ces études ont montré la capacité des probiotiques à exercer un effet de régulation du pH par la réduction de la pression partielle d'oxygène, laquelle renforce le pouvoir réducteur du milieu, ainsi plus favorable à l'activité de la population de bactéries cellulolytiques ruminales (Marden, 2007).

Chez le lapin, l'emploi de probiotiques est souvent préconisé en cas de risques d'instabilité digestive pouvant être provoqués par l'emploi d'aliment déficients en fibres (et aussi riches en

glucides fermentescibles, par ailleurs responsables d'acidose chez les ruminants). Notre étude évaluera dans différentes situations nutritionnelles le rôle de la levure en analysant *in-vivo* son impact sur l'écosystème caecal. Plusieurs paramètres du fonctionnement de l'écosystème digestif seront étudiés afin d'obtenir une approche intégrée des relations entre biotope et biocénose: paramètres du biotope (pH, production d'AGV, activité enzymatiques fibrolytiques etc.) et de la biocénose (stabilité, résistance/résilience, biodiversité) seront suivis.

En parallèle, des paramètres physiopathologiques tels que les indicateurs de l'inflammation (haptoglobine et la myéloperoxydase) et des paramètres zootechniques seront mesurés (croissance, ingestion, santé digestive etc.)

Notre travail se compose de deux parties :

Une étude bibliographique sur la physiologie digestive du lapin et sur l'effet des probiotiques (levure en particulier) chez les animaux, ainsi que quelques hypothèses sur leurs modes d'action.

Une étude expérimentale qui commencera par la mise au point d'une méthode de mesure des paramètres physiques et chimiques du caecum avec l'introduction de la notion de potentiel redox (méthodologie redox). Suivra une étude de la résistance d'une levure probiotique (*S. cerevisiae* SC 47) à la granulation et à la digestion. Et au final, l'effet de cette levure sur l'écosystème caecal, sur les paramètres de l'inflammation et sur les paramètres zootechniques de lapins élevés en deux situations nutritionnelles différentes (témoin vs stress digestif).

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : FONCTIONNEMENT DIGESTIF CHEZ LE LAPIN

I. DIGESTION CHEZ LE LAPIN

La digestion chez le lapin est un processus complexe qui se compose de deux grandes étapes (Lebas *et al.*, 1991). La première étape est une digestion classique dont les principaux organes impliqués sont la bouche, l'estomac et l'intestin grêle. Cette digestion aboutit à la mise à disposition de l'organisme, des nutriments qui sont assimilés par le sang à travers les parois du tube digestif de l'animal. La deuxième étape de la digestion est une fermentation des résidus de la première étape. Elle se déroule dans le gros intestin principalement dans le cæcum et elle fait intervenir la population microbienne en symbiose avec l'hôte.

I.A. RAPPEL ANATOMIQUE DU SYSTEME DIGESTIF

La bouche du lapin présente des dents profondément insérées dans la mâchoire (sans racines). Elles ont une croissance continue et ont un rôle masticateur réduit. L'existence d'une deuxième paire d'incisives à la mâchoire supérieure, dissimulée derrière la première paire, distingue les lagomorphes de l'ordre des rongeurs. Sa formule dentaire est de I : 2/1 C : 0/0 PM : 3/2 M : 3/3 (**Figure 1**). Les glandes salivaires sont bien développées (parotide, mandibulaire, sublinguale...).

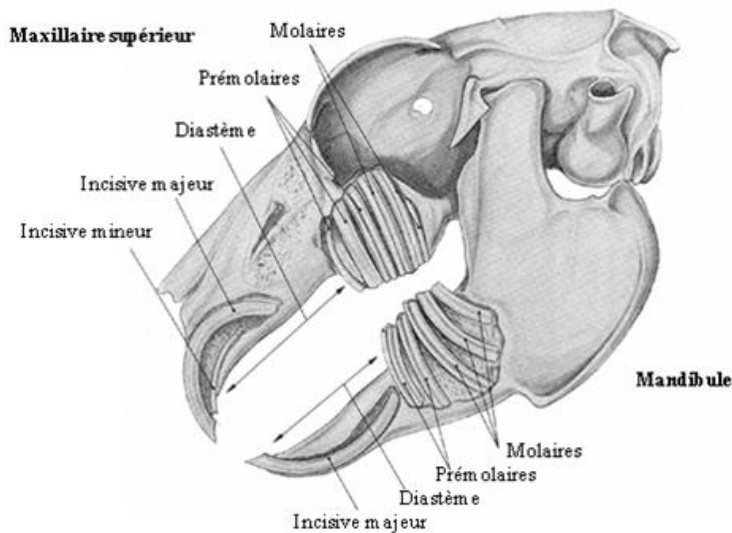


Figure 1: Vue de l'implantation des dents chez le lapin (Barone *et al.*, 1973)

I.A.1. L'estomac

L'estomac est constitué de trois parties (**Figure 2**). La partie supérieure est le fundus, la partie « moyenne » est le cardia par lequel arrive l'œsophage, et la partie inférieure est l'antrum. L'estomac se termine par le pylore qui est responsable de la régulation du flux des aliments vers l'intestin grêle grâce à son sphincter.

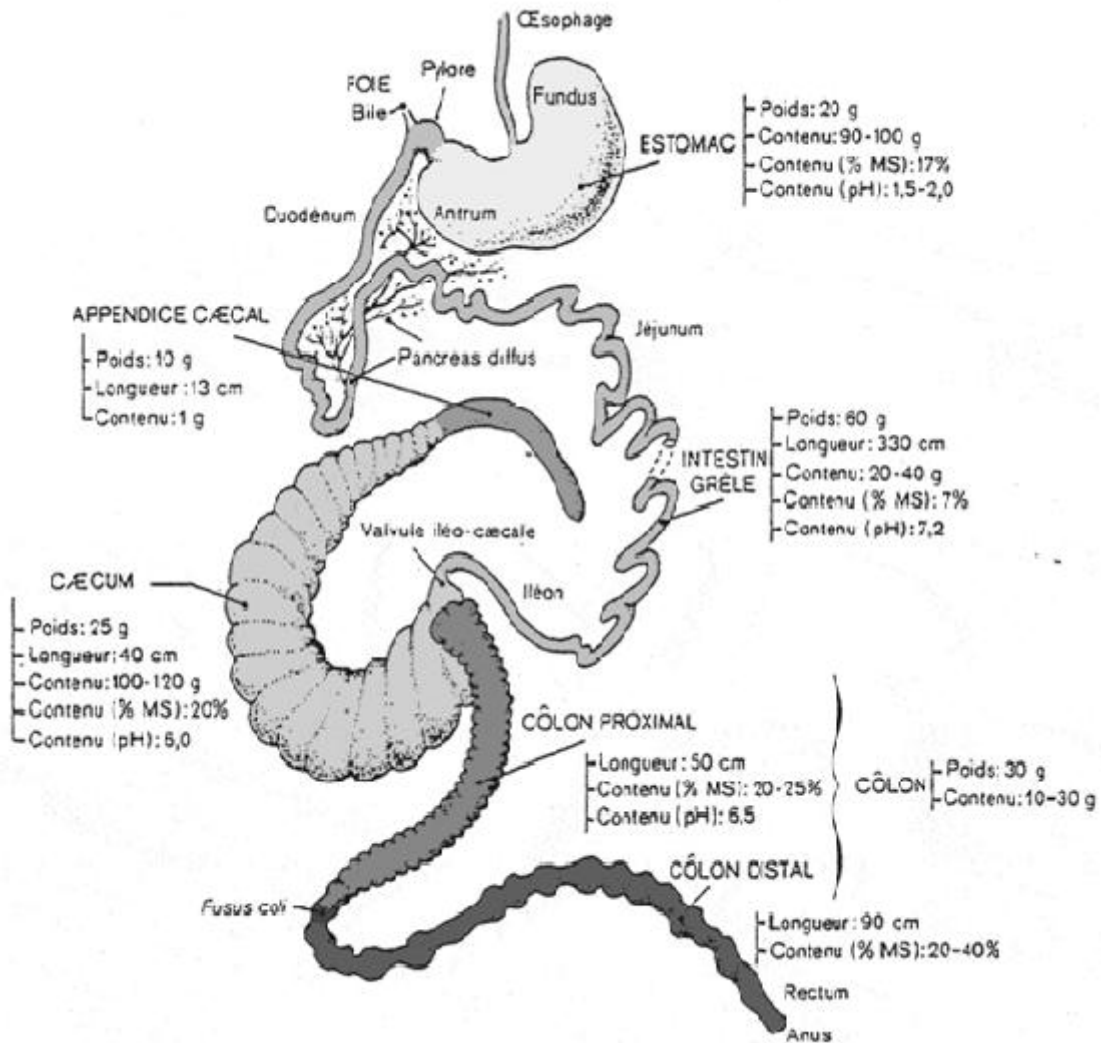


Figure 2: Schéma du tube digestif chez un lapin âgé de 12 semaines (2,4kg PV) (Lebas, 1996)

Le milieu stomacal est fortement acide avec des variations de pH entre 1,5 et 3,5. La période d'ingestion des caecotrophes correspond au pH le plus élevé qui a lieu dans la matinée (Gidenne & Lebas, 1984).

Chez le jeune lapereau de moins de 30 jours d'âge, la paroi stomacale secrète en plus de la pepsine, de la rénine ou chymosine. Cette sécrétion de chymosine devient nulle à l'âge adulte (45 jours) contrairement à la pepsine. Une lipase gastrique dont la production maximale est

autour de 30 jours d'âge est aussi sécrétée par une zone de la paroi stomacale autour du cardia. Les particules alimentaires qui arrivent dans l'estomac après leur ingestion séjournent environ 3 à 6 h dans ce milieu acide, où elles subissent très peu de transformations chimiques. Elles sont ensuite évacuées vers l'intestin grêle par de petites salves grâce aux contractions stomacales.

I.A.2. L'intestin grêle

L'intestin grêle représente plus de la moitié de la longueur du tube digestif (3 m environ chez l'adulte). La partie supérieure rattachée au pylore est le duodénum. Le jéjunum constitue la partie intermédiaire et l'iléon la partie inférieure dont l'extrémité est rattachée au caecum. Divers organes de sécrétions communiquent avec l'intestin grêle. Le foie sécrète de façon continue la bile qui est stockée dans la vésicule biliaire avant d'être transférée dans la première partie du duodénum via le canal cholédoque. Quant au canal pancréatique, il débouche dans le duodénum à 40 cm du pylore. Les enzymes digestives sécrétées par le pancréas permettent la dégradation des protéines (trypsine, chymotrypsine), de l'amidon (amylase) et de la matière grasse (lipase). D'autres glandes digestives sont rencontrées dans la paroi de l'intestin grêle. On y trouve aussi les plaques de Peyer. Ces plaques sont des tissus lymphoïdes d'environ 1 à 2 cm de diamètre.

Le pH intestinal contrairement à l'estomac est légèrement alcalin (pH 7,2 à 7,5) grâce à la bile. Il s'acidifie progressivement pour se stabiliser entre 6,2 et 6,5 à la fin de l'iléon. Le contenu de l'intestin grêle est liquide, principalement celui du duodénum et du jéjunum (6-8% de MS). Le chyme stomacal qui arrive dans l'intestin grêle est dilué par l'afflux de la bile et par les sécrétions de la paroi intestinale et du pancréas. Sous l'action des enzymes intestinales et pancréatiques, les éléments dégradables sont libérés et répartis dans le sang en direction des organes cibles. Les digesta séjournent de 1 à 3h environ dans l'intestin grêle puis débouchent dans le caecum.

I.A.3. Le caecum

Les particules non dégradées arrivent dans le caecum par sa partie basale appelée le *Sacculus rotundus*. Le volume du caecum représente environ 49% de la capacité du tube digestif (Portsmouth, 1997) et 90% de l'ensemble intestin grêle-caecum-côlon alors que pour la plupart des espèces domestiques, il ne compte seulement que 4 à 11% de cet ensemble. Seul le cheval

a également un cæcum bien développé (30%) et un côlon qui atteint 2 fois le volume du caecum. Le caecum de lapin contient 100 à 120 g de matière pâteuse et homogène, ayant une teneur en matière sèche de 22% avec un pH légèrement acide proche de 6. Le pH varie selon l'âge et la période de la journée (**Figure 3**). La paroi caecale s'invagine en forme de spires faisant 22 à 25 tours. Ces spires augmentent la surface de contact du contenu caecal à la muqueuse qui s'y trouve. L'extrémité supérieure du caecum est un appendice (appendice caecal ou vermiforme) avec un diamètre nettement plus faible dont la paroi est constituée de tissus lymphoïdes. L'appendice caecal, le *Sacculus rotundus* et les plaques de Peyer dans l'intestin grêle jouent un rôle important dans le système de défense de l'organisme. Du point de vu histologique, la muqueuse cæcale ne forme pas de villosités mais présente des cryptes. La surface est composée d'un épithélium prismatique simple, présentant une bordure de microvillosités bien développée, tapissée d'un glycocalyx. Des cellules à mucus sont présentes en faible quantité. Des lymphocytes et leucocytes ont également été identifiés. L'épithélium des cryptes comprend des cellules indifférenciées, des cellules à mucus, des cellules épithéliales immatures et des cellules endocrines

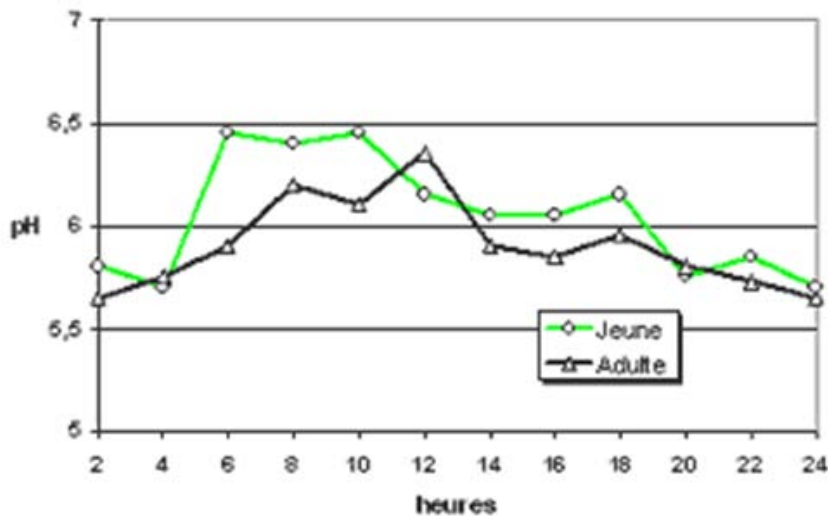


Figure 3: Évolution nyctémérale du pH cæcal chez de jeunes lapins de 5 semaines et chez des sujets adultes (18 semaines). Alimentation à volonté - ingestion de cæcotrophes observée de 4 h à 12 h chez les jeunes, et de 8 h à 14 h chez les adultes (Bellier, 1994)

I.A.4. Le côlon

Le contenu caecal transite ensuite vers le colon. Le côlon est subdivisé en 3 parties. La première partie est le côlon proximal mesurant environ 50 cm caractérisé par de petits renflements en forme de poche ou *Haustra coli*. Cette partie est le siège d'une grande production de mucus et aussi d'absorption (AGV, minéraux...). La seconde partie est le *Fusus*

coli long de 1 à 1,5 cm et portant les seuls muscles striés du tube digestif du lapin. Elle contient des cellules en gobelet, des entérocytes et des cellules glandulaires. La paroi de la partie terminale du *Fusus coli* est lisse, c'est la 3^{ième} partie du côlon appelée côlon distal. La plupart des échanges hydrominéreaux ont lieu dans cette partie. Le côlon se termine par le rectum dont l'orifice extérieur est l'anus porteur de glandes annales. Le temps de séjour moyen des digesta dans l'ensemble caecum-côlon proximal est estimé entre 6 et 12 h, selon le type d'alimentation et l'âge de l'animal.

I.B. DIGESTION ENZYMATIQUE CHEZ LE LAPIN

En élevage rationnel, l'aliment est distribué sous forme de granulés à haute teneur en matière sèche (environ 90%). L'énergie est essentiellement fournie par les glucides cytoplasmiques des végétaux, principalement l'amidon. Les constituants pariétaux participent également à l'apport d'énergie, surtout s'ils proviennent de plantes peu lignifiées. Un apport minimal de fibres est nécessaire pour assurer la régulation de motricité intestinale et stimuler le transit digestif. Lorsque la teneur en fibres augmente de 22 à 40 g/kg, le temps de transit diminue de 12 heures (Gidenne *et al.*, 2000).

I.B.1. Digestion stomacale

Le bol alimentaire dégluti s'accumule dans l'estomac et y séjourne 2 à 4 h pour y subir une transformation mécanique et chimique. Le produit de ces transformations est le chyme gastrique. L'estomac produit un suc gastrique comprenant différents types de sécrétions. Ces sécrétions sont de l'acide chlorhydrique participant à l'acidification du milieu, du mucus (glycoprotéines) constituant une couche protectrice de l'épithélium contre les attaques acides, et des enzymes (**Figure 4**). L'acidité du milieu permet la dénaturation des protéines et l'activation de certaines enzymes ainsi que l'inactivation de certains microorganismes ingérés avec l'aliment (Martinsen *et al.*, 2005). L'estomac est le siège du début de la digestion des lipides et des protéines.

La production de lipase gastrique est proche de celle de l'homme. Cette lipase hydrolyse préférentiellement les acides gras à chaînes courtes ou moyennes à un pH optimum compris entre 5 et 6 (Perret, 1982; DeNigris *et al.*, 1988; Moreau *et al.*, 1988; Rogalska *et al.*, 1990). Son optimum d'activité pour les acides gras à longues chaînes se situe à pH 4 (Moreau *et al.*, 1988). Il est établi chez l'homme que la lipase gastrique hydrolyse préférentiellement les

acides gras en position *sn*-3 sur le glycérol, jamais ceux en position *sn*-2, ce qui aboutit principalement à la formation d'acides gras libres et de *sn*-1,2-diacylglycérols (Miled *et al.*, 2000; Mu & Hxy, 2004).

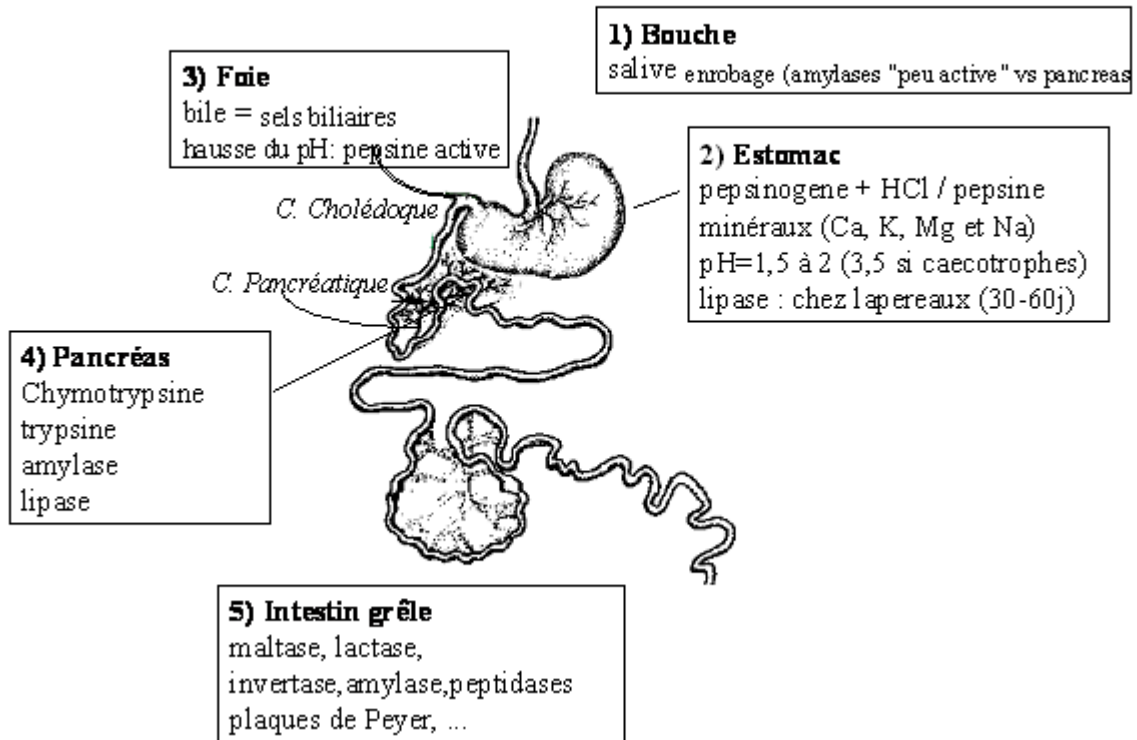


Figure 4: Schéma des différents organes intervenant dans la digestion enzymatique (Gidenne, 1996.)

La digestion stomacale des protéines est faite sous l'action de la pepsine. Elle est sécrétée par les cellules principales ou à zymogène sous une forme inactive appelée pepsinogène. Elle est activée par l'acidité gastrique. Une glycoprotéine impliquée dans l'absorption de la vitamine B12 est également sécrétée par les cellules épithéliales.

Après 2 à 4 h passées dans l'estomac, le bol alimentaire est suffisamment brassé avec les sucs gastriques. Le chyme est ensuite évacué vers le duodénum.

I.B.2. Digestion et absorption intestinale

La digestion intestinale se fait avec l'aide de glandes annexes qui sont le foie et le pancréas. Le chyme acide provenant de l'estomac est neutralisé par la pepsine active du foie, par le bicarbonate contenu dans les sécrétions pancréatiques et de la muqueuse, et par les glandes de Brunner de la sous muqueuse duodénale (Baron, 2000; Konturek *et al.*, 2004).

La digestion des protéines amorcée dans l'estomac se poursuit dans l'intestin par les protéases pancréatiques et les peptidases des entérocytes. Ces protéases sont des endopeptidases ou des exopeptidases (trypsine, chymotrypsine ou élastase). Les peptides issus de l'action des protéases sont hydrolysés en acides aminés par les peptidases de la bordure en brosse et du cytoplasme des entérocytes. Les protéines digérées dans l'intestin sont d'origine alimentaire mais aussi endogène. Les protéines d'origine endogène proviennent généralement des enzymes, des bactéries ou des squames des entérocytes. Les acides aminés libres issus de la digestion sont absorbés dans l'intestin. L'absorption se fait par diffusion si la structure de l'acide aminé lui confère des propriétés hydrophiles. Dans le cas contraire, l'absorption se fait par l'intermédiaire de transporteurs ions sodiums dépendant ou indépendant. Bien que la plupart des protéines ingérées soient transformées en acides aminés dans l'intestin, une partie parvient à passer dans la circulation sanguine sous la forme de peptides (Erickson & Kim, 1990).

La digestion des lipides est précédée de leur émulsion par des sels biliaires sécrétés par le foie. Cette émulsion aboutit à la formation de micelles sur lesquelles viennent se fixer les colipases servant d'ancrage à la lipase pancréatique. La colipase et la lipase pancréatique sont responsables de l'hydrolyse des triglycérides et des estérases. Ces estérases sont elles-même à l'origine de l'hydrolyse des autres composés lipidiques tels que les phospholipides, les cholestérols ou les esters de cholestérol. L'hydrolyse des lipides libère des acides gras libres, des mono et di-glycérides, du glycérol, de la phosphatidylcholine et du cholestérol. Leur absorption se fait par diffusion passive ou par des transporteurs à travers la membrane intestinale. Les lipides une fois dans l'entérocyte se réorganisent en chylomicron avant de passer dans la lymphe par exocytose (Thomson *et al.*, 1993).

La digestion des glucides (amidon) est assurée par l'amylase pancréatique. Elle agit sur les liaisons osidiques en α -1-4 de l'amylose et de l'amylopectine. Cette hydrolyse conduit à la formation de maltotrioses, de maltoses et de dextrans dans le suc intestinal (Corring & Rerat, 1988). Puis, les oligo- ou di-saccharidases (α ou β) de la muqueuse intestinale interviennent en fin de digestion pour libérer des oses simples. Parmi les principales α -disaccharidases, on retrouve les complexes saccharase-isomaltase (EC 3.2.1.48/10) et maltase-glucoamylase (EC 3.2.1.20/3). Chaque complexe est formé de deux sous-unités liées de manière non covalente et possédant chacune un site actif (Galand, 1989). Le premier complexe hydrolyse les liaisons terminales en α et β -(1->2), α -(1->4) et α -(1->6), tandis que le deuxième ne clive que les

liaisons en α -(1- \rightarrow 4). La production de la maltase et de l'amylase est plus importante si l'animal est nourri à un régime à haute teneur en amidon (peu de fibres) (Gidenne *et al.*, 2007b). Les oses libérés sont ensuite absorbés par la bordure en brosse entérocytaire par transport passif (fructose) ou transport actif couplé avec le sodium. Le passage de ces sucres (galactose et glucose) vers le sang se fait ensuite par transport passif au niveau de la membrane basale entérocytaire (Wright *et al.*, 2003).

I.B.3. Digestion caecale ou microbienne

Si l'amidon est bien digéré par les enzymes intestinales, la digestion des glucides pariétaux par contre a lieu principalement dans le caecum et nécessite l'intervention des enzymes bactériennes.

Les fibres alimentaires constituent la principale source de glucide pour les bactéries caecales. Ce sont la lignine (non glucidique) et les polysaccharides non amylicés (PNA). Il existe 4 types de PNA dont une partie est soluble dans l'eau et une autre à l'instar de la lignine est insoluble. Les PNA insolubles sont la cellulose, hémicellulose et une partie des pectines. Les fibres solubles sont les pectines hydrosolubles, β -glucanes et les certains arabinanes et arabinoxylanes (hémicelluloses solubles). La technique de Van Soest (Van Soest, 1963) permet le dosage ces différentes fractions de fibres (**Figure 5**).

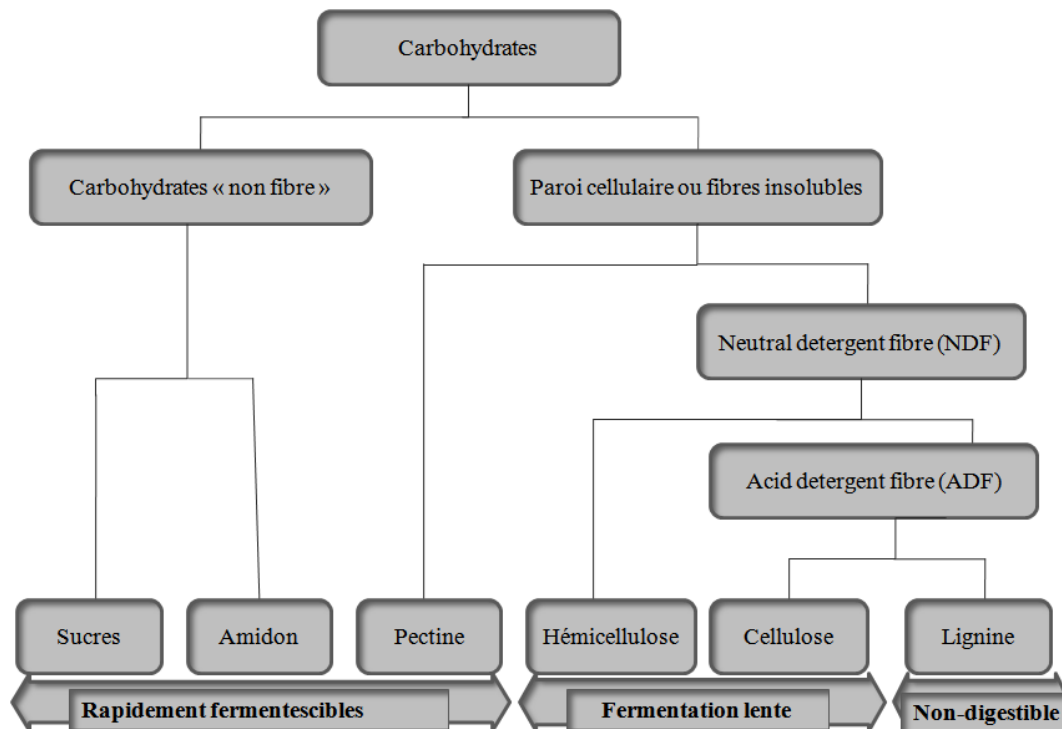
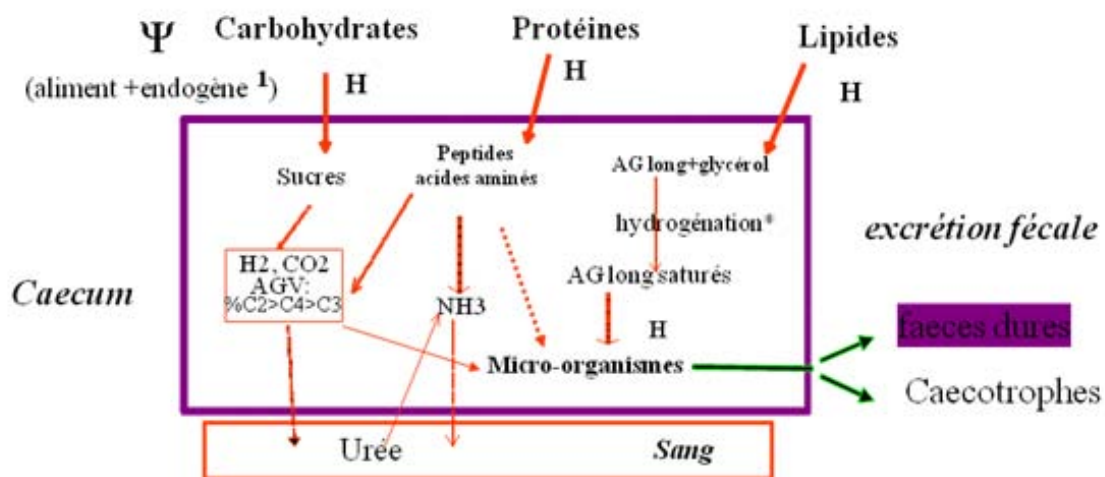


Figure 5: Nature des fibres alimentaires et méthodes de dosage

Les fibres, l'amidon, les mucopolysaccharides et les autres oligosaccharides ayant échappés à la digestion ou à l'absorption intestinale sont dégradés en hexose et pentose par les enzymes bactériennes. Ils sont ensuite fermentés en pyruvate dans les bactéries et le pyruvate est à son tour transformé en acides gras volatils (AGV) avec production de gaz (H_2 , CO_2 , CH_4) (**Figure 6**). Plusieurs techniques permettent d'estimer les activités enzymatiques des bactéries (Boulahrouf *et al.*, 1991). La digestibilité des fibres permet d'estimer globalement l'activité bactérienne. L'activité de la pectinase est généralement supérieure à celle de la xylanase, elle-même supérieure à celle de la cellulase ce qui est cohérent avec la digestibilité élevée des substances pectiques par rapport à celle de la cellulose chez le lapin (Debray *et al.*, 2002; Pinheiro, 2002). Cette variation de la digestibilité est en relation avec la forte implantation des bactéries du genre *Bacteroides* qui serait principalement pectinolytique (Sirotek *et al.*, 2001).



Ψ : substrats primaires, échappant à l'absorption dans l'intestin grêle, utilisables par les microorganismes
 (1) Aliment = amidon, fibres ; Endogène = polysaccharides du mucus, protéines des cellules épithéliales, enzymes, ...

H = hydrolyses de polymères

AGV : (C₂=acetate; C₃=propionate; C₄= butyrate)

NH₃: ammoniaque

* : hydrogénation des AG longs insaturés

Figure 6: Métabolisme caecal des principaux nutriments (Gidenne, 1997)

Les AGV produits à la suite de la fermentation sont des acides à courte chaîne utilisés par le lapin comme source d'énergie couvrant 10 à 40% des besoins d'entretien. Ils sont souvent sous la forme d'anions libres plutôt que d'acides libres. Ils sont absorbés par diffusion passive à travers la paroi caecale. Les AGV majeurs sont l'acide acétique (C₂), l'acide propionique (C₃) et l'acide butyrique (C₄). Le profil fermentaire du lapin est spécifique par rapport à celui des ruminants et des autres monogastriques à quelques exceptions près. En effet l'acétate est

prédominant (70 à 80% des AGV totaux) suivi du butyrate (8 à 20% des AGV totaux) et du propionate (3 à 10% des AGV totaux) (Bellier, 1994). Cette inversion de la production de C₄ et de C₃ serait due à la prédominance du genre *Bacteroides* qui est responsable de la production de C₄. Le profil fermentaire du lapin est donc tributaire du microbiote caecal.

Il existe dans le caecum, en plus des activités fibrolytiques, une activité métabolique de l'azote et une absorption de certains minéraux notamment le phosphate. Ces activités métaboliques (protéolytiques et uréolytiques) aboutissent à une production d'ammoniaque suite à la fermentation des acides aminés endogènes (bactéries lysées, mucus, cellules épithéliales desquamées, urée). L'ammoniaque produit peut être absorbé directement à travers la membrane par la muqueuse caecale pour la biosynthèse microbiennes (Crociani *et al.*, 1985). Les produits de la biosynthèse sont partiellement recyclés lors de la caecotrophie par le lapin.

Le temps de séjour des particules alimentaires dans le caecum est fonction de leur taille. Le temps de rétention des particules grossières (diamètre >300µm) varie de 7 à 16 heures contre 16 à 46 heures pour les particules dites fines (diamètre < 300µm) et les liquides (Gidenne, 1997). Le contenu caecal est ensuite évacué vers le côlon proximal, puis distal dans lequel 2 types distincts de pelotes fécales sont formées.

I.B.4. Caecotrophie et crottes dures

L'excrétion de caecotrophes (en grappe et recouvert de mucus) et des crottes dures sont 2 mécanismes distincts qui ont lieu à différents moments de la journée. Le rythme d'excrétion de ces 2 types de pelotes fécales est dépendant du rythme d'ingestion du lapin. Les crottes dures sont émises en grande quantité la nuit, où l'ingestion alimentaire est la plus importante. Les caecotrophes sont quant à elles émises durant la période de faible ingestion dans la matinée et en début d'après-midi sur une période unique de 7 heures environ. La caecotrophie s'opère grâce au fonctionnement dualiste du côlon proximal. Elle apparaît dès que le lapereau commence à ingérer des aliments solides (après 3 semaines d'âge). Les caecotrophes correspondent au contenu caecal qui passe par le côlon sans subir de changements importants (particules fines et grossières). Par contre, la production de crottes dures, implique de nombreuses modifications du contenu caecal au cours de son dernier passage dans le côlon proximal. Lorsque le contenu caecal s'engage dans le côlon proximal, ce dernier présente une succession de contractions avec alternance de contractions péristaltiques, puis antipéristaltiques. Ainsi les grosses particules (>300 µm) principalement les fibres

poursuivent leur transit dans le côlon distal, les particules fines sont refoulées vers le caecum pour y subir une nouvelle dégradation bactérienne (**Figure 7**) (Gidenne, 1997).

Le côlon distal agit en plus comme une «essoreuse» déshydratant l'excrément en devenir. L'eau ainsi que les AGV et les minéraux sont intensément absorbés dans le côlon surtout au niveau du *Fusus coli*. La pratique de la caecotrophie présente un intérêt nutritionnel important par son apport en protéines de haute valeur biologique (environ 30% d'origine microbienne) et des vitamines hydrosolubles (Gidenne & Lebas, 2006). La composition des caecotrophes est similaire à celle du contenu caecal mais différent de celle des crottes dures (**Tableau 1**).

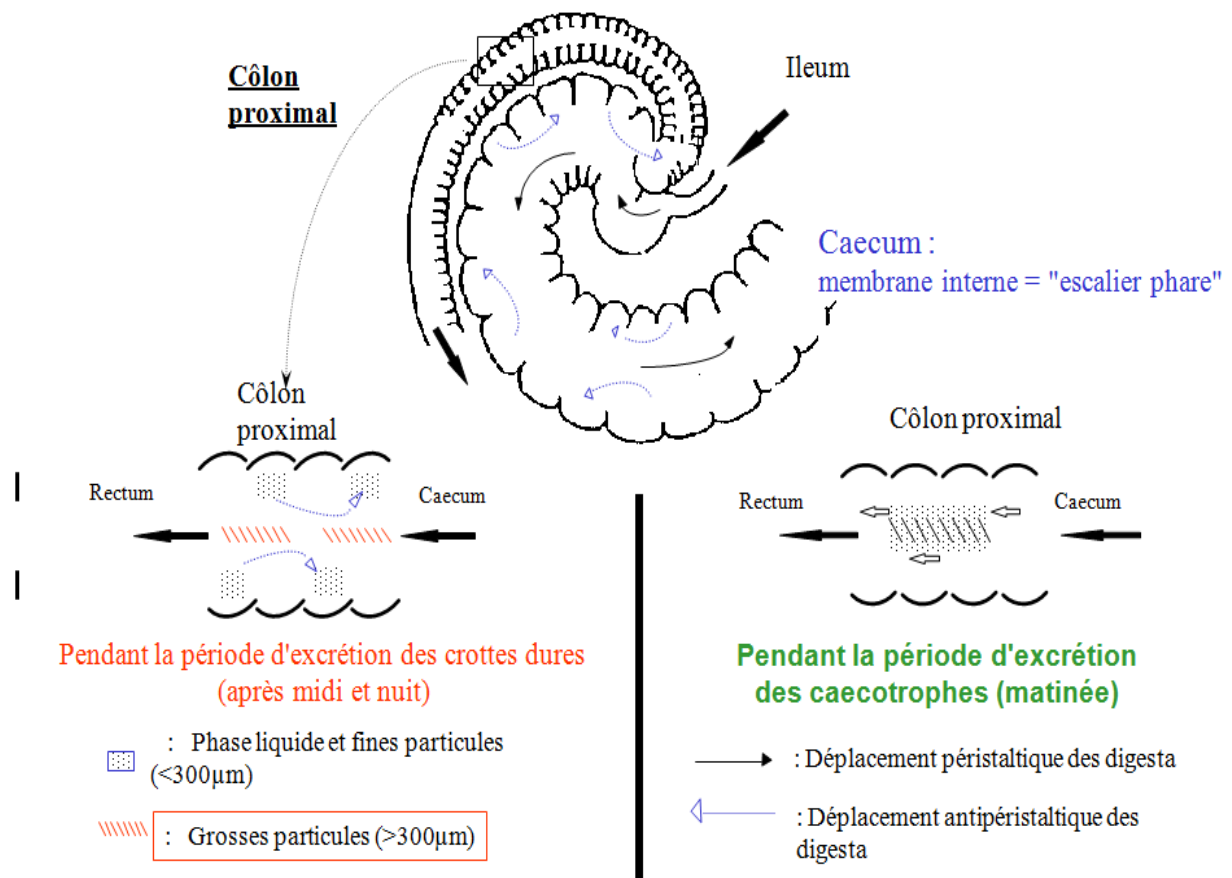


Figure 7: Mouvement des digesta dans le segment caeco-colique (Gidenne, 1997)

Le caecum du lapin au point, de vu fonctionnel peut être comparé au rumen chez les ruminants. Il est le siège d'activités fermentaires intense provenant de la biocénose dont les AGV sont les produits terminaux. Ils couvrent 10 à 40% des besoins énergétiques d'entretien du lapin. Le profil fermentaire est constitué majoritairement de l'acétate (70 à 80%), ensuite du butyrate (8 à 20%) et du propionate (3 à 10%).

Tableau 1: Composition chimique des caecotrophes et des fèces dures en %MS (Gidenne & Lebas, 2006)

	Crottes dures	Caecotrophes
MS %	48-66	18-37
MAT	9-25	21-37
Cellulose brute	22-54	14-33
Lipides	1,3-5,3	1,0-4,6
Minéraux	3-14	6-18

II. CARACTERISATION DE L'ECOSYSTEME CAECAL

L'**écosystème** caecal peut se définir comme l'association formée par la communauté des microorganismes (**biocénose**) et le milieu caecal (**biotope**) (Gidenne *et al.*, 2007a). La biocénose caecale est constituée de nombreux microorganismes qui jouent un rôle important dans la digestion. L'abondance de microorganisme dépend de la stabilité du biotope. Ce dernier est caractérisé par une teneur en matière sèche qui se situe entre 21 et 23%, le pH autour de 6 (légèrement acide) et une absence d'oxygène (anaérobie). La biocénose totale comprend une biocénose commensale (autochtone, permanente) et biocénose transitoire dont une partie est constituée de pathogènes potentiels.

II.A. ETUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE

Les techniques culturales ont permis d'obtenir des informations sur les bactéries (taxonomie, écologie, physiologie). Cependant, reproduire *in vitro* les conditions de croissance des microorganismes est difficile et seule une partie des microorganismes du caecum est identifiable. Ce faible rendement serait surtout dû au fait que la grande majorité des microorganismes (70 à 80%) ne sont pas cultivables ou que l'on ne connaît pas encore les milieux de cultures adaptés à ces microorganismes. Le développement des techniques de microbiologie moléculaire a permis aujourd'hui l'identification d'un nombre important de microorganismes dans les écosystèmes digestifs comme le caecum.

II.A.1. Mise en place de la biocénose caecale chez le lapereau

Chez l'homme le microbiote digestif est présent dès la naissance grâce à la contamination maternelle. La période de colonisation ne dure que 2 semaines (Gournier-chateau *et al.*, 1994). Les espèces majoritairement rencontrées dans le tube digestif humain sont les *Bifidobacterium spp.* et les *Bacteroides*. La population microbienne naturelle sous dominante est représentée par les *Lactobacillus*.

Chez le lapin, le caecum est encore stérile 3 jours après la naissance (Gouet & Fonty, 1979). Une semaine après la naissance, le microbiote atteint 10^7 à 10^8 bactéries/g de matière caecale. Cette concentration de bactéries reste constamment élevée (10^9 à 10^{10} bactéries/g) durant toute la vie du lapin. Cependant la composition structurale varie au cours de la croissance. Durant les 2 premières semaines d'âge, les concentrations caecales en bactéries anaérobies facultatives et en bactéries anaérobies strictes sont égales (10^7 à 10^{10} bactéries/g). Toutefois à la fin de la 2^{ème} semaine, la concentration de bactéries anaérobies facultatives baisse fortement (10^2 à 10^4 bactéries/g) et tend à disparaître au profit des bactéries anaérobies strictes au sevrage (28 jours d'âge) (**Figure 8**).

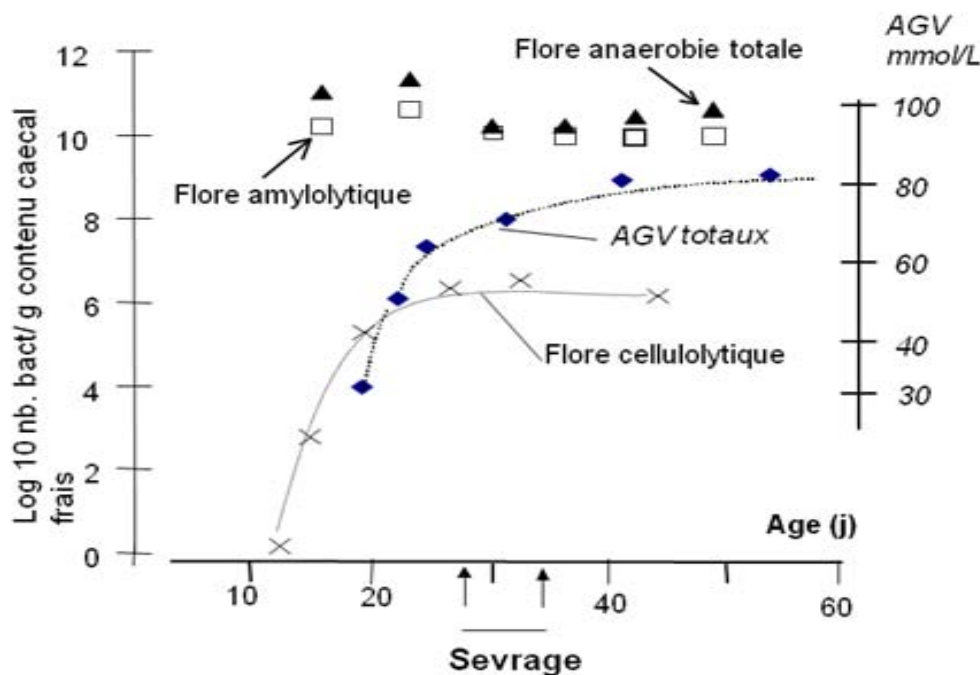


Figure 8: Installation de la flore et activité fermentaire au cours de la croissance du lapin (Gidenne *et al.*, 2008)

Le microbiote caecal est essentiellement composé de bactéries anaérobies strictes et de bactéries anaérobies facultatives.

La population bactérienne anaérobie stricte est caractérisée par une nette prédominance des bactéries anaérobies strictes non sporulées (10^{10} à 10^{11} bactéries/g) du genre *Bacteroides* (Gouet & Fonty, 1979). Une partie de ces bactéries est impliquée dans la dégradation des fibres. Les espèces cellulolytiques apparaissent à la deuxième semaine d'âge lorsque les lapereaux commencent à ingérer des aliments solides (Boulahrouf *et al.*, 1991). Cette population microbienne cellulolytique croît lentement pour se stabiliser à partir de 25 jours d'âge à $4,5 \cdot 10^6$ bactéries/g. Les genres *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Streptococcus* et *Enterobacter* 100 à 1000 fois plus faibles, complètent la population bactérienne caecale. Les *Clostridium* sulfo-réducteurs apparaissent au sevrage (28 jours) et atteignent une concentration de 10^5 à 10^6 bactéries/g avant de régresser à 10^4 bactéries/g entre 42 et 56 jours. Le microbiote amylolytique suit la même évolution que celui des anaérobies totales (Padilha *et al.*, 1995).

Le microbiote anaérobie facultatif apparaît à la première semaine d'âge et se compose exclusivement d'entérobactéries telles qu'*Escherichia coli* et les streptocoques. Ces microorganismes atteignent leur optimum respectivement au 14^{ième} jour d'âge (10^7 à 10^9 bactéries/g) et 21^{ième} jour (10^7 bactéries/g). Le microbiote anaérobie facultatif décroît rapidement au sevrage.

Grâce à la technique d'hybridation de sondes ARN 16S, Bennegadi (2002) a identifié la présence de bactéries de type *Archaea* dans le caecum. Le caecum et le reste du tube digestif du lapin sont exempts de lactobacilles (Gouet & Fonty, 1979).

La biocénose caecale du lapin au sevrage serait ainsi composée d'un microbiote dominant (*Bacteroides*), d'un microbiote sous dominant (*Clostridium*) et d'un microbiote mineure (*Streptococcus* et *E. coli*).

De toutes ces études, aucune n'a décelé la présence de levures commensales dans le caecum du lapin. Cependant, la présence de levures du genre *Saccharomyopsis guttulata* a été signalée à une concentration de 10^6 levures/g dans le caecum (Forsythe & Parker, 1985; Peeters, 1987). Toutefois ces résultats n'ont pas encore été confirmés par d'autres chercheurs.

II.A.2. Activités microbiote caecal

Le caecum joue un rôle essentiel dans la physiologie nutritionnelle chez le lapin. Il est le siège des diverses activités microbiennes (enzymatiques et fermentaires). Les glucides et les polysaccharides pariétaux sont les principaux substrats pour les bactéries qui s'y trouvent.

◦ Activités fermentaires

L'activité amylolytique et cellulolytique aboutissent à la production de glucides simples qui sont ensuite fermentés par d'autres bactéries pour aboutir à la production d'AGV. Les AGV majeurs sont l'acétate, le propionate et le butyrate et les AGV mineurs sont l'acide valérique C₅, l'isobutyrate (iC₄) et l'iso valérique (iC₅). La concentration caecale en AGV totaux croît avec l'âge du lapin. Entre 15 et 22 j, la concentration passe de 8 à 34 mmol/l du contenu caecal et à plus de 50 mmol/l au sevrage (28 j). Elle atteint 70 mmol/l à 45 j (**Figure 9**) (Padilha *et al.*, 1995; Gidenne *et al.*, 2007a). Cette variation de la concentration en AGV est marquée par une inversion des proportions de propionate et de butyrate. En effet, la concentration de butyrate (6-14%) augmente avec l'âge tandis que celle de propionate (6-8%) reste stable. Le ratio propionate/butyrate qui est supérieur à 1 avant le sevrage (3,8 à 15 jours), devient inférieur à 1 (0,5 à 49 jours) après le sevrage (Adjiri *et al.*, 1992; Adjiri *et al.*, 1995). Chez les autres herbivores, le ratio propionate/butyrate reste toujours supérieur à 1.

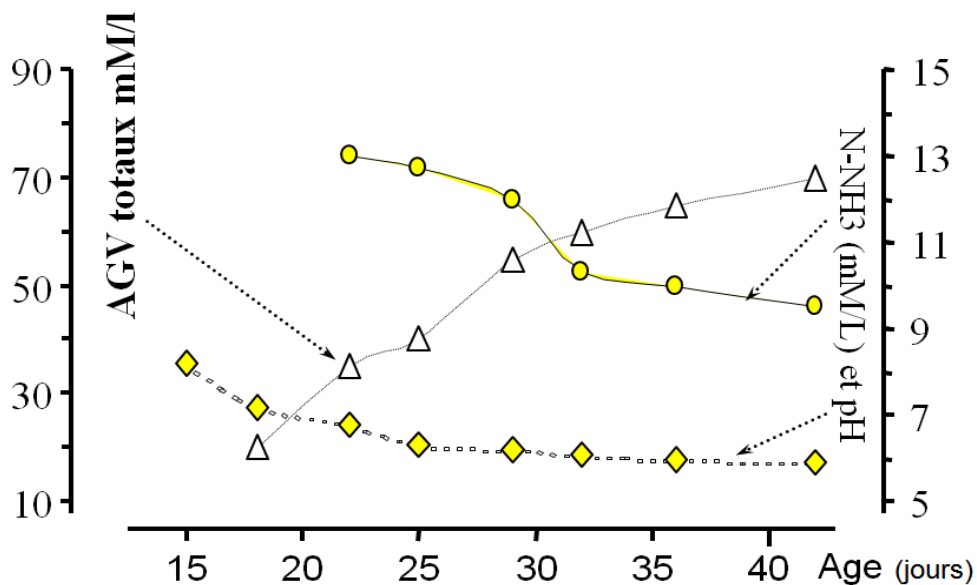


Figure 9: Evolution de l'activité fermentaire caecale en fonction de l'âge (Fortun-Lamothe & Gidenne, 2001)

◦ Activités enzymatiques fibrolytiques

La digestion cœcale caractérisée par la fermentation est précédée par une dégradation enzymatique. Cette activité métabolique est l'œuvre de divers microorganismes, majoritairement dominés par les bactéries protéolytiques, uréolytiques et par les bactéries utilisatrices de NH₃. Ce sont principalement les *Clostridium* et *Bacteroides vulgates* (Crociani *et al.*, 1984; Forsythe & Parker, 1985). Ensuite, suit le groupe des bactéries fibrolytiques

composées de bactéries cellulolytiques (*Eubacterium* et *Bacteroides*) et de bactéries pectinolytiques et xylanolytiques (*Prevotella ruminicola*). Le 3^{ème} et le 4^{ème} groupe sont respectivement les bactéries amylolytiques et les bactéries méthanogènes telles que *Methanosphaera cuniculi*. Ces bactéries sont en nombre très réduit (Biavati *et al.*, 1988; Padilha *et al.*, 1995). Les enzymes intervenant dans la dégradation des fibres sont les pectinase dont la production augmente fortement entre le sevrage (28 j) et l'âge sub-adulte (42 j) où elle se stabilise autour de 180 $\mu\text{mol.suc.réd./g MS/h}$ (Figure 10). L'activité xylanasiq (80 $\mu\text{mol.suc.réd./g MS/h}$) et cellulasiq (20 $\mu\text{mol.suc.réd./g MS/h}$) ne subissent pas de variations notables avec l'âge du lapin.

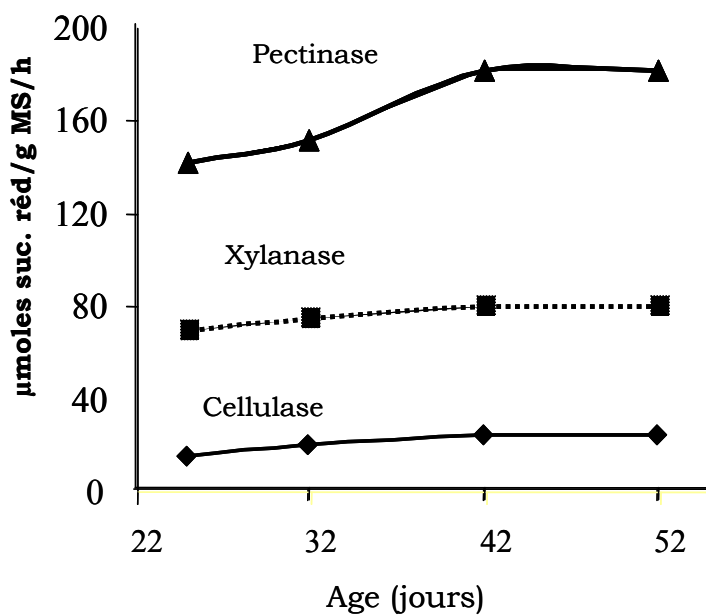


Figure 10: Activité enzymatique fibrolytique des bactéries du caecum (Gidenne *et al.*, 2000)

II.A.3. Caractérisation du biotope caecal

Le biotope caecal est caractérisé par la mesure de ses paramètres physiques (température, pH, matière sèche, viscosité, O₂, CO₂, etc.) et biochimiques (acides organiques, protéines, enzymes, etc.). Bien que de nombreuses études soient consacrées au milieu caecal, certains paramètres notamment la production de certains gaz (H₂, CO₂, CH₄) et le potentiel redox sont encore mal connus. L'ensemble des paramètres généralement étudiés varient en fonction de l'âge, du régime et de l'état sanitaire du lapin (Bennegadi *et al.*, 2003; Asmenskaite *et al.*, 2007; Castellini *et al.*, 2007). La mesure du potentiel redox (E_h) pourrait permettre d'estimer l'état d'anaérobiose du milieu, comme cela a été effectué chez le ruminant (Marden *et al.*, 2005; Marden, 2007). La mesure de l'E_h dans un milieu aqueux tel que le contenu ruminal ou

cæcal permet d'estimer la capacité de ce milieu à céder et à capter des électrons ou de l'hydrogène. Les couples redox généralement concernés sont d'une part les CO_2/CH_4 , $\text{SO}_4^{2-}/\text{SH}^-$ où dominent les bactéries méthanogènes, et d'autre part les S/SH^- , $\text{CO}_2/\text{CH}_3\text{COO}^-$ pour les bactéries acétogènes. Contrairement au rumen, il n'existe pas d'étude qui décrive le E_h dans le cæcum du lapin. La mise au point d'une méthode de mesure du E_h doit être faite de sorte à éviter la contamination du milieu de mesure par l'air atmosphérique (Nordstrom & Wilde, 1998), sous peine de modifications des caractéristiques physico-chimiques du biotope et d'erreurs de mesure du E_h .

Chez les lapins diarrhéiques, le contenu caecal devient plus liquide ce qui est l'expression d'une baisse de la matière sèche à 17 % environ. Une chute de la concentration des acides gras volatils et des proportions est aussi constatée dans les cas de diarrhée (de 40% pour le butyrate et de 10% pour l'acétate). Parallèlement, la concentration de l'azote ammoniacal, la proportion des AGV mineurs et le pH cæcal augmentent chez les malades comparativement aux lapins sains. Le pH augmente de 0,7 point. Le NH_3 est multiplié par 2 et par 7 pour les AGV mineurs. Le ratio propionate /butyrate est multiplié par 6 chez des lapins malades âgés de 36 à 65 jours (**Tableau 2**) (Bennegadi *et al.*, 2003).

Tableau 2: Comparaison des caractéristiques caecales entre lapins conventionnels sains et lapins diarrhéiques (Bennegadi, 2002)

	Etat sanitaire		Analyse statistique	
	Sains 42 à 70	Diarrhéiques [#] 36 à 65	CVr, % [†]	Probabilité
Age (jours)	42 à 70	36 à 65		
Nombre d'animaux	100	19		
Poids vif (PV), g	1864	1222	30,8	<0,001
<i>Caractéristiques caecales</i>				
Cæcum vide (CV), g	30,7	22,3	27,7	<0,001
CV /PV, %	1,67	1,90	17,9	<0,01
Contenu cæcal sec (CCs), g	25,3	19,4	34,0	0,012
Matière sèche (MS), %	23,3	16,6	11,3	<0,001
<i>Paramètres fermentaires</i>				
pH	6,00	6,71	7,5	<0,001
NH_3 , mmol /litre	11,3	27,0	38,7	<0,001
AGVt, mmol /litre	52,2	31,7	35,8	<0,001
Acétate, C ₂ , %	77,7	69,7	6,6	<0,001
Propionate, C ₃ , %	6,0	15,0	40,0	<0,001
Butyrate, C ₄ , %	15,5	9,8	31,7	<0,001
Ratio C ₃ /C ₄	0,37	1,87	81,8	<0,001
AGV mineurs, %	0,77	5,23	96,4	<0,001

: lapins en diarrhée aiguë ; † : Coefficient de variation résiduel

II.A.4. Techniques d'études de l'écosystème

La biocénose caecale ou ruminale est liée à 2 facteurs essentiels. Il y a les facteurs liés à l'animal (l'individu et l'âge) et les facteurs externes (aliment, médicament etc.). L'alimentation ou les médicaments constituent les facteurs externes les plus courants qui ont un effet direct sur l'écosystème digestif. Les espèces microbiennes constituant la biocénose de cet écosystème peuvent être regroupées selon leurs caractéristiques phénotypiques ou moléculaires (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). Le nombre d'espèces différentes selon ces critères de description constitue la *diversité spécifique*. Le thème diversité spécifique est en réalité l'association des notions de richesse et d'abondance. Les techniques de culture *in vitro* longtemps utilisées n'ont permis que la mise en évidence d'une partie de la biodiversité microbienne. Ces techniques sont toujours utilisées et restent fiables lorsqu'elles visent des espèces connues. Les nouvelles techniques moléculaires ont permis la découverte de nombreuses nouvelles espèces bactériennes. Elles sont souvent basées sur l'amplification et l'hybridation de l'ADN ribosomal 16S (ADNr 16S). L'ADNr 16S est un gène représenté chez toutes les espèces. Il ne subit pas de mutation majeure au cours de l'évolution. Les techniques les plus utilisées sont, l'hybridation, les empreintes génétiques et les inventaires moléculaires (**Tableau 3**).

Les techniques d'hybridation consistent à identifier et à dénombrer des espèces bactériennes en détectant dans un échantillon la présence de certaines séquences d'ADN. Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Dans ces conditions, on obtient d'autant plus de duplex hétérologues que les séquences d'ADN des micro-organismes étudiés sont proches. Dans les techniques classiques l'un des ADN est généralement marqué par un isotope radioactif ou par une enzyme afin de reconnaître la provenance de chaque brin d'ADN dans les hybrides. Les techniques plus modernes, comme celles faisant appel à la spectrophotométrie, ne nécessitent pas de marquage. Ces techniques permettent aussi de détecter et de quantifier les microorganismes connus ou des groupes de microorganismes dont les séquences d'ARN 16S figurent dans les banques de données. Elles utilisent de courtes séquences d'ADN (sondes) qui sont hybridées avec l'extrait d'ARN microbien de l'échantillon étudié.

Tableau 3: Principales techniques d'écologies moléculaires pour l'étude de l'écosystème microbien, avantages et inconvénients (Zoetendal *et al.*, 2004)

Méthodes	Applications et avantages	Limites
Culture	Idéal pour l'isolement des souches	Non représentatif ; lent et laborieux
Séquençage de l'ADNr 16S	Identification phylogénétique	Laborieux ; biais possibles dus à la PCR
DGGE/TGGE/TTGE	Suivi de la dynamique de communauté/populations ; analyse comparative rapide	Biais lié à la PCR ; semi-quantitatif ; l'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones
T-RFLP	Suivi de la dynamique de communauté/populations ; analyse comparative rapide ; méthode sensible	Biais lié à la PCR ; semi-quantitatif ; l'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones
SSCP	Suivi de la dynamique de communauté/populations ; analyse comparative rapide	Biais lié à la PCR ; semi-quantitatif ; l'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones
FISH	Détection ; dénombrement ; analyse comparative avec système automatisé	Nécessite d'avoir des informations liées aux séquences ciblées ; laborieux lorsqu'on se place au niveau de l'espèce
Hybridation en dot-blot	Détection ; estimation de l'abondance relative	Nécessite d'avoir des informations liées aux séquences ciblées ; laborieux lorsqu'on se place au niveau de l'espèce
PCR quantitative	Détection ; estimation de l'abondance relative	Laborieux
Puces à ADN (diversité)	Détection ; estimation de l'abondance relative	En cours de développement ; coût élevé
Profil de séquences non 16S-RNA	Suivi de la dynamique de communautés/populations ; analyse comparative rapide	L'identification nécessite des approches complémentaires basées sur l'ARNr 16S

Les techniques des empreintes génétiques et inventaires moléculaires ou de « fingerprint » permettent de réaliser un suivi des différentes populations microbiennes présentes dans un échantillon à l'aide de techniques s'appuyant sur la séparation séquence-spécifique de fragments d'ADN (DGGE, TGGE, SSCP, T-RFLP, etc.). Ces techniques sont utilisées pour le calcul des index de biodiversité ou de similarité de la population microbienne (Carabaño *et*

al., 2006). La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est basée sur la différence de migration entre les nucléotides (ADN 16S) en fonction de leur composition en nucléotides ou sur les propriétés de renaturation des différents brins d'ADN. La SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) est une technique où un gène d'intérêt (ADNr 16S) est amplifié par PCR puis dénaturé par chauffage à 94°C pour obtenir de l'ADN simple brin. Le produit est ensuite refroidi dans la glace pour éviter la réassociation des deux brins. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse non dénaturante contrairement à la DGGE. L'ensemble des bandes obtenues et détectées sous forme d'un profil de pics, indique la diversité de l'échantillon. L'aire sous chaque pic indique l'abondance relative de chaque microorganisme dans l'échantillon.

Ces différentes techniques d'étude du microbiote digestif présentent des avantages certains mais aussi des limites, résumés dans le **tableau 3-** (Zoetendal *et al.*, 2004). Toutes ces techniques moléculaires nécessitant une PCR préalable présentent un désavantage commun lié à la proportion de certains microorganismes dans l'échantillon. En effet, les microorganismes dont la proportion ne dépasserait pas les 0,1% ne seraient pas détectables par des techniques dépendantes de la PCR utilisant des amorces universelles (Muyzer *et al.*, 1993; Casamayor *et al.*, 2000).

La biocénose caecale du lapin sain est constituée en majorité de bactéries anaérobies strictes dont le genre *Bacteroides* est dominant (10^{10} à 10^{11} bactéries/g). On y trouve aussi un microbiote anaérobie facultatif minoritaire (1000 fois plus faible) tel que les *E. coli*, les streptocoques potentiellement pathogènes. Environ 80% de cette biocénose n'est pas cultivable à l'heure actuelle. Grâce aux techniques de biologie moléculaire, de nouveaux genres (*Archaea*) ont été déterminés récemment. Le biotope caecal a un taux de MS de 23%, de NH_3 de 11 mMol/l, d'AGV total de 50 mMol/l et un pH de 6 chez les lapins sains entre 40 et 70 jours d'âge. Par contre en cas de trouble digestif, la MS peut baisser d'un quart, les AGV totaux baissent de moitié, le NH_3 double et le pH tend vers 7.

CHAPITRE 2 : PROBIOTIQUES : CARACTERES GENERAUX ET IMPACT EN ALIMENTATION ANIMALE

I. DEFINITION

Les techniques d'élevage se sont rationalisées, dans le but de couvrir les besoins de plus en plus croissants de la population mondiale. En parallèle, l'utilisation de substances médicamenteuses dans l'alimentation des animaux a contribué à l'amélioration de l'état sanitaire et des performances zootechniques des animaux d'élevage (Russell & Strobel, 1989; Newbold & Wallace, 1988). Cependant, les crises alimentaires et sanitaires qui ont touché l'Europe récemment, les risques d'antibiorésistance et une opinion publique de plus en plus réticente face aux additifs ont contraint les autorités à la mise en place d'une réglementation (Corpet, 1999a). Ainsi on a assisté à une interdiction de certains antibiotiques facteurs de croissance ionophores (monensin, lasalocide) et non ionophores (avoparcine) en élevage en janvier 2006 au sein de l'U.E.

Pour faire face à ces interdictions, des solutions alternatives en accord avec la législation européenne sont recherchées. L'incorporation d'organismes vivants ou revivifiables dans les aliments est de plus en plus pratiquée par les spécialistes de l'agroalimentaire. Des effets bénéfiques sont mis en avant par ceux-ci notamment sur l'équilibre et le bon fonctionnement du microbiote digestif, la régulation du système immunitaire intestinal ou le renforcement de la barrière intestinale. Ces microorganismes constituent la « famille » **des probiotiques**. Les probiotiques ont été ainsi définis comme des préparations de micro-organismes vivants utilisées comme additif alimentaire, et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte par l'amélioration de la digestion et l'hygiène intestinale (Parvez *et al.*, 2006). Les microorganismes probiotiques utilisés sont généralement des bactéries (Trocino *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2007) et des levures (Onifade & Babatunde, 1996; Santos *et al.*, 2006; Marden, 2007). D'une façon générale, un additif alimentaire constitué de microorganismes vivants ou revivifiables est appelé « probiotique » lorsqu'il respecte les critères fondamentaux selon la loi européenne. Le premier critère est la qualité du produit qui correspond à une identification scientifique et un contrôle de la stabilité de celui-ci. Le second point est la preuve de l'efficacité du produit voire si possible connaître son mode d'action, ses effets zootechniques

et sanitaires, la dose minimale active ou son efficacité économique (Wolter, 1990). Et enfin s'assurer de l'innocuité pour le consommateur, l'animal, l'utilisateur et pour l'environnement de cet additif.

Les probiotiques peuvent être différenciés en fonction du génome, de la composition de la paroi cellulaire, de la capacité d'adhésion à la cellule épithéliale en culture ou à des mucus, et à la capacité de produire des substances antimicrobiennes. En dehors de ces caractéristiques, les propriétés technologiques et les conditions dans lesquelles les probiotiques sont ingérés peuvent constituer un critère de classification, car elles influencent souvent leur mode d'action dans le tube digestif.

Les microorganismes probiotiques sont habituellement présents dans l'écosystème digestif des animaux (bactéries en majorité). Toutefois les microorganismes tels que *Bacillus* (bactéries) ou *Saccharomyces* (levure) ne sont pas systématiquement rencontrés dans la biocénose digestive du lapin.

II. CARACTERES GENERAUX DES BACTERIES PROBIOTIQUES

Plusieurs « genres » bactériens sont utilisés comme probiotique. Les plus couramment rencontrés sont les *Lactobacillus* (*acidophilus* ou *bulgaricus*), *Streptococcus* (*latis* ou *faecium*), *Bacillus* (*subtilis* ou *cereus*). Ces souches sont spécifiques entre elles et entre espèces. Ainsi Marteau & Shanahan (2003) ont observé que la survie dans l'intestin des *Lactobacillus* est différente selon les espèces. D'autres souches de *Lactobacillus* diffèrent pour leur propriétés d'antagonisme vis-à-vis de la souche *Helicobacter pylori* (Wendakoon *et al.*, 1998). Au sein de la même espèce on constate des différences intrinsèques de propriété entre souches. De nombreux travaux ont rapporté des différences de propriétés antibactériennes ou d'adhésion à des cellules épithéliales et au mucus (Ouwehand *et al.*, 2001; Duc *et al.*, 2004; Gagnon *et al.*, 2004). Les effets d'une souche ne peuvent donc pas être extrapolés à une autre. De plus les espèces sur lesquelles sont utilisés ces probiotiques sont différentes ou simplement subissent des conditions d'élevage différentes. Il est donc conseillé de prendre avec beaucoup de réserves certains résultats comparant les effets des probiotiques car les souches souvent utilisées sont différentes bien qu'appartenant à la même espèce. Cependant de manière générale, des effets communs des probiotiques d'origine microbienne

ont été observés chez les monogastriques (Guerra *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Wenus *et al.*, 2008) ainsi que chez les ruminants (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006; Fleige *et al.*, 2007)

II.A. EFFET DES BACTERIES PROBIOTIQUES CHEZ LES MONOGASTRIQUES

Chez le porcelet, l'utilisation de probiotiques à base de bactéries lactiques notamment *Pediococcus acidilactici* NRRLB-5627, *Lactococcus lactis subsp. lactis* CECT 539, *Lactobacillus casei subsp. casei* CECT 4043 et *Enterococcus faecium* à des doses respectives de $2,6 \cdot 10^{10}$, $1,4 \cdot 10^{10}$, $1,3 \cdot 10^{10}$ et $1,110^{10}$ UFC/g permettait une amélioration significative du gain de poids de +1,6kg et de l'IC de -0,1 en moyenne entre 21 et 63 jours d'âge (Guerra *et al.*, 2007). Ces études ont aussi révélé chez les porcelets l'augmentation de la biomasse intestinale et la chute du nombre de coliformes. Pour Roselli *et al.*(2005) l'utilisation des probiotiques chez le porc a un effet positif sur la santé digestive de l'animal, se manifestant par une action préventive contre les troubles digestifs, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes et l'action immunomodulatrice. L'administration par voie orale de *Streptococcus faecium* ($7 \cdot 10^8$ - $3 \cdot 10^{10}$ UFC/g) provoque la régression des souches d'*E. coli* pathogènes introduites, suivie de l'arrêt de la diarrhée et d'une augmentation de la croissance chez des porcelets gnotobiotiques (Underdahl *et al.*, 1983; Ushe & Nagy, 1985). *Bifidobacterium lactis* ou *Bacillus toyoi* ou encore *Bacillus licheniformis* réduisent la sévérité des diarrhées par l'inhibition du développement et la réduction du nombre d'enterococci et des coliformes notamment des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) (Adami & Cavazzoni, 1999; Kyriakis *et al.*, 1999; Shu & Gill, 2001). Les probiotiques (exemple de *E. faecium*) inhibent l'adhésion à la muqueuse intestinale des pathogènes notamment celle de ETEC K88 grâce à leur action stérique (Devriese *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus par une équipe hongroise avec *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin R) (Andras *et al.*, 2008) et une équipe slovène avec *Enterococcus faecium* EK13 (Laukova *et al.*, 2006) chez le lapin. Du point de vue immunologique, les bactéries probiotiques participent au renforcement de l'immunité contre les affections intestinales (Erickson & Hubbard, 2000). Elles activent la production d'IgA et stimulent l'activité des macrophages ou des cellules NK (natural killer) (Perdigon *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 2000; Matsuzaki & Chin, 2000; Zanini *et al.*, 2007). Shu & Gill (2001) ont ainsi constaté que *B. lactis* à $3 \cdot 10^8$ UFC/g introduit pendant 7 jours dans l'alimentation des souris, leur permettait de résister à une infection de *E. coli* O157:H7. Le taux sanguin de phagocytes était significativement plus élevé chez les souris traitées. Ils ont aussi constaté que la charge bactérienne d'*E. coli* était 100 fois plus élevé chez le témoin.

Chez l'homme plusieurs actions ont à l'actif des bactéries probiotiques dont l'inhibition des processus diarrhéiques et l'amélioration clinique des patients atteints de VIH (Gournier-chateau *et al.*, 1994). Chez le lapin tout comme chez les autres monogastriques, les effets positifs sur la santé digestive peuvent s'accompagner d'une amélioration des performances zootechniques. La supplémentation de l'aliment du lapin par *Bacillus cereus* var. *toyoi* à un taux de 2.10^5 et 1.10^6 spores/g d'aliment, améliorerait le poids final des animaux de 100 g, le GMQ de 2 g/j et l'efficacité alimentaire de 0,1 point (Trocino *et al.*, 2005). Ce probiotique a permis une réduction de la morbidité de ces lapins de 9 %.

II.B. EFFET DES BACTERIES PROBIOTIQUES CHEZ LES RUMINANTS

Comme pour les monogastriques, le but principal de l'utilisation des bactéries probiotiques chez les ruminants est la recherche de microorganismes susceptibles d'améliorer la santé et la productivité des animaux.

L'addition de probiotiques dans l'alimentation des ruminants augmente la dégradabilité de la matière sèche (MS) et la fermentation ruminale. Des études *in vitro* effectuées à l'aide d'une culture probiotique (*Enterococcus faecium*) ont pu montrer une augmentation de la dégradabilité de la matière sèche et de la fermentation mesurée par le cumul de la production de gaz après 24 h d'incubation à 39°C. La production est d'environ 20 ml plus élevée lorsque l'incubation est faite avec le probiotique (71,7 ml) comparativement au témoin (50,9 ml) (Dutta & Kundu, 2005). Au-delà du volume de gaz produit, les travaux de ces auteurs ont montré que les proportions des différents acides gras volatils (AGV) sont influencées par les probiotiques. La concentration d'acétate est plus faible de -20 % lorsque la fermentation a lieu surtout en présence d'un apport combiné de levure *S. cerevisiae*-NCDC-45 (souche-522) et de bactérie *Lactobacillus plantarum*-NCDC-25 par rapport au témoin. Par contre, les concentrations de propionate et de butyrate sont plus élevées en présence de bactéries probiotiques (*E. faecium*). D'autres bactéries probiotiques (*Lactobacillus acidophilus*) sont utilisées pour stimuler la biocénose pendant la fermentation ruminale Dawson (1990) et Raeth-Knight *et al.*(2007). L'ingestion de bactéries probiotiques peut aussi provoquer des modifications structurales de la biocénose. Chez la chèvre, la supplémentation du régime en bactéries probiotiques augmente significativement la population de *Bacilli* dans le tube digestif (Kumagai *et al.*, 2004).

Les probiotiques sont aussi utilisés pour la prévention de zoonose notamment le « Shiga toxin-producing *E. coli* » vivant en commensalisme dans le tube digestif du ruminant, mais

responsable de troubles digestifs graves chez l'homme. L'utilisation d'un probiotique tel que *Lactobacillus acidophilus* réduirait de plus de 50% la souche d'*E. coli* O157 responsable de cette zoonose (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2006; Fairbrother & Nadeau, 2006). La souche utilisée par Fairbrother & Nadeau(2006) agirait par exclusion compétitive de « Shiga toxin-producing *E. coli* » pathogène.

Les probiotiques peuvent être dans certains cas inefficaces. En effet les études effectuées avec *E. faecium* sur le bouvillon ont montré que ce probiotique sans autre forme d'association ne présentait aucun effet sur les protéines de l'inflammation (Emmanuel *et al.*, 2007). De même un mélange de divers microorganismes probiotiques (*Lactobacilli*, *Bacilli*, *Streptococci*, *Saccharomycetaceae*, *Candidae*) n'a aucune d'influence sur les paramètres zootechniques (ingestion, digestibilité) et fermentaires (AGV, NH₃, pH) chez les chèvres (Kumagai *et al.*, 2004).

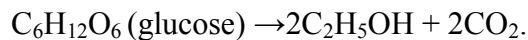
Les bactéries probiotiques représentent une approche nouvelle du contrôle du microbiote digestif chez les mammifères et les oiseaux d'élevage. Elles assureraient indirectement une protection de l'hôte contre les infections digestives, et contribueraient à la stabilité de l'écosystème digestif, d'où une amélioration des performances zootechniques. Les bactéries probiotiques peuvent ainsi constituer une alternative à l'utilisation préventive des antibiotiques.

Bien que les bactéries probiotiques soient fréquemment utilisées, un intérêt de plus en plus grandissant est porté aux levures probiotiques notamment *Saccharomyces cerevisiae* et *S. boulardii* en santé humaine, mais aussi en élevage des ruminants (vache laitière) et des monogastriques (lapin, porc, volaille, etc.). Cette partie bibliographique portera principalement sur l'utilisation de *S. cerevisiae* en élevage bovins lait et surtout en élevage cynicole.

III. ETUDE D'UNE LEVURE PROBIOTIQUE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* : GENERALITES

La levure *S. cerevisiae* est utilisée depuis longtemps dans la panification et la fabrication de boissons alcoolisées, et plus récemment pour la production de bioéthanol ou biocarburant. Mais elle est aussi utilisée comme régulateur de la biocénose intestinale chez l'homme et comme additif alimentaire pour l'amélioration des performances zootechniques des animaux

d'élevage. *S. cerevisiae* est une cellule eucaryote définie comme un champignon unicellulaire appartenant à la classe des ascomycètes. La levure se reproduit de manière asexuée par bourgeonnement. En conditions défavorables, elle forme des spores haploïdes qui peuvent fusionner pour donner des colonies de spores diploïdes. Elle se développe en milieu anaérobie et aérobie mais nécessite une source de carbone, d'azote, de vitamines et des sels minéraux. La croissance de *S. cerevisiae* se fait grâce à une réaction de fermentation en milieu anaérobie, et par la voie respiratoire en milieu aérobie. La respiration est plus efficace pour la production de l'énergie que la fermentation. Les produits de la fermentation sont l'éthanol et le dioxyde de carbone. L'équation de la réaction est la suivante :



La température optimale de croissance se situe entre 20 et 25 °C. Quant au pH optimum, divers intervalles de croissance optimale sont proposés. Rose (1987) repris par Marden (2007) donne un pH optimum compris entre 4,5 et 5. Pour Rampal (1996) le pH optimum de croissance des levures se situe entre 4,5 et 6,4. Cependant ces différences pourraient être dues à la différence entre les souches. Du point de vue chimique, une cellule de levure est composée d'environ 75 % d'eau et 25 % de MS et constitue un aliment presque complet (**Tableau 4**). Les colonies d'une levure *S. cerevisiae* (SC 47) (Biosaf®) en culture sur gélose sont en forme étoilée (**Figure 11**).

Tableau 4: Composition chimique d'une cellule de levure

Composition	Taux (%MS)
Eau	75
Matière sèche	25
Hydrate de Carbone	18-44
Lipides	4-7
Protéines	36-60
Acides nucléiques	4,8
Minéraux	6-10

Minéraux dont : 1-3% de phosphate, 1-3% de potassium et 0,4% de soufre

S. cerevisiae est utilisé en industrie comme additif pour l'alimentation animale sous diverses appellations. Pour le groupe Lesaffre Feed Additive (LFA) le nom commercial de la levure utilisée est BIOSAF® et a été déposé à la collection Nationale des Cultures de Levures, le 22/11/1973 à Norwich, en Angleterre où il existe déjà plus d'un millier de souches connues. La souche concernée est la NCYC Sc 47. C'est une souche pure (sans milieu de culture) de

levures vivantes ou revivifiables. Il en est de même pour la souche CNCM I-1077 commercialisée par la société Lallemand sous le nom LEVUCELL[®]. Les souches associées au milieu de culture contrairement aux souches pures sont cultivées et séchées avec leur milieu de croissance. L'une de ces souches utilisées en association avec le milieu de culture est commercialisée par Alltech sous le nom de YEA-SACC[®] (souche CBS 493.94).

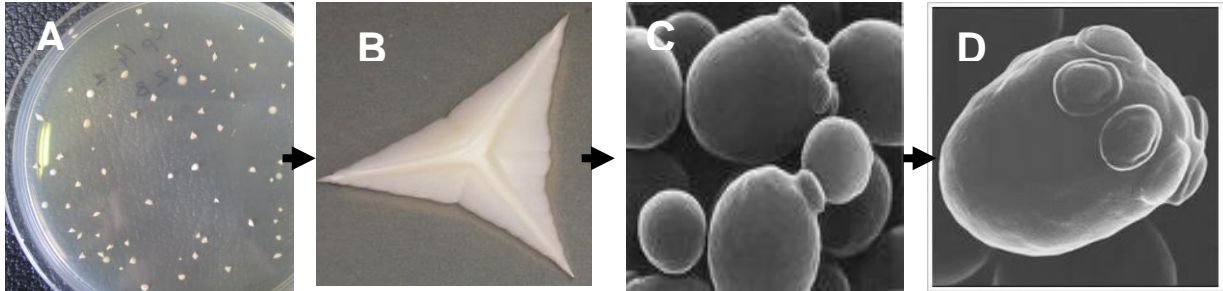


Photo 1: Photographies de *S. cerevisiae* : A et B vue à l'œil nu sur boîte de pétrie en milieu gélosé (B est une colonie) ; C et D vue au microscope électronique (D cellule isolée)

La levure probiotique (*S. cerevisiae*) disparaît « rapidement » du tube digestif soit par excrétion ou par digestion. Pour assurer donc la présence permanente de la levure dans le tube digestif, elle devra être administrée régulièrement et doit être résistante à la digestion.

IV. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CHEZ LES RUMINANTS

La levure a été introduite dans l'alimentation de la vache laitière depuis près d'un siècle. Les effets bénéfiques observés sur les fonctions digestives des vaches furent attribués à sa composition chimique (**Tableau 4**) (Carter & Phillips, 1944). Le succès plus récent des cultures de levure dans le domaine de la production animale a donné lieu à de nombreuses recherches. L'intérêt croissant des scientifiques à l'étude des levures se manifeste par le nombre important d'articles publiés chaque année (Jouany, 2000). Les résultats de ces recherches montrent que les levures ont des effets bénéfiques sur la digestion notamment la dégradation des fibres et sur la biocénose digestive. Elles influenceraient le métabolisme du lactate, le pH et E_n dans le rumen, la croissance des veaux et la production de lait des vaches. Cependant toutes les levures vivantes ne sont pas identiques et les effets positifs attendus ne sont pas souvent obtenus.

IV.A. IMPACT DE *S. CEREVISIAE* SUR L'UTILISATION DIGESTIVE DE LA RATION CHEZ LES BOVINS

La majorité des résultats de recherches s'accorde à dire qu'un apport continu de levure probiotique au bovin a des effets positifs sur la digestion ou la fermentation ruminale (Miller-Webster *et al.*, 2002). L'impact positif de la levure *S. cerevisiae* sur la digestion est mesurable sur la digestibilité de la MS, de la MO, des fibres (NDF, ADF) et des constituants azotés.

IV.A.1. Digestibilité des constituants non azotés

L'effet de la supplémentation de deux doses 0,5 et 1% de levures (*S. cerevisiae*) dans l'aliment (en MS) a été étudié par Saremi *et al.*(2004) sur des veaux de race Holstein ayant bénéficié du lait maternel jusqu'à 52 jours d'âge. Ces animaux ont été aussi alimentés de concentrés et de fourrage 7 jours après la naissance jusqu'à 90 jours. Les animaux dont le régime contenait de la levure avaient une meilleure digestibilité de la MO. Par contre aucun effet sur la digestibilité des fibres (NDF, ADF) et sur celle des protéines n'a été observé. Ces résultats comme nous le verrons dans plusieurs autres cas ne sont pas homogènes et varient d'une étude à une autre, même quand les animaux utilisés sont de la même espèce et du même âge. Cependant, d'autres travaux effectués sur des jeunes bovins Holstein de 2 à 6 mois d'âge, dont le régime est complétement de 20.10⁹ UFC de levure *S. cerevisiae*/g d'aliment, n'ont présenté aucun effet significatif des levures sur la digestibilité de la MO, des protéines et des fibres (Ramirez *et al.*, 2003).

Chez la vache laitière la levure probiotique améliorerait la digestibilité de la MS (Wiedmeier *et al.*, 1987; Dann *et al.*, 2000), de la MAT (Gomez-Alarcon *et al.*, 1990) et du NDF (Mir & Mir, 1994) ou de l'ADF (Doreau & Jouany, 1998). D'autres études plus récentes ont montré une amélioration de la digestibilité de la MO, du NDF et de l'ADF lorsque le régime de la vache en lactation est complétement avec la levure *S. cerevisiae* Biosaf[®] (Marden, 2007). Cette amélioration de la digestibilité n'est souvent pas très accentuée. Il peut souvent s'agir d'une tendance, comme dans le cas des travaux de Sobhani *et al.*(2006). Il est aussi fréquent qu'aucune modification notable de la digestibilité ne soit observée avec l'addition des probiotiques. Ainsi Cooke *et al.* (2007) n'ont constaté aucune amélioration de la digestibilité chez des vaches laitières dont le régime est complétement à hauteur de 2% de levure *S. cerevisiae*.

Les études *in vitro* confirment la variabilité des réponses relatives à l'utilisation des levures probiotiques chez les ruminants. Les résultats montrent que la levure probiotique améliore

nettement la vitesse de dégradation de certaines fractions (cellulose, NDF, ADF, MS, MO) (Wylegala *et al.*, 2005 ; Dolezal & Dolezal, 2007) et la dégradabilité globale (Ando *et al.*, 2004). Dolezal & Dolezal (2007) ont observé une amélioration de la digestibilité *in vitro* d'environ 4 et 3 % pour des doses respectives de 2,4 et 0,3 g de *S. cerevisiae* pour 2 litres de jus ruminal. Ando *et al.*(2004) ont ainsi montré que la dégradabilité des fibres suite à une addition de levures, mesurée 6, 12 et 24 h après incubation augmentait significativement. Ces résultats avaient auparavant été observés par Baljit *et al.*(2003) qui avaient eux aussi signifié une amélioration de la dégradabilité de la cellulose, de la MS et des fibres (NDF) particulièrement durant les premières heures de l'incubation. Par contre dans certains cas, aucune amélioration significative n'est observée (Doreau & Jouany, 1998). Ces variations de l'effet des probiotiques sur la digestibilité, bien qu'elles soient difficiles à expliquer, seraient en partie dues au mode d'alimentation (rationnement ou *ad libitum*), le régime de base et l'état physiologique de l'animal.

Chez les petits ruminants, l'effet des probiotiques est aussi variable que chez les bovins. Les mesures réalisées *in vitro* ont aussi montré une amélioration de la digestibilité de la MS et des fibres (NDF) chez le mouton lorsque le régime de celui-ci contient des levures *S. cerevisiae*. Ces résultats ont été confirmés par Biricik & Turkmen (2001). Ceux-ci ont montré qu'une alimentation à base de concentrés et de luzerne respectivement à 30 et 70 % ou respectivement 70 et 30 % à laquelle un apport de levure *S. cerevisiae* est effectué (4 g Yea Sacc1026® pour 100 g d'aliment), augmente la digestibilité de la MS, de la MO et du NDF. D'autres études plus récentes ont montré que l'incorporation dans la ration de 4 g de *S. cerevisiae* par jour et par animal (mouton) entraînait une amélioration de la digestibilité de la MO et du NDF respectivement de + 11,6, 7,4 et 7,1% par rapport au témoin (Paryad, 2009). El-Waziry *et al* (2007) ont aussi observé une amélioration de la digestibilité de la MO et NDF respectivement de +1,5 et 5,1% pour une très forte dose de *S. cerevisiae* dans l'aliment du mouton (22,5 g par animal par jour). Cependant Ding *et al.* (2008) ont seulement observé une amélioration de la digestibilité de l'hémicellulose de +6 %, alors que celle de la MO, NDF et ADF est inchangée chez l'agneau.

IV.A.2. Digestibilité de la matière azotée (MAT)

La production d'ammoniac (NH₃) dans le rumen est due à la dégradation des protéines alimentaire et au recyclage de l'urée salivaire. La concentration en NH₃ dans le liquide ruminal est régulée par son absorption à travers la paroi du rumen, son utilisation pour la

synthèse bactérienne et son transit intestinal. Un apport excessif d'azote entraîne une perte de NH_3 car la quantité captée pour la synthèse microbienne est inférieure à la production. L'apport de levure probiotique dans la ration permet de corriger la concentration ruminale d' NH_3 (Kamalamma *et al.*, 1996; Arcos-Garcma *et al.*, 2000). Baljit *et al.* (2003) ont constaté une baisse de plus de 7,5 % de la concentration en NH_3 chez les veaux pour une complémentation de 10 g de levure *S. cerevisiae* (YEA-SACC228®) par animal par jour. Chez l'agneau, un apport de $20 \cdot 10^9$ UFC/g de levure n'a pas d'effet sur la concentration de NH_3 ruminal, mais par contre elle entraîne une baisse de la concentration de l'azote sous forme d'urée dans le sang de 20% (Ding *et al.*, 2008). La réduction de la concentration en NH_3 se produit lorsque la ration dont bénéficie le ruminant est riche en glucides rapidement fermentescibles et non lorsque celui-ci est riche en fibres (Carro *et al.*, 1992; Moloney & Drennan, 1994). Cette baisse de la concentration en NH_3 (20 à 34 %) avec l'addition de la levure pourrait être liée à l'utilisation plus importante du NH_3 pour la synthèse des protéines microbiennes. Ce qui serait à l'origine de l'augmentation de la biomasse microbienne. Cette chute de la concentration n'est donc pas le fait d'une baisse de l'activité protéolytique microbienne (Harrison *et al.*, 1988; Williams & Newbold, 1990).

L'apport de levure dans la plupart des cas améliore la digestibilité ruminale, avec néanmoins de nombreuses variations (niveau d'ingestion, état physiologique et sanitaire, composition de l'aliment). Cette amélioration de la digestibilité en présence de levure serait surtout liée aux bactéries fibrolytiques.

IV.B. IMPACT DE *S. CEREVISIAE* SUR LE PROFIL DE LA BIOCENOSE RUMINALE

Les effets positifs de *S. cerevisiae* observés sur les performances des ruminants, notamment sur la digestion, laissent croire que cette levure probiotique modifierait positivement la biocénose ruminale. Lorsque la ration contient une forte concentration de glucides rapidement fermentescibles (faible teneur en fibres), il y a une baisse de l'activité cellulolytique ce qui correspondrait à un déséquilibre au niveau de l'écosystème ruminal. L'addition de levure probiotique contribuerait à la restauration de l'équilibre de la biocénose et au développement de bactéries spécifiques notamment des bactéries cellulolytiques ainsi que celles utilisatrices de lactate.

IV.B.1. Effet des levures sur le nombre total de bactéries dans le rumen

Les effets bénéfiques des levures peuvent être attribués aux modifications qui s'opèrent au niveau de la fermentation et au niveau de la population microbienne dans le rumen.

La grande majorité des travaux s'accordent à dire que les levures augmenteraient la concentration de bactéries totales anaérobies dans le rumen (Wiedmeier *et al.*, 1987; Newbold & Wallace, 1992). L'effet des levures est surtout marqué chez la vache laitière lorsque la ration de celle-ci est pauvre en fibres (ration acidogène). L'effet de la levure probiotique sur la population bactérienne est donc dépendant du régime tout comme dans le cas de la digestion. L'effet est plus marqué sur les bactéries anaérobies strictes (bactéries fibrolytiques et cellulolytiques) que sur les bactéries anaérobies facultatives telles que les bactéries amylolytiques (Chaucheyras *et al.*, 1997; Baljit *et al.*, 2003). L'action des levures probiotiques sur la population microbienne est aussi dépendante de la souche. Chez *S. cerevisiae*, les souches utilisées en brasserie ont une meilleure capacité à stimuler la croissance de la biocénose ruminale que celles utilisées en boulangerie (Figure 11) (Newbold & Wallace, 1992).

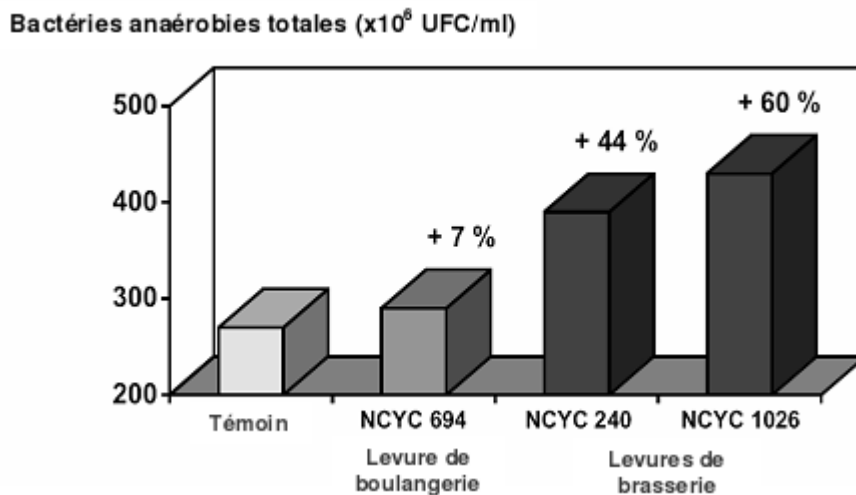


Figure 11: Effets des différentes souches de *S. cerevisiae* sur la population bactérienne ruminale en culture mixte (adapté de (Newbold & Wallace, 1992))

◦ Effets des levures sur les bactéries cellulolytiques du rumen

La concentration de bactéries cellulolytiques dans l'écosystème ruminal augmente lorsque la ration des bovins est supplémentée en levure. Marrero *et al* (2006) ont confirmé cet accroissement par des tests *in vitro*: les principales bactéries cellulolytiques dont la croissance est stimulée sont les genres *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (Girard & Dawson, 1994). Cette augmentation de la population de bactéries

cellulolytiques dans la biocénose ruminale n'améliore pas nécessairement la quantité de cellulose dégradée par *Fibrobacter succinogenes* S85 et *R. flavefasciens* (Callaway & Martin, 1997). La levure probiotique (*S. cerevisiae*) ne fournirait donc que les facteurs de croissance (vitamine, acides organiques et les acides aminés) pour la multiplication bactérienne. L'amélioration de la dégradabilité évoquée précédemment s'expliquerait par une activité accrue des enzymes telles que la carboxyméthylcellulase (CMCase) et la xylanase dans le rumen (Michalet-Doreau *et al.*, 1997). La levure créerait les conditions favorables aux activités métaboliques des bactéries cellulolytiques, en augmentant le niveau d'anaérobiose ruminal (Wallace & Newbold, 1993).

° Effet des levures sur les bactéries utilisatrices de lactate du rumen

Les levures jouent un rôle important dans la stabilité du processus de fermentation ruminal et la diminution des troubles métaboliques. Les effets bénéfiques d'une culture de levure probiotique *S. cerevisiae* vivante (5.10^9 UFC/g) sur les concentrations ruminales de lactate pour des rations très concentrées en énergie (ou acidogènes) ont été montrés par (Williams *et al.*, 1991) (**Figure 12**). La chute de la concentration en acide lactique serait due à une croissance importante et à une plus forte activité des bactéries utilisatrices de lactate, et non d'une inhibition directe des bactéries qui produisent le lactate en dégradant l'amidon. Les bactéries lactiques responsables de la baisse de l'acide lactique dans le milieu ruminal sont *Selenomonas ruminantium* et *Megasphaera elsdenii* (Chaucheyras *et al.*, 1996). Certaines études ont lié l'augmentation de l'activité de ces bactéries à la disponibilité de facteurs de croissance apportés par le milieu de culture de la levure. L'utilisation de souches pures permet de s'affranchir de cette hypothèse. La baisse de la concentration de lactate est associée à la hausse du pH dans le rumen, caractéristique d'une fermentation plus stable. Ces modifications de la fermentation ruminale améliorent la digestion, ce qui engendre l'augmentation de la consommation alimentaire.

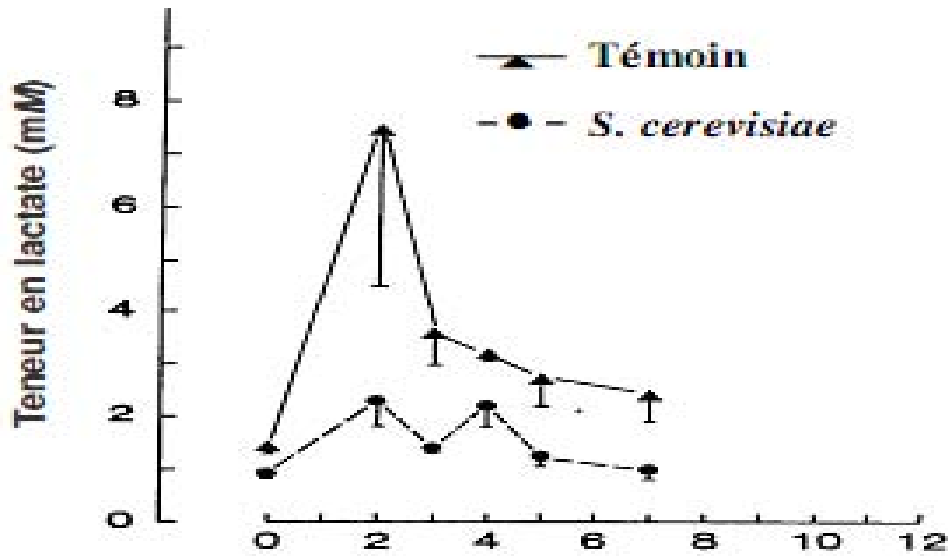


Figure 12: Effet de la levure probiotique sur la teneur de lactate dans le rumen après le repas (Williams *et al.*, 1991)

IV.B.2. Impact de *S. cerevisiae* sur le pH ruminal

La capacité des levures à améliorer la digestion et à stimuler la croissance d'une population microbienne spécifique bénéfique à l'hôte, et leur capacité à empêcher l'accumulation de lactate dans le rumen, suggère que les levures probiotiques peuvent jouer un grand rôle dans la prévention des dysfonctionnements du rumen, associés à l'utilisation d'aliment très énergétique en élevage. Ces dysfonctionnements concernent le biotope ruminal principalement la teneur en acide lactique et le pH. Lorsque la ration est pauvre en fibres (riche en amidon, substances peptidiques), il y a une augmentation de la vitesse et de la quantité d'AGV produits sous l'action des bactéries (*Streptococcus bovis*). Cette augmentation de la quantité ruminale d'AGV entraîne un début d'acidification modifiant du coup l'activité fermentaire de *S. bovis*. Le biotope déjà acidifié le sera encore plus avec la hausse de la production d'acide lactique à l'origine de la chute du pH (Cotta, 1992). L'acide lactique s'accumule dans le rumen car il n'est pas régulé par les bactéries utilisatrices d'acide lactique (*S. ruminantium* et *M. elsdenii*). Des études ont montré que l'addition de *S. cerevisiae* (1,32 g de levure/litre de contenu ruminal) conduisait à la réduction de la production de lactate par *S. bovis* de 32% environ (Lila *et al.*, 2004). Pour Chaucheyras *et al.*, (1996), les cellules de levure entrent en compétition avec *S. bovis* pour l'utilisation du glucose dans les conditions anaérobies strictes laissant moins de glucose disponible pour la bactérie. *S. cerevisiae* stimule également l'utilisation du lactate par les bactéries *S. ruminantium* et *M. elsdenii*, ce qui relève le pH. Pour une dose de $20 \cdot 10^9$ UFC/g de levure dans la ration, Ding et

al., (2008) a observé une hausse du pH ruminal de +0,4 unité de pH. Cette hausse du pH ruminal sous l'action de la levure probiotique (*S. cerevisiae*) a été également observée par plusieurs travaux antérieurs (Sobhani *et al.*, 2006; Laszlo *et al.*, 2007; Marden, 2007). Les levures ont pour effet de stabiliser le pH ruminal et permettent aux bactéries cellulolytiques de retrouver leur activité normale. 4 g de levure *S. cerevisiae* (Biosaf[®]) (10^{10} UFC/g) dans un régime acidogène permet la stabilisation du pH 4 h après l'ingestion de la ration puis la remontée de celui-ci pour atteindre sa valeur initiale contrairement au témoin sans levure (**Figure 13**) (Marden, 2007). Cependant lorsque le régime est riche en fibres, la levure semble n'avoir aucun effet sur le pH (Carro *et al.*, 1992; Plata *et al.*, 1994).

S. cerevisiae permet la baisse de la concentration en acide lactique et la stabilisation du pH ruminal lorsque la ration de l'animal est pauvre en fibres. La levure permet donc aux bactéries cellulolytiques de retrouver leur activité fermentaire dans les conditions d'une alimentation acidogène.

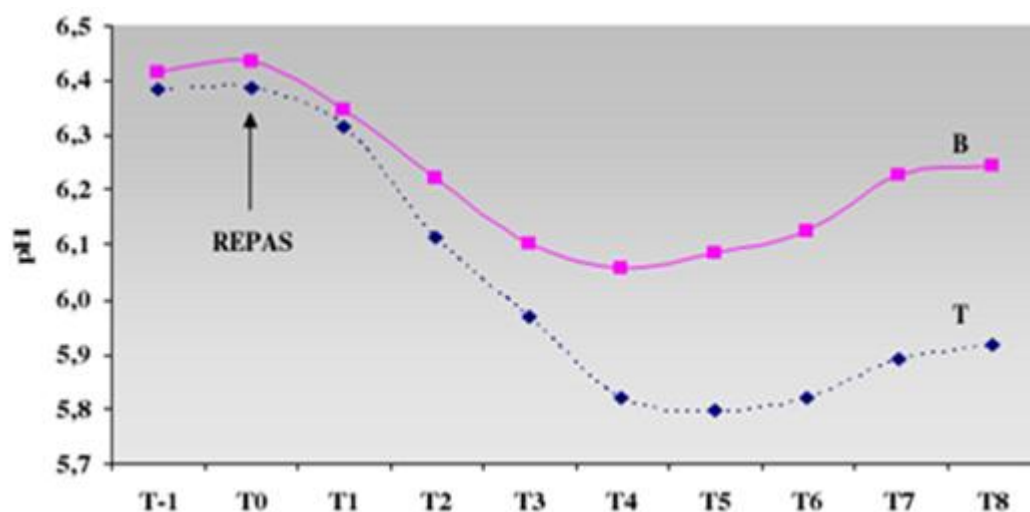


Figure 13: Evolution du pH ruminal chez la vache après un repas complétement ou non de 4 g de levure *S. cerevisiae* (Marden, 2007)

IV.B.3. Impact de *S. cerevisiae* sur le profil fermentaire

Les levures probiotiques ont un effet significatif sur le profil fermentaire ruminal (**Figure 14**). Les réponses sont variables et dépendent de divers facteurs tels que la teneur en fibres de la ration, la dose de levure, la souche de levure etc. L'incorporation de levure *S. cerevisiae* (10 g/j/vau) dans une ration riche en concentrés entraîne une hausse de la concentration en AGV totaux de plus 6 % (Baljit *et al.*, 2003). Dolezal & Dolezal (2005) ont aussi observé une hausse de la production d'AGV total de plus 1,3 g/100ml pour un apport quotidien de 6 g de

levure *S. cerevisiae* par vache. Khadem *et al.* (2007) estiment à 103 mmol/l la production totale d'AGV après 3 h chez des moutons ingérant 2,5 g de levure (*S. cerevisiae*) par jour contre 91 pour le témoin. Erasmus *et al.* (2005) ont constaté une hausse de 18,6% de propionate chez la vache laitière. Marden (2007) estime à +12 mmol/l l'augmentation de la production totale d'AGV ainsi qu'une hausse des proportions de C₂ (+ 12%) et de C₃ (+ 24%). Par contre, Laszlo *et al.* (2007) constatent certes une augmentation des AGV totaux, mais avec hausse des ratios C₂/C₃ et C₄/C₃.

Certains auteurs ne constatent aucun effet significatif de *S. cerevisiae* sur la production d'AGV (Plata *et al.*, 1994; Miranda *et al.*, 1996). La raison principale de cette absence d'effet serait due à la forte teneur en fibres des régimes utilisés. L'effet des levures serait donc plus important sur la production d'AGV si le régime utilisé est pauvre en fibres tout comme sur la stabilité du pH et la production de lactate.

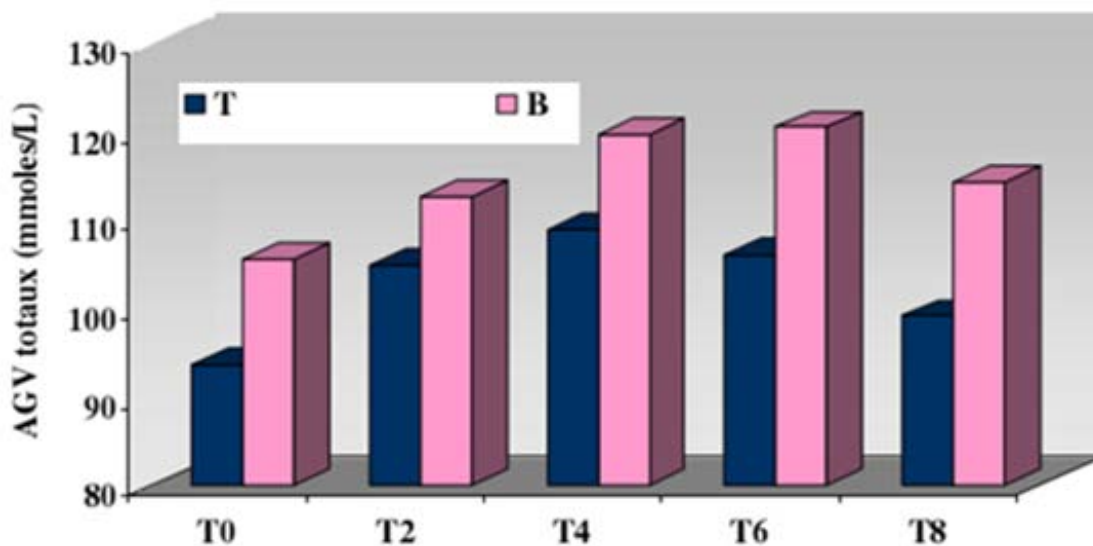


Figure 14: Effet d'un apport de 4 g de levure *S. cerevisiae* sur la concentration en AGV totaux (Marden, 2007)

T : régime témoin sans levure ; B régime contenant la levure Biosaf®

IV.B.4. Impact de *S. cerevisiae* sur la croissance et la production laitière

L'augmentation de la digestion et la stabilisation des paramètres microbiologiques, physiques et chimiques de l'écosystème ruminal, montrent que la levure probiotique pourrait améliorer les performances zootechniques. Elle aurait une action bénéfique sur la croissance des veaux et sur la production laitière. L'effet sur la croissance et sur la production laitière serait dû principalement à l'augmentation de la vitesse d'ingestion, elle-même liée à la biocénose et

aux paramètres chimiques du biotope ruminal. L'effet de la levure sur les performances des animaux est variable. Certaines études ne montrent aucune amélioration, tandis que d'autres signalent des améliorations pouvant atteindre 20% de production de lait (Denev *et al.*, 2007). L'augmentation de la vitesse de dégradation de la MS entraînerait une augmentation du niveau d'ingestion (Denev *et al.*, 2007). Les études de l'impact de levure sur la croissance montrent généralement une amélioration du GMQ et de l'indice de consommation chez les ruminants (Saha *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006). L'incorporation de 2 g de levure *S. cerevisiae* pour 100 g de MS dans une ration de veaux, augmenterait de 15,6 % le GMQ selon Lesmeister *et al.*(2004). Une étude effectuée sur 180 taurillons de race Blonde Aquitaine dont l'aliment de base est du maïs humide inerte complétementé avec une levure *S. cerevisiae* (Biosaf[®]) confirme cette augmentation du GMQ et de l'indice de consommation IC (**Figure 15**). Une autre étude effectuée en Iran avec la même levure probiotique (Biosaf[®]) a montré qu'elle augmente le pH et la population microbienne anaérobie stricte de l'écosystème ruminal. Elle augmenterait par ailleurs le gain de poids et améliorerait l'efficacité alimentaire (Rezaee *et al.*, 2006).

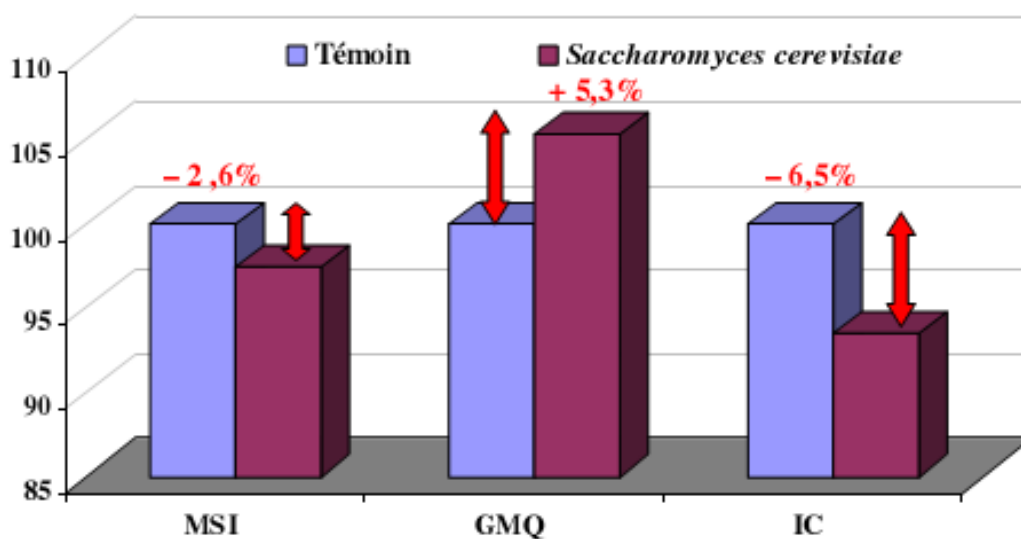


Figure 15: Effet de la levure *S. cerevisiae* sur matière sèche ingérée (MSI), le GMQ et l'IC chez les bovins viande (Moncoulon & Auclair, 2001)

L'utilisation de la levure en alimentation animale ne donne pas toujours de résultats favorables dans certaines études. Adams *et al.* (1981) n'ont pas obtenu d'amélioration du GMQ ni de l'IC chez des bovins de boucherie lorsqu'ils sont alimentés avec une ration supplémentée en levure composée à part égale de fourrage et de concentré. L'absence d'effet de la levure sur la croissance a été aussi constaté par d'autres auteurs (Ramirez *et al.*, 2003).

Elle est dans la plupart des cas, accompagnée d'une digestibilité et d'une ingestion faibles. Cela se justifierait par le taux de fibres très important contenu dans la ration de base utilisée par ces auteurs. La levure *S. cerevisiae* améliore aussi la santé des animaux (Saha *et al.*, 1999). Ces auteurs ont obtenu une réduction de la diarrhée lorsque les veaux ingèrent environ 2.10^9 CFU/jour/veau.

La plupart des études mesurant l'impact des levures sur les performances des ruminants ont porté sur la production laitière. Les résultats obtenus bien que variables montrent une augmentation significative de la production laitière ou une amélioration de sa composition. Selon des données bibliographiques résumées par Marden (2007), la levure probiotique serait responsable d'une augmentation significative la production laitière de + 0,7 à 2,4 kg par jour. Le regroupement des données de plusieurs essais comparant la production laitière de 1073 vaches témoins et 1179 autres ayant reçu une alimentation supplémentée de 10 g/j de levure probiotique, montre que celle-ci permet une amélioration de 2,2 litres de lait en moyenne par vache (Wallace & Newbold, 1993). D'autres études du même type sur 245 vaches montrent une augmentation moyenne de 2% chez les primipares et 2,7 chez les multipares par rapport aux témoins (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997). Les résultats de 22 publications portant sur plus de 9000 vaches donnent une amélioration de la production laitière variant entre 2 et 30%, et une moyenne de 7,3% (Dawson, 2000).

L'utilisation d'un régime pauvre en fibres entraîne une acidose ruminale. L'apport de levure permettrait de stabiliser le pH au dessus de 6 malgré une production élevée d'AGV. La levure interviendrait sur le pH par le renforcement du pouvoir réducteur qui serait à l'origine de la diminution de la teneur en lactate et de l'augmentation de la teneur en AGV du contenu ruminal. Elle favoriserait aussi l'activité des bactéries anaérobies strictes, notamment celles responsables de la production d'AGV et celles qui transforment le lactate en propionate. Elle améliorerait les performances de croissance des veaux et la production laitière des vaches.

V. SACCHAROMYCES CEREVISIAE CHEZ LE LAPIN

Contrairement aux ruminants et aux autres monogastriques (homme, cheval, porc, volaille), l'utilisation des probiotiques dans l'alimentation du lapin est récente. Il existe ainsi très peu d'études consacrées aux effets de la levure probiotique *S. cerevisiae* chez le lapin. Les

recherches ont porté sur la santé des animaux, la digestibilité, sur les performances de croissance, d'ingestion, d'efficacité alimentaire et sur certains paramètres sanguins. Le **Tableau 5** résume quelques travaux de recherche sur l'impact de la levure « pure » ou associée à des bactéries (lactobacille) chez le lapin (Falcao-e-Cunha *et al.*, 2007).

Tableau 5: Synthèse de travaux de recherche sur l'action des levures probiotiques chez le lapin

Références	Age (jour)	Type de levure	Dose de levure dans la ration	Nombre de lapin	Teneur en fibres	Condition expérimentale
Maertens & De Groote, 1992	28-70	Biosaf Sc	0,15% vs 1%	60	15,5% CB	CSO
Maertens & De Groote, 1992	28-70	Biosaf Sc	0,15% vs 1%	93/96	15,5% CB	CSD
Onifade <i>et al.</i> , 1999	35-56	YeaSacc	0,15% vs 0,3%			Normale
Jerome <i>et al.</i> , 1996	30-79	S. cerevisiae	10 ⁶ spore/g	108	16,5% CB	Normale
Luick <i>et al.</i> , 1992	36	Lacto-sacc	0,2%	15	23,1% ADF	Normale
Luick <i>et al.</i> , 1992	36	Lacto-sacc	0,2%	14	9,9% ADF	Normale + DF
Gippert <i>et al.</i> , 1992	28-84	Lacto-sacc	0,1%	172	10,6 CB	Commerciale
Gippert <i>et al.</i> , 1992	42-77	Lacto-sacc	0,1%	100	10,6 CB	Normale
Kamra <i>et al.</i> , 1996	42-126	Lacto-sacc		33	11,2% ADF	Normale

CSO : conditions sanitaires optimales ; CSD : conditions sanitaires défavorables ; DF : déficient en fibres ; Normale : absence de stress alimentaire et environnementale

V.A. IMPACT DE *S. CEREVISIAE* SUR L'UTILISATION DIGESTIVE DE LA RATION CHEZ LE LAPIN

Les fibres constituent une fraction très importante de la ration du lapin. Une ration très concentrée ou pauvre en fibres est susceptible de créer des entérites. La digestion des fibres pourrait être améliorée par l'incorporation de levures *S. cerevisiae* dans le régime du lapin. L'efficacité alimentaire est améliorée en présence de levure dans l'aliment selon Karmara et

al. (1996). L'effet de la levure probiotique *S. cerevisiae* (Yea-Sacc®) à la dose de 200 ppm sur la digestibilité a été évalué par Shanmuganathan *et al.* (2004) pendant 10 semaines sur des lapins âgés de 56 jours dont le régime est composé de 43 % de son de riz (13 % de fibres brutes). Les résultats ont montré que la digestibilité des nutriments est plus élevée lorsque les lapins bénéficient de la ration contenant 200 ppm de levure probiotique (**Figure 16**). La digestibilité de la MS, de la matière azotée totale, de la cellulose brute et de l'énergie était significativement plus élevée avec la levure que chez le témoin respectivement de : +3,7%, 6,4%, 1,4%, et 3,2% (P<0,05).

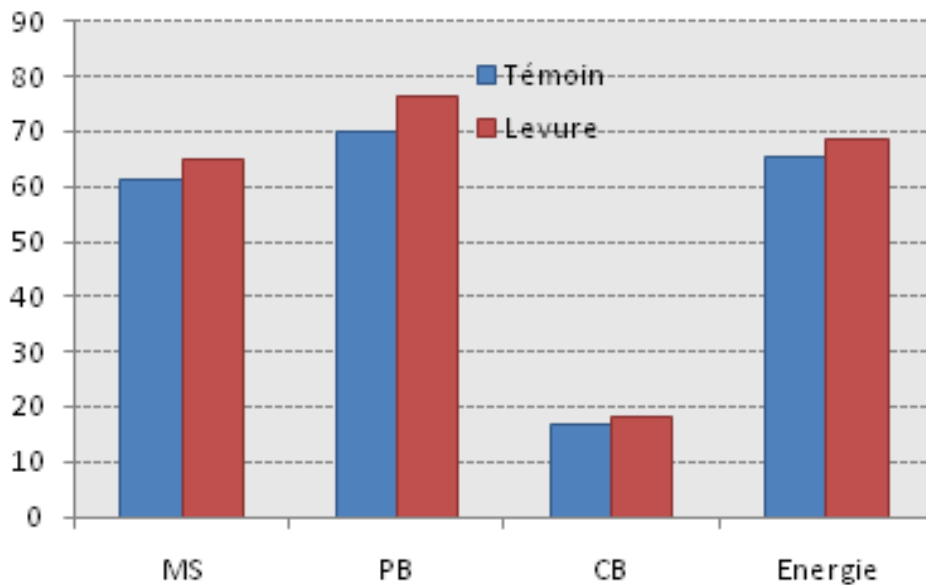


Figure 16: Digestibilité des nutriments (MS, PB, CB) et de l'énergie chez le lapin complétement ou non de 200 ppm de levure *S. cerevisiae* (P<0,05) (Shanmuganathan *et al.*, 2004)
 MS : matière sèche, PB : Protéine brute, CB : cellulose brute

L'effet de *S. cerevisiae* est plus important selon certains auteurs lorsqu'elle est utilisée en association avec d'autres prébiotiques (El-Gaafary *et al.*, 1992; El-Hindawy *et al.*, 1993; Emmanuel *et al.*, 2007), avec un impact positif sur la digestibilité. Kamra *et al.* (1996) au cours d'un essai de plus de 10 semaines (80 jours) sur des Néo-Zélandais Blancs âgés de 42 jours en moyenne, ont observé que la digestibilité de la MAT était améliorée de 3,8% lorsque la ration des animaux était complétement d'un mélange à 5.10^8 UFC/animal/jour de bactéries lactiques et de *S. cerevisiae* (Lacto-Sacc). Par contre, aucune amélioration significative de la digestibilité n'a été enregistrée que ce soit pour la MS ou pour les fibres (ADF, cellulose, hémicellulose). Il est à préciser tout de même que la ration des lapins dans ce travail contenait 33,7 % de NDF et 8,9 % de cellulose brute. El-Gaafary *et al.*, (1992) ont aussi observé une variation de l'effet de la levure sur la digestibilité selon l'âge. Ces auteurs ont aussi montré une amélioration de la digestibilité des protéines et des fibres lorsque la ration du lapin est

complémentée en Lacto-Sacc, mais seulement à la 12^{ème} semaine d'âge. Puis, l'effet du probiotique devient nul à 24 semaines d'âge. Ils n'ont pas non plus observé d'amélioration de la digestibilité de la MS et de la MO sur toute la période d'élevage. De même, Chaudhary et al. (1995) n'ont observé aucune amélioration de la digestibilité lorsque la ration du lapin à 6 semaines est complémentée avec une dose de 5.10^8 UFC/g de *S. cerevisiae*.

V.B. IMPACT DE *S. CEREVISIAE* SUR LE PROFIL MICROBIEN DU CONTENU CAECAL

Les travaux chez les ruminants montrent que la levure favoriserait l'implantation et l'activité des bactéries anaérobies strictes dans le rumen (Chaucheyras-Durand & Fonty, 2001). Chez le lapin très peu d'études à notre connaissance ont été effectuées sur l'effet de la levure et l'écosystème digestif. Toutefois selon les travaux de Bennegadi (2002), chez le lapin sain, seul *R. albus* (bactérie cellulolytique) semble être favorisé par l'utilisation de *S. cerevisiae* en alimentation. En effet, l'apport de cette levure (10^6 UFC/g) dans la ration du lapin tend à doubler le nombre de cette bactérie dans le caecum ($P=0,07$). Mais excepté *R. albus*, l'apport de cette levure n'aurait pas d'effet majeur sur l'écosystème caecal, ni sur la mise en place de la biocénose, ni sur la stimulation des activités fermentaires à l'exception d'une légère amélioration de la production d'acétate (+12,1 mmol/l). Ces résultats pourraient être attribués selon cet auteur à la faible dose d'incorporation de la levure (10^6 UFC/g), et/ou au faible temps de transit (4-6h dans le caecum), qui seraient insuffisants pour entraîner des effets sur l'écosystème digestif.

V.C. IMPACT DE *S. CEREVISIAE* SUR LA CROISSANCE

L'utilisation de levure probiotique (*S. cerevisiae*) en alimentation cunicole est ancienne, et des effets positifs sur la croissance sont obtenus dans certains cas, en fonction des conditions expérimentales. Ainsi, Maertens & De Groote (1992) ont relevé une influence positive de la levure Biosaf[®] sur le gain de poids. Ces auteurs ont constaté sur un échantillon de 90 lapins par traitement, que des doses de 0,15% (8.10^6 UFC/g) et 1% ($6,2.10^7$ UFC/g) de Biosaf[®] dans l'aliment du lapin entre le sevrage (28 j) et l'euthanasie à 70 jours, amélioreraient respectivement le GMQ de 0,4 g/j et 1,7 g/j. L'impact de la levure ne varie pas dans cette étude en fonction de la concentration de levure dans l'aliment. La dose de 0,15% donne des résultats de croissance et de mortalité plus prononcés que la dose plus élevée de 1% (43,4g/j de GMQ et 4% de mortalité contre 42,1g/j GMQ et 11% de mortalité). Cette étude a d'ailleurs

révélé que l'efficacité de la levure probiotique est dépendante des conditions d'élevage. En effet, lorsque les conditions d'élevage sont optimales c'est-à-dire une alimentation équilibrée, un nettoyage et une désinfection régulière du local d'élevage et une densité de 3 lapins/m² au maximum, les performances du lot témoin ne diffèrent pas de celles d'animaux dont la ration contient de la levure Biosaf[®]. Fuller (1999) a fait aussi la même remarque sur la santé et a conclu que l'effet bénéfique des probiotiques est prononcé lorsque les animaux sont élevés en conditions sanitaires sous-optimales. Les travaux d'Onifade et *al.* (1999) ont par contre montré une augmentation presque linéaire des performances de croissance avec la concentration de la levure *S. cerevisiae* (YeaSacc^{1026®} contenant une concentration de 10⁸UFC/g) dans la ration. Ceux-ci ont observé une hausse de gain de poids total de +50 g et +150 g pour des doses d'incorporation respectives de 1,5 et 3 g/kg de levure.

D'autres études portant sur la levure *S. cerevisiae* ont confirmé les effets bénéfiques de celle-ci sur les performances des monogastriques tels que le porc et le cheval ou même chez les oiseaux. La levure Biosaf[®] a permis l'amélioration de la digestibilité et de l'ingestion chez le cheval (Medina *et al.*, 2002; Jouany *et al.*, 2008). Même si les données sur la croissance n'ont pas été présentées par ces auteurs, l'amélioration de l'efficacité alimentaire pourrait conduire à une amélioration de la croissance. Des travaux ont aussi prouvé une amélioration de la santé et une stimulation de la croissance du porc par la levure (Kogan & Kocher, 2007). Au vu de la sensibilité des porcelets ou des lapereaux à la contamination par les pathogènes, la préservation de la santé par la levure probiotique conduirait à l'augmentation des performances de croissance et à la réduction des coûts vétérinaires.

Des travaux montrant le rôle positif des levures sur la croissance du lapin ont été pour la plupart effectués, en associant *S. cerevisiae* à d'autres microorganismes notamment les bactéries (Hollister *et al.*, 1990; Shanmuganathan *et al.*, 2004). Ces études ont aussi mis en évidence une amélioration de la vitesse de croissance et de l'efficacité alimentaire (Ayyat *et al.*, 1996; El-Hindawy *et al.*, 1993; Gippert *et al.*, 1996). L'association la plus courante est celle qui se fait entre la bactérie, notamment Lactobacille, et la levure *S. cerevisiae*. L'amélioration des paramètres de croissance généralement constatée est fonction de la dose et de l'âge des lapins utilisés (**Tableau 6**). A titre d'exemple, Gippert *et al.* (1996) ont, à l'aide d'une concentration de 0,8 g et de 0,3 g de levure+lactobacille/kg d'aliment, obtenu un gain de poids supérieur de plus 6 g/j pour la concentration la plus élevée de probiotique chez des animaux entre 6 et 12 semaines d'âge. Il en est de même pour l'indice de consommation qui

est amélioré de 0,26 point. El-Hindawy et al (1993) avaient obtenu des résultats similaires. Ces auteurs ont constaté un gain de poids de 4 et 7 g/j de plus que le témoin (aliment sans levure) pour des doses respectives de 1 et 1,5 g de levure/kg d'aliment chez des animaux entre 5 et 12 semaines d'âge. Des travaux ont aussi mis en évidence la variation de l'effet de la levure chez le lapin en fonction de l'âge (Sonbol & El-Gendy, 1992). Dans cette étude, on obtient une amélioration des performances de croissance entre 30 et 58 jours d'âge pour une dose de 1g de levure/kg d'aliment. Par contre au delà de 58 jours, il n'existe aucune différence significative entre les traitements.

Tableau 6: Synthèse des effets de la levure probiotique *S. cerevisiae*, utilisée seule ou en association, sur les performances de croissance du lapin.

Souche	Age	Dose (g de levure/kg d'aliment)	IC	GMQ (g)	Références
<i>S. cerevisiae</i>	ND	10	ND	42,1	(Maertens, 1992)
		1,5	ND	43,4	
		0	ND	41,7	
<i>S. cerevisiae</i>	De 35 à 56j	3	3,65	18,82	(Onifade et al., 1999)
		1,5	3,83	16,83	
		0	3,87	15,84	
<i>Lacto-Sacc</i>	De 42 à 84j	0,8	2,76	36,8	(Gippert et al., 1996)
		0,3	3,02	30,9	
<i>Lacto-Sacc</i>	De 28j	1	ND	5%	(Ayyat et al., 1996)
		0	ND		
<i>Lacto-Sacc</i>	De 30 à 58j	1	3,21	24,86	(Sonbol & El-Gendy, 1992)
		0	3,68	21,11	
<i>Lacto-Sacc</i>	De 35 à 84j	1,5	2,9	29,7-32,2	(El-Hindawy et al., 1993)
		1	3,03	28,8-30,3	
		0	3,26	24,8-26,2	

ND non déterminé ; Lacto-Sacc lactobacille associé à la levure *S. cerevisiae*

Si une majorité d'études montre un effet positif des probiotiques sur la croissance, d'autres cependant indiquent que les performances sont très peu ou pas du tout améliorées par l'ajout de levure dans l'aliment du lapin (El-Gaafary et al., 1992; Aoun et al., 1994; Kamra et al., 1996). Les travaux de El-Gaafary et al. (1993) conduits sur des lapins dès l'âge de 7 semaines (42j) à 12 semaines, n'ont pas aussi montré de différences significatives de performance de croissance entre le lot traité à la levure associée à Lactobacille (Lacto-sacc) à la dose de 1g/kg et le lot non traité (témoin). L'influence de « Lacto-sacc » à la dose de 5×10^8 UFC/g/jour sur la consommation, le gain de poids et l'efficacité alimentaire, évaluée par Kamra et al. (1996) ne révèle aussi aucune différence entre les lots, confirmant ainsi les résultats précédents.

D'autres effets de *S. cerevisiae* chez le lapin notamment sur les performances de reproduction de la lapine ont été étudiés. La supplémentation par le probiotique « Lacto-sacc » au taux de 0,1% dans l'alimentation de la lapine améliore selon Ayyat *et al.* (1996) ses performances de reproduction. Ces auteurs ont pu observer un accroissement de la taille de la portée à 21 jours de 0,85 point sur un effectif de 223 femelles par rapport aux témoins. Cet accroissement de la portée est suivi d'une augmentation de la production laitière de plus 14% et surtout du poids au sevrage de plus 20%.

L'effet de la levure probiotique sur les performances de croissance du lapin reste difficile à évaluer en raison de la variabilité des résultats due sûrement aux conditions expérimentales (type de levure, âge des lapins, aliment de base etc.) qui diffèrent selon les études.

V.D. IMPACT DE *S. CEREVISIAE* SUR LA SANTE DES LAPINS

Chez les monogastriques notamment chez l'homme, la diminution de la capacité de fermentation des bactéries endogènes et/ou l'émergence au sein de celles-ci de pathogènes sécrétrices de toxines telles que *Clostridium difficile*, sont la cause de troubles digestifs diarrhéiques. Ces diarrhées peuvent souvent apparaître lors de traitements par des antibiotiques. Les travaux de bon nombre d'auteurs ont montré que certaines souches, en particulier *S. boulardii*, présentent un intérêt clinique pour la prévention de la diarrhée. La diminution des risques de diarrhée chez des rats peut atteindre 50% pour une dose de $3,1.10^9$ UFC/ml (Czerucka & Rampal, 2002). L'effet de cette même levure sur la santé digestive a été constaté par Dalmaso *et al.* (2006). Ils ont constaté une baisse des troubles digestifs d'environ 50 % lorsque les souris reçoivent 100 µg/j de *S. boulardii*. Elle permettrait aussi de prévenir la récurrence de *C. difficile* en cas d'infections récidivantes (Marteau & Shanahan, 2003; Dalmaso *et al.*, 2006; de Vrese & Marteau, 2007).

Chez l'animal monogastrique en croissance, les probiotiques sont utilisés dans le but de prévenir les troubles digestifs qui apparaissent autour du sevrage avec l'ingestion d'aliments solides et les modifications des conditions environnementales responsables de stress. Chez le porc, les probiotiques sont utilisés pendant cette période pour, d'une part améliorer les performances de croissance et d'autre part, améliorer ou préserver la santé des animaux. L'ajout de *S. cerevisiae* dans l'alimentation du porc a montré des effets positifs sur les performances et sur la réduction de l'indice de diarrhée chez les porcelets de 5 à 28 jours selon Lessard (2004). Kogan & Kocher (2007) ont aussi rapporté chez le porcelet que des préparations à base de paroi cellulaire de *S. cerevisiae* réduisait la concentration de bactérie

potentiellement pathogène (*E. coli*, *Salmonella spp.*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Clostridium spp.*, *Campylobacter*) de 56%.

Comme le porcelet, le lapereau est sensible aux stress alimentaire et environnemental générés autour du sevrage. Quelques études ont montré une amélioration de la santé du lapereau lorsque la ration est complétementée avec un probiotique. Ainsi, un effet positif de la levure *S. cerevisiae* sur la santé du lapin en croissance (dose 5×10^9 UFC/kg d'aliment de Biosaf[®]) a été montré (C.A.M. & C.A.P., 1994). La mortalité dans le lot suppléementé de la levure Biosaf[®] est environ deux fois inférieure au témoin. Cependant l'ampleur de l'effet de cette levure sur la santé varie en fonction de la tranche d'âge de l'animal. La réduction de la mortalité est plus importante entre la 8^{ième} semaine d'âge et l'euthanasie ($P < 0,05$). Par contre la baisse de la mortalité est moins marquée jusqu'à 5 semaines d'âge ($P < 0,1$). Maertens & De Groote (1992) ayant aussi utilisé cette même levure probiotique ont obtenu une mortalité inférieure ($P < 0,05$) lorsque la ration des lapins est complétementée : 3,3%, 7,1% et 13,8% lorsque les rations sont respectivement suppléementées à 0,15% ($7,5 \times 10^6$ UFC/g), 1% (5×10^7 UFC /g) et 0% de levure; soit un taux de mortalité allant de 2 à 4 fois plus élevé chez le témoin par rapport au lot contenant la levure. L'impact positif de la levure sur la santé a été étudié par d'autres auteurs qui dans leurs démarches ont associé la levure *S. cerevisiae* à une bactérie notamment Lactobacille. Hollister et al. (1989) ont constaté une baisse de la mortalité par troubles digestifs chez les lapins recevant une combinaison de *S. cerevisiae* et de Lactobacille de 7,9% et 17,5% de mortalité, respectivement pour une dose de 15 g/kg et pour le témoin; soit une baisse de la mortalité de plus de 50% avec l'apport de levure.

La plupart des mortalités post-sevrage sont causées par des diarrhées chez le lapin. Cependant, à notre connaissance, aucun résultat d'autopsie ou d'études microbiologiques n'a été publié. Aucun agent pathogène précis n'a été identifié comme responsable de ces pertes dans la majorité des études.

Bien que certaines études montrent un effet positif des probiotiques sur la santé (sur la diarrhée surtout), il n'est toujours pas encore possible de formuler des recommandations thérapeutiques dans la pratique (Braegger, 2002). Ce constat est toujours d'actualité chez la plupart des mammifères y compris le lapin. Car les données qui analysent les effets positifs des levures probiotiques sur la santé des animaux sont très limitées et hétérogènes en ce qui concerne le protocole, l'aliment utilisé, les conditions sanitaires, la dose, la durée du traitement, l'âge des animaux etc.

V.E. EFFET DE *S. CEREVISIAE* SUR LES PARAMETRES SANGUINS DU LAPIN

Les mauvaises conditions sanitaires et les stress dus aux transitions sont à l'origine de changements métaboliques sous l'influence des cytokines et de certaines hormones intervenant dans le système de défense de l'organisme (Ito *et al.*, 2006). Les cytokines proinflammatoires sont synthétisées par les macrophages et les lymphocytes. Elles provoquent de la fièvre et activent les cellules immunitaires. Les acides aminés sont, dans ces conditions, réorientés vers la production des tissus impliqués dans la défense de l'organisme au détriment de la croissance. Les acides aminés sont ainsi utilisés comme substrat énergétique et surtout servent à la synthèse des protéines de l'inflammation. Une diminution ou une augmentation importante de certains acides aminés et de ces protéines de l'inflammation sont liées à l'état de santé de l'animal. Il existe plusieurs acides aminés ou protéines impliqués dans ces réactions inflammatoires. Toutefois dans cette étude bibliographique, nous nous intéresserons à une protéine de l'inflammation générale, l'haptoglobine sanguine, et une protéine indicatrice de l'inflammation locale qui est la myéloperoxydase (MPO).

V.E.1. Haptoglobine sanguine

L'haptoglobine est une protéine de la réaction inflammatoire qui permet de suivre l'évolution d'une réaction inflammatoire. Elle permet également de suspecter un phénomène d'hémolyse intra-vasculaire, même minime. C'est une glycoprotéine de transport synthétisée dans les hépatocytes. Elle est constituée de deux chaînes légères α et de deux chaînes lourdes β . En cas de maladie ou de conditions sanitaires médiocres, l'haptoglobine est libérée en quantité importante dans le sang. La concentration d'haptoglobine moyenne mesurée sur des veaux sains est de 0,9 g/l contre 3,6 g/l lorsque les animaux sont malades (Genheim *et al.*, 2007).

Les travaux de Nikunen *et al.* (2007) sur les protéines de la phase aiguë de l'inflammation (haptoglobine, fibrinogène, sérum amyloïde-A, etc.), montrent bien que les animaux infectés par *Pasteurella multocida* présentaient une concentration accrue d'haptoglobine et des autres protéines inflammatoires. Le taux est deux fois supérieur chez les bovins malades par rapport à celui des animaux sains. Chez le porc, une infection expérimentale par *Mycobacterium tuberculosis* entraîne une augmentation significative du taux d'haptoglobine en unité de DO de 0,12 à 0,39 (Melchior *et al.*, 2002). Ces résultats sont confirmés par Le Floch (2004). En

effet, lorsque les porcelets sont élevés dans une salle présentant un risque sanitaire élevé et alimentés à l'aide d'un régime ne contenant pas d'antibiotique, il y a une augmentation importante du taux d'haptoglobine notamment durant les deux premières semaines qui suivent le sevrage de plus 0,62 g/l.

V.E.2. La myéloperoxydase (MPO)

L'activation des cellules phagocytaires et la réaction inflammatoire en réponse à une infection, engendre une activation des neutrophiles pour la digestion des bactéries pathogènes. Ce type de défense de l'organisme nécessite une consommation d'oxygène appelée flambée respiratoire ou « respiration burst » en anglais et une dégranulation indépendante de l'oxygène. Cette dernière s'accompagne d'une libération de protéines cationiques et de lactoferrines ainsi que d'enzymes hydrolytiques et protéolytiques. La flambée respiratoire quant à elle implique le fonctionnement de la NADPH-oxydase, du monoxyde d'azote synthétase (NO synthétase ou NO synthase) et la MPO, agissant de concert pour éliminer les pathogènes. Cette élimination se fait par la production d'espèces oxydantes capables de détruire les capsules polysaccharidiques résistantes aux enzymes protéolytiques par NADPH-oxydase, NO synthase et la MPO (Serteyn *et al.*, 2003).

La MPO est une enzyme hémique présente en concentrations importantes dans les granules primaires des cellules polymorphonucléaires neutrophiles ou des monocytes. Elle exerce une forte activité antimicrobienne. Un taux plasmatique élevé de MPO, ou dans les liquides biologiques ou encore dans les tissus, indiquent une activation importante des neutrophiles ce qui est synonyme d'une infection (Serteyn *et al.*, 2003). Chez l'homme, la péritonite de l'intestin s'accompagne d'une hausse très importante de la MPO d'environ 80 % (Jacob *et al.*, 2007).

L'injection d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) à 2 lots de rats, montre une augmentation très significative de la MPO au niveau du côlon distal chez tous les individus ayant reçu le TNBS 4 fois plus élevée que chez le témoin (Ohashi *et al.*, 2008). Rappelons que le TNBS est un acide dont l'injection induit des colites graves (macroscopiques) chez les animaux (Marc *et al.*, 2003; Kolgazi *et al.*, 2007). La TNBS provoque en réalité une augmentation de la perméabilité tissulaire à la MPO et non une dégradation ou une

inflammation générale du tube digestif. Après l'administration de TNBS à des souris saines, il est observé au deuxième jour une colite sévère entraînant une mortalité de 24%. Les lésions induites deviennent sévères le 5^{ème} jour. Elles sont caractérisées par une nécrose du colon et une grande mortalité (69%). Au point de vue histologique, le côlon des souris atteintes de colite présente une paroi épaisse associée à un infiltrat à polynucléaires neutrophiles et à une nécrose épithéliale. La concentration de la MPO (DO de MPO/g de protéine) est 4 fois plus élevée chez celles-ci par rapport à celle des témoins sans TNBS (Dubuquoy *et al.*, 2000).

V.E.3. Impact de la levure sur les protéines de l'inflammation

Il existe très peu de données sur les protéines de l'inflammation et l'impact des levures probiotiques sur l'évolution de celles-ci en général et chez le lapin en particulier. Toutefois, au vu des relations existant entre les protéines de l'inflammation et l'état de santé de l'animal d'une part, et entre la levure et l'état de santé de l'animal d'autre part, il existe potentiellement un effet de la levure probiotique sur l'évolution ou la concentration de ces protéines de l'inflammation. Comme précédemment annoncé, en cas de troubles sanitaires, la concentration en MPO et en haptoglobine s'élève. La plupart des inflammations intestinales s'accompagneraient d'une élévation des protéines de l'inflammation telles que l'activité de la MPO et le niveau sérique d'haptoglobine. Cette concentration baisserait lorsque l'animal recouvrirait la santé. Quant à la levure, il a été montré qu'elle améliore la santé car elle a permis une réduction significative de la mortalité et de la morbidité dans la plupart des études effectuées. Chez l'homme, l'action de *S. boulardii* sur la santé en relation avec l'inflammation, se résumerait au blocage de la production de certaines protéines pro-inflammatoires (Chen *et al.*, 2006a; Sougioultzis *et al.*, 2006). Une étude chez le lapin, bien que ne portant pas sur la MPO et l'haptoglobine, indique que la composition du sang du lapin dont le régime contient de la levure probiotique est différente de celle du témoin (**Tableau 7**) (Onifade *et al.*, 1999).

Tableau 7: Effet de la supplémentation en levure sur la composition sanguine du lapin âgé de 56 jours

Indices hématologiques	Concentration en levure (g/kg) dans la ration				P		
	0	1,5	3	SEM	0 vs 1,5	0 vs 3	1,5 vs 3
Protéine Totale (g/dl)	6,1c	6,5b	6,9a	0,09	*	**	*
Globuline (g/dl)	2,9a	3,9b	4,5b	0,15	*	**	*
Hématocrite (%)	31c	34b	40a	0,85	*	***	*
Hémoglobine (%)	9,71c	10,5b	12,4a	0,44	*	**	*
Erythrocytes (106/ μ l)	5,02b	5,51b	6,01a	0,15	NS	**	*
Leucocytes (103/ul)	4,95	4,4	4,9	0,06	NS	NS	NS
Lymphocytes	47b	51a	52a	0,44	*	*	NS
Monocytes	4a	2ab	1b	0,25	NS	*	NS

A, b, c : les moyennes ayant en exposant la même lettre ne sont pas significativement différent au seuil $P < 0,05$ (Onifade *et al.*, 1999) * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, NS : différence non significative

L'impact de *S. cerevisiae* est variable chez le lapin selon la dose, l'âge, les conditions d'élevage et même selon les études. Bien que certaines études ne montrent aucun effet significatif de l'apport de la levure sur divers paramètres zootechniques, d'autres par contre ont montré des améliorations significatives sur la croissance, la digestion et la santé. Concernant le microbiote digestif, seule l'étude de Bennegadi (2002) est disponible, et ne mentionne pas d'effet majeur chez le lapin sain (avec une faible dose de levure); excepté une tendance à une proportion plus élevée de *R. albus*.

Il n'existe donc pas d'étude, à notre connaissance, portant sur l'impact de la levure et les paramètres de l'inflammation tels que l'haptoglobine et la myéloperoxydase (MPO) chez le lapin. Cependant, ces 2 paramètres peuvent doubler de concentration en cas de troubles digestifs.

CHAPITRE 3- MODE D'ACTION DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Au vu des connaissances actuelles, les probiotiques en général agiraient d'une part de manière directe sur la santé et sur la physiologie de l'animal ou d'autre part de façon indirecte par la modification de l'écosystème digestif ou par l'optimisation de la réponse immunitaire face aux agressions (Marteau & Shanahan, 2003).

Ainsi, l'un des modes d'action potentiel des probiotiques serait d'améliorer la résistance de l'écosystème microbien digestif, ou sa stabilité face à des pathogènes ou à des agressions externes. L'action des probiotiques serait influencée par de multiples interactions entre les éléments constitutifs de la biocénose et par les interactions entre la biocénose et le biotope ou l'hôte. Ainsi le rôle positif des probiotiques dans l'amélioration de la santé pourrait être dû à la compétition entre les microorganismes pour les nutriments indispensables à leur survie (oses et molécules facteurs de croissance) ainsi qu'à la production de facteurs antimicrobiens notamment les bactériocines (Marteau & Shanahan, 2003).

Un second mode d'action des probiotiques serait d'influencer positivement le fonctionnement de la barrière intestinale. Ainsi, ils auraient un effet anti-inflammatoire avéré contre certaines maladies digestives telles que la maladie de Crohn et les ulcères (Dugas *et al.*, 1999).

I. ACTION DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUR LES PROTEINES DE L'INFLAMMATION DU TUBE DIGESTIF

Les symptômes externes des maladies inflammatoires du tube digestif sont le plus souvent les pertes de poids, la baisse de l'ingestion et surtout la diarrhée. Du point de vue immunologique, la progression de la maladie et des lésions inflammatoires est associée à une augmentation de la production locale de cytokines. Il y a une infiltration massive dans la zone d'inflammation de lymphocytes T et B, de macrophages et de neutrophiles, produisant une variété de cytokines pro-inflammatoires notamment les TNF- α (tumour necrosis factor), IL (interleukin) et INF- γ (interferon). Ces cytokines pro-inflammatoires ont diverses fonctions dont des activités antivirales, la reconnaissance du soi par la formation du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou la stimulation même des lymphocytes T et des cellules NK (natural killer) (Ito *et al.*, 2006). L'accumulation de ces différents éléments principalement l'INF- γ , dans certains organes impliquerait donc un état d'inflammation chronique. Toutefois l'expression de l'inflammation intestinale est mesurable par le dosage de la MPO et l'haptoglobine.

Très peu de données existent sur le rôle et le mécanisme d'action de la levure probiotique (*S. cerevisiae*) sur la santé du lapin à travers les protéines de l'inflammation. La plupart des travaux publiés ont été effectués sur la souris (Dalmasso *et al.*, 2006), sur le porc (Kogan & Kocher, 2007), sur les ruminants (Denev *et al.*, 2007; Emmanuel *et al.*, 2007), sur les oiseaux (Asli *et al.*, 2007) et chez l'espèce humaine à l'aide de *S. boulardii* (Chen *et al.*, 2006b; Mumy *et al.*, 2008). Dans ces études, l'apparition de troubles digestifs et l'inflammation qui l'accompagne implique la combinaison de divers facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires (Dalmasso *et al.*, 2006). L'inhibition de l'inflammation par les levures probiotiques s'explique souvent par leur action sur le système immunitaire. Une étude a montré que l'inhibition par *S. boulardii* de l'accumulation des cytokines produit par les lymphocytes T (thymocyte ou cellule T) dans les tissus digestifs contribue à éviter les inflammations qui accompagnent les pathologies digestives (Dalmasso *et al.*, 2006). Les lymphocytes T détruisent les cellules étrangères ou toute autre cellule qu'ils n'ont pas appris à reconnaître. Selon ces auteurs, la levure probiotique produirait des sécrétions qui modifieraient l'adhérence des pathogènes aux cellules épithéliales. La réduction de la perméabilité membranaire du tube digestif permettrait aussi d'éviter l'inflammation causée par l'infiltration des cytokines. L'action anti-inflammatoire de *S. boulardii* a été aussi étudiée par Chen *et al.* (2006a). Ces auteurs ont lié l'action anti-inflammatoire de la levure à travers une inhibition des protéines ERK1/2. Les protéines ERK1/2 sont des enzymes ou des kinases qui jouent un rôle important dans la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire. Elles phosphorylent plusieurs substrats cytoplasmiques et nucléaires nécessaires à la transcription de nombreux gènes afin de poursuivre le processus de division cellulaire. L'utilisation de *S. boulardii* comme probiotique sur un modèle humain *in vitro* et sur la souris *in vivo* a réduit l'apparition d'inflammation liée à une infection à *C. difficile*. Cette levure a provoqué une inhibition de la toxine A sécrétée par la bactérie. L'inhibition de la toxine de l'agent pathogène a eu pour conséquence l'inactivation des ERK1/2 MAP Kinase (Extracellular signal-regulator kinase 1 and 2 Mitogen activated protein).

L'action anti-inflammatoire des levures notamment *S. cerevisiae* s'exerce, pour certains auteurs, à travers les polysaccharides constituant la paroi cellulaire (Kogan & Kocher, 2007). Pour eux, les polysaccharides composant la paroi de cette levure principalement le α -D-mannane et le β -D-glucane ont une action positive sur le système immunitaire. Le β -D-glucane a une action anti-oxydante et inhibitrice de la prolifération cellulaire. Il stimule la libération par les macrophages des cytokines TNF- α (cytokines à action anti-inflammatoire)

(Majtan *et al.*, 2005). Des études portant sur l'impact du β -D-glucane issu de la paroi de la levure *S. cerevisiae* sur le TNF- α chez la souris, montre une nette augmentation de sa production par les macrophages (Majtan *et al.*, 2005). Ce constat indique que le β -D-glucane ou la levure *S. cerevisiae* stimulerait les macrophages et activerait la TNF- α avec une action anti-tumorale ou anti-inflammatoire. En alimentation animale, la levure par sa paroi supprimerait l'effet toxique de certaines substances par l'altération de leur fraction toxique.

En résumé, l'action de la levure sur la santé ou sur la croissance des animaux serait liée à la nature des polysaccharides qui composent la paroi cellulaire. Elle inhiberait l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales du tube digestif en bloquant les liaisons carbohydrates nécessaires à cette adhésion. Elle stimulerait les cellules immunocompétentes et le mécanisme de défense immunitaire. L'action anti-inflammatoire serait liée à l'inhibition de la perméabilité membranaire des cellules épithéliales et de la prolifération des cellules inflammatoires.

II. ACTION DE LA LEVURE PROBIOTIQUE SUR L'ECOSYSTEME DIGESTIF

Chez les ruminants, l'effet de la levure se manifeste à travers la stabilisation du pH ruminal lorsque le régime de l'animal contient un fort taux de glucide rapidement fermentescible (Marden, 2007). Cette stabilisation du pH serait due à la stimulation des bactéries utilisatrices de lactate. L'effet de *S. cerevisiae* est aussi lié à la compétition pour l'utilisation des oses avec *Streptococcus bovis* limitant sa croissance et l'accumulation de lactate. La levure contribuerait au maintien du niveau d'anaérobiose du milieu ruminal par l'absorption d'oxygène. Elle produirait et fournirait en plus à certaines bactéries ruminales, notamment *Megasphaera elsdenii* et *Selenomonas ruminantium*, des molécules facteurs de croissance telles que les vitamines, les acides dicarboxyliques et les acides aminés. Le développement de ces bactéries induit l'activation du métabolisme du lactate et de sa transformation en propionate. La chute de la concentration en lactate permettrait d'éviter l'acidification trop accentuée du rumen en phase postprandiale. Les facteurs de croissance fournis par *S. cerevisiae* agiraient comme des accepteurs finaux d'électrons lors de la formation d'ATP. Ainsi au cours de la dégradation du lactate par *S. ruminantium*, la présence du malate augmenterait le métabolisme d'un facteur de 10 et d'un facteur 4 pour les autres produits intermédiaires de la dégradation du lactate en propionate (Nisbet & Martin, 1990) (**Figure 17**).

La croissance bactérienne nécessite de l'énergie, des acides aminés et des vitamines. Selon Girard (1994), la levure (en culture) fournirait aux bactéries anaérobies ces divers éléments indispensables à leur croissance. L'utilisation de ces éléments surtout le glucose par les bactéries anaérobies et par la levure contribuerait à la réduction de la quantité de sucres disponibles pour la croissance des bactéries productrices de lactate (*S. bovis*) dans le rumen (Chaucheyras *et al.*, 1996). Il s'en suit logiquement une baisse de la quantité de lactate produite dans le rumen et avec pour conséquence la stabilisation du pH.

Le développement des bactéries anaérobies serait aussi dû à une action directe de la levure sur le maintien du niveau d'anaérobiose du biotope. En effet le rumen ou le caecum chez les monogastriques (lapin, cheval, porc etc.) sont des milieux fortement réducteurs dans lesquels vivent en équilibre des microorganismes anaérobies facultatifs et anaérobies stricts.

Cette biocénose est très sensible à l'apport d'oxygène extérieur à travers l'eau de boisson, la prise d'aliment ou par diffusion à travers la paroi du tube digestif (rumen ou caecum) (Brogberg, 1957 ; Marounek *et al.*, 1982). La levure, grâce à sa capacité de captation des traces d'oxygène toxiques pour les bactéries anaérobies strictes du rumen ou du caecum, serait responsable du maintien de l'anaérobiose du milieu lorsqu'elle est ingérée en quantité suffisante. La suppression de ces traces d'oxygène rendrait le biotope plus réducteur et stimulerait par conséquent l'activité des bactéries anaérobies strictes notamment les bactéries cellulolytiques. Newbold (1996) a ainsi pu montrer que l'addition de levure dans le rumen stimulait l'utilisation de l'oxygène.

Le mode d'action des levures décrite de cette manière cache quelques points d'ombre. En effet, l'action de la levure à travers le malate comme accepteur d'électrons pour la dégradation du lactate en propionate, nécessiterait une dose très élevée de levure dans le biotope. Selon Newbold *et al.* (1996), la concentration de malate (L-malate) dans la levure probiotique est négligeable. Il faudrait donc une concentration de malate supérieure à celle contenue dans 10g de levure pour avoir un effet sur les bactéries cellulolytiques ruminales. De plus le facteur de croissance fourni par la levure profiterait certes aux bactéries cellulolytiques et aux bactéries utilisatrices de lactate, mais aussi à toutes les autres y compris les bactéries productrices de lactate telle que *S. bovis*. Une étude a d'ailleurs rapporté que l'activité de *S. bovis* augmentait en présence de malate (Russell & Wilson, 1996).

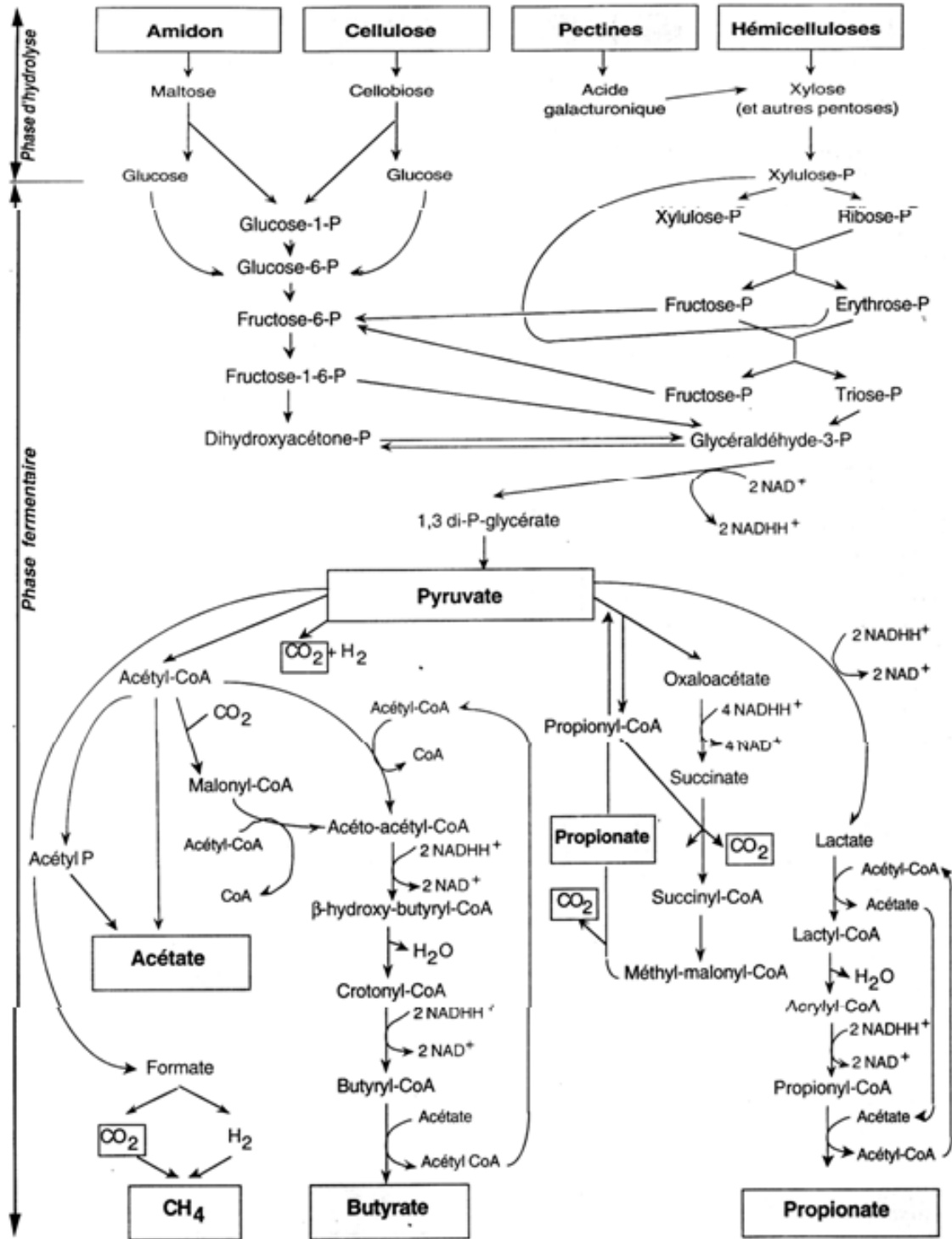


Figure 17: Voies du métabolisme glucidique (Jouany, 1995)

La plupart des études ne font pas état de la présence de lactate dans le caecum du lapin contrairement au rumen. Les produits issus de la fermentation sont essentiellement l'acétate, le propionate et le butyrate. Dans ces conditions, on pourrait s'interroger sur le rôle de la levure dans le caecum, vu qu'il n'existe pas d'acidose chez le lapin. Sur

quels paramètres la levure probiotique agirait-elle pour améliorer la santé et les performances zootechniques du lapin au delà de l'action immunologique ?

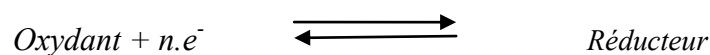
Si le mode d'action de la levure à travers la réduction du taux de lactate est à écarter chez le lapin, son rôle favorable sur l'activité métabolique en général est à prendre en compte. En plus des facteurs de croissance qu'elle pourrait fournir au microbiote autochtone, elle pourrait avoir un effet sur le pH et le potentiel d'oxydoréduction caecal, comme dans le rumen.

III. APPROCHE THERMODYNAMIQUE : EFFET SUR LE POTENTIEL REDOX ET LE pH

Les études de l'activité microbienne dans le cæcum du lapin sont généralement basées sur l'analyse des paramètres physico-chimiques notamment le pH, et les concentrations en produits terminaux des fermentations. Ces paramètres peuvent être complétés par la mesure du potentiel redox (E_h), en vue d'estimer l'état d'anaérobiose du milieu, comme cela a été effectué chez le ruminant (Broberg, 1957, Marounek et *al.*, 1987; Andrade et *al.*, 2002; Marden et *al.*, 2005). La mesure du E_h dans un milieu aqueux tels que le contenu ruminal ou cæcal permet d'estimer la capacité de ce milieu à céder ou à capter des électrons et de l'hydrogène. Contrairement au rumen, il n'existe pas d'étude qui décrive l' E_h dans le cæcum du lapin. La mise au point d'une méthode de mesure du E_h doit être faite de sorte à éviter la contamination du milieu de mesure par l'air atmosphérique (Nordstrom & Wilde, 1998), sous peine de modifications des caractéristiques physico-chimiques du biotope et d'erreurs de mesure d' E_h . Cette étude bibliographique portera essentiellement sur les réactions d'oxydoréductions dans les systèmes biologiques en relation avec la nutrition animale. Une étude plus large a été cependant effectuée par Marden (2007) chez la vache.

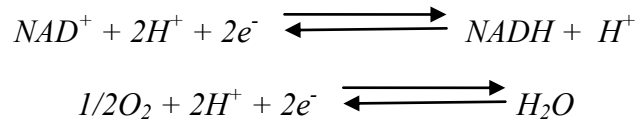
III.A. REACTION D'OXYDO-REDUCTION ET PRODUCTION D'ATP

Une réaction d'oxydoréduction est un processus de transfert d'électrons d'un donneur (réducteur) à un accepteur (oxydant). L'équation de la réaction est la suivante :



Les couples d'oxydoréduction ayant les potentiels de réduction plus négatifs cèdent des électrons aux couples à potentiel plus positif qui les acceptent en raison d'une plus grande affinité.

Dans les systèmes biologiques, les réactions redox ont lieu lorsque les électrons ou les protons sont enlevés par voies enzymatiques d'un substrat et transférés à un transporteur d'électrons tel que la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+). La réduction du NAD^+ donne le NADH et un proton.



Le couple $NAD^+/NADH$ étant plus négatif que le $1/2O_2/H_2O$, les électrons se déplacent du NADH (réducteur) vers l' O_2 (l'oxydant). Ce déplacement d'électrons se produit au cours de la respiration aérobie. Cette réaction « libère » 220 kJ.mol^{-1} d'énergie pour la synthèse d'ATP. Lorsque la réaction est dans le sens contraire c'est-à-dire d'un potentiel plus positif vers un potentiel plus négatif, elle entraîne une consommation d'énergie.

Les microorganismes chimiotrophes du système digestif mettent à la disposition de l'organisme l'énergie sous forme d'ATP. Ils utilisent l'oxygène comme accepteur exogène d'électrons dans la respiration aérobie et le nitrate (NO_3), le sulfate (SO_4^{2-}), le fer ferrique (Fe^{3+}) ou le CO_2 pour la respiration anaérobie. Le substrat énergétique peut aussi être oxydé et dégradé sans nécessiter l'intervention d'un accepteur exogène, c'est le cas de la fermentation. Elle utilise plutôt des accepteurs endogènes. La respiration et la fermentation aboutissent respectivement à la formation de 38 et 2 ATP/mole de glucose. Cette différence de rendement est due essentiellement au fait que l'accepteur dans le cas de la respiration a un potentiel de réduction beaucoup plus positif que le substrat.

III.B. MESURE DU *POTENTIEL REDOX*

Le E_h est une différence de potentiel (en Volt) mesurée par rapport à celle d'un système de référence constante. Il représente la différence de potentiel entre deux électrodes. L'une de ces deux électrodes est inerte. Elle joue le rôle de donneur ou d'accepteur par rapport aux couples redox présents dans la solution. La deuxième électrode est l'électrode de référence. Elle prend un potentiel connu et assure la connexion électrique avec le système à mesurer.

La méthode de mesure expérimentale du E_h couramment utilisée est la méthode potentiométrique. Elle est réalisée à l'aide de deux électrodes. La première est en platine et la seconde dite électrode de référence peut être en calomel, en argent-chlorure d'argent, en sulfate de mercure, en thalamide, etc. Toutes les données doivent être corrigées par rapport l'électrode d'hydrogène en tenant compte de la température du milieu et de la nature de la référence utilisée (Sauer & Teather, 1987) (**Tableau 8**).

Tableau 8: Potentiels des électrodes de référence (mV) en fonction de la température et de la concentration de chlorure de Potassium d'après (Nordstorm, 1977)

T° (°C)	Argent-Chlorure d'argent			Calomel			
	3M KCl	3,5M KCl	KCl saturé	3M KCl	3,5M KCl	4M KCl	KCl saturé
10	220	215	214	206	256	-	254
15	216	212	209	-	-	-	251
20	213	208	204	257	252	-	248
25	209	205	199	255	250	246	244
30	205	201	194	253	248	244	241
35	202	197	189	-	-	-	238
40	198	193	184	249	244	239	234

III.C. RELATIONS ENTRE POTENTIEL REDOX (EH), pH ET OXYGENE

Théoriquement, il existe une relation linéaire entre le E_h et le pH. Cependant, lorsque le E_h subit des variations rapides, cette relation n'est plus linéaire. Ainsi, Bohn (1969) a pu constater que l'apport de substances organiques facilement oxydables faisait apparaître une relation non linéaire entre le pH et le E_h . En tenant compte de l'influence de la température moyenne du rumen ou du caecum qui est de 39°C et en supposant que l'activité de l'eau est unitaire, il est possible d'exprimer la pression partielle d'oxygène en fonction du E_h et du pH. Cette relation est tirée de deux équations thermodynamiques complexes dont l'une est de Tardy *et al.* (1999) et la seconde de Nernst (Valsaraj, 2000).

$$\text{Log P(O}_2\text{)} = 64,59.E_h + 4.\text{pH} - 78,60$$

Cependant le calcul de la concentration en oxygène dans le jus ruminal à l'aide de cette formule donne des valeurs de l'ordre de 10^{-65} atm (Marden, 2007). Ce qui signifierait purement l'absence d'oxygène dans le jus ruminal, bien que cela ne soit pas vrai. Elle a tout de même donné une indication sur le niveau d'anaérobiose du rumen en présence ou en

l'absence de levure probiotique (Biosaf®). Cet auteur a pu constater la diminution de $10^{0,8}$ atm de la pression partielle d'oxygène dans le rumen de vaches ingérant de la levure.

Le rumen est un milieu très réducteur, « sans » oxygène où le E_h varie entre -250 et -150 mV (Broberg, 1957; Marounek *et al.*, 1982; Marden *et al.*, 2005). C'est un milieu favorable à l'activité fermentaire des bactéries lactiques, propioniques et méthanogènes.

CONCLUSIONS BIBLIOGRAPHIQUES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les populations microbiennes du rumen ou du caecum sont affectées par divers facteurs d'origine alimentaire et/ou microbienne. Toute perturbation de ces écosystèmes (caecal ou ruminal) par ces facteurs peut altérer la santé et les performances de l'animal.

Le lapin est sensible aux pathologies digestives durant la période post-sevrage, qui se manifestent par des diarrhées suivies de mortalités pour la plupart. Utilisée depuis de nombreuses années dans la panification et la fermentation alcoolique, la levure probiotique (*S. cerevisiae*) est aussi un additif alimentaire chez les animaux. Elle est utilisée pour la régulation de l'écosystème digestif, pour améliorer la santé et les performances zootechniques. Il est reconnu que les levures ont une action positive sur divers paramètres de physiologie digestive ou sur la croissance. Si de nombreuses études expérimentales montrent des effets bénéfiques de la levure chez les animaux, son mode d'action par contre reste mal connu.

En santé animale, l'action immunologique de la levure probiotique ou son action contre l'inflammation serait associée à sa capacité à réduire la perméabilité membranaire des cellules épithéliales ou à la modulation de l'action des cytokines par le biais des polysaccharides composant sa paroi cellulaire.

Par ailleurs, presque aucune étude n'a analysé chez le lapin les effets des probiotiques sur la biocénose caecale. Il apparaît nécessaire d'étudier les effets de cette flore exogène sur le microbiote digestif du lapin en croissance, et d'analyser les interactions avec le biotope. Chez les ruminants, l'action de la levure *S. cerevisiae* s'observe sur la régulation de la production de lactate ruminal lorsque l'animal ingère un régime concentré pauvre en fibres. Le taux de lactate est lié à la structure de la biocénose ruminale, elle-même dépendante du niveau d'anaérobiose du biotope. Des études plus récentes ont montré que cette levure avait une aptitude à consommer l'oxygène qui pourrait se retrouver dans le rumen. Elle renforce par conséquent le caractère anaérobie du biotope ruminal. La baisse de la concentration d'oxygène dans ce milieu fermentaire s'exprime par la baisse du E_h et la stabilisation du pH à 6. Cette stabilisation du pH est synonyme d'une stabilisation de la production de lactate dans le rumen.

Bien que du point de vu anatomique le site des fermentations dans le tube digestif du lapin (caecum) soit moins exposé à l'oxygène par rapport au rumen, et que les valeurs de la

pression partielle d'oxygène calculée avec les mesures de E_h et de pH ne reflètent pas exactement la concentration en oxygène, elles peuvent toute de même être utilisées comme indicateur du niveau d'anaérobiose du contenu caecal et statut sanitaire du lapin. En effet, si le thème « acidose » est à proscrire chez le lapin et la production de lactate quasi nulle dans le caecum, la levure pourrait consommer les traces d'oxygène introduites par l'eau de boisson et par la paroi du tube digestif, baisser le E_h et stabiliser le pH. La stabilisation du biotope caecal serait favorable au développement d'une biocénose anaérobie strict au détriment des aérobies responsables de pathologies digestives.

En vu de la vérification de ces hypothèses, nous avons choisi, d'étudier les variations de la biocénose et du biotope en fonction de la présence ou non de levure probiotique (*S. cerevisiae*) et de faire une brève comparaison avec les résultats recueillis avec la même levure chez d'autres espèces animales notamment la vache. Dans ce but, nous mettrons au point une **technique de mesure fiable du E_h , du pH et de la température caecale** du lapin. L'objectif est d'évaluer les différentes variations de ces paramètres du biotope en fonction de la période, de l'âge, du statut nutritionnel et du statut sanitaire du lapin. Ensuite, pour le même objectif, nous évaluerons un indicateur de l'inflammation générale (l'**haptoglobine sanguin**) et un indicateur de l'inflammation locale (la **myéloperoxydase**).

Enfin, l'effet de la levure probiotique *S. cerevisiae* SC 47 (Biosaf®) sur ces paramètres du biotope, de la biocénose et de l'inflammation sera étudié lors de différentes situations nutritionnelles.

Ainsi, au delà de contribuer aux connaissances sur l'effet de la levure probiotique en alimentation animale, ce travail de thèse intègre une démarche pluridisciplinaire (microbiologique, physique, biochimique, zootechnique etc.). Il permet de faire une approche globale des interactions statut nutritionnel, physiologique et sanitaire du lapin en post-sevrage.

MATERIELS
ET
METHODES

INTRODUCTION, HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Dans cette dernière décennie, de nombreuses études scientifiques ont tenté de montrer les effets bénéfiques des probiotiques en alimentation animale. Ces effets bénéfiques portent pour la plupart sur l'équilibre ou le bon fonctionnement de l'écosystème digestif, la régulation du système immunitaire et le renforcement de la barrière intestinale. La 1^{ère} conséquence de ces effets est l'amélioration de la santé digestive et/ou des paramètres zootechniques (croissance, ingestion).

Néanmoins, il reste encore difficile de comprendre le mode d'action des probiotiques. Ainsi, dans l'objectif de préciser leurs effets, certains auteurs ont fondé leurs hypothèses sur la consommation d'oxygène par ceux-ci. Cette hypothèse a été reprise par Marden (2007) lors de ses travaux sur la levure probiotique *S. cerevisiae* SC 47 (Biosaf®) chez la vache laitière. Cependant cet auteur a conclu que l'oxygène n'était pas thermodynamiquement disponible dans l'écosystème ruminal en raison de la faiblesse du E_h (-180 mV). Une corrélation a toutefois été établie entre l' E_h , le pH et l'ingestion de levure. Ainsi la levure renforcerait le pouvoir réducteur du rumen par la stabilisation du pH. Cette stabilisation du pH serait responsable d'une diminution de lactate et d'une augmentation de la concentration en AGV ruminal. Ces résultats seraient dûs à une action favorable de cette levure sur les bactéries anaérobies stricts au dépend des autres genres bactériens. D'autres études ont aussi montré que *S. cerevisiae* avait une action sur l'inflammation digestive et sur les protéines qui l'accompagnent.

Chez le lapin, des troubles digestifs sont fréquemment observés dans les élevages rationnels après le sevrage. Ces troubles sont responsables des mortalités et de la baisse des performances conduisant à des pertes économiques entre 4 et 10 semaines d'âge. Des auteurs ont fait état de profondes modifications du profil fermentaire caecal (AGV, pH) lors ces troubles digestifs (diarrhée). Ces perturbations sont probablement liées à un déséquilibre de la biocénose caecale. Elles causent aussi une modification des protéines sanguines. Quelques études ont permis de mettre en évidence les effets positifs des levures sur la santé du lapin et sur ses performances zootechniques, mais très peu ont mis en relation la levure *S. cerevisiae* et l'écosystème caecal du lapin.

Au vu des effets des probiotiques et de la levure en particulier sur l'écosystème, sur l'inflammation et sur les performances zootechniques des animaux, nous nous proposons d'étudier son action chez le lapin. Comme pour le rumen, le caecum est le siège de différentes

activités microbiennes, nous avons donc formulé l'hypothèse que l'action des levures probiotiques chez le lapin passerait par la stabilisation du biotope (E_h , pH, AGV, NH_3) et l'équilibre de la biocénose caecale (profil microbien). L'action positive de la levure sur l'écosystème entraînerait une amélioration de la santé exprimée par le biais des paramètres de l'inflammation, le taux de mortalité et de morbidité ; ce qui serait aussi synonyme de l'amélioration des performances zootechniques.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons mis en place des études expérimentales dont l'objectif principal est d'étudier l'effet de la levure probiotique *S. cerevisiae* SC 47 (Biosaf®) sur quelques paramètres physiologiques (inflammation), microbiologiques (profil microbien), santé digestive (mortalité, morbidité) et les performances de croissance chez le lapin du sevrage à l'âge adulte. Ces connaissances permettront de confirmer certaines hypothèses ou d'avoir une approche nouvelle sur le mode d'action de la levure. Pour répondre à cet objectif, nous avons utilisé trois approches à notre connaissance originales chez le lapin:

- Une approche physique et chimique faisant appel à la thermodynamique (E_h). Cette approche a pour but d'évaluer la variation de ces paramètres physiques et chimiques en fonction de l'état de santé du lapin et en fonction de l'apport des différentes doses de levures.
- Une approche microbiologique qui permet d'estimer la diversité et la structure de la biocénose caecale à l'aide d'une méthode d'empreinte génétique. Elle a pour but d'évaluer les différentes variations de la biocénose en fonction de l'apport de levure. La survie des levures dans le système digestif a été évaluée via une approche quantitative.
- La 3^{ème} approche est d'ordre sanitaire. Elle consiste à un suivi quotidien individuel des lapins atteints de troubles digestifs, dans le but de caractériser les paramètres physiques, chimiques, microbiologique et physiologique (inflammation) ainsi que les lésions qui apparaissent chez les lapins malades. L'effet de la levure sur ces différents paramètres et sur la santé de façon générale a été aussi étudié.

Pour bien mener cette étude, la levure *S. cerevisiae* SC 47 produit par la société LFA SA sous le nom commercial de Biosaf®, a été utilisée. Ce choix se justifie d'une part par les études récentes disponibles dans notre laboratoire avec cette même levure sur la vache et son action sur le potentiel redox ruminal ; d'autre part les travaux effectués par Maertens & De Groote (1992) qui ont montré que cette levure avait des effets bénéfiques sur les performances du lapin.

CHAPITRE 1 : MATERIELS ET METHODES COMMUNS

I. MESURE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CAECUM DU LAPIN

I.A. OBJECTIFS

L'objectif est la mise au point et la validation d'une méthode de mesure du potentiel redox dans le cæcum, à l'abri d'une contamination de l'environnement caecal par l'air ambiant. Il conduira aussi à l'estimation du niveau d'anaérobiose du cæcum du lapin en croissance nourri avec un régime standard.

I.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

Les moyens expérimentaux généraux seront détaillés dans cette partie : schémas expérimentaux, animaux et ensemble pH-mètre-électrodes. Les dispositions spécifiques à chaque protocole seront détaillées ultérieurement.

I.B.1. Schéma expérimental et dispositif de mesure

Les mesures ont été effectuées seulement "*in vivo*" sur animal sous anesthésie par injection de 1ml/ kg de poids vif de xylazine (Rompun®) et 1,5ml/kg poids vif de Kétamine (Imalgène®). La méthode utilisée est la méthode *in vivo*. Les informations supplémentaires sur le choix de la méthode seront fournies dans le chapitre 2 portant sur la mise au point de la méthode de mesure du E_h .

Deux électrodes en verre ont été utilisées pour les différentes mesures. Le pH et la température T_e du milieu cæcal ont été relevés simultanément avec une électrode de type "Unitrode" (Pt1000/B/2/3MKCl; Metrohm®) et l' E_h avec une électrode de platine (Combined Pt-ring électrode; Pt/-20 80°C; Metrohm®). Les 2 électrodes, connectées à un pH-mètre de type Metrohm® (model 713 CH-9101, Herisau, Switzerland) ont été introduites dans la matière cæcale après laparotomie et incision du cæcum entre la 5^{ème} et la 7^{ème} spire (**Figure 18**). Le pH est enregistré dès sa stabilisation soit environ 2 min après son introduction dans la matière caecale. Les premiers enregistrements d' E_h sont effectués 2 min après l'introduction simultanée des 2 électrodes (temps de référence zéro = t_0). Quatre autres mesures suivront à

intervalle régulier de 5 min soit 20 min de mesure. Les valeurs retenues sont celles relevées à 20 min après l'introduction des électrodes (temps de stabilisation) (voir chapitre 2). Lorsque les valeurs enregistrées augmentent pendant la prise de mesure, c'est-à-dire avant le temps stabilisation référencé à 20 min, la valeur retenue est celle qui est la plus faible.

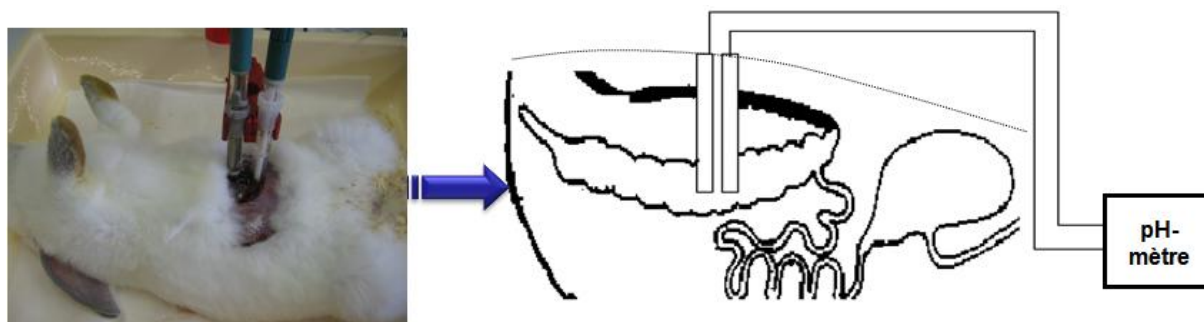


Figure 18: Dispositif de mesure du E_h , pH et de la température du caecum

I.B.2. Animaux, logement et alimentation

Toutes les mesures dans ce travail de thèse ont été effectuées dans le caecum de lapin sevré soit à 28 jours, soit à 35 jours d'âge. Ces lapins sont issus du croisement entre la souche femelle INRA 9067 (Néo-zélandais x Californiens) et la souche commerciale mâle Zika®.

I.C. CORRECTION DU POTENTIEL REDOX (E_h), ET CALCUL DE LA PRESSION PARTIELLE D'OXYGENE (PPO).

Le E_h a été calculé selon l'équation suivante: $E_h = E_0 + C$, où E_0 représente la valeur du potentiel redox lue sur le pH-mètre et C le potentiel de l'électrode de référence par rapport à l'électrode en hydrogène qui est la référence absolue. La valeur de C est de +199 mV à 39 °C selon Nordstrom (1977). La pression partielle en oxygène "PPO" est calculée selon l'équation de Nernst. $PPO (\log \text{atm}) = 64,59 \times E_h (\text{V}) + 4 \times \text{pH} - 78,60$ à 39 °C Valsaraj (2000).

II. METHODE DE MESURE ET DE CARACTERISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DIARRHEIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE: ANALYSE DU PROFIL CAECAL, ET MESURE DE L'INFLAMMATION GENERALE ET DIGESTIVE

II.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

L'objectif de ces études est d'évaluer les variations de plusieurs paramètres physiologiques et microbiologiques en relation avec le statut sanitaire, le statut nutritionnel et l'âge du lapin.

Les différents paramètres qui ont été évalués sont :

- ✓ le **profil (CE-SSCP) de la biocénose bactérienne** cœcale
- ✓ un indicateur de **l'inflammation générale** (haptoglobine) **et de la muqueuse digestive** (myélopéroxydase)

II.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

II.B.1. Mesures et prélèvements réalisés sur les animaux

- Mesure du taux d'haptoglobine sanguin

Les prélèvements sanguins pour le dosage de l'haptoglobine sont réalisés avant l'anesthésie, c'est-à-dire juste après la sortie des lapins sélectionnés des cages. Les animaux utilisés dans nos différents protocoles n'ont pas été mis à jeun avant les prélèvements. Les prélèvements se font de préférence sur la veine marginale ou à travers l'artère principale de l'oreille du lapin après pelage local. Le sang a été prélevé à l'aide d'une aiguille stérile Venoject® Needle Multi-sample 21Gx1^{1/2}''UTW 0.8x40 mm Terumo®. Il a été collecté dans un tube stérile en verre de 5 ml bouchonné Venoject® Terumo®, sous vide contenant un anticoagulant (EDTA K3). Souvent, pour des questions pratiques, le tube a été débouché lors de la collecte (**Photo 2**). Le tube est conservé à 4°C avant d'être centrifugé à 1500G à la fin des prélèvements. Le surnageant (plasma) est recueilli dans un autre tube de 5 ml identifié et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

Le dosage du taux d'haptoglobine est réalisé à l'aide du kit PhaseTM fourni par Abcys SA, par colorimétrie.

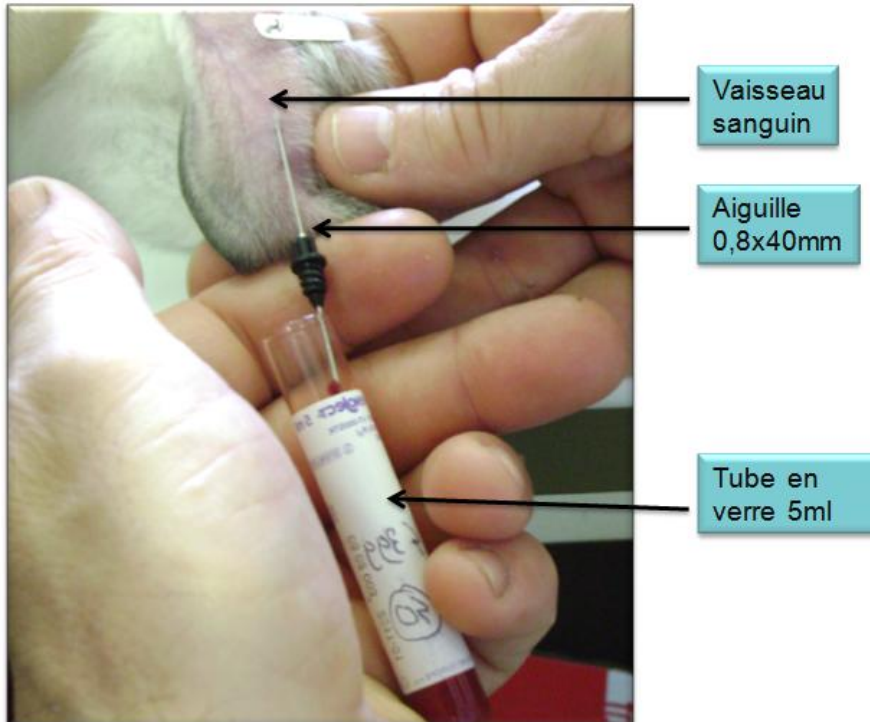


Photo 2: Prélèvement de sang à travers une artère de l'oreille
(Les gants ont été retirés pour les besoins de la photo)

(a) Principe

A pH bas l'activité des peroxydases associées à l'hémoglobine libre est inhibée. Cependant la combinaison de l'hémoglobine et de l'haptoglobine à pH bas permet de préserver cette activité des peroxydases. L'haptoglobine est ainsi quantifiée par le dosage de l'activité de la peroxydase de l'hémoglobine à pH bas dans les échantillons.

(b) Matériel de dosage

Un Kit de dosage PhaseTM Haptoglobin et un lecteur de microplaque à 630 nm. Nous avons été contraints de faire une lecture à **530 nm** car nous ne disposions pas de lecteur à 630 nm. Toutefois les tests préliminaires effectués à 530 nm avaient donné de bonnes droites de régression et des résultats proches des données bibliographiques chez les mammifères. La composition du kit est la suivante :

- 1-Hémoglobine : 12 ml d'hémoglobine stabilisé
- 2-Hémoglobine diluant: 12 ml d'hémoglobine diluant
- 3-Calibreur : 0,5 ml de calibreur de l'haptoglobine (2 mg/ml)
- 4-Chromogène : 11 ml de réactif de chromogène
- 5-Substrat : 8 ml de substrat contenant la peroxydase d'hydrogène stabilisée
- 6-Diluant Échantillon/calibreur : 12 ml tampon phosphate saline (PBS)

Le kit est conservé au frais entre 2 et 8°C

Le matériel complémentaire utilisé pour ce dosage est constitué de :

- Micropipette de précision + des cônes jetables pouvant distribuer 0 à 10 µl et 100µl
- Pipette multi-canal capable de distribuer 50 et 90µl
- Tubes à essai + pipettes en plastique (5-10 ml)
- Plaque de 96 puits
- Chronomètre

Deux réactifs ont été préparés de la manière suivante

- Hémoglobine (réactif 1)

Nous avons fait un mélange à volume égal de la solution hémoglobine avec la solution diluant de l'hémoglobine (1V/1V). Ce réactif a été conservé à 4°C avant le dosage (Il est recommandé de le préparer 15 jours avant le dosage).

- Chromogène/substrat (réactif 2)

Nous avons fait un mélange de 9 volumes de chromogène et de 5 volumes de substrat. Le réactif 2 est conservable à 4 °C pendant 24 h.

Cinq tubes de calibration pour la microplaque ont été préparés et correspondent aux concentrations respectives de 2, 1, 0,5, 0,25, 0 mg/ml d'haptoglobine (**Tableau 9**).

Tableau 9: Dilution et concentration de chaque solution dans les tubes*

N° Tube	C1	C2	C3	C4	C5
Vol Diluant échantillon/calibration µl (6)	0	50	50	50	50
Vol Hémoglobine Calibration en µl (3)	50	50	50µl de C2	50µl de C3	0
Concentration finale du tube mg/ml	2	1	0,5	0,25	0

*La préparation se conserve pendant 8h à 25°C

Le dosage proprement dit a été effectué après la préparation des tubes de calibration. Il s'est déroulé comme suit : 7,5µl de chaque tube de calibration ont été prélevés et déposés dans chaque puits vide de la microplaque. L'opération est répétée pour avoir dans les 2 puits voisins le contenu du même tube (5 tubes x 2). Les échantillons de plasma à doser ont été ajoutés dans les colonnes suivantes dans les mêmes dispositions que celles des tubes. Nous avons additionné dans chaque puits 100µl de réactif 1. 140µl du réactif 2 ont été ajoutés dans les puits. Après 5 min d'incubation à 20-25°C, nous avons fait la lecture sur un lecteur de

microplaque à 530 nm (**Figure 19**). Ensuite nous avons tracé la courbe d'étalonnage des valeurs lues en fonction de la concentration d'haptoglobine dans le témoin (puits contenant les tubes de calibration). Le tracé s'est fait en fonction de la DO lue et la concentration d'haptoglobine. Tous les résultats ont été corrigés en fonction de la courbe d'étalonnage.

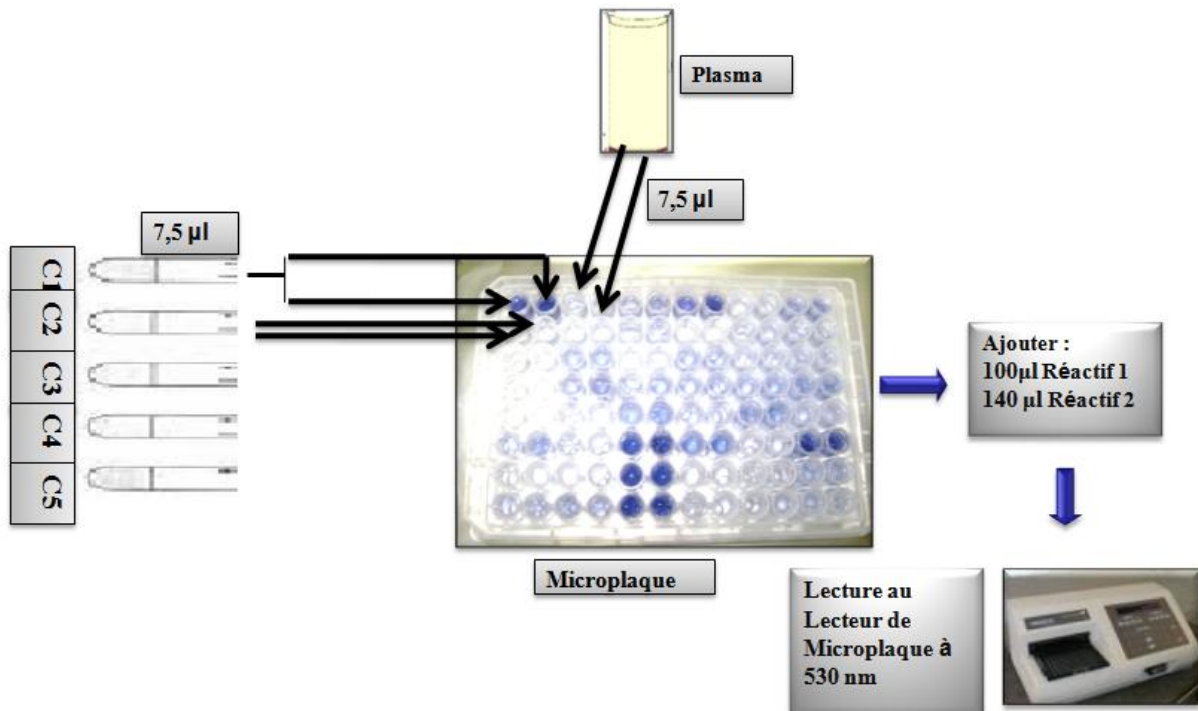


Figure 19: Protocole de dosage de l'haptoglobine sanguin. *La plaque utilisée en exemple est déjà prête pour la lecture

◦ Mesure de la MPO

Le prélèvement pour le dosage de la MPO a été réalisé après tous les autres. Le côlon du lapin euthanasié a été sélectionné sur une longueur de 1 cm environ. Pour les lapins malades présentant des lésions macroscopiques, le prélèvement s'est fait au niveau de la zone nécrosée. La section cylindrique a été ouverte et un échantillon de 0,5 cm de côté a été prélevé et nettoyé rapidement avec précaution dans du liquide physiologique à 4°C pour se débarrasser des digesta restants. Le fragment est ensuite conservé à - 80°C dans un microtube Eppendorf de 1,5 ml préalablement placé dans de la glace. La conservation ne doit pas dépasser 12 jours. Pour chaque lapin, 2 prélèvements ont été effectués. Le dosage a été effectué au laboratoire NGN de l'UMR 1054-NGN à l'INRA Toulouse en utilisant leur mode opératoire.

(c) Principe

Il s'agit de provoquer mécaniquement et chimiquement la lyse des tissus en vue de libérer la MPO contenue dans le cytoplasme des neutrophiles. Ce dosage mesure la variation d'absorbance à 450 nm relative à la dégranulation des peroxydes par la MPO.

(d) Matériel et mode opératoire

En plus du matériel généralement utilisé dans un laboratoire de biochimie, le dosage a nécessité des réactifs chimiques (HTAB, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , ODHC, H_2O_2 30%, BSA, MPO kit de Lowry) et du matériel d'extraction (polytron, centrifugeuse, sonicateur, spectrophotomètre).

Le dosage a aussi nécessité une préparation de solutions de tampon phosphate à pH 6, du phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4 0,2 M) et du phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4 0,2 M). Ces solutions ont été conservées à 4°C et utilisées dans la même journée. Un détergeant de hétéradécylethylammonium bromide (HTAB à 0,5%, P/V) avec du tampon phosphate à pH 6 a été aussi préparé. Le HTAB se conserve à 4°C pendant un mois. Une solution d'O-dianisidine dihydrochloride (ODHC) à 1 mg/ml d'eau distillée et une solution de H_2O_2 à 0,0005% (conservée à l'abri de la lumière) ont été préparées.

L'extraction a débuté par l'ajout de 1 ml de tampon phosphate pour 100 mg d'échantillon dans les tubes Eppendorf. Les échantillons ont été broyés au polytron. Trois cycles de congélation et décongélation dans de l'azote liquide (1 min) et au bain-marie (37°C, 10 min) ont suivi le broyage. Le surnageant de chaque tube a été éliminé après centrifugation à 4°C pendant 15 min à 10000 tpm. Nous avons ajouté au culot 500 μl de HTAB puis il a été passé au sonicateur pendant 10 sec à la puissance maximale. L'ensemble a été centrifugé de nouveau et le surnageant a servi au dosage de l'activité de la MPO et des protéines dans l'échantillon (**Figure 20**).

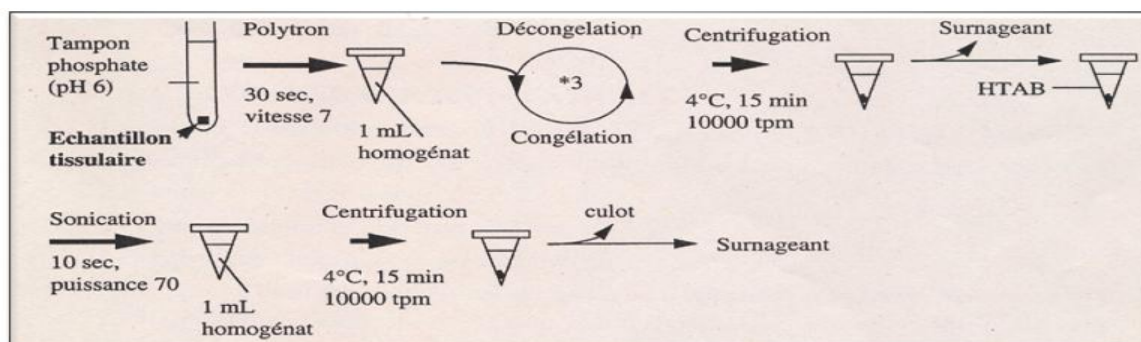


Figure 20: Procédure d'extraction et de dosage de la MPO (D'après UMR-1054-NGN, 2007)

Le dosage proprement dit commence par le tampon réactionnel en mélangeant, dans l'ordre H_2O_2 (0,0005%) et l'ODHC ensuite le tampon phosphate. Les aliquotes de dosage ont été ensuite produits. La lecture s'est faite à 450 nm pendant 2 min correspondant à 12 points de lecture espacés de 10 sec. La lecture s'est faite à différentes concentrations (3 ml du tampon réactionnel + X μ l d'échantillon). Le dosage a commencé par une concentration de 50 μ l d'échantillon pour 3 ml de tampon. Si la DO lue est inférieure à 0,05, alors nous faisons d'autres lectures avec des concentrations plus fortes (100 μ l). Si par contre la DO est supérieure, alors les lectures suivantes se font à des concentrations plus faibles (20 μ l).

L'activité MPO étant exprimé en U MPO/g de protéines, la concentration protéique de chaque échantillon dosé a été déterminée avec le reste du contenu des tubes.

◦ Analyse de la diversité microbiologique

Cette analyse permet de caractériser la communauté bactérienne dans le caecum du lapin. Elle repose sur l'utilisation des méthodes d'empreinte moléculaire. Ces méthodes se basent sur les différences présentes chez chaque espèce au niveau des régions variables des gènes d'ADNr 16S. La méthode utilisée est la SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), elle permet de séparer les molécules d'ADNr 16S en fonction de leur séquence et ainsi de discriminer les différentes espèces bactériennes au sein d'une communauté.

Principe

L'analyse CE-SSCP est basée sur la migration différentielle des séquences d'ADN monocaténares dans un polymère non dénaturant lors d'une électrophorèse capillaire (Orita *et al.*, 1989). La migration est en relation avec la conformation tridimensionnelle de l'ADN monocaténaire. Cette conformation est fonction de la composition et de la taille de la séquence nucléotidique. Pour chaque échantillon on obtient un chromatogramme caractéristique de la communauté bactérienne où chaque pic correspond soit à une espèce

isolée, soit à un groupement d'espèces (co-migration). Un marqueur de taille utilisant un fluorochrome (ROX) différent de celui utilisé pour marquer l'ADN, est ajouté à chaque échantillon. Il permet de comparer les profils entre eux.

200 à 300 mg de contenu caecal ont été prélevés sur chaque animal à l'euthanasie. Les prélèvements ont été conservés à -80°C dans des tube Eppendorf de 1,5 ou 2 ml jusqu'à l'extraction.

(e) Extraction et amplification par PCR

L'extraction de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit QIAamp® DNA Stool Mini. Les ADN totaux sont extraits par lyse des cellules (choc thermique à 95°C) dans un tampon, puis élimination des impuretés (débris cellulaires et inhibiteurs) et purification des ADN sur colonne de centrifugation. **(Figure 21)**. On obtient 50 µl de l'extrait d'ADN total conservé à -20°C.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet l'amplification de l'ADN total extrait grâce à des réactions d'élongation successives en présence d'amorces bactériennes. Le fragment d'ADN cible correspond à la région variable V3 de l'ADNr 16S (200 pb). Les amorces utilisées sont: une amorce universelle W49 5'-ACGGTCCAGACTCCTACGGG-3' et une amorce bactérienne marquée 6FAM-labelled W34 5'-TTACCGCGGCGTGCTGGCAC-3' (Sigma Proligo, France) (Delbès *et al.*, 1998; Zumstein *et al.*, 2000). L'enzyme utilisée pour la réaction de la PCR est la polymérase PfuUltra™ II Fusion HS DNA Polymerase. Cinquante (50) µl de réactif ont été additionnés à 1 µl de la solution d'ADN extrait et dilué à 1/200. Le réactif était composé de 38,25 µl d'eau PPI, 5 µl de tampon Pfu Ultra II Fusion 10X, 0,2 µM d'amorces, 200 µM de Mix dNTP, 0,25 U Pfu Ultra II Fusion HS DNA polymérase et 25 µg de BSA (sérum albumine bovine). Les paramètres du programme PCR comportait une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, 30 cycles de 30 sec à 94°C pour la dénaturation, 30 sec à 61°C pour l'hybridation, 30 sec à 72°C pour l'élongation, enfin 3 min à 72°C pour l'élongation finale (Michelland *et al.*, 2008).

La taille du produit de la PCR obtenu a été vérifiée sur gel d'agarose à 2% avec le marqueur de taille 100pb DNA ladder (Invitrogen, France).

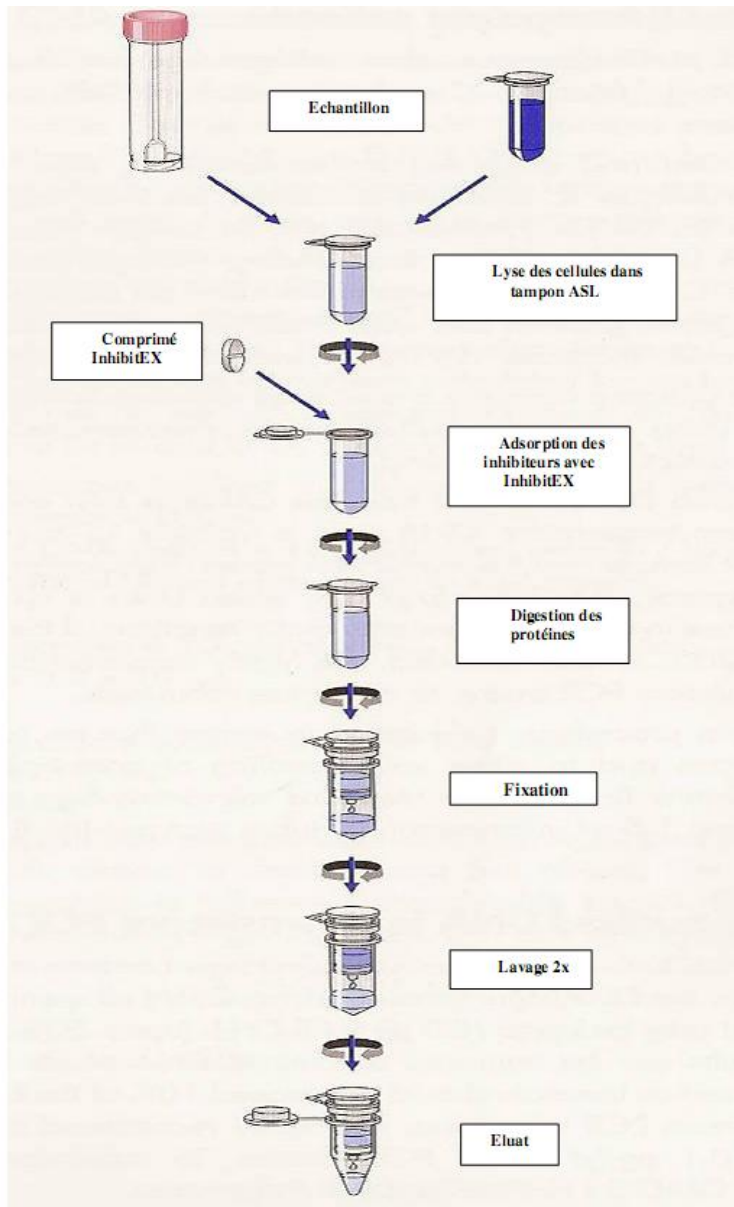


Figure 21: Extraction de l'ADN par le kit QIAamp® DNA Stool (Source: QIAamp® DNA Stool Mini Kit Handbook 2001)

(f) *CE-SSCP*

1 μ l du produit PCR a été ajouté à 7,5 μ l de formamide désionisée (Genescan-Applied Biosystem) et 0,2 μ l d'un standard interne (Rox 400HD, Genescan-Applied Biosystems). Les amplicons (fragments d'ADN amplifiés) ainsi préparés sont dénaturés pendant 5 min à 95°C puis refroidis 5 min dans de la glace. L'électrophorèse capillaire et la détection des produits de migration ont été réalisées dans un capillaire de 36 cm et de 50 μ m de diamètre avec un séquenceur (ABI PRISM® 3100 Applied Biosystems). Le capillaire contient un polymère composé de 7.2% GeneScan polymère, 10% glycérol et 1X TBE. Ainsi, pour chaque

échantillon, le séquenceur détecte la bande présente dans le gel et la transforme en un chromatographe de haute résolution (environ 22000 points).

(g) Traitement des profils

Les profils SSCP en sortie du séquenceur sont au format « .fsa ». Ces données ont été converties au format « .csv » à l'aide du logiciel Chromagna développé par M. J. Miller (US National Institute of Health). Les profils ont été ensuite alignés à l'aide du programme Safum écrit sous Matlab® version 6.05 selon le modèle Zemb *et al.* (2007) puis normalisés. Au terme de la normalisation l'aire totale sur la courbe des profils est égale à 1.

(h) Analyses

Les analyses des profils ont été réalisées avec un nouveau logiciel « StatFingerprint » (Michelland *et al.*, 2009). Les profils CE-SSCP ont été comparés 2 à 2 en distance euclidienne afin d'analyser leur **similarité** en fonction des groupes expérimentaux. Ce test est effectué par l'analyse non-Metric Multidimensional Scaling (nMDS) avec 10000 rotations (résultats présentés sous forme graphique) suivi de l'analyse de **similarité** (ANOSIM). L'ANOSIM (10000 permutations) a servi à tester le degré (R statistic) de différence en 2 groupes de profils CE-SSCP et la significativité de R(P). Lorsque P est significatif ($P < 0,05$) et R ($> 0,25$) est proche de 1, alors les profils des lapins comparés sont séparés, donc non similaires et de **structures différentes**. Cependant lorsque les profils sont similaire, nous calculerons la valeur de cette similarité (%) à l'aide d'un test-t.

Pour chaque profil, nous avons calculé un indice de **biodiversité de Simpson** adapté aux données sorties des « fingerprints ». Une analyse de variance a été réalisée selon les différents schémas expérimentaux.

III. DENOMBREMENT DES CELLULES DE LEVURE REVIVIFIABLES DANS LES ALIMENT, LES DIGESTA ET LES EXCRETA

III.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

Le lapin est classiquement nourri avec des aliments sous la forme de granulés, produits à partir d'un mélange broyé de végétaux et compressé à l'aide d'une presse. Au cours du processus de granulation, la matière alimentaire est soumise à une hausse de température qui pourrait dénaturer certains additifs, notamment les probiotiques. De plus, selon la physiologie digestive du lapin, le site d'action de la levure probiotique est le caecum situé en aval du tube

digestif, après son passage dans l'estomac où le contenu est très acide ($\text{pH} < 2$) (Gidenne & Lebas, 1984).

La maîtrise des apports en levure probiotique et son impact sur le lapin nécessite une connaissance de la quantité ingérée à travers l'alimentation ainsi que celle qui arrive effectivement dans le caecum avant d'être ensuite éliminée.

La technique de comptage des levures revivifiables appliquée au laboratoire de microbiologie la société LFA à Lille a été utilisée.

III.A.1. Objectifs

L'objectif est de déterminer le taux de levure dans l'aliment granulé, les digesta et dans les excréta.

III.A.2. Choix du modèle

La même technique de dénombrement des levures a été utilisée pour les aliments, les digesta et les excréta. La levure utilisée tout au long de ce travail de thèse est *S. cerevisiae* SC 47 (Biosaf®). Le mode de culture est la culture profonde sur gélose en boîte de pétri.

III.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

Les moyens expérimentaux généraux sont ceux utilisés classiquement dans un laboratoire de microbiologie et ne seront pas détaillés. Cependant quelques moyens spécifiques au dénombrement seront décrits brièvement.

III.B.1. Matériel de mesure

Le matériel de travail doit être stérile pour éviter toute contamination. Il est autoclavé à 121°C pendant 20 min. Puis l'ensemble de la manipulation a lieu sous flamme.

° Matériels généraux

Le dénombrement a nécessité des étuves thermostatées à 30°C et 37°C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) pour les différentes incubations. Un bain-marie à 37°C et à 47°C a servi à la mise en température de

l'eau de dilution et le refroidissement de la gélose après sa fonte à plus de 100°C dans un autre bain-marie.

◦ Matériels spécifiques

Outre la verrerie, le matériel suivant a été utilisé pour l'homogénéisation et la revivification :

- Un ensemble de 2 sachets stériles et un porte sachet ont servi au malaxeur type stomacher :
 - Stomacher Lab-Blender 400 (broyeur – malaxeur)
 - Sachets standards 400 ml (300x180), Référence CML SMTS400
 - Sachets avec filtre pleine page 400 ml (300x190), Référence CML SSF400, dans lequel l'échantillon à analysé est déposé.

- Pour la revivification
 - Boîte de pétri, de diamètre 90 mm stérile avec ergots, Référence CML BPS90EMC
 - Pipettes stériles 1 ml (à usage unique).
 - Tubes à essai autoclavables 19 ml, diamètre 16 mm, Référence CML TCP16125
 - Bouchons coiffants PP avec ergot de ventilation, autoclavable, Référence CML BBP16/01.

III.B.2. Milieu, réactifs et prélèvements

◦ Milieu et « réactifs »

Le milieu de culture utilisé est milieu YM (DIFCO™ YM Agar Référence : 5071217). C'est un milieu de culture déshydraté composé en g/l d'eau déminéralisée de 3 g d'extrait de levure, 3 g d'extrait de malt, 5 g de peptone, 10 g de dextrone et 20 g de gélose.

De l'oxytétracycline hydrochloride (C₂₂H₂₄N₂O₉ HCl à 95% au minimum), SIGMA® Référence : O-5875, des pastilles d'Hydroxyde de Potassium (KOH) à 85%, SIGMA® Référence : P-1767, de l'Acide Lactique (C₃H₆O₃) à 85%, SIGMA® Référence : L-1250 o et de l'eau stérile ont été aussi utilisés.

◦ Prélèvements

L'aliment sous forme de farine et la levure ont été soigneusement prémélangés à la main, et ensuite à la mélangeuse dans le but d'avoir une répartition homogène des sphérules de levure. Les prélèvements d'un échantillon de 2 à 3 kg de granulés ont été effectués à la sortie de la presse. Les échantillons peuvent être conservés plusieurs semaines avant leur analyse. Une quantité de 250 g environ de chaque aliment avant et après granulation est conservée sous vide.

Pour les digesta, les prélèvements ont eu lieu après euthanasie. Une quantité d'au moins 20 g a été prélevée et analysée le même jour.

° Mode opératoire

(i) *Préparation du Milieu YM gélosé*

Le milieu YM sert de base à la culture des levures, moisissures et autres micro-organismes tolérant l'acidité. Pour une préparation de 1 litre de milieu, nous avons utilisé 41 g d'YM déshydraté, que nous avons mis en suspension dans de l'eau déminéralisée. La solution homogène obtenue a été ajustée à un pH 6,2 (à 25°C) et portée lentement à ébullition sous agitation pendant 3 h. Le bouillon est refroidi à 60-70°C dans un bain et reparti par volume de 100 ml dans des flacons de 125 ml préalablement autoclavés. Ces boîtes ont été à nouveau autoclavées (munies d'un cook chex, ruban qui vire au noir après stérilisation). Le milieu ainsi préparé et stérilisé peut être conservé pendant 2 mois à 4°C.

(j) *Protocole de culture*

Le travail se fait autour du bec Bunsen qui doit rester allumé en permanence en prévision à toute contamination par les microorganismes environnementaux (conditions aseptiques). Tout le matériel utilisé est disposé autour du bec Bunsen dans un cercle de 20 cm de rayon environ et passé à la flamme avant utilisation. La culture commence par la réhydratation suivie de l'ensemencement.

(k) *Réhydratation*

10 g précis de l'échantillon contenant la levure ont été disposés dans un sachet à filtre de « stomacher » doublé d'un sachet standard. 90 g d'eau déminéralisée stérile ont été ajoutés ce qui porte le contenu du sachet à 100 g (dilution 10^{-1}). Le sachet est malaxé à l'aide d'un « stomacher » pendant 3 min à la vitesse maximale, pour broyer, hydrater et homogénéiser le

contenu. Les sachets sont ensuite mis à incuber pendant 30 min à 37°C à l'étuve. Pendant l'incubation, la gamme de dilution en série est préparée (9 ml d'eau ajoutés dans des tubes) et portée à 37°C. Les flacons de milieu YM nécessaires, sont portés à ébullition jusqu'à la fonte complète de la gélose et laissés en surfusion à 47°C ± 2°C.

(l) *Ensemencement*

A la fin de la réhydratation, le sachet contenant la dilution 10⁻¹ est homogénéisé manuellement. 1ml de la solution mère homogénéisée et filtrée est ajoutée au 9 ml du 1^{er} tube de dilution. Une série de dilution en cascade est effectuée en fonction de la teneur en cellules revivifiables attendue. 3 boîtes de pétrie ont été doncensemencées par tube de dilution (3 répétitions/échantillon) (**Figure 22**). Chacun des tubes a été bien homogénéisé avant le prélèvement (vortex, 15-20 sec). 3 ml de chaque tube sont ensemencés dans 3 boîtes de pétrie en raison de 1 ml par boîte. 0,1 g d'oxytétracycline est diluée dans 10 ml d'eau et conservée à 4°C à l'abri de la lumière. 0,7 ml d'oxytétracycline est ajoutée à 100 ml de gélose. Immédiatement, le milieu en surfusion a été coulé dans les boîtes (100 ml de gélose/7 boîtes de pétri) et agité par rotation avec précaution pour bien répartir l'inoculum dans le milieu YM afin que les cellules soient réparties sur toute la surface de la boîte. Les boîtes sont laissées à refroidissement à la température ambiante et solidifiées à plat sur la paillasse couvercle vers le haut.

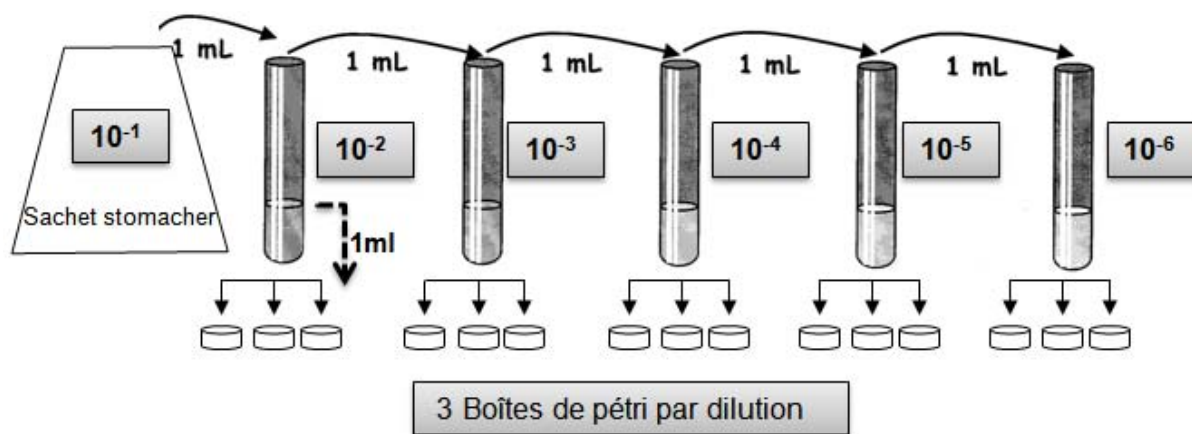


Figure 22: Etape de dilution et ensemencement au cours du dénombrement des levures contenues dans des échantillons d'aliment, de digesta ou d'excréta

(m) *Incubation*

Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à incuber dans une étuve à 30°C pendant 48 h (si nécessaire jusqu'à 72 h). Les boîtes sont placées dans l'étuve couvercle vers le bas afin d'éviter que les gouttes de condensation ne tombent sur les colonies.

L'identification ne doit pas être notée sur le couvercle, de façon à ne pas gêner le dénombrement.

III.C. EXPRESSION DES RESULTATS

III.C.1. Lecture

Les colonies de levures sont généralement trilobées, de couleur blanche, de 2 à 3 mm de diamètre.

Les boîtes dont le nombre de colonie est inférieur 30 ou supérieur à 300 ont été écartées. Lorsque les résultats diffèrent de 50% ou plus, il est conseillé de recommencer la manipulation.

III.C.2. Calcul :

Le nombre de cellules revivifiables par gramme d'échantillon analysé est donné par le calcul suivant :

$$N = \frac{\sum c}{PE \times d}$$

N /ml: nombre de cellules revivifiables (UFC/g)

$\sum c$: Moyenne de la somme des colonies pour la dilution concernée (3 boîtes par dilution)

d : Facteur de dilution : 10^{-n}

PE : Prise d'essai = 1 ml

IV. RESUME ET CHRONOLOGIE DES MESURES ET PRELEVEMENTS

Dans le but d'éviter toute influence d'une mesure sur l'autre ou une contamination au cours des différents prélèvements, nos mesures et prélèvements ont été faits dans un ordre de « marche en avant » prédéfini (**Figure 23**).

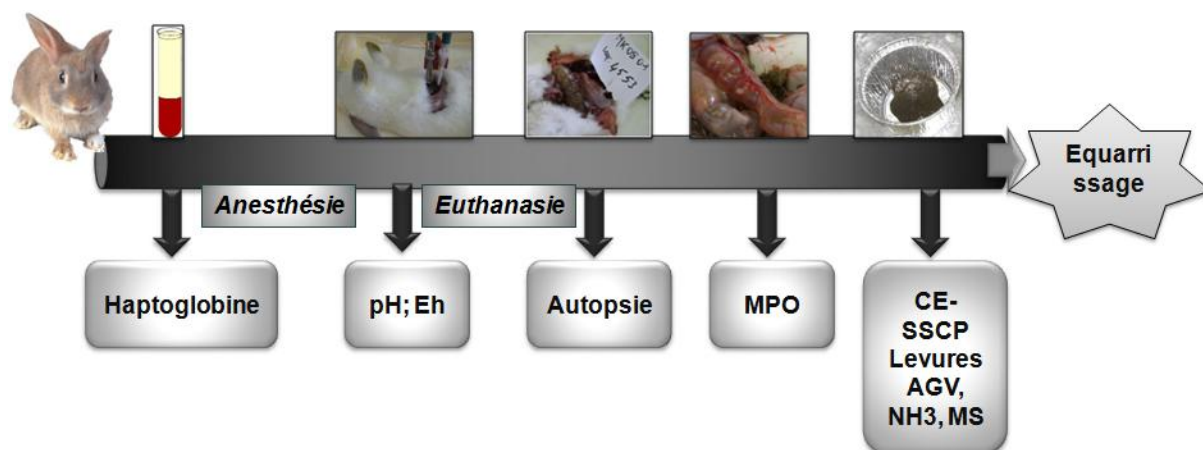


Figure 23: Organisation des prélèvements (système de marche en avant)

Pour réduire le stress dû au changement d'environnement susceptible d'influencer les protéines de l'inflammation, nous avons fait le prélèvement de sang dans les 15 minutes qui suivent la sélection des lapins. Pour cela, le nombre de lapin sélectionné et sorti de la cage d'élevage n'a pas excédé 4 lapins à la fois.

Après la prise de sang pour l'haptoglobine, un lapin est anesthésié par injection intramusculaire (IM) de Rompun® à la dose de 0,5 ml/kg de poids vif (analgésie viscérale), et 10 min après de 0,4 ml /kg de poids vif d'Imalgène® (analgésie profonde somatique). Une laparotomie (5 cm environ) et une incision du caecum entre la 5^{ème} et la 7^{ème} spire (1,5 cm environ) sont réalisées. Le pH est mesuré après l'insertion de l'électrode concernée suivi de la lecture au pH-mètre de type Metrohm® (model 713 CH-9101, Herisau, Switzerland). Ensuite l'électrode de E_h est introduite et la lecture se fait à intervalle régulier de 5 min jusqu'à 20 min. La valeur enregistrée est la valeur lue à la stabilisation dont le temps de référence est 20 min après l'incision. Cette valeur E_0 lue est corrigé par l'addition de +199mV.

Dès la fin de la prise du E_h , l'électrode est retirée et le lapin est euthanasié par injection intracardiaque de T61® à dose 0,3ml/kg de poids vif. L'animal est ensuite autopsié et les photos des lésions sont prises.

Le prélèvement de la fraction de côlon est effectué pour la MPO (*cf.* mesure MPO). Cette fraction prélevée est immédiatement conservée à -80°C.

Le caecum est retiré de l'abdomen par ses 2 extrémités pour effectuer les différents prélèvements pour le profil microbien (200 mg), les AGV (1 g), l' NH_3 (1 g) et la MS (3 g). Le prélèvement pour le profil microbien se fait sous flamme (bec benzène), et il est conservé à -80°C. Les échantillons destinés au dosage des AGV et de NH_3 sont conservés à -20°C dans des tubes contenant respectivement 2 ml de $HgCl_2$ (2%W/V) et 3 ml de H_2SO_4 (1%W/V).

CHAPITRE 2 : MESURE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CÆCUM DU LAPIN : PREMIERS RESULTATS METHODOLOGIQUES

I. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

I.A. OBJECTIFS

L'oxygène est un élément déterminant pour la caractérisation des microorganismes dans le milieu. Ainsi selon la présence ou l'absence d'oxygène, le milieu sera plus favorable au développement des microorganismes aérobies et anaérobies facultatifs ou anaérobies. La plupart de ces microorganismes anaérobies facultatifs notamment certaines espèces d'*E. coli* et les streptocoques sont responsables de maladies digestives chez le lapin (Licois *et al.*, 1991). Cependant malgré de nombreuses études effectuées sur le cæcum de lapin, aucune donnée à notre connaissance ne met en relation la teneur en oxygène du cæcum, les microorganismes et la santé digestive du lapin. Le seul moyen disponible pour estimer la teneur du cæcum en oxygène comparativement au rumen est d'utiliser l'équation de Nerst. Par cette équation la pression partielle d'oxygène est définie en fonction du pH, du E_h (mV) et la température.

Ces expériences visent à mettre au point et à valider une méthode de mesure du pH et du potentiel redox dans le cæcum, à l'abri d'une contamination de l'environnement caecal par l'air ambiant. Il conduira aussi à l'estimation du niveau d'anaérobiose du cæcum du lapin en croissance nourri avec un régime standard. Ces résultats serviront ultérieurement à l'étude de l'impact de l'addition d'une flore exogène sur le niveau d'anaérobiose du cæcum et ses conséquences nutritionnelles, sanitaires et zootechniques sur le lapin.

I.B. CHOIX DU MODELE

Le lapin est un herbivore dont le rythme d'ingestion est dépendant de la caecotrophie. La nuit correspond à la période d'ingestion alimentaire la plus importante. Par contre dans la matinée, le lapin s'alimente très peu et ingère surtout les caecotrophes. L'après-midi l'animal ingère peu d'aliment. Ce comportement alimentaire du lapin nous a amené à effectuer les mesures sur 3 périodes pour mieux cerner les variations de paramètres physiques et chimiques du contenu caecal dans son ensemble.

Selon des observations préliminaires que nous avons effectuées, la mesure du E_h dans une solution étalon ou dans une solution aqueuse (jus de rumen) s'obtenait 1 min environ après l'introduction de l'électrode de mesure. Le caecum contrairement au liquide ruminal est pâteux (20-23% MS), et les valeurs d' E_h à la stabilisation sont obtenues au delà de 15 min de mesure. Au vu de ce temps de mesure relativement long, il nous a paru nécessaire de vérifier si le maintien en vie du lapin sous anesthésie avait une influence sur l' E_h comparativement à la mesure après euthanasie. Pour atteindre cet objectif, 2 méthodes de mesure ont été utilisées : méthode *in vivo* vs méthode *post mortem*.

Les mesures du potentiel redox (E_h), de la température (T_e), et du pH ont donc été effectuées selon un schéma factoriel 2 X 3, correspondant à la comparaison de 2 techniques et de 3 périodes. Les mesures ont été effectuées sur des lapins adultes âgés de 65 jours où les paramètres physiques, chimiques et microbiologiques du caecum sont « stabilisés ».

II. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

Dans cette partie : schémas expérimentaux, animaux et logement, mesures et prélèvements réalisés et les méthodes utilisées pour évaluer les différents paramètres chimiques, ainsi que l'analyse statistique des données seront détaillées dans ce chapitre.

II.A. SCHEMAS EXPERIMENTAL ET DISPOSITIF DE MESURE

Les mesures ont été effectuées soit "*in vivo*" sur animal sous anesthésie par injection de 1ml/kg de poids vifs de xylazine (Rompun®) et 1,5ml/kg poids vif de Kétamine (Imalgène®), soit "*post-mortem*" sur animal euthanasié (après anesthésie par injection intracardiaque de 1 ml/kg de poids vif de T61®). Trois heures de mesures ont été choisies: soit durant la caecotrophie (de 8 à 10 h), soit en fin de caecotrophie (12-14 h), soit en dehors de la caecotrophie en fin de période d'éclairage (18-19 h) (**Figure 24**). Le pH et la température T_e du milieu caecal ont été relevés en même temps que l' E_h .

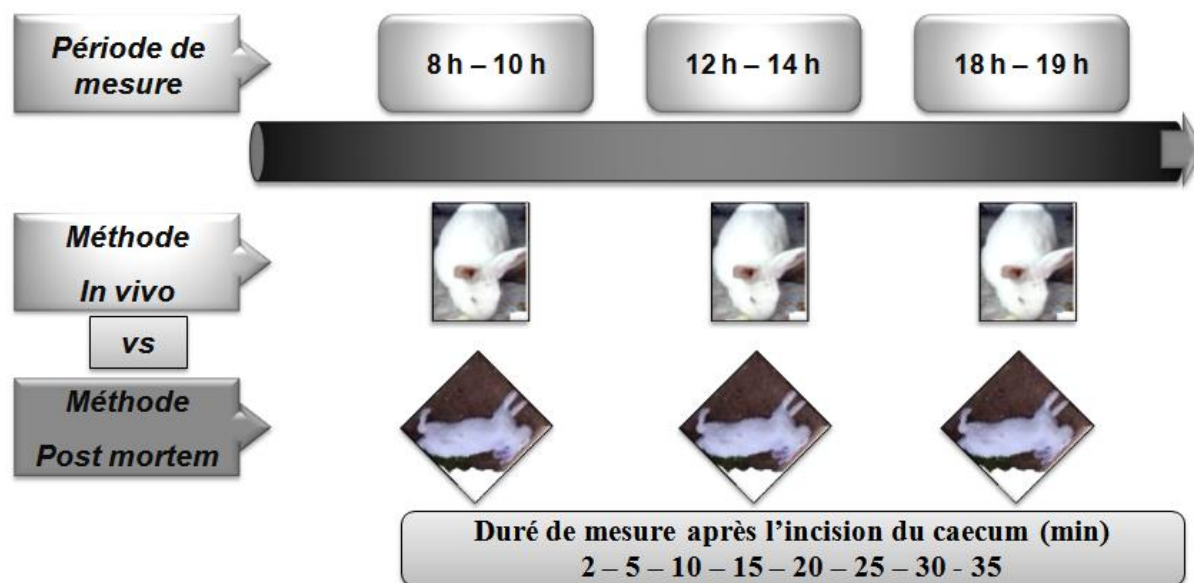


Figure 24: Schéma expérimental utilisé pour les mesures du Eh, pH et température du caecum

II.B. ANIMAUX, LOGEMENT ET ALIMENTATION

L'étude a porté sur un total de 34 lapins issus du croisement entre la souche femelle INRA 9067 (Néo-zélandais x Californiens) et la souche commerciale mâle Zika®, âgés de 65 jours et d'un poids vif moyen de 2,2 kg. Les animaux ont été nourris à volonté avec un régime commercial standard (MAT=16%; ADF=19,1%). La composition est résumée dans le **tableau 10**. Les animaux ont été élevés en cage individuelle avec un éclairage de 12 h (7 :00 à 19 :00 h) et une température de $18 \pm 3^\circ \text{C}$.

Tableau 10: Composition centésimale et chimique de l'aliment selon le fournisseur (Rablo Formax Salino)

Matières	Proportion %	Nutriment	Proportion %
Blé	7,50	Protéine Brute Nx6,25	15,97
Pulpe de betterave	15,80	Matière grasse	2,31
Coques de soja	10,90	Cendres	7,75
Son fin blé dur	35,15	Cellulose brute	16,72
Tourteau tournesol	24,00	NDF	40,24
Mélasse de soja	3,57	ADF	19,98
Lysine 98 HCl pure	0,12	ADL	4,58
Sel	0,50	Pectine	8,24
Carbonate de chaux	0,97	Hémicellulose	20,22
CMV	1,50	Amidon	13,19
Total	100,0	Minéraux	1,88

II.C. MESURES ET PRELEVEMENTS REALISES AU COURS DES EUTHANASIES

Un prélèvement du contenu cæcal sur 6 lapins par période a été effectué immédiatement après la dernière mesure d' E_h (+35 min) en vue de déterminer sa concentration en matière sèche (MS), en AGV et en NH_3 . Une fraction est destinée au dosage des AGV et une autre au dosage du NH_3 , elles sont conservées dans des tubes en plastique (PVC) bouchonnés de 45 ml contenant du $HgCl_2$ (2%, w/v) à $-18\text{ }^\circ\text{C}$ avant leur analyse. Le $HgCl_2$ et la congélation ont pour but d'inhiber toute activité microbiologique dans les échantillons prélevés. Les proportions de digesta et de $HgCl_2$ utilisées étaient de 2 g de digesta pour 2 ml de $HgCl_2$ pour les AGV et de 1 g pour 3 ml pour le NH_3 . La 3^{ème} fraction de 3 g environ a servi au dosage de la MS cæcale. La détermination du taux de MS a été faite immédiatement après le prélèvement. Les animaux utilisés dans la méthode *In vivo* ont été euthanasiés par injection intracardiaque de T61® avant d'effectuer les prélèvements.

II.D. ANALYSES DE LA MS, DES AGV ET DU NH_3

La teneur en MS dans les matières cæcales est déterminée par séchage pendant 24h à $103\text{ }^\circ\text{C}$. Le dosage des AGV a été effectué par chromatographie en phase gazeuse.

II.E. ANALYSES STATISTIQUES

Les données d' E_h , PPO, pH et T_e ont été soumises à une analyse de la variance avec pour effets fixes la méthode et l'heure de mesure. Les données de MS et d'AGV ont fait d'objet d'une analyse de la variance avec comparaison des moyennes. L'interaction entre les deux facteurs étant non significative elle a été retirée du modèle (procédure GLM de SAS)

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DIARRHEIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE : CONSEQUENCES SUR L'ECOSYSTEME CAECAL, ET IMPACT POTENTIEL SUR LE NIVEAU D'INFLAMMATION GENERALE ET DIGESTIVE

I. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

Chez le lapin atteint de troubles digestifs on observe une modification du profil fermentaire cæcal (AGV, pH) et probablement de l'écosystème microbien cæcal. Dans certaines pathologies, telles que les colibacilloses, on observe aussi une inflammation aiguë de la muqueuse digestive (jéjunale, iléale, caecale et colique). Il s'agira dans ce travail de valider certains paramètres de la biocénose (profil flore et flore totale) et de l'inflammation (taux sérique d'haptoglobine et myélopéroxydase) en relation avec l'apparition de troubles digestifs.

I.A. OBJECTIFS

Il s'agit d'identifier et de valider les paramètres qui varient en relation avec l'apparition de troubles digestifs, lorsque le lapin est nourri avec un régime déficient en fibres (stress alimentaire). Les différents paramètres qui ont été évalués dans le cæcum sont :

- ✓ les **paramètres physico-chimiques** (Eh, pH, AGV, NH₃, MS) des lapins « sains » en comparaison avec les lapins « malades » recevant ou non un régime déficient en fibres.
- ✓ le **profil (CE-SSCP) de la biocénose** cæcale
- ✓ un indicateur de **l'inflammation générale** (haptoglobine) et **de la muqueuse digestive** (myélopéroxydase)

I.B. CHOIX DU MODELE

Lorsque le lapin est victime de trouble de la santé (diarrhée), des perturbations au niveau de certaines composantes sanguines et de l'écosystème caecal sont observées. La colibacillose est une maladie fréquente en élevage cunicole. Certaines souches n'exerceraient leur pouvoir

pathogène que sur certaines tranches d'âge. L'âge des lapereaux a un effet important au moment de l'inoculation d'un colibacille O103:K-:H2 sur l'expression de la maladie (Licois, 2008). Ils ont montré que, lors d'un sevrage à 31 jours, les lapereaux âgés de 28 et 35 jours sont les plus sensibles à l'expression grave de la maladie (plus de 70 % de mortalité) que l'inoculation ait lieu à 21, 28 ou 35 jours, alors que les lapereaux inoculés à 42 et 56 jours seraient moins sensibles à la colibacillose. Ces auteurs avaient alors formulé l'hypothèse de l'existence possible de récepteurs spécifiques à l'adhésion d'*E. coli* pendant une période déterminée de la vie de l'animal. Chez les espèces telles que l'homme, le porc, le rat ou les ruminants, les études ont montré que les perturbations digestives sont accompagnées d'une hausse du taux d'haptoglobine sanguin ou de la myéloperoxydase (MPO). Bien que quelques études ont été menées sur le statut sanitaire et la composition du sang chez le lapin par Bennegadi (2002) et Onifade (1999), aucune ne relie à notre connaissance le statut sanitaire du lapin aux conditions d'élevage, la variation de l'haptoglobine et de la MPO.

II. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

II.A. SCHEMA EXPERIMENTAL

L'étude a nécessité 2 lots de lapins nourris soit avec un régime déficient en fibres (ADF = 9% ; lot DF) soit avec un régime témoin (ADF = 20% ; lot T). Dix lapins au sevrage et 10 autres lapins sains (ne présentant aucun signe extérieur de maladie) de chaque lot ont été prélevés au hasard à 36, 49 et 59 jours d'âge pour les mesures de l'inflammation générale et locale, du profil bactérien et des paramètres physicochimiques du caecum. Du sang (1ml) a été prélevé dans la veine marginale de chaque animal puis centrifugé. Le plasma est conservé à -20°C pour le dosage de l'haptoglobine sérique. Des échantillons de la muqueuse caecale et de l'iléon ont été prélevés à 28 et 36 jours d'âge pour la Myéloperoxydase (MPO) et de colon à 46 et 59 jours d'âge car les résultats préliminaires sur le caecum et l'iléon ont donné des valeurs de MPO nulles ou non valides (dosage effectué selon le mode opératoire de l'UMR 1054-NGN) (**Figure 25**). Les mesures d' E_h et de pH ont été effectuées sous anesthésie (Rompun®, Imalgène®). Les prélèvements du contenu caecal ont servi au dosage des AGV, NH_3 et de la MS d'une part et à l'étude du profil de la flore (SSCP) d'autre part.

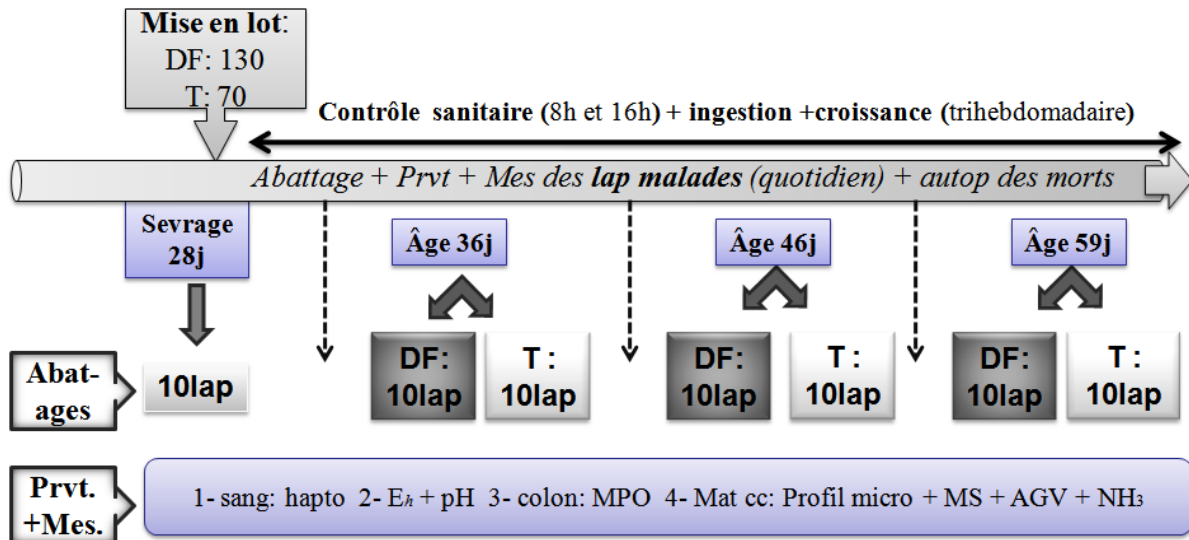


Figure 25: Schéma expérimental et chronologie des euthanasies

*T : témoin ; DF : déficient en fibres ; Lap : lapin ; Prvt : prélèvement ; Mes : mesure ; autop : autopsie ; haptoglobine ; Mat cc : matière caecale ; Profil micro : profil microbien du caecum (SSCP)

II.B. ANIMAUX, LOGEMENT ET ALIMENTATION

II.B.1. Animaux et logement

Les lapins ont été élevés en cage individuelle. Ils ont le même génotype que ceux décrits dans le chapitre 1. Ils ont aussi bénéficié des mêmes conditions environnementales. Les différents lots ont été constitués au sevrage. Les animaux ont été répartis au hasard dans les différentes cages de façon à avoir 2 lots d'animaux identiques en poids. Il a été attribué à chaque lapin une fiche d'identité sur laquelle toutes les mensurations et observations ont été effectuées. Les lapins dans cet essai n'ont bénéficié d'aucun antibiotique durant leur croissance.

II.B.2. Alimentation

Les 2 lots de lapins constitués ont été nourris à volonté, soit avec le régime déficient en fibres (DF), soit avec le régime témoin (T) couvrant les besoins des lapins en croissance. La composition de chacun de ces aliments est présentée dans le **Tableau 11**.

II.A. CONTROLE DE L'INGESTION, DE LA CROISSANCE ET DE LA MORTALITE

Tous les lapins ont été pesés le jour de la mise en lot pour avoir le poids initial. Il en a été de même pour l'aliment distribué à chaque lapin. Le suivi zootechnique a été fait par le contrôle

individuel de l'ingestion et du poids tous les lundis, mercredis et vendredis pour tous les lapins durant toute l'expérience. Les cages des animaux malades (**diarrhéiques**) ont été identifiées « M », et les animaux dont l'ingestion ou le poids ont baissé identifiés « B ».

Tableau 11: Aliments expérimentaux: ingrédients et composition chimique théorique

Ingrédients	Aliment T (g/kg)	Aliment DF (g/kg)
Son de blé fin	28,00	4,50
Blé tendre	12,00	54,10
Luzerne	34,00	7,00
Paille de blé	3,10	2,00
Tourteau de soja	6,90	18,00
Tournesol	5,20	6,20
Pulpe de betterave	8,00	2,00
Huile végétale	1,00	-
Sucre	0,00	3,00
Sel	0,50	0,50
Carbonate de calcium	0,00	0,80
Phosphate bicalcique	0,00	0,70
Méthionine	0,0	0,20
CMV	0,10	1,00
TOTAL	100,00	100,00

Composition chimique, g / kg

Amidon	125	333
MAT	163	177
CB	162	73
NDF	358	181
ADF	201	92
ADL	45	21
<i>MAD*</i>	<i>115</i>	<i>140</i>
<i>ED (Kcal/kg*)</i>	<i>2335</i>	<i>2860</i>
<i>MAD/ED (g/Mcal)*</i>	<i>49,1</i>	<i>48,9</i>

*Données calculées

II.B. MESURES ET PRELEVEMENTS REALISES AU COURS DES EUTHANASIES

II.B.1. Choix des lapins euthanasiés

Le contrôle individuel quotidien des animaux a permis de les classer en 3 groupes : les lapins **sains**, **morbides** et **morts**. Dans cette étude, deux groupes d'animaux ont été euthanasiés en fonction du statut sanitaire. Il s'agit des animaux « sains » et des animaux morbides mais uniquement ceux atteints de diarrhée préalablement identifié « M ». Les mesures d' E_h et pH ont été réalisées sous anesthésie et les prélèvements après euthanasie par injection létale de

T61. Avant l'anesthésie et l'euthanasie, les lapins ont subi dans la mesure du possible un prélèvement de sang pour le dosage de l'haptoglobine.

° Euthanasie des lapins « sains »

L'euthanasie des animaux « sains » s'est fait en ne tenant compte que de l'âge. Quatre séries ont eu lieu respectivement au sevrage à 28 jours, à 36 jours, à 46 jours et à 59 jours. L'euthanasie au sevrage a permis la collecte d'information sur les lapins nourris au lait et au granulé avant le passage au régime granulé exclusivement.

° Euthanasie des animaux malades

Les animaux identifiés B et M ont été contrôlés chaque jour (ingestion et poids), jusqu'à l'apparition de diarrhée aiguë. Tous les animaux présentant un symptôme **net de diarrhée** ont été sacrifiés en vue de réaliser des mesures de E_h , pH, et effectuer les prélèvements au niveau caecal pour l'étude du profil microbiologique et du dosage de la MS, les AGV, le NH_3 . Un morceau du côlon est également prélevé pour le dosage de la MPO.

Les animaux qui ont présenté des signes cliniques de troubles digestifs ont été autopsiés. Un "échantillonnage" de lapins morts a été constitué en parallèle pour être autopsié avec photographie des organes d'une part, et d'autre part 2 à 3 lapins morts par semaine ont été envoyés dans un cabinet vétérinaire pour une autopsie et une analyse de bactériologie (recherche *E. coli* pathogènes par exemple) et de parasitologie (coccidies).

II.B.2. Mesures prélèvements pour analyses chimiques

Les mesures de l'inflammation générale (haptoglobine) et de l'inflammation digestive (MPO) ont été effectuées sur tous les lapins euthanasiés sains et morbides.

Les mesures du E_h et pH ont été effectuées en utilisant la méthode *in vivo* après anesthésie. Les techniques de prélèvement du contenu caecal en vu des analyses microbiologique et chimiques sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre 1-matériels et méthodes.

CHAPITRE 4 : STABILITE DE LA LEVURE PROBIOTIQUE A LA GRANULATION ET A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN

I. RESISTANCE DES LEVURES A LA GRANULATION

I.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

I.A.1. Objectifs

Le lapin est classiquement nourri avec des aliments sous la forme de granulé, produit à partir d'un mélange broyé de végétaux et compressé à l'aide d'une presse. Au cours de ce processus de fabrication, la matière alimentaire est soumise à une hausse de température. Cette variation de température pourrait être à l'origine de la dénaturation de certains additifs notamment les probiotiques.

La maîtrise des apports en levure probiotique et son impact sur le lapin nécessite une connaissance de la quantité ingérée à travers l'alimentation.

Notre but est de déterminer le taux de survie d'une levure probiotique après la granulation dans une presse tournant à « sec ». les mesures ont été réalisées pour trois aliments de formulation différente, et dont on attend une température différente de granulation.

I.A.2. Choix du modèle

Il s'agissait de déterminer l'effet de la variation de la température au cours de la granulation sur la teneur des granulés en levure en fonction de la teneur en fibres de ceux-ci. Trois régimes dont un régime déficient en fibres DF et deux régimes fibreux C et T ont été testés à cet effet. Des prises de température et des prélèvements d'échantillons ont été effectués sur la farine de base des 3 régimes ainsi qu'au cours de la granulation, soit en début de granulation, en milieu de granulation correspondant environ à la granulation de la moitié de la farine de base et en fin de granulation où la température de la presse était la plus élevée. Les différents prélèvements ont été analysés pour la détermination du nombre de levures au laboratoire de microbiologie de la société LFA à Lille (France). La teneur en NDF a été effectuée à l'UMR-TANDEM de l'INRA.

I.B. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

I.B.1. Formulation des aliments

Neuf aliments ont été produits et répartis en 3 groupes en fonction de leur formule de base (**Tableau 12**).

Tableau 12: Ingrédient des mélanges de base (g/100g)

	Groupe DF	Groupe T	Groupe C
Ingrédients			
Son blé	5,2	20,3	30,9
Soja 48	19,6	10,2	0,0
Pulpe betterave	7,7	20,3	0,0
Blé	56,1	12,6	14,4
Luzerne	9,3	30,5	34,0
Paille	2,1	6,1	4,1
Tourteau tournesol	0,0	0,0	5,2
Graines soja ex	0,0	0,0	7,2
Sucre	0,0	0,0	4,1
<i>TOTAL</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>	<i>100,0</i>
NDF (%)	21	39	37

Les aliments du groupe DF sont basés sur une même formule déficiente en fibres, et contenant soit une dose de 5 g de Biosaf/kg d'aliment (DF5), soit 1 g de Biosaf (DF1), soit 0 g (DF0) (témoin DF).

Les aliments du groupe T sont basés sur une même formule susceptible de combler les besoins du lapin en croissance. Les aliments du groupe T ont bénéficié du même taux de levure que ceux du groupe DF. Ces doses étaient de 5g de Biosaf/kg d'aliment pour le T5, 1g de Biosaf pour le T1 et 0g pour le T0.

Les aliments du groupe C sont basés aussi sur une même formule pour combler les besoins du lapin en croissance, et contiennent soit une dose de 5g de Biosaf/kg d'aliment (C5), soit 1g de Biosaf (C1), soit 0g (C0). Ces aliments sont constitués d'ingrédients permettant à priori une

température de granulation supérieure à celle du groupe DF et T en raison de sa forte teneur en fibre.

La dose de 1g de probiotique par kilo d'aliment correspond à 5.10^9 à 10^{10} UFC de levure dans le kilo d'aliment.

Un prémélange de levure a été effectué à la main dans 2 kg de farine de base avant son introduction dans la mélangeuse de type ELECTRA® de capacité minimale de 30 kg et 180 kg maximum avant la granulation. Le mélange a été effectué pendant 5 min environ.

I.B.2. Granulation et prélèvements

Nous avons débuté la granulation par les 3 témoins dans le but d'éviter toute contamination qui pourrait avoir lieu dans la presse.

Un échantillon de 2 à 3 kg a été prélevé dans un récipient cylindrique isotherme de type KG W ISOTERM en premier temps juste en sortie de la presse à granulés en début, milieu (15 à 20 min après) et fin de granulation pour les aliments DF, T et C. Une sonde thermique de type QUICK L-NOVOL® a été introduite dans l'échantillon prélevé pour la prise de la température de granulation. Les températures en début, milieu et fin de granulation ont été enregistrées pour chacun de 9 aliments. Tous les échantillons qui ont servi à la prise de température ont été jetés. Toutefois les températures enregistrées pour chaque aliment ont été associées à un niveau de prélèvement à la sortie du refroidisseur. Les premiers granulés sortis du refroidisseur sont ceux qui ont été granulés en début de granulation et les derniers ceux granulés en fin de granulation (**Figure 26**).

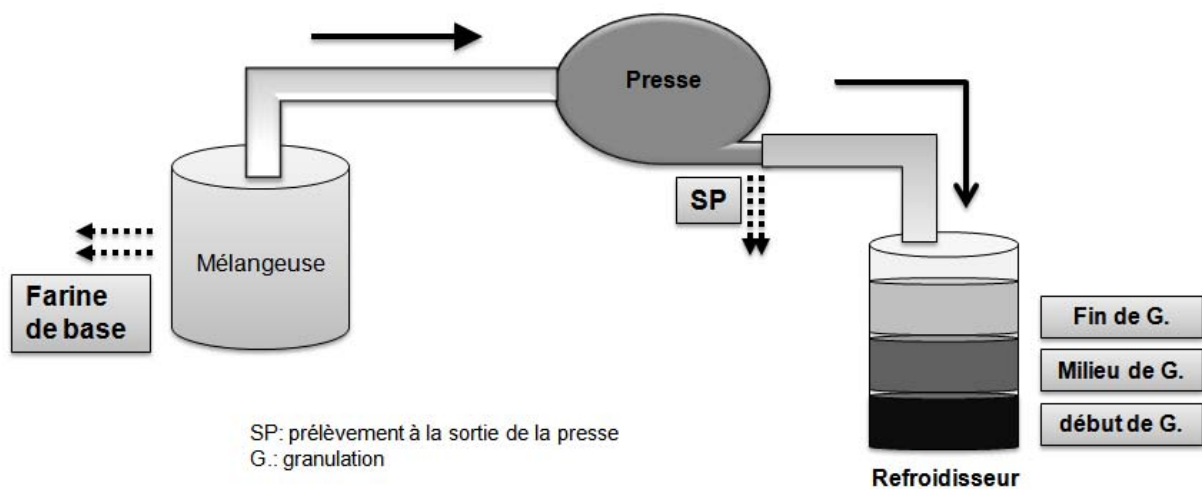


Figure 26: Schéma du processus de granulation et d'échantillonnage

Quatre prélèvements de 200 g environ par aliment ont été effectués. Le premier prélèvement est la farine de base, le second en début de granulation, ensuite en milieu et fin de granulation. Chaque prélèvement a été conservé à température ambiante dans un sac plastique avant son analyse au laboratoire de la société LFA.

Toutefois l'échantillonnage débutera pour chaque série (DF, T, C) par les aliments témoins (DF0, T0, C0) dans le but de suivre l'évolution de la température lors de la granulation, et en vue de préciser la présence ou non de levures sauvages dans les témoins après la granulation..

II. RESISTANCE DE LA LEVURE A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE

II.A. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

II.A.1. Objectifs

L'action probiotique d'un microorganisme ne serait donc possible que si celui-ci survit lors de son passage dans les différents compartiments du système digestif.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la résistance de la levure probiotique *S. cerevisiae* à la digestion du lapin ainsi que le taux d'excrétion à travers les crottes dures.

II.B. CHOIX DU MODELE

Chez le lapin, les organes cibles des probiotiques sont le cæcum et le côlon. Le probiotique doit pouvoir traverser la première partie du tube digestif (estomac et intestin grêle) pour effectuer son action. *S. cerevisiae* utilisé comme probiotique dans l'alimentation du lapin doit donc avoir une double résistance. Cette levure doit résister à la variation de la température de granulation en premier, et ensuite résister à la traversée du tube digestif notamment à la forte acidité de l'estomac. Selon la physiologie digestive du lapin, les levures ingérées qui arrivent dans le caecum sont évacuées et sont soit réingérées à travers les caecotrophes soit éliminées complètement du tube digestif à travers les crottes dures.

L'évaluation du taux de levure au niveau des différentes portions du tube digestif a nécessité des tests de dénombrements. Ces tests ont été réalisés sur plusieurs échantillons d'un même niveau de prélèvement sur des individus différents (c'est-à-dire sur du **contenu caecal**, sur

des caecotrophes et sur les crottes dures). Pour réduire les variabilités entre espèce ou éviter les différences dues à la période de prélèvement, les échantillons d'un même niveau ont été prélevés dans un intervalle de temps relativement court. Cependant les moyens techniques dont dispose notre unité d'analyse ne nous ont pas permis d'envisager le dénombrement de tous les prélèvements à la fois.

Nous avons dans cet essai évalué le taux de survie de *S. cerevisiae* dans la portion inférieure du tube digestif du lapin (**cæcum**) ainsi que dans les **caecotrophes** et dans les **crottes dures**. Nous avons dosé au préalable le taux de survie de cette levure contenue dans l'aliment après granulation.

Pour réaliser cette étude, nous avons effectué des tests préliminaires de conservation des échantillons de contenu cæcal et des crottes frais ou conservés avec ou sans conservateur.

II.C. TEST PRELIMINAIRE : CONSERVATION DES ECHANTILLONS DE DIGESTA ET DE FECES EN VUE DU DENOMBREMENT DES LEVURES

Le but de ce test était d'évaluer la durée de conservation des échantillons de matière caecale, de caecotrophes et de crottes dures de lapins nourris à l'aide d'un régime contenant des levures probiotiques. Ce test a servi de test préliminaire à l'étude de la résistance de la levure à la digestion et son taux d'excrétion.

II.C.1. Animaux, logement et alimentation

Un aliment (C10) contenant la levure a été formulé pour cet essai (**Tableau 12**). Une dose de 10 g de levures Biosaf® par kilogramme de farine a été incorporée à la farine de base formulée pour répondre aux besoins nutritionnels du lapin en croissance. Cinq lapins de 65 jours de 2 kg de poids vif et nourris *ad libitum* depuis une semaine (7 jours) au régime C10 ont été utilisés.

II.C.2. Mesures et prélèvements réalisés

Trois niveaux de prélèvements successifs (nature du prélèvement) ont été effectués sur chaque lapin (**Figure 27**):

- Prélèvement des crottes dures (Cd)
- Prélèvement des caecotrophes (Cp)

- Prélèvement du contenu caecal (Cc)

L'obtention des caecotrophes a nécessité la pose d'un collier spécifique enfin d'empêcher le lapin d'avoir accès à son anus. Chaque niveau de prélèvement a été divisé en 2 lots dont :

- Un lot de 4 échantillons de plus de 10 g chacun traité avec un conservateur (glycérol) dans une proportion de 25 % de la masse du prélèvement
- Un lot de 4 autres échantillons de 10 g chacun traité sans conservateur

Les 8 échantillons prélevés ont été analysés deux à deux (conservateur vs sans conservateur) dès le prélèvement (J0), 5 jours après (J5) et 10 jours (J10). La méthode de la culture sur gélose a été utilisée pour le comptage au laboratoire de l'UMR TANDEM (technique de comptage des levures revivifiables appliquée au laboratoire de microbiologie la société LESAFFRE à Lille). Les animaux ont été euthanasiés par injection de T61® en intracardiaque à dose 0,3ml/kg de poids vif pour le prélèvement du contenu caecal.

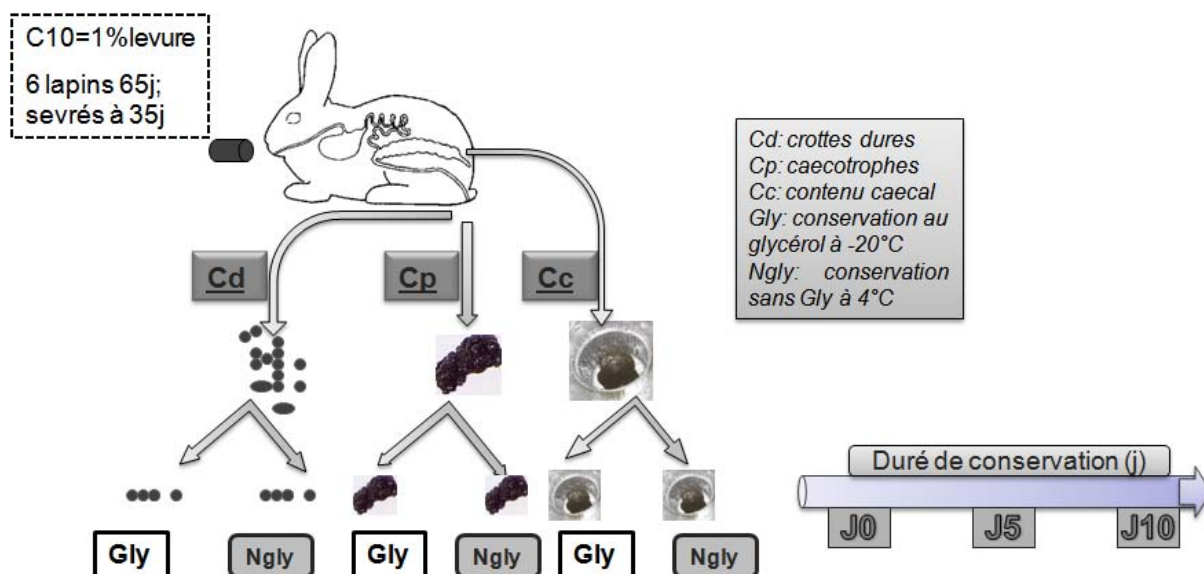


Figure 27: Schéma expérimental de l'étude de conservation des échantillons de crottes dures, de caecotrophes et de contenu caecal

II.D. ETUDE DE L'IMPACT DE LA LEVURE SUR L'ECOSYSTEME CAECAL ET SUR LES PARAMETRES ZOOTECHNIQUES DU LAPIN

Le but de ce test était d'étudier le taux de survie d'une levure probiotique au cours de son passage dans le tube digestif du lapereau sevré, son impact sur l'écosystème caecal et sur les performances zootechniques. L'étude s'est effectuée en 2 parties :

- La première partie s'est portée sur le taux de survie de la levure au niveau du cæcum, des caecotrophes et des crottes dures, ainsi que la digestibilité, les paramètres physico-chimiques et l'activité microbiologique du cæcum (**Figure 28**)
- La seconde partie, les performances zootechniques (croissance, mortalité, morbidité) entre le sevrage et l'âge d'euthanasie ont été étudiées.

◦ Animaux, logement et alimentation

La 1^{ière} partie a été réalisée en comparant 3 lots de 10 animaux élevés en cage individuelle à métabolisme, et nourris à volonté à l'aide de trois aliments expérimentaux, contenant un apport croissant de probiotique dont un témoin "C0" (sans Biosaf®), le "C1"(1 g Biosaf® / kg alim.) et le "C10"(10 g/kg).

Les animaux ont été logés dans des cages individuelles après le sevrage (35 jours) et ont suivi une phase d'adaptation pendant 7 jours durant laquelle ils ont été adaptés au port de collier plastique 1 h/jour.

◦ Mesures et prélèvements réalisés

La mesure du taux de survie au cours de la granulation a été réalisée en comparant la concentration en levures dans les 3 aliments, avant et après granulation.

L'analyse du taux de survie au cours du transit digestif a été réalisée par comparaison de la concentration en levures dans le cæcum et dans les excréta à celles provenant d'échantillons d'aliment prélevés en parallèle dans les mangeoires des animaux.

Trois prélèvements (nature du prélèvement) ont été effectués sur chaque lapin.

- Prélèvement des crottes dures (Cd)
- Prélèvement des caecotrophes (Cp)
- Prélèvement du contenu cæcal (Cc), juste après le prélèvement de caecotrophes.

Le contenu du cæcum a été obtenu à la suite d'euthanasie du lapin par injection de T61® à dose 0,3 ml/kg de poids vif.

La mesure de digestibilité des aliments a été réalisée sur une période de 4 jours. Pour chaque lapin, la première collecte de fèces dures et suivie de la pesée (poids frais) a été réalisée le matin, dont une partie a servi au dosage des levures et le reste conservé pour la digestibilité (-18°C). Les 3 collectes suivantes ont été stockées à -18°C dans un sachet identifié et taré. Le poids frais des 3 collectes a été additionné au poids de la collecte n°1, afin d'obtenir un poids

total frais excrété. Puis, les fèces dures ont été séchées selon la méthode "Europe" (24h à 80°C, + 24h à 103°C).

Puis, la semaine suivante ont été effectués les collectes de caecotrophes et les prélèvements caecaux. Chaque jour, 6 lapins ont été choisis : installation du collier à partir de 8h, puis observation et collecte de caecotrophes. Individu par individu, après collecte de caecotrophes (20 à 30g), l'animal est transféré au laboratoire pour être anesthésié, afin de procéder aux mesures et prélèvements sur le cæcum, soit dans l'ordre: le potentiel redox, le pH et la température, puis trois prélèvements de digesta en vue d'analyser les AGV, le NH₃, et étudier du profil microbiologique (CE-SSCP).

Ces mesures ont été effectuées sur 5 jours consécutifs, à raison de 6 lapins par jour (2 lapins par lot et par jour), du lundi 5 mars au vendredi 9 mars 2007.

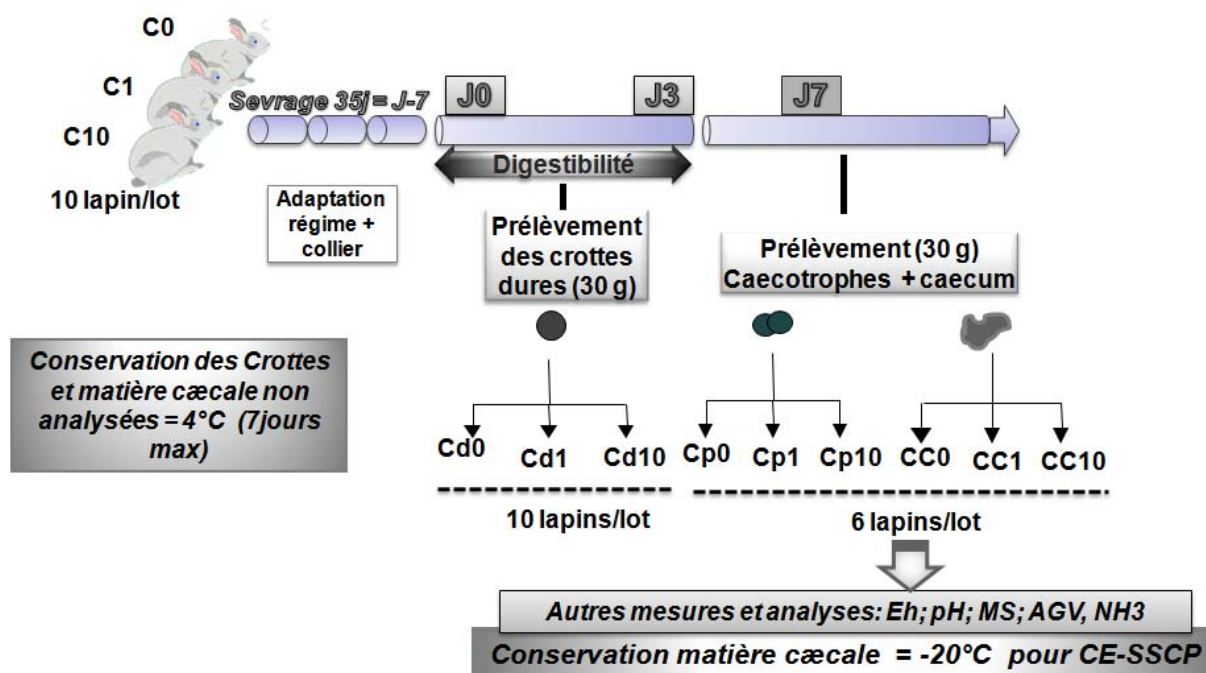


Figure 28: Schéma expérimental de l'étude de résistance de la levure à la digestion et son impact sur l'écosystème caecal

° Animaux, logement et alimentation

L'étude des performances zootechniques (croissance, ingestion, santé digestive) a été réalisée sur 3 lots de 40 lapereaux, élevés en cage individuelle du sevrage (35j) jusqu'à l'âge d'euthanasie (70 jours d'âge), et nourris à volonté avec les 3 aliments expérimentaux décrits précédemment.

Les aliments C0, C1 et C10 ont été produits à l'aide du même mélange de base. L'incorporation de la levure probiotique a été réalisée en addition au mélange de base.

° Mesures zootechniques

Des observations quotidiennes de l'état de santé des animaux ont été effectuée 2 fois par jour jusqu'à l'euthanasie. L'ingestion et la croissance individuelles ont été relevées de façon hebdomadaire.

CHAPITRE 5 : IMPACT D'UNE LEVURE PROBIOTIQUE SUR LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN ET SES PERFORMANCES, ET SUR QUELQUES PARAMETRES DE SA PHYSIOLOGIE : ETAT INFLAMMATOIRE GENERAL, BIOTOPE ET BIOCENOSE CAECALE

I. OBJECTIFS ET CHOIX DU MODELE

I.A. OBJECTIFS

Il s'agissait de déterminer si l'addition de levures a un rôle favorable sur la physiologie digestive et la santé du lapereau, lorsqu'il est soumis à un **stress alimentaire**, telle qu'une déficience en fibres reconnue pour accroître le risque de troubles digestifs.

Les différents paramètres qui ont été évalués en relation avec le taux de levure (10 g/kg) sont :

- l'effet des levures sur les **paramètres du biotope caecal** (E_h , pH, AGV) des lapins « sains » en comparaison avec ceux de lapins morbides recevant ou non un régime complémenté à la levure (0 ou 10g/kg Biosaf®)
- le **profil (PCR-SSCP) et la quantification (qPCR)** de la flore bactérienne du cæcum.
- l'état d'**inflammation générale** avant et pendant les troubles digestifs.
- les « **paramètres zootechniques** » des lapins: ingestion, croissance, santé digestive.

La première partie a été consacrée à l'étude de l'effet de la levure sur l'écosystème caecal et sur les paramètres de l'inflammation et la seconde partie à l'impact zootechnique.

I.B. CHOIX DU MODELE

Malgré de nombreuses études évoquant l'impact positif des probiotiques sur la croissance et la santé des animaux, il est encore difficile de prédire leur efficacité et de comprendre leur mode d'action.

Lors des études précédentes, nous avons montré que certains paramètres du biotope (E_h , pH, le taux de MS) et de la biocénose caecale, ainsi que des paramètres de l'inflammation variaient en fonction de l'âge ou du régime (taux de fibres) ou encore de l'état de santé des lapins. Nous avons pu constater que lorsque le régime était complémenté avec au moins 1g de levure/kg d'aliment, l' E_h augmentait contrairement au pH qui restait inchangé. D'autre part, l'addition de

levure (10g/kg) réduisait la mortalité par troubles digestifs. Il était question dans ce chapitre de confirmer les variations observées dans les études précédentes, et en particulier de préciser l'impact de la levure sur les paramètres du biotope (redox et pH), de l'inflammation générale et de la santé digestive des animaux (morbidité et mortalité par troubles digestifs) à différents stades physiologiques et différents statuts nutritionnels.

II. MOYENS EXPERIMENTAUX GENERAUX

II.A. SCHEMAS EXPERIMENTAUX

Un schéma factoriel à 2x2 niveaux a été utilisé. Le premier facteur est l'aliment caractérisé selon sa teneur en fibre définissant le statut nutritionnel du lapin. Nous avons donc un aliment déficient en fibres (DF) et un aliment ayant une teneur normale en fibres (T). Le second facteur est la complémentation ou non en levure. Nous avons défini ainsi 4 aliments dont le chiffre qui précède le code de la teneur en fibre (DF ou T) indique la supplémentation ou non de ceux-ci en levure (DF0, DF10, T0, T10).

II.B. ANIMAUX, LOGEMENT ET ALIMENTATION

Quatre aliments ont été constitués à partir de 2 aliments de base (**Tableau 13**) :

Un lot DF0 dont le régime est déficient en fibres sans levure (lot DF0),

Un lot DF10 dont le régime est supplémente de 10 g de levure Biosaf®/kg (lot DF10),

Un lot T0 dont le régime dit témoin est sans levure (lot T0)

Un lot T10 dont le régime est supplémente de 10 g de levure Biosaf®/kg

Cette étude a nécessité un total de **168** lapereaux, sevrés à 28 j, qui ont été élevés en cages collectives d'engraissement à raison de 6 lapins par cage, soit:

48 animaux nourris avec l'aliment DF0 (lot DF0, 8 cages),

48 animaux nourris avec l'aliment avec DF10 (lot DF10, 8 cages)

36 animaux nourris avec l'aliment T0 (lot T0, 6 cages)

36 animaux nourris avec l'aliment T10 (lot T10, 6 cages)

Les lapins ont été nourris du **sevrage (28 jours d'âge)** à **59** jours avec ces différents aliments.

Tableau 13: Aliments expérimentaux: ingrédients et composition chimique théorique

Ingrédients	Aliment T (g/kg)	Aliment DF (g/kg)
Son de blé fin	280,0	45,0
Blé tendre	125,0	546,0
Luzerne	340,0	70,0
Paille de blé	31,0	20,0
Tourteau de soja	69,0	180,0
Tourteau de tournesol	52,0	62,0
Pulpe de betterave	80,0	20,0
Huile végétale	10,0	-
Sucre	0,0	30,0
Sel	5,0	5,0
Carbonate de calcium	0,0	8,0
Phosphate bicalcique	0,0	7,0
Méthionine	3,0	2,0
CMV	5,0	5,0
TOTAL(g)	1000,00	1000,00

Composition chimique théorique

MS%	90,4	90,2
*Amidon g/kg	125	333
MAT (g/100gMS)	19,0	21,1
Cellulose brute (g/100gMS)	16,1	7,1
NDF	44,8	20,4
ADF	21,5	9,0
ADL	5,3	2,0
*MAD	115	140
*ED (Kcal/kg)	2335	2860
*MAD/ED (g/Mcal)	49,1	48,9

*Valeurs obtenues par calcul

II.C. CONTROLE DE L'INGESTION, DE LA CROISSANCE ET DE LA MORTALITE

Le suivi zootechnique a été fait par le contrôle individuel de l'ingestion et du poids tous les mardis et vendredis pour tous les lapins durant toute l'expérience. Les cages des animaux malades (**diarrhéiques**) ont été identifiées « M », et les animaux dont l'ingestion ou le poids ont baissé notés « B ».

II.D. MESURES ET PRELEVEMENTS REALISES AU COURS DES EUTHANASIES

Des mesures et des prélèvements ont été effectués sur les lapins sains à 36 et 58 jours d'une part et d'autre part sur les lapins morbides sur toute la durée d'élevage.

II.D.1. Choix des lapins

Le contrôle individuel quotidien des animaux a permis de les classer en 3 groupes : les lapins **sains**, **morbides** et **morts**. Dans cette étude, deux groupes d'animaux ont été euthanasiés en fonction du statut sanitaire. Il s'agit des animaux « sains » et des animaux morbides mais uniquement ceux atteints de diarrhée préalablement identifiés « M ». Les mesures d' E_h et pH ont été faites sous anesthésie et les prélèvements après euthanasie par injection létale. Avant l'anesthésie et l'euthanasie, les lapins ont subi dans la mesure du possible un prélèvement de sang pour le dosage de l'haptoglobine.

° Euthanasie des lapins « sains »

L'euthanasie des animaux « sains » s'est fait en ne tenant compte que de l'âge. Deux séries ont eu lieu respectivement à 36 jours (36-38 jours) et à 58 jours (58-60 jours). Pour des dispositions liées au nombre et à la durée des prélèvements, l'euthanasie a été étendue sur 3 jours pour chacune des séries. Dix lapins par lot ont été euthanasiés pour chaque série.

° Euthanasie des animaux malades

Les animaux identifiés B et M ont été contrôlés chaque jour (ingestion et poids), jusqu'à l'apparition de diarrhée aiguë. Tous les animaux présentant un symptôme **net de diarrhée** ont été sacrifiés en vue de réaliser des mesures de E_h , pH et effectuer les prélèvements au niveau caecal pour l'étude du profil microbiologique et du dosage de la MS, les AGV, le NH_3 . Un échantillon du côlon est également prélevé pour le dosage de la MPO (**Figure 29**).

Les animaux qui ont présenté des signes cliniques de troubles digestifs aigus ont été autopsiés. Un "échantillonnage" de lapins morts a été constitué en parallèle pour être autopsié avec photographie des organes d'une part, et d'autre part 2 à 3 lapins morts par semaine ont été envoyés dans un cabinet vétérinaire pour une autopsie et une analyse de bactériologie (recherche *E. coli* pathogènes) et de parasitologie (coccidies).

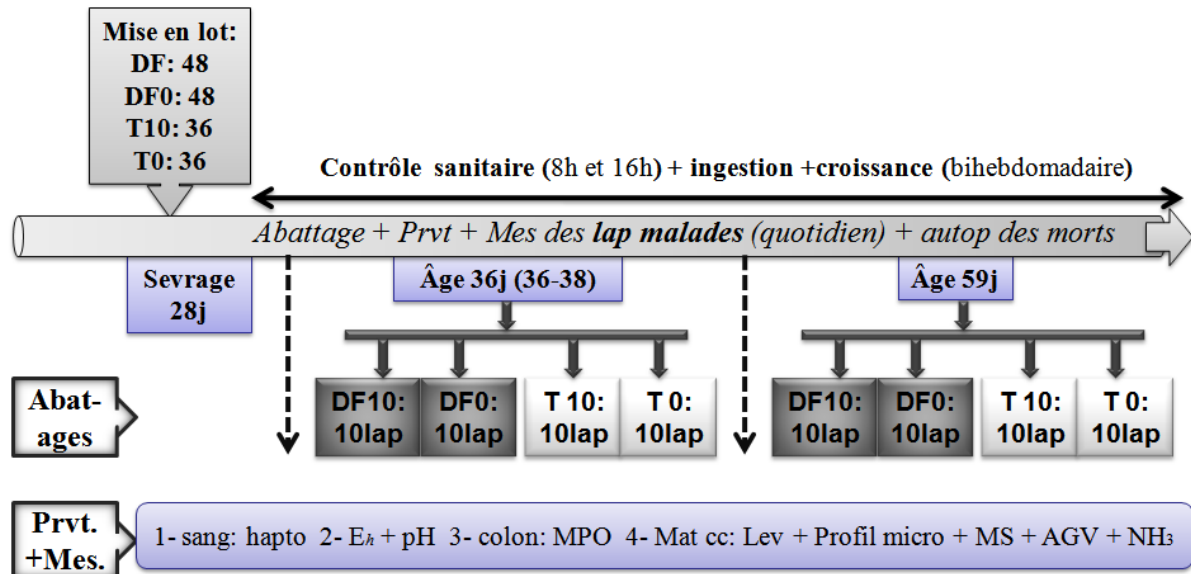


Figure 29: Schéma expérimental et chronologie des euthanasies

*T : témoin ; DF : déficient en fibres ; Lap : lapin ; Prvt : prélèvement ; Mes : mesure ; autop : autopsie ; hapto : haptoglobine ; Mat cc : matière caecale ; Profil micro : profil microbien du caecum

II.D.2. Dosage du niveau d'inflammation

Les mesures de l'inflammation générale (haptoglobine) et de l'inflammation digestive (MPO) ont été effectuées sur tous les lapins euthanasiés sains et morbides.

Les mesures du E_h et pH ont été effectuées en utilisant la méthode *in vivo* après anesthésie. Les techniques de prélèvement du contenu caecal en vue des analyses microbiologique et chimiques sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre 1.

II.D.3. Contrôle de la dose de levures ingérée

En vu de s'assurer de la dose de levure ingérée réellement par les lapins ainsi que celle qui a résisté à la digestion, nous avons procédé à l'analyse des aliments après la granulation et du contenu caecal. Un prélèvement du contenu caecal de 3 animaux bénéficiant de la supplémentation en levure (T10 et DF10) a été fait et le dosage de la quantité de levure effectuée pour chaque tranche d'âge (36 et 58 jours).

III. MESURES ZOOTECHNIQUES

III.A. OBJECTIFS

L'objectif de la précédente partie était de préciser l'impact de la levure sur les paramètres du biotope (redox et pH), de l'inflammation générale (haptoglobine) et des performances zootechniques (croissance, morbidité et mortalité par troubles digestifs).

Le présent protocole avait pour but d'augmenter l'effectif d'animaux en expérimentation pour mesurer avec plus de précision les paramètres de croissance et de santé digestive du lapereau.

III.B. ANIMAUX ET ALIMENTATION

Dans cette étude seul le nombre de lapin mis en jeu et la densité ont changé par rapport au schéma de la partie II. 160 lapereaux, sevrés à 29 jours (lundi), qui ont été élevés en cages collectives d'engraissement (5 lapins par cage) ont été utilisés, soit:

- 45 animaux nourris avec l'aliment DF0 (lot DF0, 9 cages),
- 45 avec DF10 (lot DF10, 9 cages)
- 35 avec T0 (lot T0, 7 cages)
- 35 avec T10 (lot T10, 7 cages)

L'essai a été conduit du **sevrage à 29 jours à 60 jours**. Les animaux morts au cours de l'essai ont été autopsiés sur place ou envoyés dans un cabinet vétérinaire pour une analyse bactériologique.

RÉSULTATS
ET
DISCUSSIONS

CHAPITRE 1 : MESURE DU POTENTIEL REDOX DANS LE CÆCUM DU LAPIN: PREMIERS RESULTATS METHODOLOGIQUES

L'objectif de cette étude est la mise au point et la validation d'une méthode de mesure du potentiel redox dans le cæcum du lapin. Elle conduira à l'estimation du niveau d'anaérobiose du cæcum du lapin en croissance.

Ces résultats trouveront leur application ultérieurement dans l'étude de l'impact de l'addition d'une flore exogène sur le niveau d'anaérobiose du cæcum et ses conséquences nutritionnelles, sanitaires et zootechniques sur le lapin.

Pour mieux cerner les variations de paramètres physiques et chimiques du contenu caecal dans son ensemble, les mesures ont été effectuées sur 3 périodes de la journée distribuées en fonction de la caecotrophie.

Dans ce chapitre, nous présenterons les résultats de ces travaux préliminaires puis les résultats de validation des mesures du potentiel redox dans le cæcum du lapin proprement dit.

I. RESULTATS DES TRAVAUX PRELIMINAIRES

Le dispositif de mesure du E_h caecal a été inspiré de celui mis au point pour le rumen de la vache (Marden et *al.*, 2005). Cependant, la consistance pâteuse et homogène du contenu caecal rend impossible la mesure dans la phase liquide, contrairement au rumen. Pour faire les mesures d' E_h caecal sans contamination par l'air ambiant, 3 possibilités s'offraient à nous :

- 1- Comme pour le rumen, l'une des possibilités était de procéder *via* la cannulation caecale du lapin. Le contenu caecal serait prélevé dans un vase de mesure dans lequel le vide serait préalablement fait. Le contenu caecal tomberait dans le vase par gravité (lapin dans un hamac). Ce dispositif aurait l'avantage de faire des mesures continues sur le même animal et à plusieurs reprises. Par contre la canulation caecale ne peut se faire sur un lapin de moins de 1 kg. Il n'est donc pas possible de mesurer le E_h autour de la période du sevrage, qui est une période clé pour la sensibilité aux troubles digestifs.
- 2- Mesure ex-vivo. Il s'agit d'une euthanasie de l'animal en vue d'un prélèvement rapide du cæcum entier, pour des mesures qui se feraient avec des dispositions pour éviter le contact du contenu caecal avec l'air. Mais ce dispositif augmente le délai avant la prise de mesure. Ce qui pourrait être une source d'erreurs.

3- Mesure in situ sur un lapin **anesthésié** ou **euthanasié**. Cette méthode à l'avantage d'être simple et rapide. Elle fera l'objet d'une pré-étude (*cf.* ci-après)

I.A. MESURE IN SITU SUR ANIMAL ANESTHESIE

Cette expérience préliminaire consiste à faire des mesures de pH, de Température et de E_h à intervalle de temps de 5 min sur 3 lapins afin de fixer grossièrement les conditions techniques de prélèvement, et les durées de mesure pour le E_h . Aucune analyse statistique dans cette étude préliminaire n'a été réalisée en raison de l'effectif réduit de lapins utilisés (3 lapins).

I.A.1. Potentiel redox (E_h)

Le E_h baisse rapidement de -60 mV (de -120mV à -180 mV) dans le 1^{er} quart d'heure avant de se stabiliser jusqu'à la fin des mesures. La valeur du E_h en début de mesure (-120 mV à 2min) est plus élevée de 45 mV que celle à 10 min. Par contre les valeurs enregistrées entre la 15^{ème} et la 35^{ème} min sont sensiblement identiques ; la moyenne de la mesure à 15, 20 et 35 min est de -176 mV (**Figure 30**).

I.A.2. pH

Le pH croît légèrement (+ 0,2 unité-pH) jusqu'à 10 min et reste pratiquement constant jusqu'au temps +35 min, avec une moyenne de 6,2 mais avec une grande variabilité (écart-type :0,3 à 0,4) (**Figure 30**).

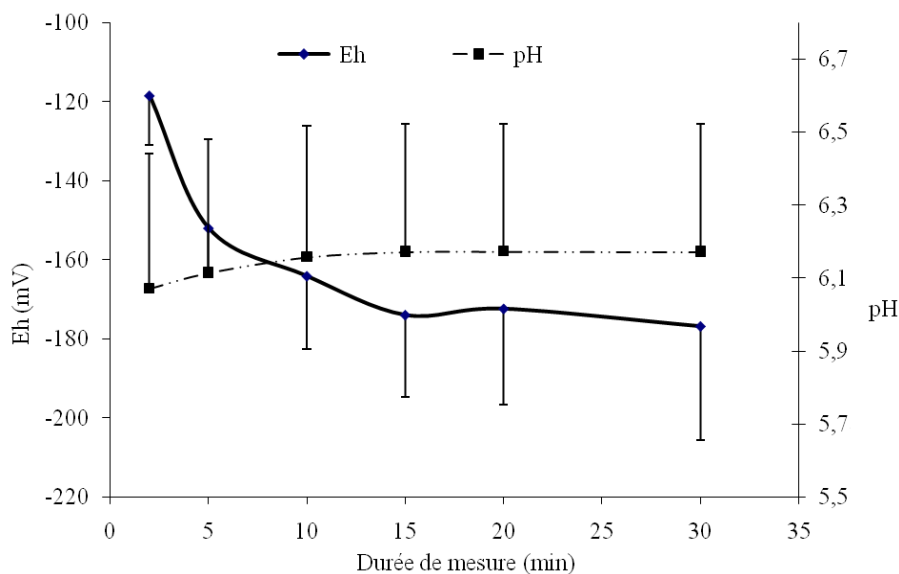


Figure 30: Variation du potentiel redox et du pH en fonction de la durée de mesure (n = 3 lapins)

I.B. INTERROGATIONS ET DISCUSSION

I.B.1. E_h caecal

La baisse du E_h avec le temps pourrait s'expliquer par 2 raisons : une entrée d'air dans le contenu caecal en début et/ou le temps de stabilisation de l'électrode de mesure.

L'incision du caecum et l'introduction des électrodes dans le milieu caecal s'accompagneraient probablement d'une contamination du milieu caecal par l'air ambiant ce qui justifierait la forte valeur d' E_h en début de mesure. L'oxygène contenue dans l'air introduit est rapidement consommée par les bactéries anaérobies facultatives caecales à l'origine de la baisse du E_h entre l'insertion des électrodes et la 15^{ème} min de mesure (Broberg, 1957). La chute du E_h pourrait être aussi attribuée au temps de stabilisation de l'électrode de mesure dans le contenu caecal pâteux (20 à 23 %MS) car la mesure du E_h se réalise à l'aide de 2 demi-piles constituées chacune d'une électrode et d'un soluté relié entre eux par un pont salin qui permet d'échanger des ions. L'établissement de ce pont salin et l'échange des ions seraient probablement freinés par la viscosité caecale et mettraient plus de temps à se réaliser dans le contenu caecal en raison du taux de MS élevé (20-23%MS) (Gidenne *et al.*, 2004). Ce temps nécessaire donc à l'établissement du pont salin et de l'optimum d'échanges d'ion se situerait au-delà de 15 min.

I.B.2. Pourquoi la grande variabilité du pH caecal ?

La variabilité des valeurs enregistrées lors de la mesure du pH caecal pourrait être due à un effet individu, par exemple lié au délai entre le repas précédent et la mesure. Le pH moyen (6,1) est sensiblement identique à ceux observés dans la littérature sur les lapins sains ou sevrés nourris avec un régime normal (Bennegadi, 2002; Gidenne *et al.*, 2004; Gidenne & Licois, 2005).

I.C. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La chute du E_h dès le début de la prise de mesure et sa stabilisation à -174 mV (15 à 20 min) proviennent soit de la contamination du milieu caecal par de l'oxygène, soit correspond au temps nécessaire pour la stabilisation de l'électrode de mesure. Le temps minimum de stabilisation serait entre 15 et 20 min, à partir duquel le E_h moyen est de -174 ± 24 mV et le pH de $6,1 \pm 0,4$.

La méthode de mesure *in situ* est celle qui servira de base pour les études à venir et le délai de mesure serait au moins de 15 à 20 min. La validation de la mesure du E_h caecal sera effectuée sur un effectif plus élevé

II. MESURE IN SITU DU POTENTIEL REDOX DANS LE CÆCUM DU LAPIN, COMPARAISON DE DEUX METHODES : METHODE *POST MORTEM* VS METHODE *IN VIVO*

L'objectif est la mise au point d'un dispositif de mesure simultané du E_h , pH et de la température du contenu caecal afin de valider la méthode de mesure du E_h chez le lapin. Pour mieux cerner le temps de stabilisation de l'électrode de mesure ou le retour à l'état d'anaérobiose réel, les mesures ont été effectuées sur 35 min. Nous avons comparé 2 méthodes de mesure à savoir la méthode de mesure sous anesthésie (*in vivo*) et la méthode de mesure sur l'animal euthanasié (*post mortem*) en vue de vérifier, si l'euthanasie ne pouvait pas influencer les caractéristiques de l'écosystème caecal au cours des 35 min de mesure. Ces 2 méthodes ont été étudiées sur 3 périodes de mesure en raison du comportement alimentaire du lapin : 8h-10h et 12h -14h correspondent théoriquement à la période de caecotrophie (excrétion et ingestion des caecotrophes), et 17h-19h celle d'excrétion de crottes dures. 34 lapins âgés Californien x Néo-zélandais de 60 jours et de $2,3 \pm 0,2$ kg de poids moyen ont été utilisés. Le gain moyen quotidien de poids durant la semaine qui a précédé la prise de mesure était de 45 ± 21 g/j par animal.

II.A. RESULTATS

Il n'y a pas d'interaction significative entre la méthode, la période et la durée de mesure.

II.A.1. Résultats méthodologiques

Comme précédemment les valeurs d' E_h baissent significativement pendant la prise de mesures pour chacune des 2 méthodes utilisées. Cette baisse est de 60 mV pendant les 15 premières minutes, puis les valeurs se stabilisent à -220 mV entre 20 et 35 min après l'incision du caecum (**Figure 31**). Toutefois les valeurs de E_h à 5 et 10 min ne sont pas significativement différentes de celles enregistrées à 2 min ni de celles qui sont comprises entre 15 et 35 min.

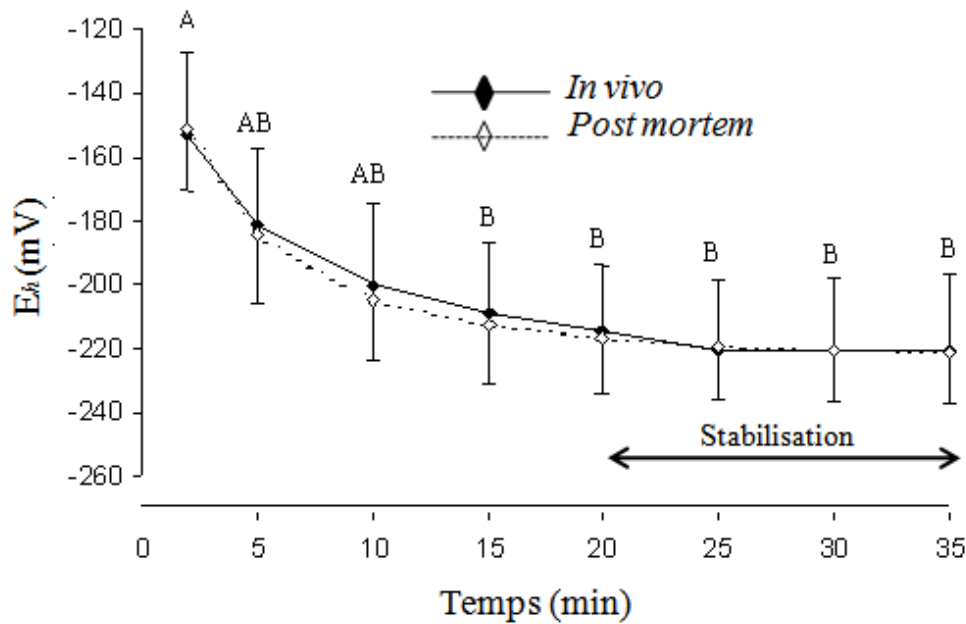


Figure 31: Cinétique du potentiel redox dans le contenu caecal selon de 2 méthodes de mesures : *in vivo* vs *post mortem*

* Moyennes et écart-types pour 17 répétitions par point (3 périodes de mesure combinées), AB les valeurs affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,001$)

La méthode de mesure et la période n'influence pas significativement l' E_h du caecum (Tableau 14). L'écart entre les moyennes ΔE_h (5min-35min) est 7 fois plus grand que celui entre 20 et 35 min [ΔE_h (20min-35min) = 2 mV vs ΔE_h (5min-35min) = 14 mV].

Tableau 14: Effet de la méthode et de la période de mesure sur les valeurs d' E_h , de pH et de température du contenu caecal

	M		P			Signification				
	Post-mortem	In vivo	0800-1000h	1200-1400h	1700-1900h	RMSE	M	P	DM	M × P
n	17	17	12	12	10					
E_h (mV)	-204	-206	-196	-205	-208	10	0.96	0.31	<0.01	0.74
pH	5.9	6.0	5.8	6.0	6.1	0.0	0.66	0.22	1	0.62
T (°C)	37.2	38.9	38.2	37.8	38.2	0.3	<0.01	0.43	1	0.38

† Abréviations: M: méthode, P: période de mesure, DM: durée de mesure, n: nombre de lapins, T: température,

*Les interactions DM×M:P×DM:P×M×DM: P = 1

La **figure 32** montre que le pH par contre ne varie pas significativement avec la durée de mesure. Le E_h et le pH ne varient pas significativement quelles que soient la méthode et la période de mesure choisie. Le E_h et le pH moyen sont respectivement de 205 ± 21 mV et $6,0 \pm 0,3$. La variation de pH (ΔpH) pendant les 35 min de mesure est de 0,1.

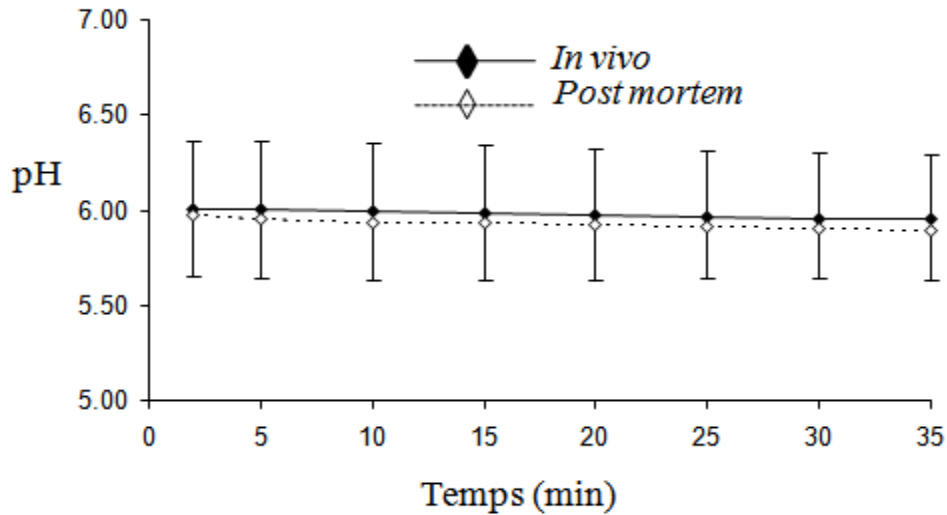


Figure 32: Cinétique du pH dans le contenu caecal selon 2 méthodes de mesures : in vivo vs post mortem

*Moyennes et écart-types pour 17 répétitions par point

II.A.2. Effet de la méthode et de la période de mesure sur la température caecale

Contrairement aux E_h et pH, la température du contenu caecal est influencée par la méthode de mesure. Elle est 2°C plus élevée lorsque le lapin est maintenu vivant sous anesthésie (méthode in vivo) que lorsqu'il est euthanasié immédiatement après anesthésie (méthode post mortem). Les moyennes sont respectivement 37°C et 39°C en post mortem et en in vivo ($P < 0,01$). Elle ne varie pas au cours des mesures pour les 2 méthodes d'étude (**Figure 33**). Les variations moyennes de la température caecale pendant les 35 min de mesure sont respectivement de 0,4°C et 0,1°C pour la méthode post mortem et in vivo.

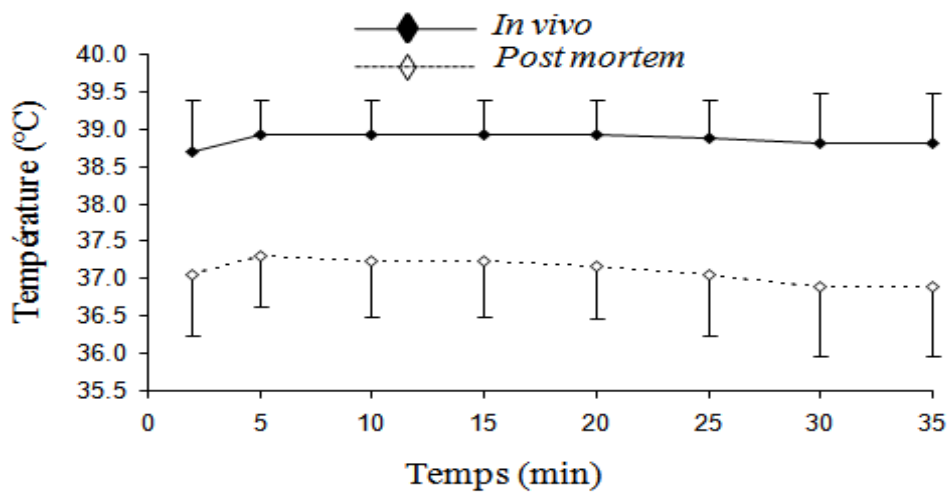


Figure 33: Cinétique du potentiel redox dans le contenu caecal selon de 2 méthodes de mesures : in vivo vs post mortem

II.A.3. Relation entre E_h et pH dans le caecum

La **figure 34** montre que le E_h peut s'exprimer en fonction du pH ($P < 0,01$). Cependant le coefficient de corrélation entre ces 2 paramètres est faible ($r^2 = 0,22$).

Il n'y a par contre pas de corrélation significative entre le E_h et la température, ni entre le pH et la température caecale.

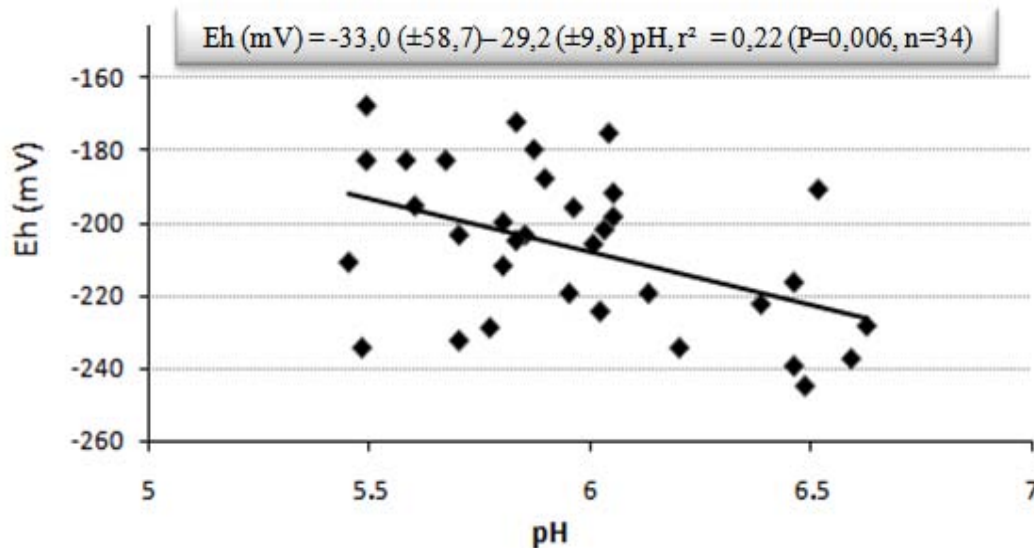


Figure 34: Relation entre le E_h et le pH à la stabilisation (moyenne entre 20 et 35 min) du contenu caecal à 10 semaines d'âge

II.A.4. Effet de la méthode et de la période de mesure sur l'activité fermentaire caecale

La méthode de mesure et l'heure n'ont pas eu d'effet significatif ni sur les teneurs caecales en MS ni sur les concentrations en AGV (**Tableau 15**). Le contenu caecal présente une teneur moyenne en MS et en AGV totaux respectivement de 22 % et 110 mmol/l. Les proportions d'acétate (C_2) de butyrate (C_4) et de propionate (C_3) sont respectivement de 77, 17 et 5 % des AGV totaux. La proportion molaire de C_2 est 4,5 fois celle du C_4 et 15,7 fois celle du C_3 caecal.

Il existe une corrélation significative entre le E_h et la concentration en AGV totaux, mais avec un r^2 faible. L'équation de la droite correspondante est : $Eh = -248 (\pm 17) + 0,4 (\pm 0,2) AGV$ ($P = 0,02 ; r^2 = 0,16$).

Par contre, il n'y a pas de corrélation significative entre E_h et concentration en NH_3 et pH.

Tableau 15: Caractéristiques de l'activité fermentaire cœcale en fonction de la méthode et de l'heure de la mesure

	M		P			RSEM	Signification		
	<i>In-vivo</i>	<i>Post-</i>	0800-	1200h1	1700-		M	P	P×M
		<i>mortem</i>	1000h	400h	1900h				
MS (%)	22,2	22,1	22,2	22,4	21,7	1,8	0,83	0,72	0,96
AGV total (mMol/l)	111,1	108,7	112,7	110,3	105,7	18,7	0,75	0,64	0,38
Acétate (%)	77,1	77,1	76,0	77,5	78,1	4,4	0,95	0,54	0,93
Propionate (%)	5,0	5,2	4,8	5,4	5,1	1,0	0,73	0,49	0,64
Butyrate (%)	17,1	16,9	18,4	16,3	16,1	4,4	0,98	0,41	0,86
Butyrate/Propionate	3,5	3,4	4,0	3,2	3,3	1,2	0,93	0,26	0,48

† Abréviations: M: méthode, P: période de mesure, MS; matière sèche, AGV : acides gras volatils,

La variabilité (CV %) des mesures de E_h , pH, température, AGV et MS est respectivement de 5,1, 0,8, 0,7, 17 et 8,6%.

II.B. DISCUSSION

Les caractéristiques physico-chimiques d'un biotope (E_h , pH, température, O_2 , CO_2 , etc.) jouent un rôle important dans l'activité microbienne. Une baisse du pH se traduit par une hausse du E_h (Broberg, 1957). Dans le rumen, une « acidification » du milieu ou une augmentation du E_h (soit une hausse de la pression partielle d'oxygène) serait favorable aux microorganismes anaérobies facultatifs au détriment des anaérobies stricts.

II.B.1. Effet de la caecotrophie : période de mesure

Notre étude montre que la prise du pH ou de la température cœcale, de manière ponctuelle, ou continue jusqu'à 35 min après l'introduction des électrodes de mesure est possible et n'affecte pas leurs valeurs. Ces 2 paramètres ne varient pas en fonction de l'heure de mesure dans la journée ou par rapport au délai postprandial (caecotrophie). Le E_h bien qu'il varie significativement au cours des 35 min de mesure n'est pas non plus influencé par l'heure de mesure dans la journée. Les résultats ici montrent que l'arrêt de l'ingestion d'aliments pendant la période de caecotrophie affecte peu les caractéristiques physiques du caecum, contrairement aux études précédentes de Bellier et *al.* (1995). Ces auteurs ont en effet constaté une variation du pH et des AGV du contenu caecal en fonction de l'heure. De même, des travaux récents montrent que dans le rumen de la vache, le E_h et le pH variaient après le repas respectivement de plus 20 mV et de moins 0,4 unité de pH (Marden, 2007 ; Marden *et*

al., 2008), ce qui est logique compte tenu de la position "amont" du rumen dans le tube digestif; par rapport au caecum .

II.B.2. Effet de la méthode

Nous n'avons pas décelé de différence entre les 2 méthodes de mesure du E_h . La chute du E_h en début de mesure, comme nous l'avons supposé précédemment serait probablement liée au temps de stabilisation de l'électrode qui se situerait à 20 min après l'insertion dans la matière caecale. La matière caecale constituant la seconde demi-pile par son aspect pâteux (contrairement au jus ruminal) laisserait passer difficilement les électrons et les ions. Dans notre travail, la stabilisation du E_h constatée correspondant à l'optimum d'échange d'électrons entre la matière caecale et la référence est de 20 min, temps à partir duquel les moyennes diffèrent très peu l'une de l'autre ($\Delta E_h = 2$ mV). Des résultats similaires ont été obtenus dans le rumen où le temps nécessaire pour la stabilisation des électrodes de mesure de E_h est de 25 min bien que le contenu soit liquide (Andrade *et al.*, 2002).

On ne peut cependant exclure qu'une contamination par l'air ambiant lors de l'insertion des électrodes de mesure, conduirait à un E_h élevé qui baisserait dans les minutes qui suivent. Cependant, sachant qu'en parallèle le pH, sensible à la teneur en CO_2 de l'air ne varie pas, cette hypothèse nous semble moins forte. Néanmoins, pour le rumen de la vache, Marden (2007) constate une remontée du E_h . Ruminal de plus 20 mV qui serait due à une entrée d'air dans le rumen pendant l'ingestion, l'abreuvement ou pendant la mastication.

Les données d' E_h montrent que le milieu caecal sain est très anaérobie et très réduit. Ces données confirment celles obtenues respectivement dans le caecum (-200 mV) et le côlon (-220 mV) de la chèvre par Marounek *et al.* (1987) et dans le rumen de la vache tarie (environ -206 mV) par Marden *et al.* (2005). Par comparaison, le E_h caecal du lapin est plus bas que celui du rumen plus accessible à l'air ambiant dont le E_h est compris entre -174 et -210 mV chez la vache tarie (Marden, 2007). Par contre le E_h caecal est identique à celui du côlon de la chèvre moins exposé à l'air ambiant (Marounek *et al.*, 1987). Ceci conforte le fait que le milieu caecal est plus réducteur et plus anaérobie que le milieu ruminal qui est constamment contaminé par l'air ambiant lors de l'ingestion. Mais l'entrée d'air ou d' O_2 ambiant n'expliquerait à elle seule cette variation. Car si l' O_2 est utilisé comme accepteur exogène d'électrons dans la respiration aérobie, d'autres ions tels que le nitrate (NO_3), le sulfate (SO_4^{2-}), le fer ferrique (Fe^{3+}) ou le CO_2 jouent ce rôle pour la respiration anaérobie. De plus, le

substrat énergétique peut aussi être oxydé et dégradé sans nécessiter l'intervention d'un accepteur exogène dans le cas de la fermentation.

D'une manière générale le E_h varie d'une espèce à une autre. Les données sont aussi variables au sein de la même espèce. Chez le mouton, il varie entre -103 et -260 mV (Broberg, 1957; Barry *et al.*, 1977; Mathieu *et al.*, 1996) et de -136 à -171 chez un castrat (Broudiscou *et al.*, 2001). Chez la chèvre les variations observées sont de -128 à -220 (Marounek *et al.*, 1982; Marounek *et al.*, 1987 ; Andrade *et al.*, 2002). **Les valeurs du E_h et les microorganismes colonisateurs de ces biotopes sont par conséquent susceptibles d'être différents selon l'espèce, le statut physiologique et le statut sanitaire de l'animal.**

II.B.3. Relation entre le E_h , pH et AGV

Les corrélations entre le E_h et le pH et entre le E_h et les AGV, montrent que les réactions biochimiques du contenu caecal sont tributaires des couples redox présents dans le milieu. Des corrélations significatives entre le pH et E_h ont été aussi observées chez les ruminants par Baldwin & Emery (1960), Marounek *et al.* (1987) et Giger-Reverdin *et al.* (2006) avec des coefficients de corrélation plus élevés (0,64 à 0,71) ainsi que les pentes (-60 à -70).

Le pH caecal est conforme aux données de la littérature dont les mesures ont été faites sur des lapins du même âge (10 semaines) (Bellier *et al.*, 1995; Gidenne *et al.*, 2004). Les données de pH enregistrées avec les 2 méthodes montrent qu'il n'y a pas de contamination du contenu caecal par le CO_2 atmosphérique pendant les mesures. En effet, chez le ruminant, le pH du rumen dépend de la pression partielle de CO_2 dans le milieu. Lorsque le pH est mesuré dans un milieu exposé au CO_2 , la valeur obtenue est plus élevée en raison de la réduction de la quantité des ions H^+ disponibles. C'est pourquoi, il est recommandé d'éviter toute contamination par l'air ambiant lors du relevé de pH et d' E_h ruminal (Marden *et al.*, 2005)

La concentration et les proportions d'AGV sont conformes aux observations sur les lapins de 10 semaines d'âge (Bellier *et al.*, 1995; Carabaño *et al.*, 2006, Falcao-E-Cunha *et al.*, 2006). Le ratio positif butyrate/propionate est supérieur à 1, contrairement aux ruminants et chez la majorité des monogastriques, comme l'avaient déjà constaté Gidenne (1986) et Garcia *et al.* (2000). Cette inversion du rapport butyrate/propionate s'expliquerait par la population plus importante de bactéries du groupe Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides productrices de butyrate que celles productrices de propionate (Bennegadi, 2002).

L'usage de la méthode post-mortem pour la mesure du E_h engendre une perte de 2 °C de la température du milieu cæcal par rapport à la méthode in vivo. Cependant, cette baisse de température ne semble pas modifier l'activité fermentaire de la biocénose caecale.

L'heure de mesure n'a pas d'effet majeur sur les paramètres physico-chimiques cæcaux mesurés ici (pH, E_h , AGV). Ceci pourrait s'expliquer par le rythme d'ingestion assez régulier chez le lapin sub-adulte nourri à volonté qui ne présente pas d'absence marquée de repas.

II.C. CONCLUSIONS

La mesure du E_h dans les conditions anaérobies strictes peut se réaliser chez le lapin à l'aide de la méthode in vivo et de la méthode post-mortem. Cependant, le délai minimum recommandé pour les mesures est de 20 min, correspondant au temps de stabilisation des électrodes. La valeur moyenne de E_h attendu pour des lapins de 10 semaines est de -220 ± 20 mV. Le E_h est faiblement corrélé avec le pH ($r^2 = 0,22$) et les AGV totaux ($r^2 = 0,16$).

En perspectives, le E_h cæcal devrait être associé à d'autres paramètres physico-chimiques (AGV, NH_3 , pH etc.) du milieu pour mieux expliquer le fonctionnement de l'écosystème cæcal. Le E_h pourrait ainsi être un candidat potentiel comme indicateur de l'état d'équilibre de l'écosystème cæcal tout comme les AGV, le pH et le NH_3 .

CHAPITRE 2 : CARACTERISATION PHYSIOPATHOLOGIQUE DES TROUBLES DIARRHEIQUES D'ORIGINE NUTRITIONNELLE CHEZ LE LAPIN EN CROISSANCE : CONSEQUENCES SUR L'ECOSYSTEME CAECAL, ET IMPACT POTENTIEL SUR LE NIVEAU D'INFLAMMATION GENERALE ET DIGESTIVE

L'objectif de cette étude est l'identification et la validation d'indicateurs physiologiques qui varient avec l'apparition de troubles digestifs, lors de l'application d'un stress alimentaire. Les indicateurs choisis sont les indicateurs de **l'inflammation générale** (haptoglobine) et de la **muqueuse digestive** (myélopéroxydase), des indicateurs du biotope (paramètres physico-chimiques: E_h , pH, AGV, NH_3 , MS) et de la biocénose caecal (**approche fingerprint par CE-SSCP**).

Rappelons que le modèle expérimental est de type 2 x 3. Ce qui correspond à 2 situations nutritionnelles (déficient en fibres vs témoin) et 3 âges (36j, 49j, 59j).

I. RESULTATS

L'analyse des deux aliments confirme que la teneur en fibres de l'aliment témoin T est environ 2 fois plus élevée que celle de l'aliment déficient en fibres DF (**Figure 35**). L'aliment T présente une teneur en NDF et ADF respectivement de 45 et 22% contre 20 et 9% pour l'aliment DF.

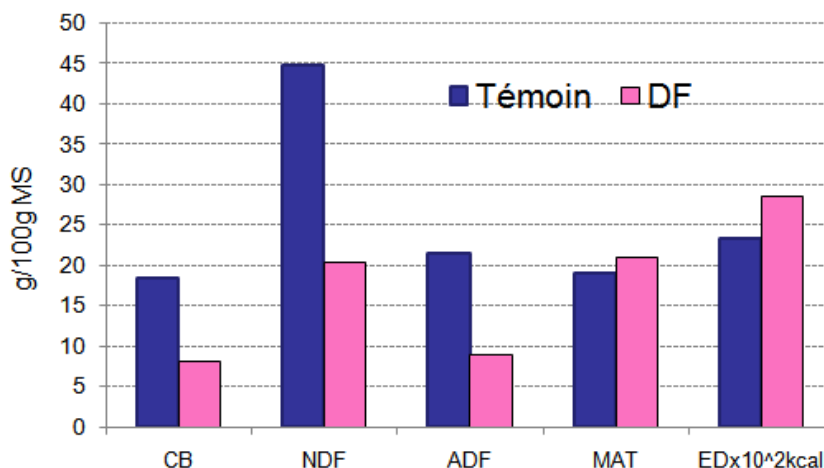


Figure 35: Composition chimique et énergie digestible des aliments expérimentaux

I.A. SYMPTOMES ET STATUT SANITAIRE

I.A.1. Observations cliniques

Les troubles de la santé observés sont résumés dans le **tableau 16**, 85% des cas de mortalité et de morbidité ont été provoqués par une diarrhée. L'examen général des animaux malades ou morts permet de constater une souillure de l'arrière train (diarrhée) et des animaux plus ou moins amaigris. A l'autopsie le contenu de l'intestin (duodénum, jéjunum, iléon), du caecum et du côlon est le plus souvent liquide et/ou gazeux. Ces organes sont pour la plupart des cas, dilatés et inflammés (**Photo 3**). L'analyse de laboratoire a révélé la présence de colibacilles.

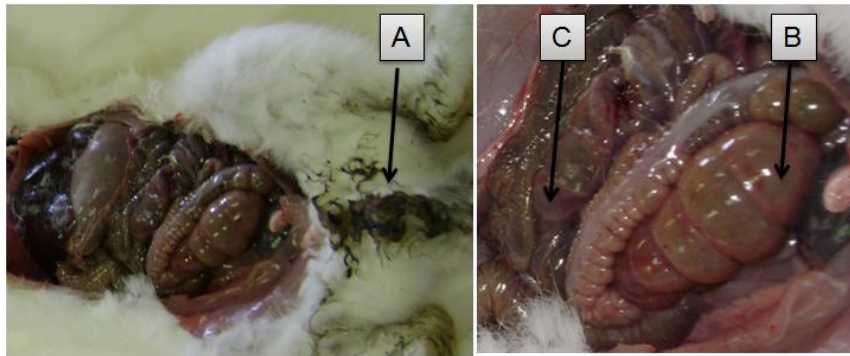


Photo 3: Vue générale du lapin atteint de diarrhée

(A : souillure de l'arrière train ; B et C : dilatation et inflammation du caecum (B) et l'intestin grêle (C), contenu liquide et gazeux)

Tableau 16: Tableau clinique des animaux décédés

	Lésions	Nombre de cas
Examen général	Amaigrissement	26
	Souillure arrière-train	28
	Ballonnement	5
Intestin grêle	Inflammé	4
	Hyper sécrétion de mucus	10
	Dilaté	9
Caecum	Inflammé	3
	Hyper mucus	2
	Parésie	2
	Dilaté	9
Colon	Inflammé	5
	Hyper mucus	11
	Parésie	2
	Dilaté	9

I.A.2. Statut sanitaire

Sur un effectif total de 200 lapins (DF : 130 vs T : 70), 13 sont morts et 26 ont présenté des signes de diarrhée sans causer la mort (morbidité). Le taux de morbidité est similaire dans les 2 lots (**Tableau 17**): 18 animaux sur 130 pour le DF et 8 sur 70 pour le T. De même, nous n'observons pas de différence significative entre les 2 lots pour le taux de mortalité et le risque sanitaire.

Tableau 17: Mortalité et morbidité en fonction du type d'aliment entre 28 et 56 jours d'âge

	Témoin	DF	<i>P>F</i>
Morbidité	8 (11,4)	18 (13,8)	0,62
Mortalité	6 (8,6)	7 (5,4)	0,38
Risque sanitaire	14 (20,0)	25 (19,2)	0,89

() Correspond au pourcentage

Deux groupes de lapins ont été constitués pour l'analyse des résultats. Nous analyserons dans un premier temps les données sur les animaux sains, puis celles portant sur les animaux morbides atteints de diarrhée aiguë.

I.B. MESURE SUR LES ANIMAUX SAINS

I.B.1. Mesures zootechniques : croissance et efficacité alimentaire

Les mesures zootechniques n'ont été effectuées que sur les animaux sains, restés en vie et ayant atteint au moins 56 jours d'âge.

◦ Croissance

La croissance des lapins du lot T est plus élevée (+16%) que celle du lot DF entre 28 jours (sevrage) et 56 jours d'âge ($P < 0,01$). Le gain de poids est également plus élevé (+16 %) durant la première semaine qui suit le sevrage et la 2^{ième} (+18%) dans le lot T par rapport au lot DF ($P < 0,01$). Par la suite, le gain de poids n'est pas significativement différent entre les 2 lots entre 42 et 56 jours d'âge (**Figure 36**).

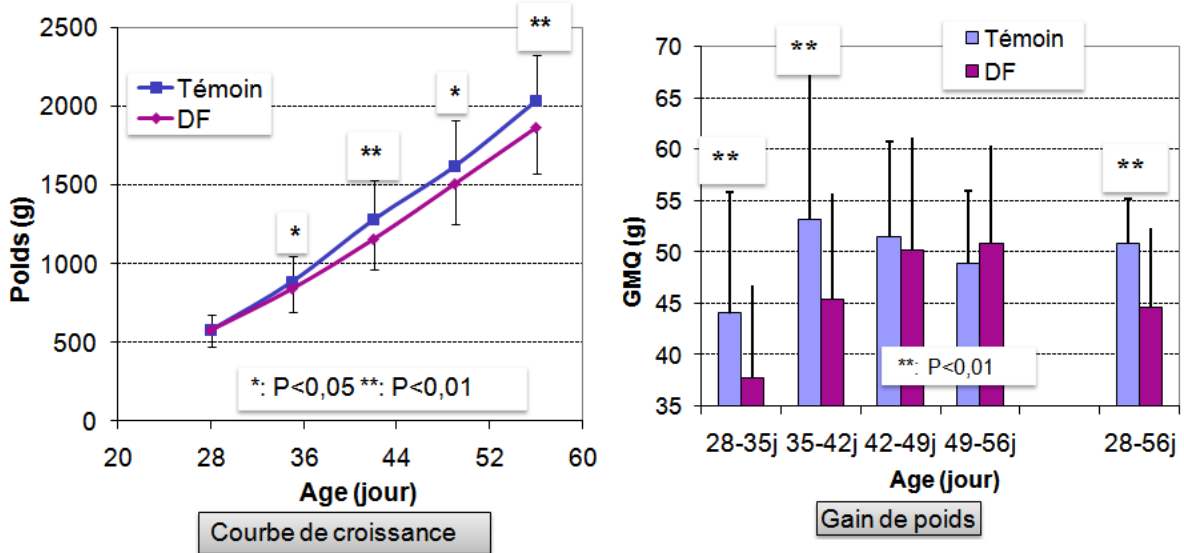


Figure 36: Croissance† et gain de poids des lots T et DF de lapins sains en fonction de l'âge

† : Le poids moyen d'un même lot à l'âge J est comparé à celui de l'âge J+7 ; * : P < 0,05 entre DF et T au même âge ; ** : P < 0,01 entre DF et T au même âge

◦ Indice de consommation et énergie digestible ingérée

L'indice de consommation (IC) est 33% supérieur chez les lapins du lot T comparé à ceux du lot DF, entre 28 jours (sevrage) et 56 jours (P < 0,01). Il est significativement plus élevé dans le lot T par rapport au lot DF entre 28-35 jours, 35-42 jours, 42-49 jours et 49-56 jours d'âge respectivement de plus 14, 44, 42 et 90% (P < 0,01). Entre le sevrage et l'âge de 56 jours, l'IC a augmenté de 167% pour le lot T et de 62% pour le DF (**Figure 37**).

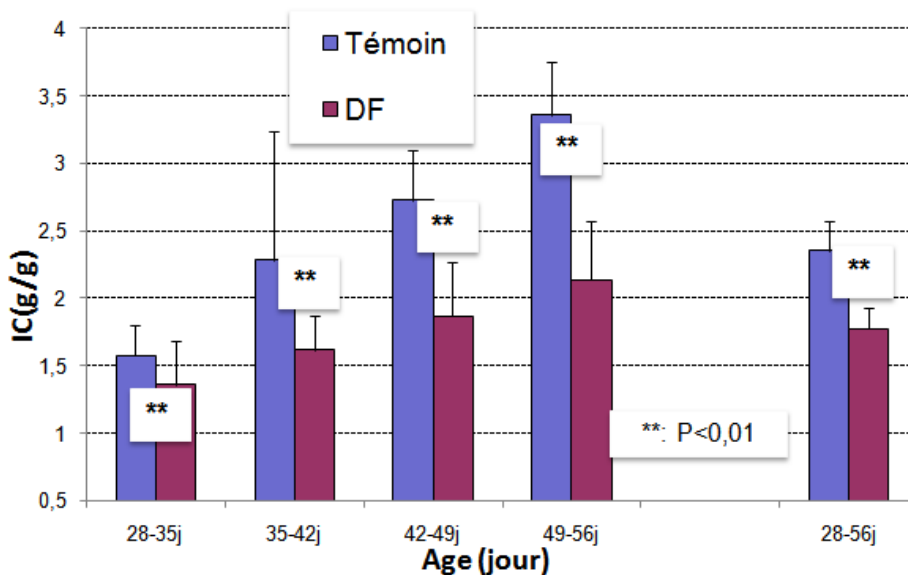


Figure 37: Indice de consommation des 2 lots de lapins sains en fonction de l'âge

* : P < 0,05 entre DF et T au même âge ; ** : P < 0,01 entre DF et T au même âge

De 28 à 56j, l'énergie digestible ingérée (EDi) est 9% plus élevée dans le lot T que dans le lot DF ($P < 0,05$), ce qui suggère une absence de régulation de l'ingéré énergétique pour le régime déficient. De même, elle est plus élevée pour le lot T par rapport au lot DF entre 28-35 jours, 35-42 jours et 42-56 jours d'âge, respectivement de 14, 28 et 23% ($P < 0,01$). Elle est toujours plus élevée dans le lot T par rapport au lot DF entre 49 et 56 jours de 10% ($P < 0,05$). L'EDi croît évidemment avec l'âge ; entre la première semaine d'élevage et la semaine 49-56, l'EDi entre 42 et 56 jours est double de celle observée pendant la première semaine après le sevrage dans les 2 lots, (**Figure 38**).

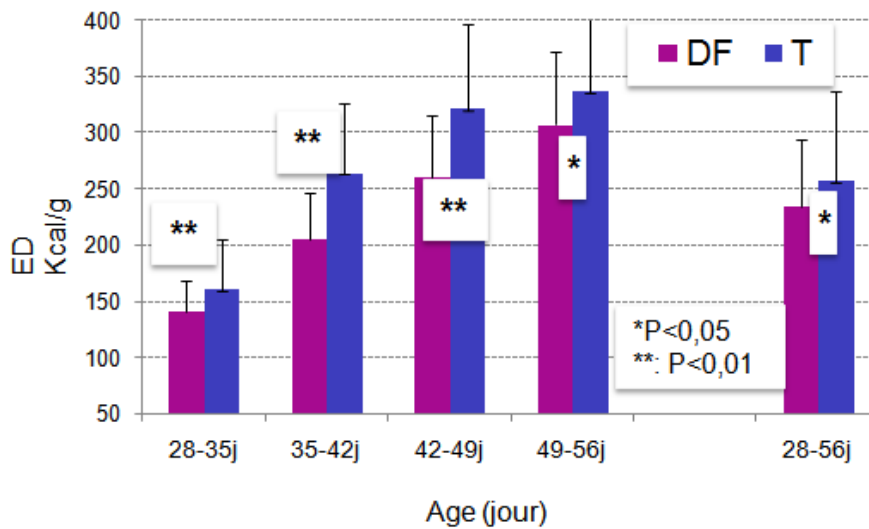


Figure 38: Energie digestible ingérée des 2 lots de lapins sains en fonction de l'âge

T : lot témoin ; DF : lot déficient en fibres ; * : $P < 0,05$ entre DF et T au même âge ; ** : $P < 0,01$ entre DF et T au même âge

I.B.2. Indicateur de l'inflammation générale : haptoglobine

Il n'a pas été possible d'obtenir des données au sevrage en raison de la difficulté liée au prélèvement de sang sur les lapins de cet âge (28 jours).

Aucune interaction significative n'a été observée entre le régime et l'âge du lapin.

La concentration d'haptoglobine varie au cours de la croissance, mais pas de façon linéaire. Elle est la même à 36 jours et à 59 jours d'âge, avec une moyenne de 1,8 mg/ml. Elle baisse presque de moitié à 46 jours d'âge ($P < 0,01$) (**Figure 39**). Les moyennes à 36, 46 et 59 jours sont respectivement de 1,7, 1,0 et 1,9 mg/ml.

La concentration d'haptoglobine plasmatique ne varie pas en fonction du régime. La concentration moyenne est de 1,5mg/ml.

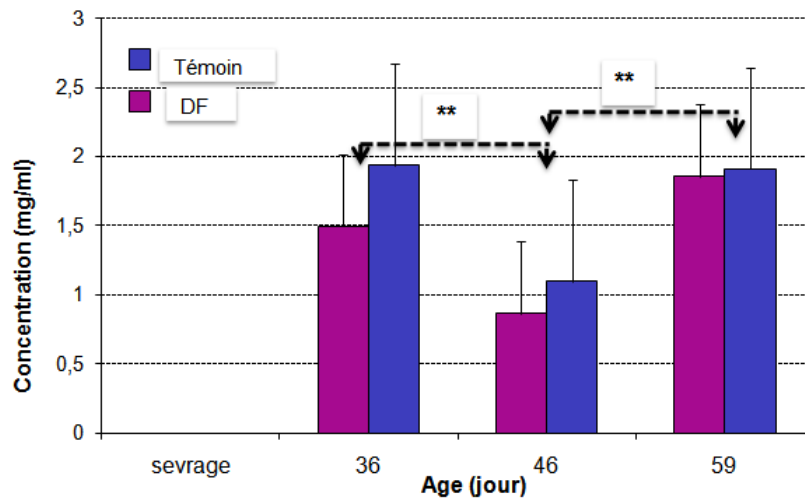


Figure 39: Concentration comparée d'haptoglobine des 2 lots de lapins sains en fonction de l'âge†

** P < 0,01, † Pas de prélèvement effectué au sevrage, les données de T et DF sont regroupées pour chaque âge et les moyennes ont été comparées 2 à 2 par âge.

I.B.3. Indicateur d'inflammation localisée : Myéloperoxydase (MPO)

Très peu d'échantillons ont donné des résultats valides pour des raisons non encore déterminées. Aucun résultat valide n'a été obtenu sur les prélèvements d'iléon et de caecum à 28 et 36 jours d'âge. Cinq résultats valides ont été obtenus successivement à 46 et 59 jours d'âge, mais uniquement sur les tissus issus du côlon. La moyenne de MPO calculée à l'aide de ces 10 valeurs est de 569 unités de MPO. En raison du nombre très limité de résultats valides, aucune étude statistique n'a été envisagée. Pour la suite des travaux, cet indicateur n'a donc pas été retenu.

I.B.4. Indicateur du biotope caecal

- Le potentiel redox (E_h) et le pH

Il n'y a pas d'interaction significative entre l'âge et le régime pour le E_h et pour le pH (**Tableau 18**).

Le E_h ne varie pas significativement au cours de la croissance. La valeur moyenne est de -226 mV. Cependant, il tend à baisser de 25 mV entre le sevrage et l'âge de 46 jours avant de remonter à nouveau à 59 jours. Le pH caecal non plus ne varie pas significativement durant la première semaine qui suit le sevrage. La moyenne entre 28 et 36 jours est de 6,4. En revanche, il baisse de 0,4 (P<0,01) entre l'âge de 36 jours et 46 jours, à partir duquel aucune variation

n'est observée jusqu'à 59 jours. Le E_h ne varie pas quelle que soit la nature du régime. La moyenne est de -226 mV.

Le pH caecal est plus élevé pour les animaux nourris avec un régime déficient en fibres de 0,2 unité de pH par rapport au témoin ($P < 0,01$).

Tableau 18: Variation des paramètres physiques et chimiques du caecum en fonction de l'âge et du régime des lapins sains

	Age (jour)				Reg			$P>F$		
	28	36	46	59	T	DF	RMSE	Age	Reg	Age xReg
N	10	20	20	18	30	28				
%MS	25,0	25,1	23,4	21,7	22,4	24,7	18,4	0,08	<0,06	0,98
AGVt (mmol/l)	68,0 ^B	73,0 ^B	80,7 ^{AB}	96,2 ^A	92,2	72,7	19,4	<0,01	<0,01	0,2
C ₂ (%)	84 ^A	81 ^{AB}	80 ^B	78 ^B	80	79	4	0,01	<0,01	0,19
C ₃ (%)	10 ^{AB}	12 ^A	8 ^{AB}	7 ^B	8	11	4	<0,01	0,16	0,17
C ₄ (%)	5 ^B	7 ^B	11 ^{AB}	14 ^A	12	9	6	<0,01	<0,01	0,19
C ₃ /C ₄	2 ^A	1,7 ^{AB}	0,7 ^{BC}	0,5 ^C	0,5	1,2	0,03	0,02	0,05	0,72
NH ₃ (mmol/l)	14,1 ^{AB}	20,5 ^A	14,7 ^{AB}	10,7 ^B	12,3	18,8	8,2	<0,01	<0,01	0,21
pH	6,4 ^A	6,3 ^A	5,9 ^B	6,0 ^B	6,0	6,2	5,3	<0,01	<0,01	0,48
E_h (mV)	-215	-229	-239	-220	-230	-228	27	0,08	0,73	0,76

^{AB} les chiffres ayant des lettres différentes sont significativement différent ; Reg : régime, N : nombre de lapin

◦ MS et NH₃

Il n'y a pas d'interaction significative entre le régime et l'âge pour la MS et le NH₃ caecal.

La teneur en MS du contenu caecal tend ($P < 0,08$) à baisser avec l'âge, le %MS moyen est de 23,8%.

La concentration de NH₃ baisse significativement au cours de la croissance entre l'âge de 36 jours et 59 jours de 58% ($P < 0,01$). La concentration en NH₃ au sevrage n'est pas significativement différente de celle enregistrée à 36, 46 et 59 jours, la moyenne observée est de 15,5 mmol/l.

Le taux de MS tend à augmenter (+ 10 %) lorsque le régime est déficient en fibres ($P < 0,06$).

La concentration caecale en NH₃ augmente significativement de 53% lorsque le régime est déficient en fibres par rapport au régime témoin ($P < 0,01$).

◦ Profil fermentaire

Il n'y a pas d'interaction significative entre le régime et l'âge pour la concentration en AGV totaux et pour ses différentes proportions.

La concentration en AGV totaux augmente entre le sevrage et l'âge de 59 jours de 41% ($P < 0,01$). La proportion de C_2 est plus élevée au sevrage qu'à 59 jours de 7% ($P < 0,01$). Le pourcentage de C_3 ne change pas significativement entre le sevrage et 46 jours. Par contre la production de C_3 baisse significativement entre l'âge de 36 jours et 59 jours de près de 42% ($P < 0,01$). La proportion de C_4 ne varie pas significativement entre le sevrage et 46 jours, mais elle augmente progressivement entre le sevrage et 59 jours d'environ +180% ($P < 0,01$). Le rapport C_3/C_4 est d'environ 2 au sevrage, mais ce rapport s'inverse entre l'âge de 46 jours (0,7) et l'âge de 59 jours (0,5) ($P < 0,02$).

La concentration en AGV totaux baisse de 21% pour le régime déficient en fibres par rapport au témoin ($P < 0,01$). Le pourcentage de C_2 ne varie pas avec la nature du régime. La concentration d'AGV totaux baisse de 21% pour le régime déficient en fibres par rapport au témoin ($P < 0,01$). Le pourcentage de C_2 et de C_3 ne varie pas avec la nature du régime. Le pourcentage de C_3 moyen représente 8% de la d'AGV totale. Le pourcentage de C_4 dans le régime DF baisse de 25% par rapport au témoin ($P < 0,01$). Le rapport C_3/C_4 dans le régime DF est presque le double de celui du témoin ($P = 0,05$).

I.B.5. Corrélation entre les paramètres du biotope et l'haptoglobine

Le E_h et le pH sont faiblement corrélés avec le taux d'haptoglobine sanguin ($P < 0,05$). En revanche, les variations de pH expliquent 37% des variations de la concentration en AGV totaux, provenant d'une corrélation avec les concentrations en C_2 , C_4 ($P < 0,01$), tandis que la corrélation avec le propionate est plus faible (**Tableau 19**).

I.B.6. Profil bactérien et indice de biodiversité

- Rappels et définitions de quelques notions utilisées

L'abondance est le nombre d'individus par espèce (estimée par l'aire sous les pics des profils)

La **richesse** : nombre d'espèces différentes (estimée par le nombre de pics)

L'indice de diversité de Simpson : variables synthétiques issues de l'analyse de la richesse (nombre de pic) et de l'abondance de différentes espèces présentes (aire sous les pics) dans l'écosystème $D = -\log \sum a_i^2$ (où a_i est l'abondance du pic i à la représentation)

La structure d'une communauté ou d'un profil : études des coordonnées x et y des profils CE SSCP dans un écosystème.

La **nMDS** (méthode d'ordination) permet la visualisation globale des différentes communautés étudiées dans un plan. Chaque communauté qui correspond à un profil CE SSCP est représentée par un point. Les distances entre les points traduisent les distances euclidiennes calculées entre les profils CE SSCP (profil). Le **stress** sur la représentation exprime la qualité de la représentation sur un plan des distances originelles entre profils. Plus le stress est élevé plus l'image est déformée.

Tableau 19: Corrélation (R^2) entre les paramètres du biotope et du taux d'haptoglobine

	E_h	pH	AGVt	C_2	C_3	C_4	NH_3	MS	Hapto
E_h	1	0,01 (0,7)	0,01 (0,57)	0,01 (0,62)	0,01 (0,6)	0,01 (0,68)	0,01 (0,31)	0,01 (0,66)	0,10 (0,02)
PH		1	0,37 (<0,01)	0,32 (<0,01)	0,10 (<0,01)	0,38 (<0,01)	0,13 (<0,01)	0,01 (0,67)	0,01 (0,04)
AGVt			1	0,96 (<0,01)	0,04 (0,11)	0,59 (0,01)	0,01 (0,9)	0,05 (0,05)	0,01 (0,57)
C_2				1	0,03 (0,19)	0,04 (<0,01)	0,23 (<0,01)	0,04 (0,10)	0,01 (0,37)
C_3					1	0,30 (<0,01)	0,28 (<0,01)	0,01 (0,7)	0,06 (0,07)
C_4						1	0,30 (<0,01)	0,06 (0,04)	0,01 (0,83)
NH_3							1	0,03 (0,15)	0,04 (0,14)
MS								1	0,01 (0,9)
Hapto									1

Hapto : taux d'haptoglobine ; AGVt : AGV totaux ; () : $P > F$

L'ANOSIM teste la proximité ou la similarité entre les groupes (le groupe est l'ensemble des individus ayant le même traitement). Elle est calculée par le rapport R (R-Anosim) :

$R\text{-Anosim} = (\text{moyenne des distances de rang entre groupes} - \text{moyenne des distances de rang intra-groupes}) / (\text{le nombre de rang} / 2)$.

R-Anosim est testé statistiquement au seuil de $P < 0,05$. Si $R\text{-ANOSIM} > 0,75$ les groupes sont bien séparés ; $0,5 < R\text{-ANOSIM} < 0,75$ les groupes sont considérés comme séparés mais légèrement chevauchant ; $0,25 < R\text{-ANOSIM} < 0,5$ séparés mais fortement chevauchant ; $R\text{-ANOSIM} < 0,25$ groupes non séparés. Les profils microbiologiques du contenu caecal ont été analysés en fonction de l'âge et de la nature du régime des lapins.

Il n'y a pas d'interaction significative entre l'effet de l'âge et celui de la nature du régime sur l'indice de biodiversité ($P=0,7$). L'indice de Simpson de la population bactérienne du contenu caecal ne varie pas significativement entre le sevrage et l'âge de 59 jours, la moyenne est de 5,9 ($P=0,8$). Il n'y a pas de variation significative non plus entre le régime DF et le témoin. La moyenne enregistrée est de 5,9 ($P=0,6$).

◦ Profil bactérien

La structure de la biocénose représentée par le nMDS (**Figure 40**), montre que la communauté bactérienne est stable au cours de la croissance ($R\text{-ANOSIM}=-0,04$; $P=1$).

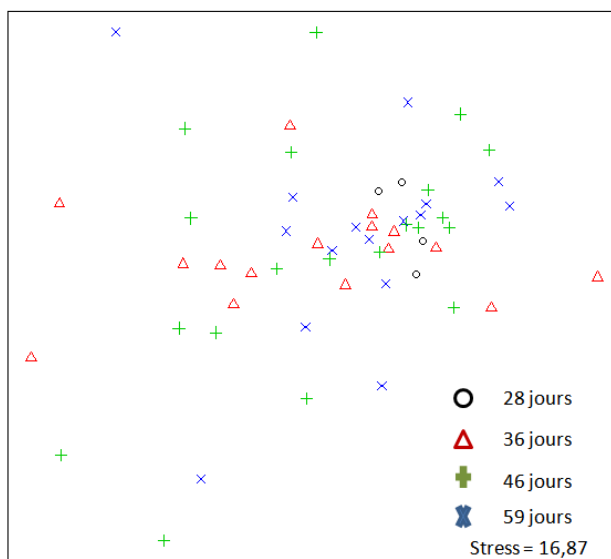


Figure 40: Analyse des profils CE-SSCP en fonction de l'âge des lapins (un point représente un individu)

L'étude de la similarité entre les profils pris 2 à 2 montre qu'au sevrage, le pourcentage de similarité varie entre 72 et 80% entre le sevrage et 46, 36 jours et 59 jours ($P<0,05$) (**Figure 41**). La communauté microbienne devient plus stable après 36 jours avec 95% de similarité.

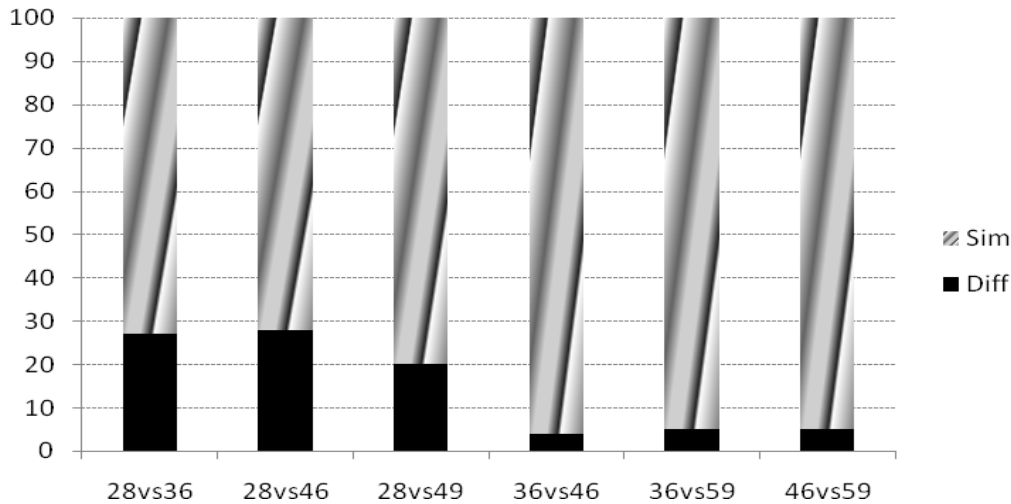


Figure 41: Similarité entre les profils en fonction de l'âge

Sim= pourcentage de similarité calculé ; Diff= pourcentage de dissimilarité (différence) entre les profils ($P < 0,05$).

La structure de la biocénose n'est pas influencée par le régime. Le profil des lapins au sevrage et celui des animaux ayant reçu les régimes DF et T ne sont pas différents (nMDS (**Figure 42**) et l'ANOSIM ($R\text{-ANOSIM} = -0,01$; $P = 0,8$)).

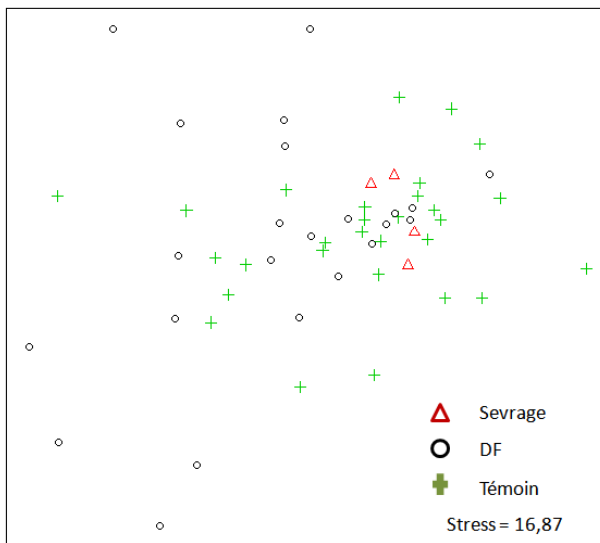


Figure 42: Analyse des profils CE-SSCP en fonction de la nature du régime des lapins
(un point représente un individu)

L'étude de la similarité entre les profils montre que le profil au sevrage est peu similaire au profil des animaux DF à 62% qu'à celui des animaux T à 77%. La similarité entre T et DF est aussi faible 61%. (**Figure 43**).

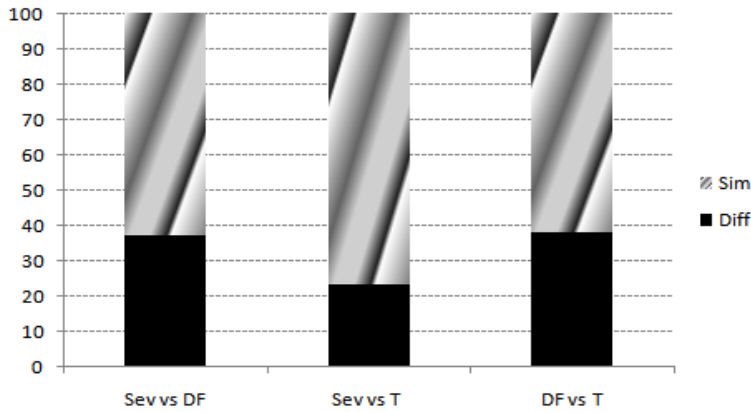


Figure 43: Comparaison des profils CE-SSCP 2 à 2 en fonction du régime

Sim= pourcentage de similarité calculé ; Diff= pourcentage de dissimilarité (différence) entre les profils ($P < 0,05$). Sev = 28 ; DF et T mesuré à 36, 46 et 59 jours

◦ Corrélation entre le biotope et la biocénose

Le **tableau 20** montre les corrélations entre le biotope et la diversité d'une part et entre le biotope et les profils (biocénose) d'autre part. La diversité de Simpson est significativement corrélée avec le E_h , le C_3 et le C_4 , mais avec de faibles coefficients de corrélation. Le profil CE-SSCP est seulement corrélé avec les AGV et le pH, Cependant les coefficients de corrélation (R^2) sont très peu élevés.

Tableau 20: Corrélations entre la diversité et le biotope, et entre les profils CE-SSCP et le biotope

	Diversité		Profil CE-SSCP	
	R^2	$P > F$	R^2	$P > F$
E_h	0,07	0,05	0,02	0,9
pH	0,02	0,35	0,05	0,08
AGV total	0,02	0,34	0,06	0,01
C_2	0,01	0,53	0,06	0,01
C_3	0,17	<0,01	0,10	<0,01
C_4	0,13	<0,01	0,12	<0,01
MS	0,01	0,65	0,02	0,51
Haptoglobine	0,03	0,25	0,03	0,26

I.C. CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES LAPINS SAINS ET DES MALADES ATTEINTS DE TROUBLES DIGESTIFS

Il n'a pas été possible de faire des comparaisons combinées intra-régime et intra-âge des lapins malades, d'une part en raison du faible nombre d'animaux malades, et d'autre part en raison de l'étalement et de l'irrégularité des cas de troubles digestifs sur la période

expérimentale. Rappelons que les lapins dits « malades » présentent une forte diarrhée et sont pratiquement agonisants. Ces animaux sont donc euthanasiés après une prise de sang, en vue d'abrèger leur « souffrance », en revanche il reste difficile de réaliser les prélèvements sanguins pour le dosage des indicateurs de l'inflammation.

I.C.1. Paramètres de l'inflammation

Il n'y a pas d'interaction significative entre le statut sanitaire du lapin et son régime (**Tableau 21**).

La concentration en haptoglobine sérique est plus élevée chez les lapins « malades » que chez les lapins « sains » de 0,8mg/ml ($P<0,05$; $CVr=51\%$) soit une hausse de 53% (**Figure 44**). Les valeurs moyennes sur toute la période d'élevage pour tous les 2 régimes, sont respectivement de 1,5 mg/ml et 2,3 mg/ml chez les lapins sains et chez les lapins malades. En revanche aucune variation n'est observée avec la nature du régime (moyenne = 1,7 mg/ml).

Tableau 21: Variation de la concentration d'haptoglobine sanguine et du biotope caecal en fonction des fibres et du statut sanitaire du lapin

	Statut sanitaire		Reg		SEM	P>F		
	Sains	Malades	T	DF		Ss	Reg	SsxReg
Poids cae* (g frais)	125	88	118	125	42	<0,01	0,06	0,13
MS (%)	23,5	13,8	20,9	23,6	4,9	<0,01	0,01	0,21
NH ₃ (mmol/l)	15,5	23,2	13,6	19,4	11,1	0,06	0,46	0,38
AGVt (mmol/l)	82,8	37,1	84,6	67,0	21,2	<0,01	0,11	0,29
C ₂ (%)	79	77	79	79	16,7	<0,01	0,13	0,26
C ₃ (%)	8	14	8	10	2,7	0,05	0,33	0,05
C ₄ (%)	11	8	13	10	6,8	<0,01	0,36	0,19
pH	6,1	6,9	6,1	6,3	0,4	<0,01	0,71	0,02
E _h (mV)	-229	-230	-229	-230	29	0,94	0,52	0,41
Hapto (mg/ml)	1,5	2,3	1,7	1,6	0,8	0,02	0,8	0,3

*caecum plein, T : régime témoin, DF : régime déficient en fibres, Ss : statut sanitaire, Reg : régime, Hapto : concentration sanguine d'haptoglobine

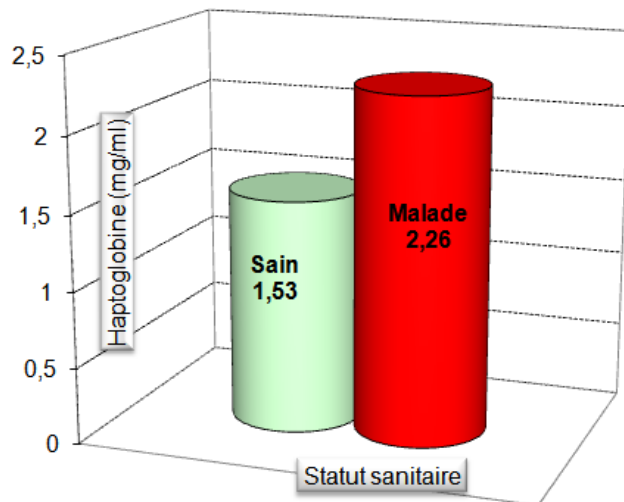


Figure 44: Concentration comparée d'haptoglobine plasmatique de lapins sains et des lapins malades entre le sevrage et 59 jours d'âge ($P<0,05$)

I.C.2. Caractéristiques du biotope caecal

Il existe une interaction significative entre le statut sanitaire et le régime pour la proportion de C_3 ($P=0,03$) et pour le pH caecal ($P=0,02$). Par contre pour la MS, le E_h , les AGV totaux, $\%C_2$, $\%C_4$ et le taux d'haptoglobine sérique, il n'y a pas d'interaction significative entre la nature du régime et le statut sanitaire (**Tableau 21**).

Le E_h ne varie pas quel que soit le statut sanitaire du lapin : il est en moyenne de -229 ± 28 mV. Le pH caecal des lapins atteints de diarrhée est plus élevé que celui des « sains » respectivement de 8% et de 18% avec le régime DF et avec le régime témoin ($P<0,01$).

La concentration en AGV totaux baisse de plus de la moitié (-55%) chez les lapins malades par rapport aux lapins sains ($P<0,01$). Le pourcentage de C_3 ne change pas selon le statut sanitaire lorsque les animaux sont alimentés au régime DF. Par contre dans le lot témoin la proportion de C_3 est réduite de moitié lorsque les lapins sont atteints de troubles digestifs (8% vs 16%) ($P<0,01$). Le pourcentage de C_4 tend à baisser lorsque les lapins sont malades ($P=0,07$). Le rapport C_3/C_4 est de 0,7 chez les lapins sains, ce rapport s'inverse lorsque les animaux sont malades (1,7). Le pourcentage de C_2 n'est pas modifié en fonction du statut sanitaire du lapin ; la moyenne est 79%. La concentration de NH_3 caecal tend à augmenter de 50% lorsque le lapin est malade ($P=0,06$).

Le taux de MS est plus élevé chez les lapins « sains » que chez les lapins atteints de diarrhée d'environ 70 % ($P<0,01$).

I.C.3. Profil bactérien

L'indice de diversité du microbiote bactérien caecal des lapins malades n'est pas significativement différent de celui des sains. La moyenne est de $5,9 \pm 0,5$. Cependant les moyennes sont environ 2 fois plus variables chez les lapins sains ($\sigma=0,62$) que chez les morbides ($\sigma=0,35$).

La structure de la biocénose ne varie pas significativement avec le statut sanitaire des animaux (R-ANOSIM=-0,08 ; P=0,16). La similarité entre les 2 types de profils (malades vs sains) atteint 82% (P<0,05)..

I.D. DISCUSSION

I.D.1. Statut sanitaire

Des études antérieures ont établi une relation entre le taux de fibres et l'apparition des troubles digestifs en élevage cunicole (Gidenne, 1997; Gidenne & Licois, 2005). Les données que nous avons enregistrées dans le cadre de notre travail ne confirment pas ces travaux, sans doute en raison du nombre réduit de lapin utilisé dans cette étude.

Bien que la morbidité, la mortalité, la croissance et l'efficacité alimentaire permettent de suivre la santé digestive du lapin, d'autres paramètres notamment l'inflammation, le biotope et la biocénose peuvent contribuer à l'évaluation de l'état sanitaire d'un élevage.

Les paramètres de l'inflammation générale tels que le taux d'haptoglobine sanguine et l'inflammation localisée (concentration de la MPO) augmentent significativement en cas de perturbation de la santé de l'animal (Melchior *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2006; Yueh *et al.*, 2008). Nous constatons chez l'animal atteint de troubles digestifs une augmentation du taux d'haptoglobine sanguine de 53%. La concentration sanguine d'haptoglobine semble donc être un bon indicateur pour la mesure de l'état inflammatoire générale du lapin en croissance. Cependant, le coefficient de variation (CVr) atteint 50%. Une grande variabilité dépassant parfois 50% de la valeur moyenne a aussi été observée chez l'homme par Mao *et al.* (2008) et chez le porcelet par Le Floch *et al.* (2004) et par Petersen *et al.* (2002). Les concentrations enregistrées dans notre travail sur les lapins sains et sur les lapins malades sont sensiblement égales à celles obtenues par Le Floch *et al.* (2004) respectivement sur les porcelets élevés dans des conditions sanitaires optimales (1,5 mg/ml) et dans des conditions sanitaires dégradées (2,0 mg/ml) du sevrage à 41 jours d'âge. Cette même équipe a montré que la concentration d'haptoglobine sanguine était environ 0,8 mg/ml chez des porcs sains et supérieure à 2 mg/ml chez des porcs malades (Melchior *et al.*, 2004). La concentration

d'haptoglobine sérique chez le lapereau semble plus élevée que celle des humains sains (1 mg/ml) (Mao *et al.*, 2008), des souris (1,2 mg/ml) (Ito *et al.*, 2006) et celle de certains porcs (<1 mg/ml) ((Petersen *et al.*, 2002; Yueh *et al.*, 2008).

L'apparition de troubles digestifs est accompagnée de modifications au niveau de la biocénose. Bennegadi (2002) a ainsi observé que le nombre total de bactéries dans le contenu caecal des lapins malades était réduit de 19%. Dans notre travail, la diversité bactérienne et le profil CE-SSCP ne diffèrent pas selon le statut sanitaire de l'animal. Le pourcentage de similarité entre les 2 profils est élevé (82% soit 18% de dissimilarité). Ces résultats indiquent que la biocénose subie très peu de modifications "qualitatives" au cours des troubles digestifs. Ils montrent aussi que l'équilibre de l'écosystème caecal est très sensible, et affecterait plutôt les caractéristiques du biotope (pH, AGV) sans toutefois modifier le potentiel redox. Chez les lapins malades, il y aurait une diminution de *R. albus* et *R. flavesciens* lié à la diminution du taux de fibres dans le caecum (Bennegadi, 2002). Il pourrait s'en suivre une augmentation des proportions de certains *Bacteroides* notamment *Bacteriodes fragilis* qui peuvent avoir une action pathogène chez le lapin (Myers *et al.*, 1990). D'autres bactéries potentiellement pathogènes telles que les *E. coli* et les *Clostridium* se multiplieraient et sont fréquentes chez les lapins diarrhéiques. Cependant leur niveau est le plus souvent en dessous du seuil de détection, ce qui justifierait le nombre de cas positif de *E. coli* et de *Clostridium* très réduit (1 cas sur 4) à l'analyse de laboratoire que nous avons effectué sur les lapins diarrhéiques morts tout comme Bennegadi (2002). L'auteur n'avait observé que la concentration d'*E. coli* provenant du contenu caecal de lapins atteints de diarrhée hémorragique était inférieure 10^6 bactéries/g. De plus, la recherche de *Clostridium spiroforme* par coloration GRAM était négative. La baisse de l'ingestion chez les malades aurait pour conséquence l'arrêt de l'activité des bactéries du genre *Butyrivibrio* d'où l'importance de la chute de la concentration de butyrate et du profil fermentaire du contenu caecal.

Chez les lapins atteints de troubles digestifs, les activités fibrolytiques bactériennes sont fortement modifiées. Il s'en suit une baisse de la concentration en AGV due principalement à la réduction de l'activité pectinasique en raison du manque de substrats dans le caecum Gidenne & Jehl (2000). Cela pourrait aussi justifier la forte réduction de la concentration d'AGV totaux (>50%) chez les sujets malades (37 vs 83 mmol/l) dans notre travail. En plus de la baisse de la concentration en AGV, il y a l'inversion du ratio propionate/butyrate qui passe de 0,7 chez les lapins sains à 1,7 chez les malades. L'inversion du ratio est surtout provoquée par la chute de près de 70% de la concentration de butyrate chez les lapins

diarrhéiques. Ce résultat confirme le constat de Bennegadi-Laurent *et al.* (2004) qui a relevé 73 mmol/l d'AGV total chez les lapins sains contre 38 mmol/l chez les malades. Ces auteurs ont aussi évoqué une inversion de ratio propionate/butyrate qui passe de 0,2 à 2,3 lorsque les lapins sont atteints de troubles digestifs. Le manque de substrat dans le caecum semble bien à l'origine de la chute de la production de butyrate. En effet, il a été démontré que lorsque le lapin est à jeun pendant 48 heures, il y a une chute rapide du taux d'AGV et particulièrement du butyrate dont la proportion devient inférieure à celle du propionate (Vernay & Raynaud, 1975 ; Gidenne & Bellier, 1992). La baisse de la concentration d'AGV est marquée par la hausse du pH, qui passe dans notre étude de 6,1 à 6,9 chez les lapins malades. La baisse des AGV totaux rend plus vulnérable le lapin car la multiplication des *E. coli* n'est plus inhibée par les AGV ainsi que celle de *Clostridium difficile* par le butyrate. L'augmentation de la proportion de propionate chez les lapins morbides au détriment du butyrate, seraient essentiellement due à la fermentation des acides aminés. Cela peut s'expliquer par le manque de substrat fermentescible (carbohydrates) dans le caecum à cause de l'arrêt de l'alimentation. Les bactéries dégraderaient alors les protéines endogènes présentes dans le caecum pour obtenir des chaînes carbonées. La dégradation des acides aminés entraîne une augmentation de la concentration d'ammoniac de près de 50% dans notre étude.

Par ailleurs, le E_h ne varie pas en fonction du statut sanitaire du lapin contrairement au NH_3 , au pH et à la concentration en AGV. Le facteur principal responsable de la variation du E_h est le niveau d'anaérobiose du milieu (Marounek *et al.*, 1987 ; Marden, 2007). Dans les conditions d'anaérobiose, le E_h ruminal moyen est de -200 mV et peut remonter à -120 mV à l'ingestion où il y a une entrée d'air (ou de dioxygène) dans le rumen (Marden, 2007). Lorsque les conditions d'anaérobiose stricte sont respectées, le E_h baisse. Chez les sujets atteints de troubles digestifs, la chute de la concentration en AGV totaux pourrait être liée à l'augmentation des bactéries anaérobies facultatives notamment les entérobactéries tels que le *E. coli* et les streptocoques. Le développement de ces bactéries anaérobies facultatives au détriment de bactéries anaérobies strictes aurait pour conséquence la chute de la concentration en AGV observée chez les malades. Mais, cette situation n'affecterait pas le niveau d'anaérobiose, si l'on en juge à la stabilité du E_h selon le statut sanitaire..

I.D.2. Teneur du régime en fibres

Dans notre étude, la forte réduction de l'apport de fibres (22 à 9% d'ADF) n'a pas eu d'effet majeur sur le statut sanitaire du lapin, même si numériquement il y a un peu plus de cas de

morbidité chez les lapins recevant le régime déficient. En revanche, et sur un nombre plus élevé d'animaux, plusieurs autres études ont démontré que la morbidité et le risque sanitaire étaient accrus lors d'un apport insuffisant en fibres (Gidenne, 2003; Gidenne *et al.*, 2004).

Le déficit en fibres a entraîné ici une baisse de l'ingestion (ED) et de la croissance (GMQ) entre le sevrage et l'âge de 56 jours respectivement de 22 et 16% environ par rapport au témoin. Ainsi, le lapin ne peut réguler son ingéré énergétique en dessous d'un certain seuil d'apport de lignocellulose (ici 9% ADF), comme cela avait été constaté antérieurement (Bennegadi, 2002).

Nos résultats montrent que la concentration d'haptoglobine n'est pas fonction de la teneur en fibres de l'aliment des lapins. Cet indicateur ne pourrait donc être un critère "prédictif" du risque sanitaire en fonction du statut nutritionnel de l'animal. En effet, la réduction du taux de fibres dans la ration n'entraîne pas systématiquement une dégradation de la santé, il s'agit plus d'un accroissement du risque encouru. La moyenne de 1,5 mg/ml d'haptoglobine obtenue dans les 2 lots (DF et témoin) dans notre travail est équivalente à celle observée chez le porcelet élevé dans les conditions sanitaires optimales par Floc'h *et al.* (2004).

L'évolution des AGV dans le caecum en fonction de niveau de fibres montre que l'ingestion d'un aliment pauvre en fibres entraîne une baisse de sa concentration en AGV totaux de 21%, des proportions de C₂ et C₄ de 1 et 3% et une hausse de 100% du rapport C₃/ C₄ tandis que celle du C₃ reste inchangée. Ces résultats sont pour l'essentiel en accord avec les observations de différents auteurs (Bennegadi, 2002; Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004; Gidenne *et al.*, 2004). Cependant ces auteurs ont au contraire observé une hausse de la proportion de C₄ avec la réduction du taux de fibres qui serait liée à une augmentation de l'activité fermentaire des bactéries du genre *Bacteroides* productrice de butyrate (Vernay & Marty, 1984).

La baisse des AGV pourrait être liée à une réduction de la population de bactéries cellulolytiques dans le caecum comme le supposaient Boulahrouf *et al.* (1991). Ceux-ci ont constaté une baisse d'un log de la population microbienne cellulolytique lorsque le taux de fibres (cellulose brute) dans la ration passe de 17 à 11% tout comme dans cette étude où la teneur en CB dans le témoin est de 18% et de 8% pour le DF. Dans notre travail, bien que la diversité et la structure de la biocénose ne montrent pas de différence significative entre les 2 régimes, le pourcentage de dissimilarité de 38% observé pourrait être lié à cette variation de la biocénose cellulolytique observée par ces auteurs. Des résultats similaires ont été obtenus chez les ovins par Sadet (2008). En effet, cet auteur a observé que chez des ovins nourris à l'aide de régimes différents (100% fourrage, 80% céréale, 65% céréale), il n'y a aucune

différence au niveau de la structure de la communauté bactérienne et des profils DGGE. Il a conclu qu'il pourrait tout de même exister un effet du régime sur les profils et la structure, mais il serait de faible amplitude pour être détecté par les techniques d'analyses classiques de « fingerprint ».

La réduction du taux de fibres dans la ration entraîne une hausse du NH_3 et du pH caecal respectivement de 50% et +0,2. Par contre le E_h ne varie pas en fonction du taux de fibres dans la ration. Les résultats de pH et de NH_3 sont en accord avec ceux de Gidenne *et al.* (2004). Ils ont observé également une hausse du pH de 0,2 et du NH_3 de 39% lorsque le taux de fibres (ADF) passe de 23 à 9%. Quant au E_h dans le caecum, nous n'avons pas chez le lapin des données bibliographiques nous permettant de faire des comparaisons. Cependant, les observations effectuées chez les ruminants notamment chez la vache tarie, montrent que lorsque la ration est déficiente en fibres (riche en amidon), le E_h ruminal est supérieur à celui d'un animal dont la ration est riche en fibres (Marden, 2007). En effet, cet auteur a constaté qu'avec une ration déficiente en fibres, le E_h avant le repas était de -170 mV et atteignait 3 h après le repas -169 mV. Par contre avec un régime riche en fibres, le E_h initial était de -180 mV et baissait jusqu'à -208 2 h après le repas. La moyenne de E_h (-230 mV) que nous avons observée dans cette étude est inférieure à celle observé précédemment (*cf.* Résultats, chapitre 1) sur le lapin de 10 semaines âge de 50 jours nourris au régime témoin (-220 mV) et à celle des ruminants qui atteint rarement - 200 mV (lorsque la correction de la mesure est effectué en ajoutant +199 mV à la valeur enregistrée).

I.D.3. Age du lapin

Le taux d'haptoglobine est environ 80% plus élevé au sevrage et à 59 jours qu'à 46 jours. La mesure à 46 jours correspond à la période à laquelle la mortalité et la morbidité était la plus faible. En effet entre 43 et 50 jours d'âge le risque sanitaire observé était de 8 sur 39 cas. Le taux d'haptoglobine baisserait donc lorsque le risque sanitaire serait bas et *vice versa*. La variation du taux d'haptoglobine n'est pas liée à l'âge mais plutôt au statut sanitaire de l'animal. Ce point est à confirmer sur un nombre plus élevé d'animaux.

La concentration en AGV totaux durant les 2 premières semaines qui suivent le sevrage ne varie pas significativement la moyenne est de 73,9 mmol/l. A 59 jours, la hausse de la concentration devient significative pour atteindre 96,2 mmol/l. Ce résultat est conforme a ceux de Gidenne & Jehl (2000), Bennegadi-Laurent *et al.* (2004) et Piattoni *et al.* (1995). Cependant les moyennes observées semblent plus élevées que celles de la littérature qui sont

inférieures pour la plupart à 60 mmol/l entre le sevrage et 42 jours, et à 80 mmol/l entre 56 et 70 jours (Bennegadi, 2002; Abecia *et al.*, 2007). En ce qui concerne le profil fermentaire, la proportion de C₄ croit entre le sevrage et 59 jours de 5 à 14% (hausse de 180%) contrairement au C₃ qui ne varie pas. Ce qui entraîne une inversion du rapport C₃/C₄ qui passe de 2 au sevrage à 0,5 à 59 jours (soit une baisse de 82%). Ces résultats sont classiques et en accord avec la littérature (Gidenne *et al.*, 2007a). Des résultats similaires ont été obtenus par Gidenne *et al.* (2004). L'absence de variation du profil fermentaire entre 46 et 59 jours d'âge, indique une stabilisation de l'activité fermentaire caecale à l'âge adulte.

Chez l'animal sain, le E_h caecal bien qu'il ne varie pas significativement avec l'âge du lapin, tend tout de même à baisser à l'âge de 46 jours. Il n'est pas exclu que cette baisse légère soit associée au fait qu'à cet âge le risque sanitaire était le plus bas. La moyenne de -220 mV observée à l'âge de 59 jours correspond à celle précédemment obtenue chez des lapins âgés de 50 jours nourris au régime témoin. Les valeurs observées à la stabilisation sont peu variables (CV_r = 12%) et sont inférieures à celles enregistrées chez les ruminants (-180 à -190 mV).

Par contre le NH₃ et le pH baissent significativement avec l'âge du lapin respectivement de 20,5 à 10,7 mmol/l entre 36 et 59 jours, et de 6,4 à 5,9 entre le sevrage et l'âge de 59 jours. Bennegadi-Laurent *et al.* (2004) ont également observé une baisse du pH et du NH₃ du contenu caecal entre le sevrage et l'âge adulte (70 jours) respectivement de 6,1 à 5,7 et 12,3 à 9,9 mMol/l. Le pH et le NH₃ ne varient pas entre l'âge de 46 et 59 jours. Ces résultats concordent avec ceux de Gidenne *et al.* (2004) qui n'ont observé aucune variation significative de la concentration de l'NH₃ et du pH entre l'âge de 42 jours et 56 jours.

Dans notre étude, aucune variation de la diversité de la biocénose caecale au cours de la croissance n'a été observée, et de même, la structure des communautés bactériennes semble peu varier du sevrage à 8 semaines d'âge (analyses nMDS et R-ANOSIM). Des travaux antérieurs ont montré que la concentration caecale de bactéries totales et des eucaryotes augmentaient jusqu'au sevrage et que la concentration de *Archaea* baissait (Bennegadi *et al.*, 2003). Au delà du sevrage, aucune variation significative n'était observée (Gidenne *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que la population de bactéries anaérobies dans le caecum se stabilisait après le sevrage à 10⁹-10¹⁰ bactérie/g (Boulahrouf *et al.*, 1991; Padilha *et al.*, 1995). Des mesures effectuées chez le lapin entre 12 et 17 semaines d'âge confirment ces observations. En effet, il a été montré par Michelland *et al.* (2008) que la structure et la diversité ne variaient pas chez le lapin adulte (de 12 à 17 semaines d'âge). Bennegadi (2002) a observé une croissance significative de bactéries fibrolytiques de 68% entre le sevrage (28

jours) et l'âge de 70 jours. Nos résultats confirment ces observations antérieures et montrent qu'après le sevrage, la biocénose caecale se stabilise. Ceci justifie la faible similarité (74% en moyenne) observée entre le sevrage et l'âge de 36 à 59 jours d'une part et d'autre pas la forte similarité (95%) entre les profils à 36, 49 et 59 jours.

I.D.4. Relation entre les paramètres de l'écosystème et le taux d'haptoglobine sérique

Contrairement à ce qui pourrait être attendu, nous n'avons pas identifié de corrélation forte entre le E_h et d'autres paramètres du biotope tels que le pH, les AGV, le NH_3 et la MS caecal. Par contre, la concentration d'haptoglobine dans le sang est positivement corrélée avec le E_h , et le pH. Toutefois les coefficients de corrélation sont faibles et varient entre 0,10 et 0,07. Le pH, E_h , la MS et l'haptoglobine ne sont pas corrélés à la diversité et ne varient pas en fonction de la structure du microbiote caecal.

I.E. CONCLUSIONS

Les troubles digestifs sont associés à une hausse des indicateurs de l'inflammation générale notamment la concentration d'haptoglobine sanguine qui s'accroît d'environ 53% chez les sujets morbides. Du point de vue physico-chimiques et microbiologique, les troubles digestifs entraînent la chute de la concentration caecale en AGV totaux (-55%) et du pourcentage de MS caecal (-41%) d'une part et d'autre part la hausse du pH de 0,8 et de l'ammoniac de +50%. En plus, le ratio C3/C4 inférieur à 1 chez les lapins sains, s'inverse (>1). Par contre, le potentiel redox ne diffère pas selon le statut sanitaire de l'animal et la moyenne est de -230 mV.

Ces variations des paramètres du biotope n'entraînent pas de grandes variations de la biodiversité bactérienne caecale, ni de profondes modifications de la structure de la communauté bactérienne qui restent relativement stables, quelque soit le statut sanitaire du lapin.

La réduction du taux de fibres dans la ration de 22 à 9 % d'ADF entraîne la chute de la concentration caecale en AGV totaux de 21% ainsi que la proportion de C_4 de 25% et une hausse du ratio C_3/C_4 de 100%. Elle provoque également la hausse du pH de 0,2 et du NH_3 de 53%. Par contre, la teneur en fibres alimentaires n'affecte pas le statut sanitaire, le taux d'haptoglobine sérique, la diversité, le profil CE-SSCP, le E_h et le C_4 caecal.

Chez les lapins sains, la concentration en AGV totaux et la proportion de C₄ caecal augmentent respectivement de 41% et 180% entre le sevrage et l'âge de 59 jours. La proportion de C₂ par contre baisse de 7%, le ratio C₃/C₄ passe en dessous de 1. Le pH baisse également de -0,4. Cependant ces paramètres du biotope se stabilisent à 46 jours d'âge. Le E_h et le taux d'haptoglobine ne varient pas en fonction de l'âge du lapin. De même, la biocénose après le sevrage se stabilise une semaine après le sevrage.

CHAPITRE 3 : STABILITE DE LA LEVURE PROBIOTIQUE A LA GRANULATION ET A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN

I. RESISTANCE DES LEVURES A LA GRANULATION

L'action probiotique d'un microorganisme n'est possible que si celui-ci survit lors de son passage dans les différents compartiments du système digestif. Dans le cas particulier du lapin, l'organe cible étant le cæcum, le probiotique doit pouvoir traverser la première partie du tube digestif notamment l'estomac très acide.

Ainsi, *Saccharomyces cerevisiae* utilisé comme probiotique dans l'alimentation de lapin doit avoir une double résistance: face à l'élévation de la température lors du processus de granulation des aliments, et face à la digestion.

L'objectif ici est d'évaluer la viabilité des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) ajoutées à l'aliment au cours du processus de granulation pour trois aliments (DF, T, C) différents par la concentration en fibres, et susceptibles de présenter une température de granulation différente. Chacun des aliments contenait soit une dose de 5 g de levure Sc 47 Biosaf® par kg d'aliment, soit 1 g, soit 0 g pour les témoins. Des prises de température et des prélèvements d'échantillons ont été effectués sur la farine de base des 3 aliments ainsi qu'au cours de la granulation soit en début de granulation, en milieu de granulation correspondant environ à la granulation de la moitié de la farine de base et en fin de granulation où la température de la presse est supposée la plus élevée.

I.A. RESULTATS ET DISCUSSION

I.A.1. Effet de la teneur en fibres sur la température de granulation

Il n'y a pas d'interaction significative entre le taux de fibres et le temps de prélèvement (durée de granulation) à la sortie de la presse.

L'analyse de la teneur en NDF a donné une valeur de 21, 37 et de 39 % respectivement pour les régimes DF, C et T. La température de la presse en fin de granulation des aliments DF, T et C augmente respectivement d'environ 50, 60 et 70 °C par rapport à la température de la farine avant la granulation (température ambiante 18-20°C), et la variation de température à la

sortie de la presse à granulés entre le début de la granulation et la fin est de +10, +13 et +13 °C (**Tableau 22**).

La hausse de la température de granulation est fonction de la teneur en fibres (NDF) de l'aliment. L'aliment "T" à haute teneur en fibres (39% de NDF) a une température à la fin de la granulation supérieure de 19°C par rapport au DF (21% de NDF) et de +7°C par rapport au C (37% de NDF). Il existe une corrélation simple entre le taux de NDF et la température en fin de granulation ($P < 0,01$; $R^2 = 0,51$). La droite de régression entre la température en sortie de presse en fin de granulation (θ_f) et le taux de fibres dans l'aliment est :

$$\theta_f(^{\circ}\text{C}) = 47,3 (\pm 5,2) + 0,8 (\pm 0,2) \cdot \text{NDF}(\%)$$

Tableau 22: Teneur en fibres (NDF) et variation de la température des aliments à la sortie de la presse au cours de la granulation

	N	NDF (%)	Température en sortie de presse			CVr(%)	P>F
			Début de G.	Milieu de G.	Fin de G.		
Aliment							
DF	9	21	58 ^B	66 ^A	68 ^{Ac}	3	<0,01
C	9	37	67 ^B	78 ^A	80 ^{Ab}	2	<0,01
T	9	39	74 ^B	85 ^A	87 ^{Aa}	2	<0,01
Niveau de prélèvement	27		67 ^B	77 ^A	78 ^A	2	<0,01

^{AB} : sur une même ligne, les valeurs ayant des lettres différentes sont significativement différentes entre elles.

^{abc} : dans une même colonne, les valeurs ayant des lettres différentes sont significativement différentes entre elles ; G. granulation ; N= nombre de mesure ; CVr= coefficient de variation relative

I.A.2. Effet de la teneur en fibres et de la température finale de granulation sur la viabilité de la levure

Lorsque la concentration de levure est inférieure à 2 log (UFC/g) dans un aliment, il est considéré comme étant dépourvu de levure.

Tous les aliments ne contenant pas de levure initialement dans la farine (<2 log), ont une teneur qui reste inférieure à 2 log jusqu'à la fin de la granulation (**Tableau 23**).

Avant la granulation, les aliments déficients en fibres DF (21% NDF) ont une concentration de 6 et 7 log (UFC/g) respectivement pour l'aliment DF1 et DF5. A la fin de la granulation la perte est de 1 log pour le DF5 et 0 log pour le DF1.

Pour les régimes fibreux C (37% NDF), la concentration de levures initiale est de 6 log (UFC/g) pour le C1 et 7 pour le C5. La perte est de 1 log pour chacun des 2 régimes.

Dans les aliments à haute teneur en fibres T (39% NDF), la concentration initiale avant la granulation est 7 log (UFC/g) pour les 2 régimes (T1 et T5). La perte de levure en fin de granulation est de 4 et 2 log respectivement pour T1 et T5.

Tableau 23: Evolution de la teneur en levures (log UFC/g) dans les aliments en fonction de la dose et du moment de prélèvement au cours de la granulation

	Régime	Dose (g/kg)	Farine	Début de G.	Milieu de G.	Fin de G.
DF	DF0	0	<2	<2	<2	<2
	DF1	1	6	6	6	6
	DF5	5	7	7	6	6
T	T0	0	<2	<2	<2	<2
	T1	1	7	4	4	3
	T5	5	7	5	5	5
C	C0	0	<2	<2	<2	<2
	C1	1	6	5	5	5
	C5	5	7	6	6	6

DF : régime à 21% NDF ; T : régime à 39% NDF ; C : régime à 37% NDF ; DF1, T1, C1 : régimes contenant 1g de levure par kg d'aliment ; DF0, T0, C0 : régimes ne contenant pas de levure ; DF5, T5, C5 : régimes contenant 5g de levure par kg d'aliment ; G. : granulation ; Farine : aliment avant la granulation.

I.B. CONCLUSION

La hausse de la teneur en fibres entraîne l'augmentation linéaire de la température de granulation. Avec la hausse de la température de granulation, la perte en levures est de 1 log pour les taux de NDF allant de 21 à 37%. Par contre, lorsque la teneur en NDF atteint 39%, la perte est de 4 log et de 2 log pour des concentrations initiales d'environ 7 log (UFC/g).

II. RESISTANCE DE LA LEVURE A LA DIGESTION : IMPACT SUR LA DIGESTION, LA CROISSANCE ET LA SANTE DIGESTIVE

II.A. METHODOLOGIE : DENOMBREMENT DE LA LEVURE DANS LES DIGESTA ET LES FECES, IMPACT DU DELAI DE CONSERVATION

L'objectif de ce test est d'étudier si la durée de conservation des échantillons de matière caecale, de caecotrophes et de crottes dures peut affecter la mesure de la concentration en levures vivantes dans l'échantillon. Un aliment contenant une dose de 10 g de levure Biosaf® (C10) et 5 lapins de 65 jours pesant 2 kg en moyenne ont été utilisés. Des prélèvements successifs de crottes dures, de caecotrophes et de contenu caecal (nature du prélèvement) ont été effectués sur chaque lapin. Ces échantillons ont été traités ou non au glycérol et conservés pendant 0, 5 et 10 jours.

II.A.1. Résultats et discussion

La concentration en levures dans les échantillons conservés à 0, 5 et 10 jours est la même dans les 2 traitements (avec glycérol ou sans glycérol) (**Tableau 24**). Aucune analyse

statistique n'a été faite en raison du nombre réduit d'échantillons dont nous disposions. Les analyses sur des échantillons de caecotrophes et de contenu caecal conservés pendant 10 jours n'ont pas été effectuées en raison de la faible quantité de matière prélevée.

Tableau 24: Concentration en levures *S. cerevisiae* en log (UFC/g) dans les prélèvements de crottes dures, caecotrophes et contenu caecal traités (Gly) ou non traités (Ngly) au glycérol en fonction de la durée de conservation

	Traitement	Duré de conservation (jour)		
		0	5	10
Cd	Ngly	4,5	4,7	4,2
	Gly	4,5	4,1	4,6
Cp	Ngly	4,6	3,7	*
	Gly	4,6	4,7	*
Cc	Ngly	4,0	4	*
	Gly	4,0	2,8	*

Cd : crottes dures ; Cp : caecotrophes ; Cc : contenu caecal ; Gly : conservation au glycérol à -20°C ; Ngly : conservation sans Gly à 4°C. * : non déterminé

◦ Effet du mode de conservation

Il n'y a pas d'écart observé entre la conservation avec le glycérol et sans le glycérol des échantillons de caecotrophes, de crottes dures et de contenu caecal. La conservation des prélèvements à 4°C sans traitement préalable n'affecte pas la concentration en levures qu'ils contiennent.

◦ Effet de la durée de conservation

La concentration en levures ne varie pas après 10 jours de conservation pour les crottes dures et 5 jours pour les caecotrophes et le contenu caecal. La concentration moyenne en levures est de 5 log dans les crottes dures et les caecotrophes et de 4 log dans le contenu caecal.

II.A.2. Conclusion

Les prélèvements de caecotrophes et de contenu caecal peuvent être conservés à 4°C sans traitement particulier pendant 5 jours au moins et 10 jours pour les crottes dures sans modifier la teneur en levures.

II.B. ETUDE DE LA RESISTANCE DE LA LEVURE A LA DIGESTION

Le taux de survie d'une levure probiotique au cours de son passage dans le tube digestif a été mesuré chez le lapereau sevré. Son effet sur la biocénose et le biotope ainsi que son impact

sur les performances zootechniques ont aussi été étudiés. L'étude s'est effectuée en 2 parties : une sur la mesure du taux de survie de la levure au cours de la digestion et une autre sur son impact sur les performances zootechniques.

II.B.1. Analyse du taux de survie de la levure à la digestion, paramètres physico-chimiques et activité microbiologique du cæcum

La première partie a été réalisée en comparant 3 lots de 10 animaux, élevés en cage individuelle à métabolisme, et nourris à volonté à l'aide de trois aliments expérimentaux, contenant un apport croissant de levure dont un témoin "C0" (0 g/kg), le "C1"(1 g de levure/kg alim.) et le "C10"(10 g/kg). L'analyse du taux de survie au cours du transit digestif a été réalisée par comparaison de la concentration en levures dans le cæcum et dans les excréta (crottes dures et caecotrophes) à celles provenant d'échantillons d'aliment prélevés en parallèle dans les mangeoires des animaux. La mesure de la digestibilité a été réalisée pendant 4 jours. Les prélèvements et les mesures des paramètres physiques, chimiques et l'activité microbiologique du caecum ont été effectués sur 5 jours consécutifs, à raison de 6 lapins par jour (2 lapins par lot et par jour) (cf. chapitre Matériel & méthodes).

◦ Taux de survie de la levure et paramètres physico-chimiques du caecum

La concentration en levures est exprimée en log (UFC/g). Les données révèlent la présence de levures sauvages dans l'aliment avant la granulation (C0) à la concentration de 2,5 log (CFU/g MS) (**Tableau 25**). Pendant la granulation la température passe de 19°C (température ambiante) à 80°C à la fin de la granulation. Cette hausse de la température entraîne la destruction des levures sauvages (<2log après la granulation) contenues dans les aliments contrairement à la levure probiotique utilisée dans ce travail.

Tableau 25: Concentration en levures vivantes dans l'aliment avant et après la granulation, et taux de survie dans le tube digestif du lapin

	Regime			CVr (%)	P>F
	C0	C1	C10		
Concentration avant granulation, Log(UFC/g MS)	2,5	5,7	7,0		
Concentration après granulation Log(UFC/g MS)	< 2	5,6	6,5		
Quantité de levure ingérée, Log (UFC/jour)	*	7,6	8,5	1,0	<0,01
Quantité de levure excrétée, Log (UFC/jour)	*	7	8,3	2,5	<0,01
Taux de survie % (excrété/ingéré)**		90,3	96,9	2,3	<0,01

* : calcul invalide ; ** : calcul effectué avec 6 lapins ; CVr : coefficient de variation relative ; *C0 : témoin sans levure ; C1 : 1g de levure/kg ; C10 : 10g de levure/kg

La **Figure 45** montre que l'on ne détecte pas de levures dans le caecum ainsi que dans les fèces des lapins dont le régime ne contient pas de levure ajoutée. En revanche, la concentration en levures environ 10h après l'ingestion d'aliment supplémenté est plus élevée

de 1 log environ chez les lapins C10 que chez les C1 dans le caecum (Cc), dans les caecotrophes (Cp) et dans les crottes dures (Cd).

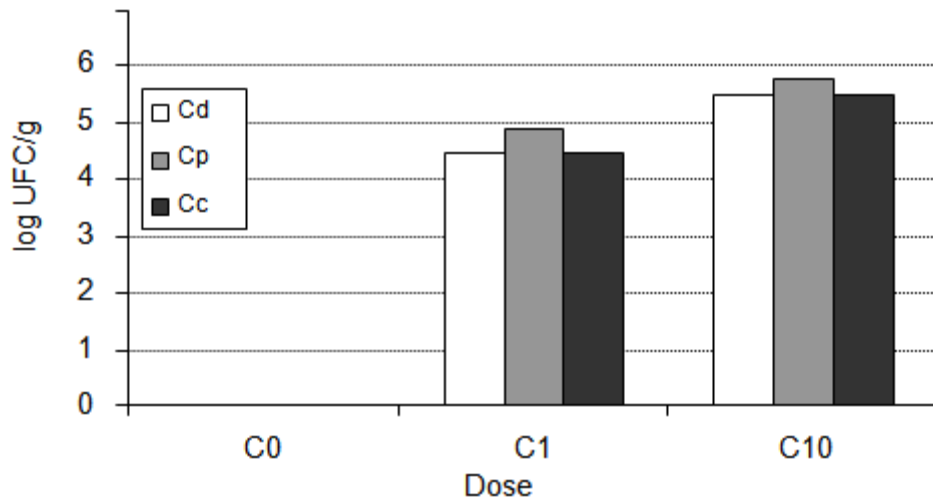


Figure 45: Concentration en levures *S. cerevisiae* (log (UFC/g MS)) en fonction de la dose introduite dans l'aliment

Cd : crottes dures, Cp : caecotrophes, Cc : contenu caecal, C0 : témoin sans levure, C1 : 1g/kg de levure, C10 : 10g/kg de levure

Lorsque nous considérons tous les régimes, la concentration en levures est plus élevée dans les crottes dures que dans le contenu caecal d'environ 0,6 log ($P < 0,01$). La concentration obtenue dans les caecotrophes n'est pas différente de celles des crottes dures et du contenu caecal, la moyenne est de 5,0 log(UFC/g).

La détermination de la concentration en levures dans les fèces a permis de calculer son taux de survie à la digestion. Le taux de survie de cette levure calculé par le rapport de l'excrété et l'ingéré en log diffère selon le régime. Il est 8% plus élevé dans le régime C10 par rapport au régime C1 ($P < 0,01$).

Le pH, le taux de MS, le NH_3 , les AGV totaux et les différentes proportions d'AGV dans le caecum sont similaires dans tous les traitements (**Tableau 26**). En revanche, le E_h caecal des animaux du régime témoin (C0) est 25 mV plus bas que celui de la moyenne des régimes C1 et C10 ($P < 0,05$).

Tableau 26: Effet de l'addition de levures *S. cerevisiae* sur le biotope caecal du lapin âgé de 7 semaines.

	Dose en g/kg (régime)			RMSE	P>F
	0 (C0)	1 (C1)	10 (C10)		
Nombre de lapins	6	6	6		
MS %	23	23	23	1,8	0,6
pH	5,9	6,0	6,1	0,3	0,8
E _h (mV)	-251 ^B	-238 ^A	-213 ^A	97	<0,05
NH ₃ (mmol/l)	11,2	13,3	14,9	5,8	0,6
AGV total (mmol/l)	100,4	110,9	105,5	19,4	0,7
C ₂ %	77,6	78,7	75,5	13,6	0,5
C ₃ %	5,1	5,0	6,1	1,8	0,5
C ₄ %	16,3	15,6	17,6	5,3	0,7

^{AB} : les moyennes ayant des lettres différentes sont significativement différentes ; RMSE : racine carrée moyenne des carrés des erreurs

La digestibilité des nutriments (MS, MO, MAT) n'est pas améliorée par l'apport de levures. Le coefficient de digestibilité est de 62,9±1,7, 62,7±1,7 et 74,7±2,5 respectivement pour la MS, MO et MAT chez les 3 lots de lapin (**Tableau 27**).

Tableau 27: Effet de l'addition de levures *S. cerevisiae* sur l'ingestion et la digestibilité des nutriments

	Dose en g/kg (régime)			RMSE	P>F
	0 (C0)	1 (C1)	10 (C10)		
Nombre de lapins	8	9	9		
Ingéré (gMS/j)*	125	122	121	12	0,8
d MS %	62,4	63,3	63,5	1,7	0,4
d MO%	62,0	63,1	63,0	1,7	0,4
d MAT %	74,9	75,0	74,2	2,5	0,8

* ingéré de MS obtenu sur 4 jours ; d : digestibilité ; RMSE : racine carrée du carré moyen de l'erreur (ou écart type résiduel)

L'étude a mis en évidence une corrélation significative entre le E_h et le pourcentage de butyrate (P<0,05 et R² = 0,30) et une tendance entre le E_h et le pH (0,11 et R² = 0,17).

- Caractérisation de la communauté bactérienne du caecum

L'indice de biodiversité de Simpson tend à être plus élevé de 11% lorsque le régime du lapin est complété en levure par rapport au témoin (P=0,10) (**Figure 46**). Par contre il n'y a pas d'effet de la dose de levures sur la diversité microbiologique (P=0,3), la moyenne de l'indice de diversité est de 5,2.

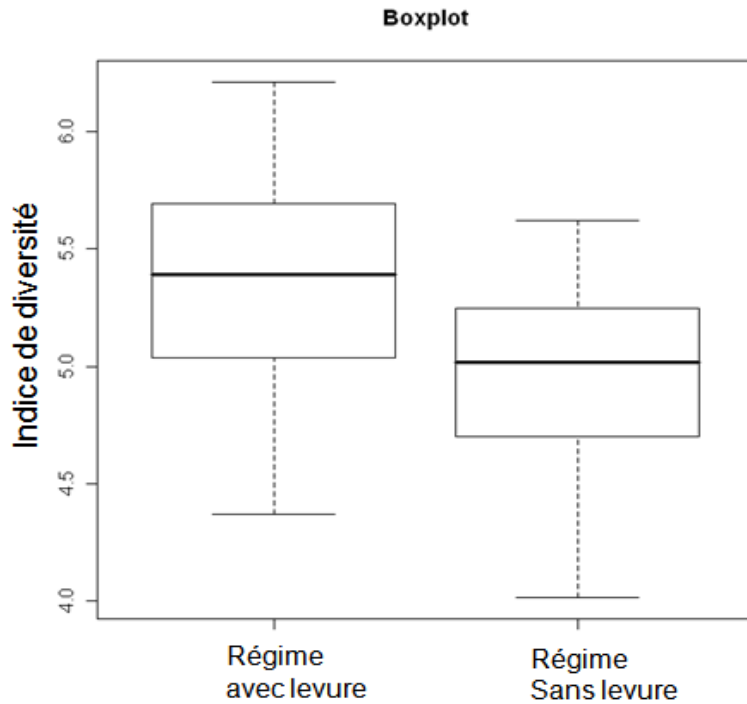


Figure 46: Effet de l'apport de *S. cerevisiae* dans l'aliment sur l'indice de biodiversité (P=0,1 ; RMSE=0,5)

(Régime avec levure=C1+C10 ; Régime sans levure=C0)

La structure estimée par la nMDS (**Figure 47**) et l'ANOSIM (R-ANOSIM=-0,01 ; P=0,7) montrent qu'il n'y a pas de différence entre les profils en fonction de la dose de levure. L'apport de levure n'a pas d'effet sur la structure de la biocénose caecale (R-ANOSIM=0,07 ; P=0,4).

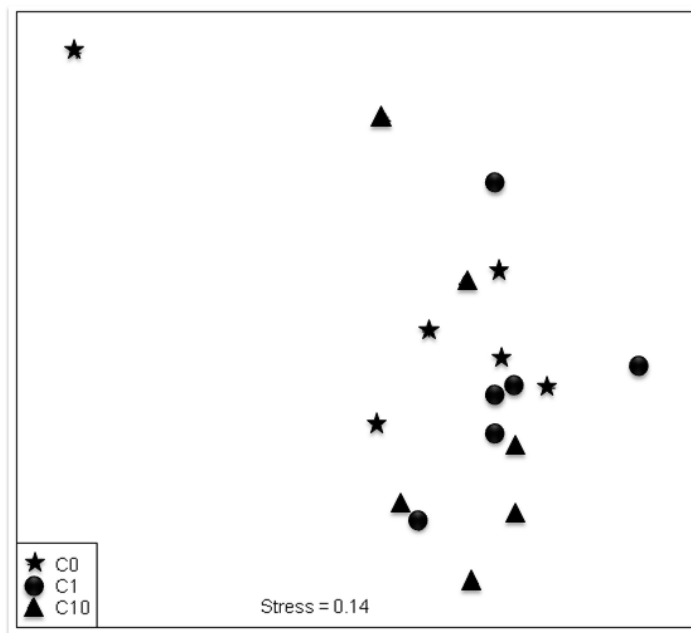


Figure 47: Effet de la dose* de levures sur la structuration du profil microbien du contenu caecal

*C0 : témoin sans levure ; C1 : 1g de levure/kg ; C10 : 10g de levure/kg ; un point correspond à un lapin

La similarité entre les profils des lapins témoins et des lapins C1 est de 97% et celle entre le témoin et le lot C10 de 96%. Les profils des animaux ayant reçu la levure (C1 et C10) est similaire à 100%. La structure du profil des lapins témoins est similaire à 93% aux lots levure.(**Figure 48**).

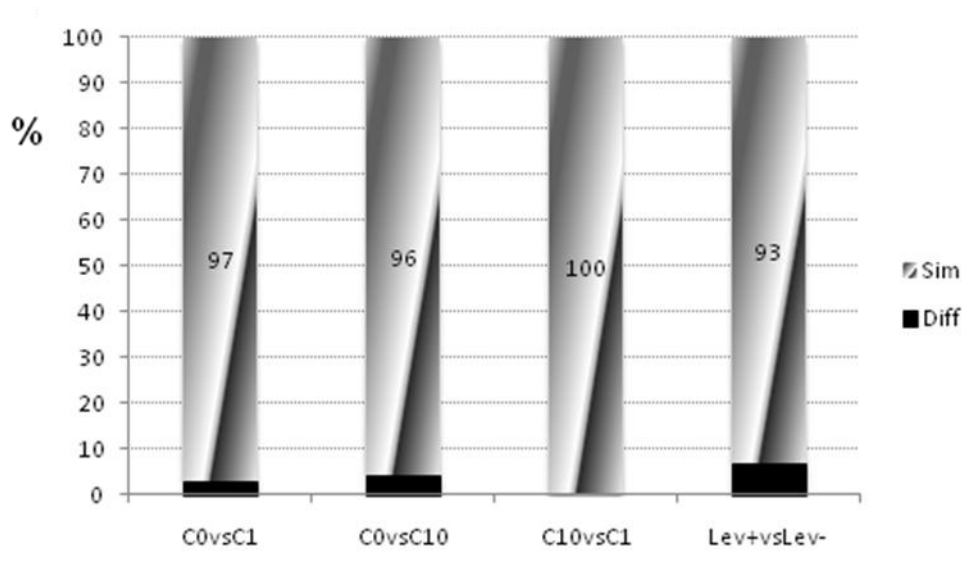


Figure 48: Similarité entre les profils CE-SSCP en fonction du régime et de la levure à l'aide d'un test-t

Sim= pourcentage de similarité calculé ; Diff= pourcentage de dissimilarité (différence) entre les profils ($P < 0,05$) ; C0 : témoin sans levure ; C1 : 1g de levure/kg ; C10 : 10g de levure/kg ; lev+ : régime supplémenté en levure ; lev- : régime sans levure

II.B.2. Impact de la levure sur la croissance, l'ingestion et la santé digestive du lapin

Il n'y a pas d'interaction significative entre l'effet de la levure et l'âge, sur la croissance et l'ingestion d'une part, et d'autre part sur la santé digestive des lapins.

◦ Effet de la levure sur la croissance et l'ingestion

Les résultats de croissance, d'ingestion et d'efficacité alimentaire ne montrent pas de différence significative entre les 3 aliments. Les moyennes d'ingestion, de GMQ et d'IC sont respectivement de 142g/j, 45g/j et 3,2 (**Tableau 28**).

Tableau 28: Effet de la levure sur l'ingestion, le gain de poids et l'indice de consommation des lapins sains*

	Dose g/kg (Régime)			RMSE	P>F
	0 (C0)	1 (C1)	10 (C10)		
Nombre de lapin	29	26	36		
Poids au sevrage 35 j (g)	1030	1030	1030	120	1
Poids final 70 j (g)	2650	2663	2558	245	0,2
Ingestion 35-70j (g/j)	145	143	138	25	0,9
GMQ 35-70 j (g/j)	46	46	44	7	0,4
IC	3,2	3,2	3,1	0,5	0,8

*C0 : témoin sans levure ; C1 : 1g de levure/kg ; C10 : 10g de levure/kg ; RMSE : racine carrée moyenne des carrés des erreurs

- Effet de la levure sur la santé digestive

Au cours de ce travail, il y a eu environ 37% d'animaux morts. A l'exception de 4 cas sur 44, les troubles digestifs ont été à l'origine de ces mortalités. Les lésions observées à l'autopsie sont présentées dans le **tableau 29**. Par ailleurs les analyses de laboratoire n'ont pas révélé la présence d'agents pathogènes identifiables par les tests courants en laboratoire vétérinaire.

Tableau 29: Tableau lésionnel des lapins atteints de troubles digestifs

	Lésions	Nombre de cas
Examen général	Amaigrissement	8
	Souillure arrière-train	34
	Ballonnement	6
Intestin grêle	Inflammé	7
	Hyper sécrétion de mucus	16
	Dilaté	16
Caecum	Inflammé	5
	Hyper mucus	10
	Parésie	4
	Dilaté	10
Colon	Inflammé	8
	Hyper mucus	9
	Parésie	2
	Dilaté	8

L'état sanitaire des animaux diffère selon les régimes, bien que le nombre de lapins soit peu élevé (**Tableau 30**). Au sevrage et au cours de la première semaine d'élevage, aucune mortalité n'a été enregistrée dans les 3 lots. Le taux de mortalité a été relativement élevé entre 42 et 56 jours d'âge où il atteint 21%. Par la suite, la mortalité est restée haute, soit 16 % entre 56 et 70 jours d'âge. Il n'y a pas de différence significative entre les lots entre 56 et 70 jours.

Le lot C10 a eu la plus faible mortalité (10%) par rapport au lot C1 (35%) et le lot C0 (28%). Globalement sur toute la durée d'élevage (35 à 70 jours), la mortalité est 2 fois moins élevée dans le lot C10 (23%) que dans le lot C1 (43%) et C0 (45%).

Le taux de morbidité n'est pas différent entre les traitements. La moyenne est de 22% pour les 3 lots sur toute la durée d'élevage.

Tableau 30: Impact de l'addition de levure sur la santé du lapin en croissance

	Dose g/kg (Regime)			P>F
	0 (C0)	1 (C1)	10 (C10)	
Mortalité: nombre de lapin				
35 à 42 j	0	0	0	
42 à 56 j	11 ^{AB} (n=40)	14 ^A (n=40)	4 ^B (n=40)	0.04**
56 à 70 j	7 (n=29)	3 (n=26)	5 (n=36)	NS
35 à 70 j	18	17	9	0.08*
Morbidité: nombre de lapin				
35 à 70 j	8 (n=40)	8 (n=40)	9 (n=40)	NS

^{AB}: les moyennes ayant le même chiffre ne sont pas significativement différents (P=0,05); NS: P>0,15; n: nombre initial de lapin par période. ** contraste C10 vs (C0+C1): P=0,02; * contraste C10 vs (C0+C1): P=0,03

II.C. DISCUSSION

II.C.1. Résistance de la levure

Avant la granulation, la concentration en levures naturelles dans l'aliment témoin atteint 2,5 log (UFC/g). Harrison et *al.* (1988) et Maertens & De Groote (1992) ont aussi fait des observations similaires indiquant la présence de levures « sauvages » dans l'aliment témoin. De plus, l'absence de levures dans le contenu caecal des lapins témoins confirme qu'il n'y a pas de levures sauvages dans le caecum. Cependant, nos résultats montrent que ces levures sont détruites après la granulation. En revanche la levure probiotique ajoutée et protégée par enrobage (Sc 47 Biosaf®), résiste aux conditions difficiles de granulation où la température dépasse parfois 80°C en sortie de notre presse (INRA TANDEM). Toutefois il y a une perte estimée à 1 log environ. Outre leur résistance à la température et à la pression de granulation, les levures résistent à l'acidité stomacale (pH<2) et aux sécrétions biliaires lors de la traversée du tube digestif. Ainsi, la survie de la levure devient plus importante (hausse de 8%) lorsque la quantité incorporée est multipliée par 10. Les taux de survie moyens observés dans cette étude sont améliorés de 39% par rapport à ceux de Maertens & de Groote (1992) avec sensiblement les mêmes doses de levure. En effet, ceux-ci à la suite de l'incorporation de 6,9

log(UFC/g) et 7,7 log(UFC/g) de levure dans l'aliment avant la granulation, ont observé des taux de survie respectifs de 68 et 67% soit 4,7 et 5,2 log(UFC/g) après la granulation.

II.C.2. Impact de l'apport de levure sur l'écosystème caecal

Malgré de fortes concentrations en levures trouvées dans le caecum (environ 5 log UFC/g), les paramètres physico-chimiques notamment les AGV, la MS, le NH₃ et le pH du contenu caecal des lapins ne sont pas modifiés par l'incorporation de levure dans la ration. En revanche, le E_h augmente de 25 mV avec l'apport de la levure. Ces résultats semblent être en contradiction avec ceux de Marden (2007) et Marden *et al.* (2008) qui observent une hausse du pH de 0,2, de la production d'AGV de 12% et une baisse 20 mV du E_h ruminal avec l'apport de 4g de levure dans la ration de la vache. Cela pourrait s'expliquer par les caractéristiques de l'écosystème de ces 2 animaux (lapin vs vache). En effet, le rumen est situé en amont du tube digestif et n'est donc pas totalement anaérobie, et il héberge des microorganismes anaérobies facultatifs contrairement au caecum dans lequel prédominent les bactéries anaérobies strictes. Chez le lapin adulte (42 jours), il a été montré que l'apport de *S. cerevisiae* dans la ration (6 log (UFC/g)), augmentait la proportion molaire de C₂ de 2% par rapport au témoin. Par contre, il n'a pas d'influence significative sur la concentration en AGV totaux et sur les proportions de C₃ et de C₄ ainsi que sur le ratio C₃/C₄ du caecum (Bennegadi, 2002). Des travaux portant sur les bactéries probiotiques ont aussi montré qu'elles n'ont pas d'effet sur les caractéristiques du biotope caecal du lapin (Maertens *et al.*, 1994; Kermauner & Strucklec, 1996).

Les résultats de cette étude montrent que l'apport de levure modifie peu les caractéristiques de la biocénose caecale. Cependant, elle tend à augmenter la diversité microbienne d'environ 11%. Bennegadi (2002) a constaté que l'addition de *S. cerevisiae* dans l'alimentation du lapin avant le sevrage modifiait peu la typologie de la biocénose. Cette observation a été effectuée à l'aide de quelques sondes ARN (couvrant environ 50% de la biocénose). Néanmoins, cet auteur a observé qu'avec l'apport de la levure, la proportion de *R. albus* tend à être 2 fois plus élevée chez les lapereaux à 28 jours et à 42 jours. L'addition prolongée de la levure probiotique dans l'alimentation des jeunes animaux, favoriserait l'implantation et la croissance du microbiote fibrolytique notamment *R. albus*. Chez les ruminants, certaines hypothèses sur l'effet de la levure sur la biocénose ruminale sont fondées sur sa capacité à limiter la croissance des bactéries productrices de lactate (*S. bovis*) et à favoriser en revanche la croissance des bactéries capables de transformer le lactate en propionate (*Megasphaera*

elsdenii et *Selenomonas ruminantium*) (Chaucheyras *et al.*, 1996). D'autres observations effectuées chez le porc avec *S. boulardii*, indiquent que cette levure probiotique stimulerait le microbiote endogène, en particulier les Bifidobactéries et les Lactobacilles. En revanche, elle limiterait le développement des germes indésirables tels que les Entérobactéries et en particulier les Salmonelles (van Winsen *et al.*, 2001).

II.C.3. Impact de l'apport de levure sur les performances zootechniques

La mortalité observée était associée à 90% à la diarrhée. L'apport de levure a permis d'améliorer la santé digestive des lapins en croissance. Dans cette étude, l'amélioration du statut sanitaire se caractérise par la réduction du taux de mortalité de près de 50 % par rapport au témoin sans levure pour une complémentation de 10g/kg de *S. cerevisiae*. Les travaux de Maertens & De Groote (1992), montrent que les doses de 0,15% (8.10^6 UFC/g) et 1% ($6,2.10^7$ UFC/g) de levure *S. cerevisiae* ont permis la réduction de la mortalité respectivement de 76% et 45% par rapport au témoin au cours de la croissance. A l'inverse de nos résultats, la dose de 1% de levure (10g/kg) améliore moins la mortalité par rapport à la dose de 0,15% (1,5g/kg), ces auteurs n'ont donc pas observé d'effet dose sur la santé. Une autre étude effectuée par Hollister *et al.*(1990) avait également montré une réduction de la mortalité de -10,8% par rapport au témoin lorsque le régime du lapin était complétement à l'aide de probiotique *S. cerevisiae* combinée à Lactobacille. Bennegadi (2002) en revanche, constate que l'ajout de *S. cerevisiae* avant le sevrage ne permet pas de prévenir la mortalité et la morbidité due aux entéropathies du lapin. Nous avons également observé l'absence d'effet de la levure sur la morbidité qui pourrait être due aux conditions d'élevage (utilisation des cages individuelles). Bennegadi (2002) a ainsi observé que la morbidité augmentait d'environ +7% dans les élevages en cages collectives par rapport aux élevages en cages individuelles. Le taux de mortalité moyen observé dans ce travail semble être supérieur de +9% à celui de Bennegadi (2002) et à Maertens & De Groote (1992) (14% pour le témoin). Par contre en présence de levure, la mortalité moyenne obtenue par Bennegadi (2002) est supérieure de +6% à celle que nous avons observée.

La levure n'a pas d'effet significatif sur la digestibilité et l'efficacité alimentaire quelle que soit la dose d'incorporation. Par conséquent, la croissance observée dans les 3 lots ne diffère pas. Plusieurs raisons pourraient justifier ce résultat. En effet, la dose de levure utilisée serait peut être insuffisante pour avoir un effet significatif sur les performances des animaux. De plus, le niveau de croissance enregistré dans ce travail est relativement élevé chez les animaux

sains (GMQ=46g/j ; IC=3,2), ce qui rend difficile une amélioration par l'addition de levure. De même, lorsque les animaux sont élevés dans des conditions d'élevage optimales, il est difficile d'obtenir un effet significatif des probiotiques sur les performances de croissance ou sur la santé (Maertens & De Groote, 1992; Onifade *et al.*, 1999). D'autre part le nombre de lapins utilisés dans cette étude est réduit, ce qui limite la détection de faibles différences sur les paramètres zootechniques. A l'inverse de nos observations, Bennegadi (2002) a observé un effet négatif de la levure sur les performances zootechniques du lapin. Selon ce dernier, l'addition de *S. cerevisiae* aurait réduit la croissance des lapins de -19% entre 28 et 70 jours. D'autres travaux n'ont pas révélé de différence entre l'apport de levure et le témoin sur la croissance des lapins (Sonbol & El-Gendy, 1992; Kamra *et al.*, 1996). Cependant, certains travaux révèlent en revanche, un effet linéaire de la dose de levure sur le gain de poids et l'IC (Sonbol & El-Gendy, 1992; El-Hindawy *et al.*, 1993; Gippert *et al.*, 1996; Onifade *et al.*, 1999). En effet, Onifade *et al.* (1999) ont observé pour des doses respectives de 0,04% et 0,08% de levure *S. cerevisiae*, une hausse du GMQ de 6 et 19% ainsi qu'une amélioration de l'IC de 1 et 7% par rapport au témoin. De même, El-Hindawy *et al.* (1993) ont observé une amélioration de 16% et 21% du GMQ et 7 et 11% de l'IC lorsque le régime du lapin est supplémenté de 0,1 et 0,15% de probiotique (*S. cerevisiae* + lactobacilles). Contrairement à nos observations, El-Gaafary *et al.* (1992) ont montré que l'apport de levure améliore la digestibilité des nutriments de 5% pour les MAT et de 4% pour les fibres. Nos résultats sont cependant en accord avec ceux de Kamra *et al.* (1996) qui n'ont pas observé d'amélioration de la digestibilité des nutriments avec l'apport de la levure à l'exception de la MAT. Il a été aussi montré qu'un apport de 6.10^8 UFC/g de levure dans la ration de la vache laitière n'avait aucun effet sur la digestibilité des nutriments sauf la dégradabilité des ADF qui semble être améliorée 32,5% vs 26,3% (Doreau & Jouany, 1998).

II.D. CONCLUSION

La levure probiotique *S. cerevisiae* protégée par enrobage « résiste » relativement bien à la granulation et à la digestion, sachant que des pertes 1 à 2 log sont observées. Le taux de survie de cette levure estimé à partir du logarithme des concentrations ingérées et excrétées, augmente avec la dose. Il est de 90% et 97% pour des taux d'incorporation de 0,1 et 1% dans l'aliment. Cette étude a aussi permis de confirmer l'absence de levures « sauvages » dans le caecum du lapin.

L'addition de la levure dans l'aliment de lapin de 7 semaines d'âge, à la dose de 10^6 UFC/g, n'a pas d'impact sur le biotope caecal à l'exception du E_h qui augmente de 25 mV. Le pH est de 6 et la concentration caecale en AGV totaux et en NH_3 observés sont respectivement de 105 mmol/l et 13 mmol/l. De même que sur le biotope, la levure n'a pas entraîné de modification de la structure du microbiote caecal. En revanche, elle tend à augmenter la diversité microbienne de 11% par rapport au témoin.

La levure dans cette étude a permis une baisse de la mortalité pouvant atteindre 50% lorsque le régime est complété avec 1% de levure. Par contre, aucun effet n'a été observé sur la morbidité (moyenne de 23%). De même, la levure *S. cerevisiae* n'a pas eu d'impact sur la digestibilité des nutriments, la croissance et l'IC au cours de la croissance. Les moyennes respectives de digestibilité de la MS, de la MO et de la MAT sont de 63, 63 et 75%. Celles de la croissance et de l'IC sont de 45 g/j et 3,2 entre le sevrage et l'âge 70 jours.

Pour mieux analyser l'impact de la levure sur la santé digestive et sur l'écosystème caecal, il serait nécessaire de faire des mesures dans des conditions de stress contrôlé, notamment de stress alimentaire tels que l'usage d'un aliment déficient en fibres, et en utilisant un nombre plus élevé d'animaux.

L'effet de la levure sur l'écosystème caecal et le niveau d'inflammation générale ainsi que sur les performances zootechniques pourrait être évalué en fonction du statut nutritionnel et sanitaire de l'animal. Ce sera l'objet de l'étude suivante.

CHAPITRE 4 : IMPACT D'UNE LEVURE PROBIOTIQUE SUR LA SANTE DIGESTIVE DU LAPIN ET SES PERFORMANCES, ET SUR QUELQUES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES : ETAT INFLAMMATOIRE GENERAL, BIOTOPE ET BIOCENOSE CAECALE

Dans les études précédentes, nous avons montré que les paramètres du biotope (le E_h , le pH, le taux de MS), de la biocénose caecale et de l'inflammation pouvaient être influencés ou non par l'âge, la teneur en fibres du régime ou par l'état de santé des lapins. De plus, nous avons constaté que la complémentation de l'aliment à un taux suffisant de levure avait pour conséquence l'augmentation du E_h et une tendance à la hausse de la diversité de la biocénose caecale. D'autre part, l'addition de levure (10g/kg) réduisait la mortalité due à des troubles digestifs.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de la levure sur la biocénose (structure et diversité), le biotope (E_h , pH, AGV) et l'inflammation générale (haptoglobine) à différents stades physiologiques et en fonction du statut nutritionnel (régime DF vs régime témoin). Une seconde partie permettra d'évaluer l'effet de la levure sur la croissance, l'ingestion du lapin et la santé digestive au cours de la croissance du lapin.

Un modèle expérimental 2x2 (déficient en fibres vs témoin) x (1% levure vs 0% levure) a été utilisé (*cf* Matériel & Méthode).

I. RESULTATS

Dans notre travail, la chute de la croissance de 7%, consécutive à la réduction du taux de fibres dans la ration, semble due à une baisse excessive de l'ingestion, indiquant un défaut de régulation dans le cas de régimes très énergétiques (ou très pauvres en fibres).

I.A. COMPOSITION DES ALIMENTS ET CONCENTRATION EN LEVURES DANS LE CAECUM

A l'analyse, l'aliment témoin T contient environ 2 fois plus de fibres (NDF, ADF) que l'aliment DF (**Tableau 31**). Par contre la teneur en amidon est 2 fois plus élevée dans l'aliment DF que dans le témoin T.

Vingt-huit échantillons de contenu ont été analysés pour vérifier le taux de survie de la levure au cours de la digestion.

Après la granulation, la concentration en levures dans les 2 aliments DF10 et T10 est sensiblement égale. L'aliment DF10 contient 7,5 log (UFC/g) et 7,3 log (UFC/g) pour T10. La concentration moyenne en levures obtenue dans le contenu caecal de lapins ayant bénéficié des régimes DF10 et T10 après euthanasie est de 6,2 log (UFC/g) soit une baisse de 1 log par rapport à l'aliment. Par contre la concentration chez les lapins dont le régime ne contenait pas de levure est nulle.

Tableau 31: Composition chimique des deux aliments avant l'addition de la levure

Composition (g/100g MS)	T	DF
MS	91,5	90,6
MM	9,1	6,5
MO	91,1	93,5
MAT	18,5	22,2
CB	17,1	7,3
NDF	37,4	20,1
ADF	18,7	8,7
ADL	4,7	2,1
Hémicellulose*	18,7	11,5
Cellulose**	14,0	6,6
Amidon	16,2	36,4
Levure (UFC/g)***	2.10 ⁷	3.10 ⁷

*NDF-ADF ; **ADF-ADL, *UFC par g de granulé analysé, T : témoin ; DF : déficient en fibres

I.B. STATUT SANITAIRE ET OBSERVATIONS GENERALES

Les contrôles quotidiens ont permis de détecter et de suivre l'évolution des animaux malades. Les lapins en phase d'agonie ou morts ont été autopsiés. Plus de 95% des cas de troubles digestifs se manifestent par la diarrhée indépendamment du régime. Les lésions observées sont résumées dans le **tableau 32**. Cependant, il y a eu 2% des cas de mortalité sans cause apparente.

Tableau 32: Relevé des lésions sur des lapins autopsiés, atteints de troubles digestifs

	Estomac	Intestin grêle	Caecum	Colon
Contenu liquide	36	46	41	38
Dilatation	8	32	31	33
Parésie	0	1	11	1
Congestion	0	0	9	5
Mucus	0	4	6	8

Les incidents sanitaires sont plus importants entre 44 et 64 jours d'âge (tous lots confondus) (**Tableau 33**). 4% de mortalité ($P = 0,06$) et environ 5% de morbidité ($P = 0,10$) en plus ont été enregistrés entre 44 et 64 jours par rapport à la période 28-43 jours. Le risque sanitaire augmente en moyenne de 8% pendant cette seconde période d'élevage ($P = 0,01$).

Il n'y a pas d'interaction significative entre l'âge et la teneur en fibres du régime, ni entre l'âge et la dose de levure, en ce qui concerne l'état sanitaire (mortalité, morbidité et risque sanitaire). Par contre il y a une interaction entre la teneur en fibres de l'aliment et la levure sur la morbidité et le risque sanitaire pendant les périodes 28-43 jours et 28-64 jours (**Tableau 33**).

Entre 44 et 64 jours, le taux de fibres et l'apport de levure n'ont pas d'effet sur le statut sanitaire des lapins. Le taux de mortalité, de morbidité et le risque sanitaire observés sont respectivement de 11, 13 et 25%.

Tableau 33: Données sanitaires en fonction de la teneur en fibres du régime et en fonction de la dose de levure

	Fibres		Levure		$P>F$		
	T	DF	Lev-	Lev+	F	Lev	F x Lev
28j-43j							
Effectif	134	170	152	152			
Mortalité	8 (6,0)	14 (8,2)	16 (10,5)	6 (4,0)	0,25	0,14	0,19
Morbidité	10 (7,4)	17 (10,0)	16 (10,5)	11 (7,2)	0,17	0,10	0,02
Risque sanitaire	18 (13,4)	31 (18,2)	32 (21,1)	17 (11,2)	0,04	<0,01	<0,01
44j-64j							
Effectif	106	136	116	126			
Mortalité	12 (11,4)	15 (11,0)	14 (12,1)	13 (10,4)	0,91	0,69	0,97
Morbidité	14 (13,3)	18 (13,2)	16 (13,8)	16 (12,8)	0,98	0,73	0,36
Risque sanitaire	26 (24,8)	33 (24,3)	30 (25,9)	29 (23,2)	0,92	0,57	0,48
28j-64j							
Effectif	134	170	152	152			
Mortalité	20 (14,9)	29 (17,1)	30 (19,7)	19 (12,5)	0,47	0,06	0,27
Morbidité	19 (14,2)	32 (18,8)	30 (19,7)	21 (13,8)	0,13	0,06	0,02
Risque sanitaire	39 (29,1)	61 (35,9)	60 (39,5)	40 (26,3)	0,11	<0,01	<0,01

T : témoin, DF : déficient en fibres ; lev- : aliment sans levure, lev+ : aliment contenant 1% de levure, F : taux de fibres, lev : dose de levure. Les valeurs entre parenthèses désignent des pourcentages.

I.B.1. Effets du taux de fibres

La réduction du taux de fibres dans la ration n'affecte pas le taux de mortalité au cours de la croissance. Les moyennes entre le sevrage et 43 jours d'une part et d'autre part entre le sevrage et l'âge de 64 jours sont respectivement de 7 et 16%.

Deux semaines après le sevrage, la morbidité observée est indépendante du niveau de fibres. Lorsque l'aliment ne contient pas de levure, la morbidité moyenne est de 11% (DF0 et T0). Par contre, lorsque l'aliment contient de la levure, la morbidité est 8 fois plus élevée avec le régime déficient en fibres (DF10) par rapport au régime conventionnel (T10). Du sevrage à l'âge de 64 jours, il n'y a pas d'effet du taux de fibres sur la morbidité, la moyenne est de 20% pour les régimes sans levure (DF0 et T0). En revanche, avec l'addition de levure, la morbidité est 3 fois plus élevée avec la réduction du taux de fibres par rapport au régime normal (T10) (**Tableau 34**).

Tableau 34: Mortalité, morbidité et risque sanitaire enregistrés par période en fonction du régime

	Régime à 0% levure		Régime à 10% levure		P>F
	T0	DF0	T10	DF10	
28j-43j					
Effectif	67	85	67	85	
Mortalité	8 (11,9)	8 (9,4)	0 (0)	6 (7,1)	0,41
Morbidité	9 ^A (13,4)	7 ^A (8,2)	1 ^B (1,5)	10 ^A (11,8)	0,15*
Risque sanitaire	17 ^A (25,4)	15 ^A (17,7)	1 ^B (1,5)	16 ^A (18,8)	0,03*
44j-64j					
Effectif	49	67	57	69	
Mortalité	6 (12,4)	8 (11,9)	6 (10,5)	7 (10,1)	0,97
Morbidité	8 (16,3)	8 (11,9)	6 (10,5)	10 (14,5)	0,81
Risque sanitaire	14 (28,6)	16 (23,9)	12 (21,1)	17 (24,6)	0,84
28j-64j					
Effectif	67	85	67	85	
Mortalité	14 (20,9)	16 (18,8)	6 (9,0)	13 (15,3)	0,26
Morbidité	15 ^A (22,4)	15 ^A (17,7)	4 ^B (6,0)	17 ^A (20,0)	0,07**
Risque sanitaire	29 ^A (43,3)	31 ^A (36,5)	10 ^B (14,9)	30 ^A (35,3)	<0,01**

Morbidité : * contrastes T10 vs DF0 : P=0,10, T10 vs DF10: P=0,04, T10 vs T0 :P=0,03

** contrastes T10 vs DF0 : P=0,04, T10 vs DF10: P=0,02, T10 vs T0 :P=0,01

Risque sanitaire : *contrastes T10 vs DF0 : P=0,01, T10 vs DF10: P<0,01, T10 vs T0 :P<0,01. **contrastes T10 vs DF0 : P<0,01, T10 vs DF10: P<0,01, T10 vs T0 :P<0,01

Les valeurs entre parenthèses désignent des pourcentages. ^{AB} les valeurs de la même ligne ayant la même lettre en exposant sont statistiquement égales

Le risque sanitaire 2 semaines après le sevrage, est indépendant du niveau de fibres. Avec les régimes ne contenant pas de la levure, la moyenne est donc de 22%. Par contre, lorsque l'aliment contient de la levure, le risque sanitaire est 13 fois plus élevé avec le régime déficient en fibres (DF10) par rapport au régime conventionnel (T10). Entre le sevrage et l'âge de 64 jours, il n'y a pas d'effet du taux de fibres sur le risque sanitaire, la moyenne est de 40%. En revanche, avec l'addition de levure, le risque sanitaire est 2 fois plus élevé avec la réduction du taux de fibres par rapport au régime normal (T10).

I.B.2. Effets de la levure

L'apport de levure *S. cerevisiae* n'a pas d'effet sur la mortalité pendant les deux semaines qui suivent le sevrage. Cependant la levure tend à réduire de 50% la mortalité durant cette période ($P=0,14$). Du sevrage à l'âge de 64 jours, la levure tend à baisser de 37% la mortalité ($P<0,06$).

Entre le sevrage et 43 jours d'âge, l'addition de levure dans le régime normal (T), réduit la morbidité de 9 fois par rapport au régime sans levure ($P=0,03$). L'apport de levure dans le régime déficient en fibres n'apporte pas d'amélioration, le taux de morbidité moyen est de 10%. Entre le sevrage et 64 jours, l'addition de levure fait baisser d'environ 4 fois la morbidité avec le régime normal ($P=0,01$). Par contre l'apport de levure dans le régime déficient en fibres n'a pas d'effet sur la morbidité, la moyenne observée est de 19%.

Le risque sanitaire est 17 fois plus bas avec l'addition de levure dans le régime conventionnel (T) ($P<0,01$) entre le sevrage et 43 jours. Par contre, l'addition de levure au régime déficient en fibres n'améliore pas le risque sanitaire, la moyenne est de 18%. Du sevrage à l'âge de 64 jours, l'apport de levure dans le régime conventionnel (T) réduit de 3 fois le risque sanitaire ($P<0,01$), contrairement à l'apport de levure dans le régime déficient en fibres (la moyenne est de 35%).

I.C. MESURE ZOOTECHNIQUES : CROISSANCE ET EFFICACITE ALIMENTAIRE

L'évolution de la croissance et de l'efficacité alimentaire n'a été évaluée que sur les lapins sains qui ne présentent pas de signes de morbidité apparents.

L'analyse des données montre une interaction significative entre la période d'observation et la teneur en fibres de l'aliment pour le GMQ ($P<0,01$). En revanche, il n'y a aucune interaction entre la teneur de l'aliment en fibres et l'apport de levure. Ainsi, l'effet de la teneur en fibres et de celle de la levure sur le gain de poids et l'IC est présenté par le **Tableau 35**.

I.C.1. Effets de la teneur en fibres du régime

Entre le sevrage et 43 jours, les lots de lapins recevant les aliments déficients en fibres (DF) ont une croissance journalière (GMQ) et un IC réduits respectivement de 18 et 17% (P<0,01) par rapport aux lots témoins (T).

Entre 44 et 64 jours, aucun effet significatif de la teneur en fibres n'est constaté sur le gain de poids, la moyenne observée est de 46 g/j. Par contre, l'IC est réduit de 21% (P<0,01) par rapport au régime conventionnel (T).

Du sevrage à l'âge de 64 jours, la réduction du taux de fibres dans l'aliment, entraîne une baisse du GMQ et de l'IC respectivement de 7 et 20% (P<0,01).

Tableau 35: GMQ et IC par période d'élevage en fonction de la teneur en fibres du régime et en fonction de la dose de levure

	Fibres		Levure		RMSE	P		
	T	DF	Lev-	Lev+		F	Lev	F x Lev
Nombre de cage	26	34	30	30				
28j-43j	26	34	30	30				
GMQ (g)	52,3	42,9	46,2	47,8	3,9	<0,01	0,07	0,12
IC	1,8	1,5	1,7	1,6	0,2	<0,01	0,74	0,81
44j-64j								
GMQ (g)	45,4	46,2	46,2	45,6	4,3	0,51	0,62	0,65
IC	2,9	2,3	2,6	2,6	0,5	<0,01	0,81	0,71
28j-64j								
GMQ (g)	48,2	44,9	46,2	46,4	3,3	<0,01	0,67	0,27
IC	2,5	2,0	2,2	2,2	0,3	<0,01	0,64	0,66

T : témoin, DF : déficient en fibres ; lev- : aliment sans levure, lev+ : aliment contenant 1% de levure, F : taux de fibres, lev : dose de levure.

I.C.2. Effets de l'addition levure

Entre le sevrage et 43 jours d'âge, l'addition de levure dans le régime a tendance à améliorer le GMQ de 1,3 g/j (soit 3%) par rapport au témoin sans levure (P=0,07). Elle n'a par contre pas d'effet sur l'IC, la moyenne est d'environ 1,7. De 44 à 64 jours, aucun effet significatif de la levure n'est observé sur le GMQ et sur l'IC. Les moyennes respectives sont de 46 g/j et 2,6.

De même, du sevrage à 64 jours, aucun effet significatif de la levure n'est également observé sur le GMQ et sur l'IC dont les moyennes respectives sont de 46 g/j et 2,2.

I.D. EFFET DE LA LEVURE ET DU NIVEAU DE FIBRES SUR L'INFLAMMATION : TAUX D'HAPTOGLOBINE

Il n'y a pas d'interaction entre l'apport de levure et la teneur en fibres de l'aliment sur le taux d'haptoglobine sanguin (**Tableau 36**). Les différentes observations ont été effectuées à 36 et 56 jours.

Tableau 36: Effet de la teneur en fibres du régime et de l'apport de 1% de levure (*S. cerevisiae*) sur la concentration d'haptoglobine sérique

	Fibres		Levure		RSEM	P		
	T	DF	Lev-	Lev+		F	Lev	F x Lev
36j								
N	19	20	22	17				
Haptoglobine (mg/ml)	1,4	1,4	1,5	1,2	0,4	1	0,06	0,9
58j								
N	20	20	19	21				
Haptoglobine (mg/ml)	1,7	1,8	1,7	1,8	0,4	0,2	0,6	0,9

T : témoin, DF : déficient en fibres ; lev- : aliment sans levure, lev+ : aliment contenant 1% de levure, F : taux de fibres, lev : dose de levure ; N : nombre de lapin.

I.D.1. Effet de la teneur en fibres du régime

Une semaine après le sevrage, la réduction de la teneur en fibres de l'aliment n'a pas d'effet sur la concentration sanguine d'haptoglobine. La concentration moyenne observée est de 1,4 mg/ml. De même, 4 semaines après le sevrage, la teneur en fibres dans l'aliment n'a aucun effet sur le taux d'haptoglobine. La moyenne observée est d'environ 1,8 mg/ml. La variabilité (Cv_r) observée à 36 jours est de 30%.

I.D.2. Effet de l'addition de levure

La concentration sanguine d'haptoglobine semble s'élever avec l'âge : +18% à 63 jours d'âge comparé au sevrage (35j.; P<0,01 ; Cv_r=25%). L'apport de levure jusqu'à une semaine après le sevrage, tend à réduire cette concentration d'haptoglobine de 33% (P=0,06). 4 semaines après le sevrage, elle n'apporte aucune variation sur la concentration d'haptoglobine. La moyenne observée est de 1,8 mg/ml. La variabilité (Cv_r) observée à 58 jours est de 22%.

I.E. EFFET DE LA LEVURE ET DU NIVEAU DE FIBRES SUR L'ECOSYSTEME CAECAL

I.E.1. Impact sur le biotope

Les résultats portant sur les AGV ne seront pas présentés dans cette partie en raison de délais d'analyse trop longs.

Aucune interaction n'a été décelée entre l'apport de levure, la teneur en fibres de l'aliment et l'âge de mesure sur les paramètres du biotope caecal (**Tableau 37**).

Tableau 37: Effet de la teneur en fibres du régime et de l'addition de levure sur les paramètres physiques et chimiques du contenu caecal

	Fibres		Levure		RSEM	P		
	T	DF	Lev-	Lev+		F	Lev	F x Lev
36j								
N	19	20	22	17				
E _h (mV)	-196	-188	-194	-190	23	0,3	0,5	0,3
pH	5,7	6,0	5,9	5,9	0,4	0,02	0,8	0,7
MS (%)	23,4	23,9	23,6	23,7	1,3	0,4	0,9	0,2
NH ₃ (mmol/l)	13,5	11,8	12,4	12,9	4,0	0,3	0,8	0,4
58j								
N	20	20	19	21				
E _h (mV)	-186	-185	-190	-182	24	0,9	0,3	0,8
pH	5,9	5,9	5,9	5,9	0,3	0,4	0,8	0,4
MS (%)	22,1	23,5	23,8	21,8	2,3	0,05	<0,01	0,5
NH ₃ (mmol/l)	6,3	14,8	8,4	12,2	6,2	<0,01	0,15	0,6

T : témoin, DF : déficient en fibres ; lev- : aliment sans levure, lev+ : aliment contenant 1% de levure, F : taux de fibres, lev : dose de levure ; N : nombre de lapin.

° Effet de la teneur en fibres du régime

A 36 jours d'âge, seul le pH est influencé par le taux de fibres dans l'aliment. En effet, la réduction de la teneur du régime en fibres (de 19% à 9% ADF) entraîne une hausse du pH de + 0,3 par rapport à l'aliment normal (T) (P<0,05). En revanche, le E_h, la MS et le NH₃ du contenu caecal ne sont pas influencés par la réduction du taux de fibres dans la ration à cet âge, les moyennes respectives sont -192 mV, 23,7% et 12,7 mmol/l.

Quatre semaines après le sevrage, l'apport d'une ration déficiente en fibres entraîne une hausse de 6% du taux de MS (P=0,05) et de la concentration en NH₃ de 135% (P<0,01). Par contre, le E_h et le pH ne varient pas avec la réduction de la teneur de fibres dans le régime, les moyennes sont respectivement de -186 mV et 5,9.

◦ Effet de l'addition de levure

Les observations effectuées à 36 jours d'âge montrent que l'apport de levure dans l'alimentation, n'apporte aucune modification du pH, E_h , MS et de la concentration en NH_3 dans le caecum. Les moyennes de pH, E_h , MS et de NH_3 , sont 5,9, -192 mV, 23,7% et 12,7 mmol/l.

A 58 jours, le lot ayant bénéficié d'un apport de levure dans l'alimentation, a un taux de MS 8% plus bas que le lot témoin sans levure ($P < 0,01$). L'apport de levure dans la ration, n'a eu aucun effet sur le pH, le E_h et la concentration de NH_3 , avec des moyennes respectives de -186 mV, 5,9 et 10,3 mmol/l.

I.E.2. Impact sur la biocénose

La diversité et la structure du microbiote ont été étudiées en fonction de la teneur du régime en fibres et de l'apport de levure. Par ailleurs, il n'y a pas d'interaction entre la teneur en fibres de l'aliment, l'apport de levure et l'âge, sur l'indice diversité de Simpson. Cependant, la variabilité (CVr) atteint 20%.

◦ Effet de la teneur en fibres du régime

La réduction du taux de fibres dans l'aliment n'a pas d'effet significatif sur la diversité. La moyenne est 4,7.

Le nMDS (non Metric Multidimensional Scaling) (**Figure 49**) et l'ANOSIM ou analyse de la similarité ($R\text{-ANOSIM} = -0,01$; $P = 0,1$) montrent que le teneur en fibres du régime n'a pas d'effet sur la structure du microbiote.

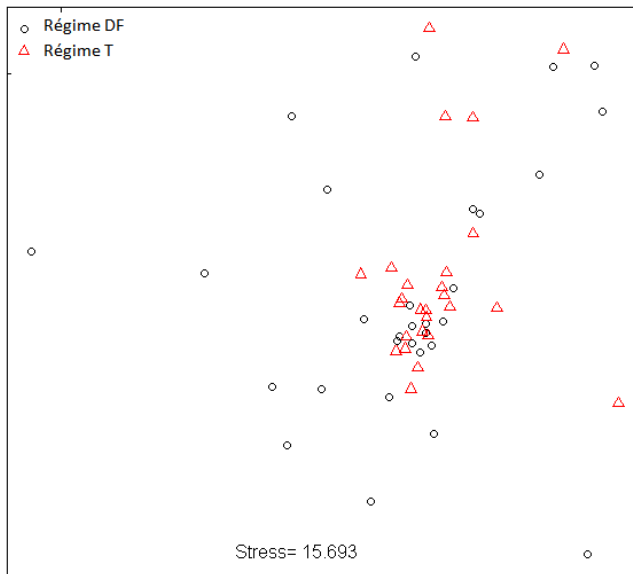


Figure 49: Impact de la teneur en fibres du régime sur les profils CE-SSCP du contenu caecal
(Un point correspond à un lapin)

- Effet de l'addition de levure

L'apport de levure, tend à augmenter la diversité microbienne du contenu caecal de 9% ($P=0,07$). Les moyennes observées sont respectivement de 4,9 avec l'apport de levure et 4,5 pour le régime sans levure (**Figure 50**).

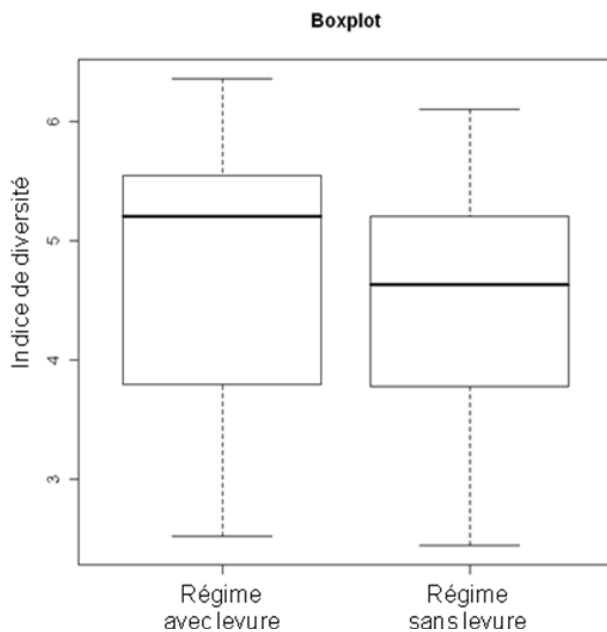


Figure 50: Impact de l'addition de levure sur la diversité microbologique caecale ($P=0,07$; $Cvr=20\%$)

(Régime avec levure=DF10+T10 ; Régime sans levure=DF0+T0)

L'apport de levure n'a pas d'effet sur la structure du microbiote bactérien (nMDS **Figure 51** $R\text{-ANOSIM}=-0,01$; $P=0,3$).



Figure 51: Impact de l'addition de la levure sur la structure du microbiote bactérien du contenu caecal chez le lapin en croissance âgé de 36 et 58 jours
(Un point correspond à un lapin)

- Similarité entre les profils

L'étude de la similarité entre les profils pris 2 à 2 en fonction de la nature du régime, à l'aide d'un test-t montre que la biocénose bactérienne caecale chez les lapins nourris avec le régime déficient en fibres (DF) est similaire à 91% de celle du lot témoin (T). Elle est équivalente à 97% entre les témoins sans levure (T0) et le témoin avec levure (T10). En revanche, le lot déficient en fibres sans levure est à 100% similaire au lot avec la levure. De même, la similarité entre les lots sans levure (DF0+T0) et les lots avec la levure (DF10+T10) est de 100% (**Figure 52**).

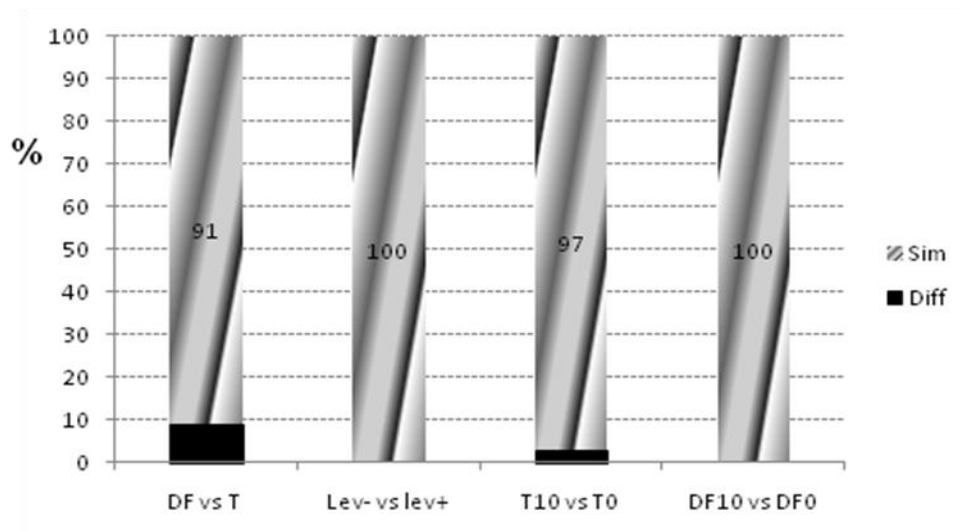


Figure 52: Similarité entre les profils microbiologiques en fonction de la teneur en fibres et de l'apport de levure à l'aide d'un test-t
(Lev-=DF0+T0 ; Lev+=DF10+T10)

I.F. CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES LAPINS MALADES

Le suivi quotidien individuel en cage collective a permis d'éliminer les lapins souffrant de diarrhée aiguë. Ces animaux morbides ont été euthanasiés et autopsiés. Les prélèvements effectués sur les lapins atteints d'entérite et les lapins sains a permis de faire une étude comparative des paramètres physico-chimiques et du niveau d'haptoglobine sanguine. Le **Tableau 38** montre une différence significative sur tous les paramètres évalués à l'exception des caractéristiques de la biocénose (structure et diversité). Le potentiel redox des lapins morbides augmente de + 20mV par rapport à celui des lapins sains ($P<0,05$). Le pH des animaux malades est supérieur de +0,6 à celui des animaux sains ($P<0,01$). Il en est de même pour le NH_3 qui passe du simple au double chez les animaux morbides ($P<0,01$). Le % de MS chute de moitié chez les lapins malades ($P<0,01$). Le taux d'haptoglobine est environ 2 fois plus élevé chez les malades ($P<0,01$).

Tableau 38: Caractéristiques physiopathologiques des lapins morbides

	Statut sanitaire		RMSE	P>F
	Morbide	Sain		
E_h (mV)	-170	-191	32	0,02
pH	6,5	5,9	0,4	<0,01
MS %	12,1	23,4	3,1	<0,01
NH_3 (mMol/l)	26,0	12,3	8,1	<0,01
Haptoglobine (mg/ml)	2,9	1,5	0,4	<0,01

L'apparition de troubles digestifs n'entraîne pas la modification de l'indice de diversité, la moyenne est de 4,7 et le coefficient de variation de 21%.

Les troubles digestifs n'ont pas provoqué une modification de la structure des microbiotes, représentée par le nMDS (**Figure 53**) (R-ANOSIM=-0,02 ; P=0,2). La similarité entre la biocénose des lapins morbides et celle des lapins sains, atteint 96%.

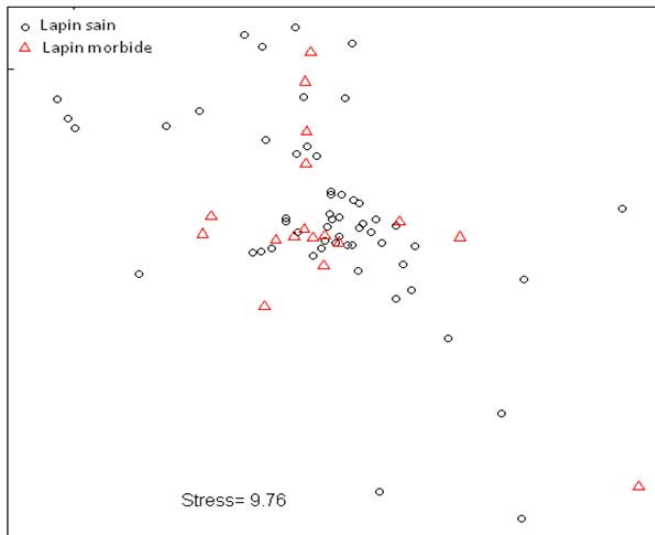


Figure 53: Structure de la biocénose bactérienne caecale en fonction du statut sanitaire (lapins morbides et des lapins sains) entre le sevrage et 58 jours
(Un point correspond à un lapin)

I.G. CORRELATION ENTRE BIOTOPE, BIOCENOSE ET HAPTOGLOBINE

La structure de la biocénose n'est pas influencée par les paramètres du biotope étudié (E_h , pH, NH_3 , MS) (Tableau 39).

La concentration d'haptoglobine est significativement corrélée avec le pH, le NH_3 et la MS avec des R^2 variant de 0,18 à 0,58. Tous ces paramètres du biotope sont corrélés entre eux sauf entre le pH et le E_h , entre le pH et le NH_3

Tableau 39: Corrélation (R^2) biotope, biocénose et haptoglobine sérique

	Diversité	Haptoglobine	pH	E_h	NH_3	MS
Diversité	1	0,06 (0,02)	0,01 (0,3)	0,01 (0,6)	0,06 (0,02)	0,02 (0,16)
Haptoglobine		1	0,18 (<0,01)	0,05 (0,03)	0,22 (<0,01)	0,58 (<0,01)
pH			1	0,01 (0,5)	0,02 (0,17)	0,29 (<0,01)
E_h				1	0,01 (0,9)	0,06 (0,02)
NH_3					1	0,12 (<0,01)
MS						1

() : $P > F$

II. DISCUSSION

II.A. CARACTERISTIQUES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES LAPINS MORBIDES

Les perturbations digestives non-spécifiques (agents pathogènes non connus) apparaissent après le sevrage et se poursuivent jusqu'à la fin de l'élevage avec plus de mortalité entre 44 et 64 jours d'âge, marquées par la hausse du risque sanitaire de 7 à 19%. Le symptôme principal de ces troubles digestifs est la diarrhée associée à la baisse de l'ingestion et à la chute de la croissance, avec à l'autopsie un contenu caecal liquide, et des organes digestifs parfois dilatés et/ou inflammés (intestin grêle et caecum/ côlon).

L'apparition de ces troubles entraîne des perturbations du biotope (baisse des AGV, hausse E_h , pH etc.) associés à des modifications de la motilité digestive et du transit (Laplace, 1978; Bennegadi, 2002). En effet, l'hypomotilité augmente le temps de séjour et favorise donc la stase alimentaire, pouvant conduire à une prolifération des bactéries potentiellement pathogènes et une accumulation des produits de fermentation et de gaz. Ceci pourrait aussi se combiner à une entrée potentielle d'oxygène dans le caecum (via l'eau de boisson), ce qui justifierait la hausse de 20 mV du E_h , du pH de 0,6, de 2 fois la concentration de NH_3 et la chute de 50% du taux de MS caecale observées chez les lapins morbides. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus antérieurement dans ce travail et ceux de quelques auteurs (Gidenne, 1997; Bennegadi *et al.*, 2003).

Néanmoins, ces perturbations du biotope causeraient peu de modifications de la biocénose bactérienne, qui serait similaire à 96% des lapins morbides et des lapins sains. Cependant au cours des troubles digestifs, la proportion de certaines bactéries peut être réduite. Il s'agit des bactéries du genre anaérobie strict gram négatifs (*Bacteroides*) notamment les fibrolytiques représentant 5% du microbiote (Gidenne *et al.*, 2008) ou des *Archaea* (non détectés par les amorces utilisées dans ce travail) dont la concentration régresse après le sevrage (moins de 15%) ou encore des *E. coli* et des *Clostridies* potentiellement pathogènes (Bennegadi, 2002; Bennegadi *et al.*, 2003; Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004). Bien que ces modifications soient faibles à l'échelle du microbiote caecal, elles seraient tout de même suffisantes pour désorganiser le fonctionnement digestif du lapin.

Les troubles digestifs sont associés à un indicateur de l'inflammation générale : le taux d'haptoglobine dont la concentration sanguine double pendant les troubles digestifs. La hausse du taux sérique d'haptoglobine lors des troubles de la santé a été déjà observée dans nos résultats précédents, mais aussi chez les monogastriques et chez les ruminants (Melchior

et al., 2002; Le Floc'h *et al.*, 2004; Genheim *et al.*, 2007; Nikunen *et al.*, 2007). En effet, chez la vache (Genheim *et al.*, 2007; Nikunen *et al.*, 2007) et chez le porc (Melchior *et al.*, 2002; Le Floc'h *et al.*, 2004), infectés respectivement de *Pasteurella multocida* et de *Mycobacterium tuberculosis*, la concentration d'haptoglobine sérique est le double, ou le triple de la concentration observée dans le sang des animaux sains.

II.B. IMPACT DE LA REDUCTION DE LA TENEUR EN FIBRES DE LA RATION

Le stress alimentaire notamment le déficit en fibres, est un facteur favorisant l'apparition des troubles digestifs chez le lapin (Blas *et al.*, 1991; Gidenne & Jehl, 2000; Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004). La réduction du taux de fibres de 50% dans la ration opérée dans ce travail, a pour but de favoriser les entéropathies non spécifiques. Cependant, la réduction de la teneur en fibres de 19 à 9% d'ADF, n'a pas permis d'augmenter significativement le risque sanitaire contrairement aux travaux de Bennegadi (2002) et de Gidenne & Jehl (1999). En effet, il a été observé que la réduction du niveau de fibres de 19 à 9% faisait doubler le risque sanitaire chez le lapin (Bennegadi, 2002). De même, Gidenne & Jehl (1999b) ont observé, une hausse du risque sanitaire de 20 à 16% avec la réduction du taux de fibres dans la ration. Ces auteurs expliquent l'action des fibres sur la santé par le niveau d'ingestion, le transit digestif et l'écosystème caecal. Ainsi, avec une ration réduite en fibres, l'ingestion (y compris celle des fibres) baisse car le lapin régule son ingéré en fonction du niveau d'énergie digestible dans l'aliment. Avec la réduction du taux de fibres alimentaires, le temps de transit des nutriments dans le caecum se rallonge (Gidenne, 1994; Bellier & Gidenne, 1996; Gidenne *et al.*, 2000). De plus, le ralentissement du transit digestif réduit le renouvellement des substrats pour la biocénose caecale, pouvant induire une baisse du microbiote fibrolytique, et de l'activité fermentaire (baisse de la concentration AGV, hausse du ratio C₃/C₄ et une alcalinisation du pH) (Morisse *et al.*, 1985). Ainsi, le déséquilibre au niveau de l'écosystème caecal associé à un potentiel affaiblissement de l'effet barrière de la biocénose, serait à la base de la hausse du risque d'entéropathie observée chez les animaux recevant une alimentation déficiente en fibres.

Nous avons observé que la réduction du taux de fibres dans l'aliment, a des effets variables sur le biotope caecal. Elle entraîne une augmentation du pH une semaine après le sevrage de 0,2, tandis qu'elle n'a eu aucun effet sur le E_h, la MS et le NH₃. A 58 jours par contre, elle engendre une hausse de la MS de 1,4 unité et de 2 fois la concentration de NH₃. En revanche, aucun effet n'est observé sur le E_h et le pH caecal. Selon Gidenne *et al.* (2008), bien que

l'augmentation de la teneur en fibres de la ration n'entraîne pas nécessairement d'augmentation de l'activité fibrolytique bactérienne ou de modification du profil fermentaire, une réduction trop importante du taux de fibres (ADF<10%) peut provoquer une rétention trop longue des *digesta* dont les conséquences pourraient être une perturbation des paramètres du biotope caecal. Sur la biocénose également, la réduction du taux de fibres n'a pas entraîné de modification de la structure de la communauté et de la diversité bactérienne du caecum. La similarité entre le microbiote bactérien caecal des animaux témoins et ceux des animaux déficients en fibres est élevée et atteint 91%. Ce faible effet du taux de fibres serait aussi en lien avec l'âge des lapins, dont la communauté bactérienne se stabiliserait à l'âge adulte (Gidenne *et al.*, 2008; Michelland *et al.*, 2008). La concentration en fibres alimentaires pourrait tout de même moduler la biocénose soit directement soit indirectement (Gidenne *et al.*, 2008). Ainsi, la réduction du taux de fibres, défavoriserait les bactéries cellulolytiques (*R. albus*) et les *Archaea* (Bennegadi, 2002).

Le faible effet de la réduction du taux de fibres dans la ration sur le statut sanitaire du lapin est corrélé avec la réponse inflammatoire représentée par un taux d'haptoglobine sérique sensiblement égal quelle que soit la nature du régime utilisé. Les moyennes observées à 58 jours semblent tout de même élevées pour des lapins sains au vu de nos données précédentes. En effet, la moyenne du taux d'haptoglobine observée précédemment chez les lapins sains est 1,5 mg/ml. Cette légère hausse du taux d'haptoglobine à 58 jours serait liée à l'augmentation du risque sanitaire observé à cet âge par rapport à l'âge de 36 jours (31% à 36 jours vs 55% à 58 jours).

II.C. IMPACT DE L'ADDITION DE LEVURE *S. CEREVISIAE*

La comparaison des 4 régimes (interaction entre la teneur en fibres et l'apport de levure) montre que l'effet de la levure est plus important en l'absence de stress alimentaire. L'aliment à taux normal de fibres (19% d'ADF) complétement en levure, entraîne une baisse du risque sanitaire de 3 fois par rapport au témoin sans levure. En revanche, la levure n'a ici aucun effet lorsque l'aliment est déficient en fibres. En plus, l'addition de levure n'a permis aucune amélioration de la croissance et de l'efficacité alimentaire. Ces résultats sont plutôt en contradiction avec les données bibliographiques qui estiment que l'effet des probiotiques est plus important lorsque les animaux sont élevés dans des conditions sanitaires ou d'alimentation défavorables (Maertens & De Groote, 1992; Onifade *et al.*, 1999; Marden,

2007). Nos résultats pourraient être influencés par le nombre réduit d'échantillon de lapins utilisés pour des études zootechniques d'une part, et par le comportement alimentaire du lapin face au régime déficient en fibres d'autre part, dont l'ingestion est régulée en fonction de la concentration énergétique. De plus, les performances de croissance observées avec les régimes sans levure sont déjà bonnes et ne peuvent par conséquent subir de grandes améliorations perceptibles.

Ce dernier constat, expliquerait l'absence d'effet majeur de la levure *S. cerevisiae* sur l'écosystème caecal. Ainsi, les paramètres du biotope notamment le pH, le E_h et le NH_3 n'ont pas subi de variation importante avec l'apport de levure dans l'aliment. Les moyennes de pH (5,9) et de NH_3 (10-12 mmol/l) sont équivalentes à celles observées chez les lapins adultes sains (Carabano & Piquer., 1998; Gidenne *et al.*, 2007b). En revanche, le E_h semble élevé par rapport aux observations précédentes où la moyenne variait entre -220 et -230 mV. Elle est plus proche de la valeur moyenne chez les ruminants qui est d'environ -130 mV et -180 mV avec l'apport de *S. cerevisiae* (Marden, 2007). Nos résultats chez le lapin, sont en "contradiction" avec ceux observés chez la vache en production par cet auteur, qui observe une hausse du pH de 0,4 et une baisse du E_h de 50 mV et de la concentration de NH_3 de 41% avec l'apport de 5 g de levure dans la ration acidogène. Quant à la biocénose bactérienne caecale, l'addition de levure n'entraîne aucune modification de la diversité bien que cette dernière tende à augmenter de 9% (P=0,07). Des résultats de réduction de la diversité bactérienne ont été observés avec l'apport de certains antibiotiques chez le lapin (Abecia, 2006; Abecia *et al.*, 2007). Bennegadi (2002) a constaté qu'avec un apport de levure *S. cerevisiae*, la proportion de bactéries fibrolytiques notamment celle de *R. albus* tend à être 2 fois plus abondante après le sevrage. Cet auteur a aussi observé que chez les jeunes lapereaux, la levure modifiait peu la typologie du microbiote bactérien, analysé partiellement par une technique d'hybridation de sondes ARN-16S.

III. CONCLUSION

Lors de troubles digestifs, le pH et le E_h du contenu caecal augmentent de 0,6 et 20 mV ainsi que le NH_3 dont la concentration est le double de celle d'un lapin sain. Le taux sérique d'haptoglobine double également chez le lapin malade. En revanche, les troubles digestifs n'entraînent pas de variation de la diversité ni de la structure de la

communauté bactérienne du caecum. L'indice de diversité moyen est de 4,7 et la similarité de 96%.

La réduction de taux de fibres de 50% (de 19% à 9% d'ADF) a peu modifié l'état sanitaire des animaux dans notre étude (mortalité, morbidité, risque sanitaire) et le taux sérique d'haptoglobine. Aucun effet n'est également observé sur le biotope (pH, E_h , MS) à l'exception du NH_3 à 53 jours d'âge dont la concentration double avec la réduction du taux de fibres. La réduction du taux de fibres entraîne une baisse de la croissance de 7% et de l'IC de 20%. Par contre, cela n'a eu aucun effet important sur la diversité et sur la structure du microbiote bactérien caecal. La diversité et la similarité observées sont respectivement de 4,7 et de 91%.

La levure probiotique *S. cerevisiae* a permis l'amélioration de la santé digestive des lapins, illustrée par la réduction du risque sanitaire d'environ 3 fois lorsqu'elle est apportée à un régime équilibré. Par contre, l'apport de levure dans un régime déficient en fibres n'a eu aucun effet sur la santé des animaux. La levure n'a pas d'effet sur la croissance et l'IC, avec des moyennes respectives de 46 g/j et 2,2. Elle n'a également pas d'effet sur le taux sérique d'haptoglobine bien qu'elle tende à réduire la concentration de 20% une semaine après le sevrage. L'addition de levure n'a pas d'effet sur le biotope (pH, E_h , NH_3 , MS). Elle tend en revanche à augmenter la diversité de la biocénose bactérienne de 9%. La similarité de la biocénose bactérienne chez les lapins ayant reçu la levure et le témoin est de 97% lorsque l'aliment est équilibré en fibres, elle est de 100% lorsque le régime est déficient en fibres.

DISCUSSION GENERALE

La population microbienne du tube digestif et son environnement direct (le biotope digestif) sont sous l'influence des divers facteurs abiotiques et biotiques dont les conséquences peuvent être bénéfiques ou néfastes à la dynamique de cette population et leurs activités, et peuvent affecter la santé digestive de l'animale. Comme pour d'autres mammifères monogastriques, la période du sevrage est critique pour le lapereau, car elle correspond à une période de stress (alimentaire, comportemental, social, etc) combinée à une maturation active de sa physiologie digestive, tant du point de vue de sa morphologie que de ses fonctionnalités. Durant cette période, le risque de dysfonctionnement digestif est important. Ainsi, chez le lapereau, la fréquence des troubles digestifs est parfois élevée, et peut conduire à de fortes pertes d'animaux.

Outre le fonctionnement digestif propre à l'animal, il est important de comprendre les règles de fonctionnement de l'écosystème digestif, tout particulièrement chez les herbivores, si l'on souhaite mieux maîtriser les dysfonctionnements digestifs en lien avec l'environnement de l'animal (pathogènes, nutriments, etc), en particulier chez le jeune.

Par ailleurs, les facteurs biotiques tels que les probiotiques peuvent exercer des effets bénéfiques sur la santé digestive des animaux. Par exemple, Maertens and De Groote (1992) ont montré qu'en cas de mortalité élevée en élevage cunicole, l'addition de levure probiotique *S. cerevisiae* pouvait permettre de réduire la mortalité de 50%. L'apport de cette même levure dans une ration acidogène se traduit par une stabilisation du pH ruminal et la réduction des risques d'acidoses chez la vache (Marden, 2007; Marden *et al.*, 2008). Selon ces auteurs la levure renforcerait le pouvoir réducteur du milieu en baissant le E_h favorisant l'activité des bactéries anaérobies strictes. Cependant leurs modes d'action sont mal connus.

L'objectif de nos recherches est d'apporter notre contribution à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème digestif et des interactions biotope-biocénose, en se limitant à la sphère caecale du lapereau. De plus, nous avons pour objectif d'améliorer notre compréhension du mode d'action de microorganismes ajoutés à l'écosystème caecal. Nous avons restreint notre approche à l'étude de l'effet des levures probiotique, sur différents paramètres physico-chimiques du biotope (E_h , pH, AGV...) et sur la biocénose (structure et diversité) de l'écosystème caecal, ainsi que son effet sur les indicateurs de l'inflammation (MPO, haptoglobine) et les performances zootechniques (santé digestive, croissance, ingestion...) (**Figure 54**).

Nous allons d'abord discuter de l'approche méthodologique que nous avons choisie, notamment de la pertinence de plusieurs nouveaux indicateurs pour les objectifs visés. Ensuite

une discussion portera sur l'effet de la levure sur l'écosystème caecal, et sur le niveau d'inflammation générale, la santé digestive, la croissance et l'efficacité alimentaire et enfin, nous tenterons d'apporter une description du mode d'action possible de la levure chez le lapin.

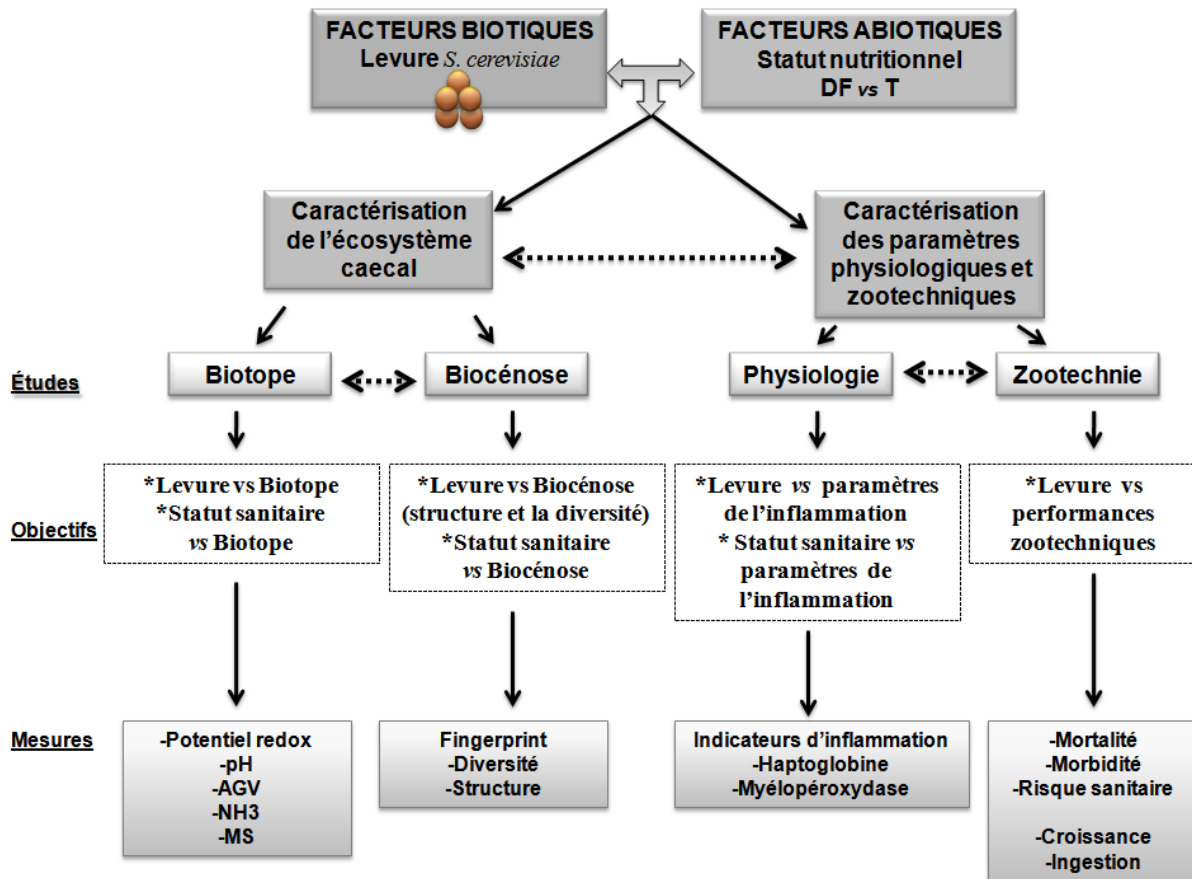


Figure 54: Approche méthodologique pour caractériser l'effet de facteurs biotiques et abiotiques sur l'écosystème caecal, et quelques paramètres physiopathologiques et zootechniques chez le lapereau.

APPROCHE METHODOLOGIQUE

L'originalité de notre travail réside dans l'utilisation d'une approche synthétique combinant des indicateurs du biotope et de la biocénose de l'écosystème caecal, combiné à une approche physiopathologique (inflammation) et zootechnique, afin d'identifier les mécanismes sous-jacent impliqués dans le déterminisme de la sensibilité aux diarrhées post-sevrage chez le lapereau. Dans cette partie nous aborderons l'intérêt, les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes ainsi que leurs limites (**Tableau 40**).

Tableau 40: Avantages et limites des méthodes utilisées pour analyser l'écosystème digestif du lapin, et les indicateurs de l'inflammation

Méthodes	Avantages	Limites
Potentiel redox	<ul style="list-style-type: none"> *Mise en œuvre simple (un seul opérateur) *Variabilité interindividuelle réduite (Cv=5%) *Permet d'estimer le niveau de réduction ou d'anaérobiose du milieu caecal *Coût modéré 	<ul style="list-style-type: none"> *Impossibilité de faire de cinétique sur le même lapin *Durée de mesure assez longue (45 min/lapin : préparation+temps de stabilisation) *Reproductibilité avec des différences entre 2 essais de $\pm 40\text{mV}$
Fingerprint (CE-SSCP)	<ul style="list-style-type: none"> *Suivi de la dynamique de communauté/populations *Analyse comparative rapide à l'aide du logiciel StatFingerprint 	<ul style="list-style-type: none"> *Biais lié à la PCR *Ne permet pas d'observer les espèces mineur *L'identification ultérieure requiert de faire une banque de clones *Coût élevé (3€/extraction)
Myéloperoxydase	<ul style="list-style-type: none"> *Indicateur d'inflammation localisée au lieu du prélèvement 	<ul style="list-style-type: none"> *Grande variabilité de la mesure *Taux de réussite du dosage faible chez le lapin (1/10) *Résultats du dosage sont peu précis chez le lapin
Haptoglobine	<ul style="list-style-type: none"> *Indicateur d'inflammation générale *Dosage facile * Ne nécessite pas d'euthanasie *Possibilité de faire une cinétique sur le même lapin *Renseigne sur le statut sanitaire de l'animal 	<ul style="list-style-type: none"> *Difficulté de réaliser des prélèvements chez les jeunes lapins (moins de 36j) *Elle n'indique pas une infection précise *Coût (500€/kit/200 échantillons)

I. ETUDE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU CONTENU CAECAL : PERTINENCE DE LA MESURE DU POTENTIEL REDOX.

Le potentiel redox influence le développement des microorganismes du tube digestif, car ce critère reflète le niveau d'anaérobiose du biotope. Rappelons qu'il est possible de calculer la pression partielle d'oxygène dans un milieu par l'équation de Nernst (Valsaraj, 2000). Ainsi,

un milieu très réduit (E_h bas) et donc très pauvre en oxygène, est favorable aux microorganismes anaérobies stricts. Le E_h est utilisé chez les ruminants et chez certains monogastriques pour caractériser le niveau d'anaérobiose ou le niveau des populations de bactéries anaérobies dans le tube digestif (Broberg, 1957; Hornich & Chrastova, 1981; Stewart, 1997; Marden *et al.*, 2008). Sachant que cette mesure du E_h n'a jamais été réalisée pour l'écosystème caecal du lapin, nous avons mis au point un dispositif pour mesurer le E_h caecal tout en respectant les conditions d'anaérobiose du milieu. Il s'agit ensuite de valider la pertinence de ce critère, en analysant les relations entre le E_h et d'autres paramètres liés à l'écosystème caecal, physico-chimique (pH, profil fermentaire...) et microbiologiques, ou liés à d'autres fonctions physiopathologiques de l'animal (inflammation, statut sanitaire). De plus, nous avons choisi d'analyser ces relations dans un modèle expérimental de stress nutritionnel, croisé avec l'apport de microorganismes exogènes tels que les levures.

La mesure du E_h chez le lapin, permettrait de faire une estimation du niveau d'anaérobiose du contenu caecal. Cependant, il n'est pas possible de suivre le même individu sur plusieurs heures et de faire une cinétique comme chez les ruminants en raison de l'euthanasie qui a lieu à la fin des mesures. Ce qui augmente évidemment le coût financier de l'étude qui s'additionne à celui du matériel technique (pH-mètre, électrodes, produits chimiques...). Le délai minimum de mesure du E_h caecal a été établi à 20 minutes, délai qui correspond probablement à la stabilisation de la mesure pour un milieu peu liquide (pâteux) comme le contenu caecal. Il n'est pas aussi exclu qu'il y ait des contaminations du contenu caecal par l'air ambiant lors de l'insertion des électrodes de mesure. Néanmoins, il est fort probable que cela n'affecte pas les mesures finales d' E_h , sachant que les mesures de pH demeurent stables. Les mesures effectuées au cours d'un même protocole à la stabilisation (20 min) sont très peu variables ($Cv=5\%$). Par contre, le temps total de mesure (incluant la préparation de l'animal), estimé à 45 min par lapin, limite le nombre de mesures.

La méthodologie redox est donc relativement accessible et fiable en ce qui concerne l'écosystème caecal du lapin. Cela permet d'avoir une approche nouvelle pour la caractérisation du biotope caecal et de son niveau d'anaérobiose.

II. ETUDE DU PROFIL MICROBIOLOGIQUE DU CONTENU CAECAL

Les avantages, les inconvénients et les limites de l'étude par "fingerprint" du profil microbiologique sont ceux liés à la CE-SSCP décrits précédemment (*cf.* : étude

bibliographique chapitre 1, II-A-4). C'est une technique de mesure de l'empreinte génétique des populations microbiennes, qui permet d'estimer leur biodiversité ou leur similarité entre différents échantillons. Les limites de cette technique sont liées à l'étape d'amplification de l'ADN 16S (PCR), dont les proportions dans certains microorganismes ne dépassent pas 0,1%, et donc ne sont pas détectables par cette technique lorsque des amorces universelles sont utilisées.

En parallèle, des mesures du E_h caecal chez l'animal euthanasié, nous avons choisi de faire des prélèvements directement dans le caecum. Néanmoins, des résultats très récents indiquent qu'il est possible de suivre la biocénose caecale d'un même individu au cours du temps, en prélevant des caecotrophes (Michelland *et al.*, 2008).

D'autre part, nous avons utilisé un nouveau logiciel StatFingerprint (Michelland *et al.*, 2009) développé dans l'unité TANDEM, pour analyser plus aisément les empreintes génétiques de la communauté bactérienne caecale et les relations entre ces empreintes et les paramètres étudiés (paramètres physico-chimiques, haptoglobine) ainsi que l'impact de l'apport de levure sur la biocénose.

III. ETUDE DE QUELQUES INDICATEURS DE L'INFLAMMATION

L'apparition d'une infection chez les mammifères, s'accompagne de réactions physiologiques dont le rôle est la défense de l'organisme. Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation ou protéines de la réaction inflammatoire sont définies comme des protéines dont la concentration plasmatique évolue au cours d'une réaction inflammatoire. Les protéines dont la concentration plasmatique augmente sont appelées protéines de la réaction inflammatoire positives. Certaines sont locales (e.g. **Myéloperoxydase**) et d'autres générales (e.g. **Haptoglobine** sérique).

La mesure de la MPO permet d'évaluer le niveau d'inflammation pour une portion du tube digestif concerné. Le dosage proprement dit est précédé d'une extraction mécanique consistant à faire une lyse des cellules du fragment prélevé (e.g. côlon). Chez la souris, la plupart des prélèvements se font sur des zones de nécrose visibles provoquées au niveau du côlon, par injection d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS) pour provoquer une inflammation aiguë. Dans notre étude, chez le lapin sain ou atteint de troubles digestifs (diarrhée), la concentration en MPO dans la muqueuse colique est faible et très variable (avec une réussite du dosage de moins d'un cas sur 10). Nous n'avons donc pas poursuivi la mesure

de MPO. Néanmoins, sous réserve d'une mise au point particulière au cas du caecum et du côlon chez le lapin, ce critère mériterait d'être validé comme prédicteur d'un état physiopathologique perturbé. L'haptoglobine est une glycoprotéine plasmatique, appartenant au groupe des α -globulines, qui peut se combiner avec l'hémoglobine et en exalter ainsi l'activité peroxydasique. C'est un indicateur d'inflammation générale relativement aisé à doser dans le sang. Bien que ce critère présente une variabilité interindividuelle élevée ($Cv=25\%$), il semble être un bon indicateur du statut sanitaire de l'animal. De plus, cet indicateur est utilisable pour des études de cinétiques intra-individuelles (contrairement à la MPO où l'euthanasie est nécessaire pour l'échantillonnage). Chez le lapereau, l'une des difficultés est néanmoins la réalisation de prélèvements sanguins, particulièrement chez les animaux affaiblis par un trouble digestif, et pour lesquels des phénomènes de vasoconstriction sont fréquents et limite le prélèvement. Cependant, l'haptoglobine n'est pas indicatrice d'une pathologie précise. Toute perturbation de la santé, autre que digestive ou le stress, entraînerait aussi une hausse du taux d'haptoglobine notamment chez les porcs, les vaches. (Melchior *et al.*, 2002; Nikunen *et al.*, 2007).

L'haptoglobine est très sensible aux variations du statut sanitaire. Elle pourrait permettre d'évaluer efficacement l'impact d'un stress nutritionnel, combiné ou non à l'apport de levure, sur la santé digestive du lapereau.

ECOSYSTEME CAECAL : INTERACTIONS FACTEURS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES

La population microbienne (biocénose) digestive est en perpétuelle interaction avec le milieu environnant (biotope) ; les microorganismes autochtones réagissent ainsi à de nombreux facteurs abiotiques et biotiques, qui peuvent induire des effets bénéfiques ou néfastes sur la dynamique de ces populations et leurs activités. Parmi ces facteurs biotiques, les probiotiques se caractérisent par leur aspect vivant et par leur rôle bénéfique potentiel. Avec moins de 100 publications entre 1991 et 1995, les recherches sur l'utilisation des microorganismes vivants, en alimentation animale ou humaine se sont considérablement développées dans ces dernières années avec plus de 850 publications pour la seule année 2006 à mars 2007 (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). La plupart de ces travaux sont portés sur les effets bénéfiques des probiotiques. Cependant certaines études plus récentes tentent de fournir une explication

au mode d'action des probiotiques (Rambaud *et al.*, 2004; Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007; Marden, 2007; Marden *et al.*, 2008). Chez les ruminants, Marden *et al.* (2007 et 2008) essaient de mettre en évidence l'action de la levure *S. cerevisiae* sur le potentiel redox pour qualifier le niveau d'anaérobiose du rumen et les microorganismes qui s'y développent. Au vu des résultats de Maertens & De Groot (1992) sur le lapin avec la même levure, nous nous sommes fixés pour objectif de faire une étude comparative de l'effet de cette levure sur l'écosystème caecal et ruminal (**Tableau 41**), dans le but d'apporter notre contribution à l'explication du mode d'action de la levure probiotique en alimentation animale.

Au vu de la bibliographie, **l'originalité de notre travail réside en l'étude de l'impact de la levure probiotique *S. cerevisiae* sur l'écosystème digestif du lapin (E_h , indice de biodiversité, similarité) d'une part, et d'autre part sur l'inflammation générale (haptoglobine sérique)**. Nous tenterons ainsi dans cette partie d'apporter des explications sur l'effet de la levure sur les paramètres physico-chimiques et microbiologique du caecum, sur les indicateurs de l'inflammation et leurs rôles sur la santé digestive du lapin.

I. FACTEUR ABIOTIQUE : EFFET DU STATUT NUTRITIONNEL SUR L'ECOSYSTEME

L'apport de nutriment dans un écosystème est évidemment un facteur essentiel de l'équilibre des populations microbiennes. Appliqué au tube digestif du lapin, le flux de *digesta* arrivant au niveau caecal joue donc un rôle clé, et il agira sur les paramètres physico-chimiques du biotope (pH, le E_h , AGV, gaz, etc.) et conditionnera l'équilibre des communautés microbiennes. De nombreuses études ont été effectuées sur les relations entre l'aliment et l'écosystème digestif et la santé de l'animal, et notamment chez le lapin. En effet, ce dernier constitue un modèle expérimental de choix (Gidenne & Jehl, 2000; Bennegadi, 2002; Bennegadi-Laurent *et al.*, 2004; Asmenskaite *et al.*, 2007; Castellini *et al.*, 2007), en raison de la disponibilité en modèles expérimentaux physiopathologiques (déficiency en fibre, restriction alimentaire, inoculation expérimentale de pathogènes, etc.).

Tableau 41: Impact de l'addition d'une même levure *S. cerevisiae* Sc 47, sur les paramètres physico-chimiques du lapin et de la vache (vache tarie et vache laitière), et variations des paramètres physico-chimiques du contenu caecal du lapin en fonction du statut sanitaire

Chez le lapin*				
	Effet de la levure		Statut sanitaire	
	Témoin	Levure	Lapin sain	Lapin morbide
Inflammation générale				
Haptoglobine (mg/ml)	1,6	1,5	1,5	2,6
Biocénose caecale				
Diversité (indice de Simpson)	4,6	5,1	5,3	5,3
Biotope caecal				
pH	5,9	5,9	6,0	6,7
E_h (mV)	-222	-210	-220	-200
MS caecal %	23,0	23,4	23,0	13,0
AGVt (mmol/l)	100,4	105,5	82,8	37,7
C ₂ %	77,6	78,7	65,6	28,7
C ₃ %	5,1	5,0	6,9	5,1
C ₄ %	16,3	15,6	9,7	2,8
NH ₃ (mmol/l)	12,6	13,3	13,9	24,6
Chez les vaches**				
	Témoins vache tarie	Témoin vache en lactation	Levure vache tarie	Levure vache en lactation
Biotope ruminal				
pH	6,0	5,9	6,02	6,1
E_h (mV)	-176,5	-115	-196,6	-149
AGVtotal (mmol)	102,3	85,3	114,4	99,4
C ₂ %	64,5	62,3	64,0	59,5
C ₃ %	15,5	21,1	17,2	26,0
C ₄ %	15,8	12,4	14,2	10,2

*Moyennes arithmétiques calculées à partir des données expérimentales de la présente thèse ; ** Données tirées de Marden (2007)

I.A. EFFET DU STATUT NUTRITIONNEL SUR LE BIOTOPE

Le modèle de stress nutritionnel provoqué par une ration déficiente en fibres (9% ADF) a été utilisé par Bennegadi (2002) pour étudier les entéropathies non spécifiques chez le lapin en lien avec l'écosystème caecal. Lors d'une déficience en fibres alimentaires, on observe une baisse de la biomasse bactérienne caecale, accompagnée de la baisse des activités enzymatiques fibrolytiques et des AGV totaux (Gidenne & Jehl, 2000; Gidenne *et al.*, 2000). Dans nos études, et avec le même modèle alimentaire (9% ADF), nous avons observé une baisse relative de 21% environ de la concentration d'AGV dans le caecum des lapins

« déficients en fibres » (**Tableau 42**). La plus forte baisse concerne la proportion de butyrate (25% dans notre étude) et ensuite l'acétate qui diminue légèrement (1%). Par contre, la proportion de propionate reste inchangée. La baisse de la concentration en AGV totaux avec le régime déficient en fibres, est probablement due à la plus faible quantité de substrat fermentescible entrant dans le caecum, et qui entraîne l'inversion du ratio C₃/C₄ et la hausse du pH de 0,2 dans le contenu caecal de lapins morbides. En effet, lorsque le flux iléal des nutriments baisse après une mise à jeun (donc baisse de la quantité de fibres), on assiste aussi à une chute de la concentration caecal en AGV et à une inversion du ratio C₃/C₄ (Vernay & Raynaud, 1975; Gidenne & Bellier, 1992; Piattoni *et al.*, 1997). La hausse de la concentration de NH₃ serait due à une augmentation de la quantité de protéine fermentée par le microbiote caecal en raison du flux iléal qui serait élevé avec la réduction du taux fibres dans le bol alimentaire.

Tableau 42: Paramètres physiques et chimiques du caecum en fonctions de l'âge et du régime, chez le lapin sain.

	Régime*		NE
	T	DF	
ADF%	20	9	
pH	5,9	6,0	2/2
E _h (mV)	-204	-201	0/2
%MS	22,6	24,0	0/2
AGVt (mmol/l)	92,3	72,7	1/1
C ₂ (%)	80	79	1/1
C ₃ (%)	8	11	0/1
C ₄ (%)	12	9	1/1
C ₃ /C ₄	0,7	1,2	1/1
NH ₃ (mMol/l)	10,7	15,1	2/2

*moyennes arithmétiques calculée à partir des données des régimes témoins ou DF ; T : régime témoin ; DF : régime déficient en fibres. NE : nombre d'essais ayant révélé des différences significatives (P<0,05)

Le potentiel redox mesuré au cours de nos travaux montre que le milieu caecal est très réducteur. Cependant, malgré l'effet de la déficience en fibres sur la biotope (pH, AGV), cela ne semble pas affecter le E_h caecal, qui est en moyenne de -203 mV. La valeur du potentiel redox est cependant relativement variable, et oscille entre -185 mV (régime DF) et -230 mV (régime T). En parallèle, le E_h n'est pas corrélé avec le pH ou avec la concentration en AGV. Comparé à l'écosystème ruminal, lors de l'emploi d'une ration pauvre en fibres, le pH ruminal baisse (cas de l'acidose) contrairement au caecum où le pH augmente. Cette baisse du pH est liée à l'augmentation rapide de la production d'AGV dans le rumen. Le ratio

acétate/propionate diminue indiquant ainsi une augmentation de la production de propionate et butyrate par rapport à l'acétate. Le rapport acétate/propionate peut traduire une acidose lorsqu'il sera inférieur à 2,5 (Sauvant, 2006). Selon Marden (2007), le pH ruminal de vaches alimentées avec un régime riche en amidon (et pauvre en fibres) descend en dessous du seuil de l'acidose de 6,25 défini par Sauvant *et al.* (1999). Par contre le ratio acétate/propionate atteint 4,16 ($C_2=66,0$, $C_3=15,9$, $C_4=10$ mM) ce qui n'est pas caractéristique d'une acidose ruminale. La concentration de lactate (0,2 mM) non plus ne semble pas indiquer le contraire. L'effet cumulé du lactate (dont la concentration est indicatrice d'un acide fort) et des AGV serait à l'origine de la chute du pH ruminal constaté lors de l'ingestion de cette ration riche en glucide rapidement fermentescible (Marden, 2007). A l'opposé, lorsqu'une ration a un taux d'amidon relativement bas, il y a une hausse du pH (sensiblement égal à 7) attribuée à la diminution de la production d'AGV et à la production importante de salive provoquée par la fibrosité de la ration.

L'état de réduction ou d'oxydation du milieu définit par le potentiel redox indique que le milieu ruminal est fortement réducteur (Marden, 2007). L'évolution du E_h d'une ration fibreuse est inférieure à celle d'une ration riche en amidon. La différence entre les 2 rations atteint -40mV environ. Ceci signifierait qu'une ration déficiente en fibres rendrait le contenu ruminal moins réducteur qu'une ration fibreuse. Cet auteur a aussi montré l'existence de corrélations négatives entre le pH et le potentiel redox selon la teneur en fibres de la ration (r pour la ration fibre=0,45, r pour la ration amidon=0,74). Le pH correspond donc à un potentiel redox bas donc à un milieu plus réducteur exempt d'oxygène.

Dans le cas de l'écosystème caecal, nous n'avons pas observé de telles relations entre le E_h et le pH, dans le cas d'une déficience en fibre.

I.B. EFFET DU STATUT NUTRITIONNEL SUR LA BIOCENOSE CAECALE

Chez le lapin, l'aliment influence également la structure de la biocénose caecale (Gidenne *et al.*, 2008). Comparativement aux ruminants, l'ingestion d'une ration déficiente en fibres par le lapin n'entraîne pas d'acidose de l'écosystème en raison de l'anatomie digestive du lapin, mais plutôt une alcalose (hausse sensible du pH) associée à une baisse de l'activité fibrolytique bactérienne. A l'inverse, l'augmentation du taux de fibres dans la ration est favorable aux bactéries cellulolytiques (Boulahrouf *et al.*, 1991) notamment *Ruminococcus albus* (Bennegadi *et al.*, 2003), mais aussi aux *Archaea*. On assiste aussi à une réduction de *Clostridium perfringens* associée à une baisse de la mortalité (Gidenne *et al.*, 2008). Dans

notre travail, les résultats obtenus ne sont pas toujours complètement cohérents avec ceux de la littérature. Nous avons constaté que la diversité n'est pas modifiée avec la réduction de la teneur en fibres de l'aliment de 50%, la moyenne observée est de 5,3. En plus, aucun effet sur la structure microbiologique du contenu caecal n'a été observé avec la réduction de la teneur de l'aliment en fibres. Ainsi, les analyses de la similarité ont montré que les populations des 2 biocénoses (déficient en fibres vs témoin) sont en moyenne similaire à 77% (moyenne calculée à partir de 2 essais). Cependant, nous observons un écart important ($\pm 27\%$) entre les 2 essais (**Figure 55**). Cette variation de la similarité d'un essai à un autre serait liée à la variabilité individuelle (Michelland *et al.*, 2008). Nos résultats sont en accord avec ceux de Martignon *et al.* (2008) qui n'observent pas de variation de la diversité ni de la structure du microbiote lors d'une réduction du flux de substrat entrant dans le caecum (modèle d'un rationnement alimentaire). La diversité de la biocénose observée par cet auteur est inférieure à celle que nous avons enregistrée (4,9 vs 5,3).

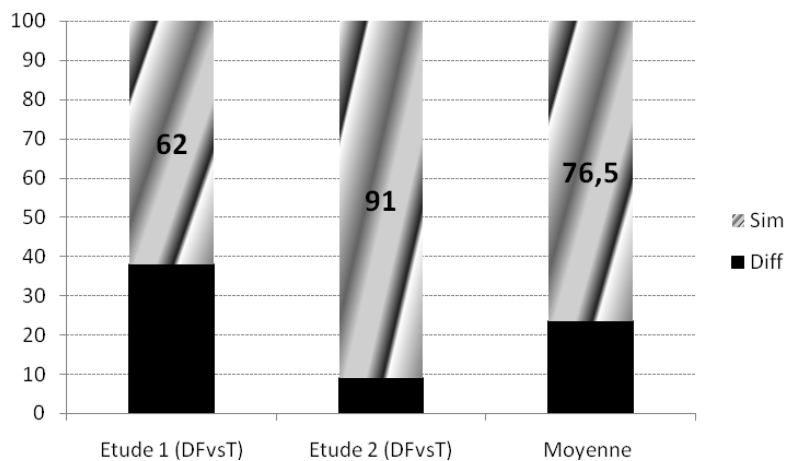


Figure 55: Similarité entre les profils bactériens des lapins DF et des témoins T: variation entre 2 séries de mesure

T : régime témoin ; DF : régime déficient en fibres

Chez les ruminants, les régimes déficients en fibres ou riches en glucides rapidement fermentescibles entraîneraient une augmentation des populations amylolytiques ruminales des lactobacilles et des bactéries utilisatrices de lactate (*Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*), et une diminution à l'opposé de l'activité des bactéries cellulolytiques conduisant au phénomène d'acidose (Medina *et al.*, 2002; Marden, 2007). Le développement rapide des bactéries amylolytiques engendré par la teneur en amidon trop élevée de la ration, entraîne une augmentation de la viscosité et des gaz de la fermentation, conduisant à la formation d'une mousse stable impliquée dans la météorisation spumeuse et de pathologies digestives chez le bovin (Nagaraja, 2002). L'effet de la réduction de la teneur de la ration en fibres chez

le cheval comme chez le ruminant modifie l'équilibre de la biocénose caecum-côlon, marqué par la diminution des bactéries cellulolytiques et l'augmentation des bactéries anaérobies totale, des bactéries utilisatrices de lactate, de *Lactobacilli* et de *Streptococci* (Medina *et al.*, 2002). Certains protozoaires ciliés consommateurs d'amidon et des oses, s'adaptent et se développent lorsque la ration contient une forte teneur en amidon. Cependant lorsque la teneur de concentré énergétique de la ration dépasse 75%, la croissance de ces protozoaires est inhibée selon Nagaraja (2002). Par ailleurs, il a été montré aussi que la diversité de la biocénose chez les ruminants n'est pas affectée avec l'apport d'une ration riche en amidon et pauvre en fibres (Sadet, 2008).

Les effets de la teneur en fibres se manifestent différemment chez le lapin et chez le ruminant. Lorsque la ration est déficiente en fibres elle entraîne chez le lapin une baisse la concentration en AGV totaux et une hausse du pH. Le ratio C_3/C_4 est également modifié et devient supérieur à l'unité. Cependant, le déficit du régime en fibres n'a aucun effet sur le potentiel redox caecal dont la moyenne reste autour de -203 mV. Bien qu'il puisse y avoir une chute de la concentration des bactéries fibrolytiques avec la réduction du niveau de fibres, aucun effet n'a été observé sur la diversité et la structure microbiologique du contenu caecal. La similarité entre la biocénose des animaux dont le niveau de fibres est réduit et le témoin est de 77% avec un écart de $\pm 27\%$ entre 2 séries de mesures. Par contre, chez les ruminants, l'effet de l'absence de fibres dans la ration entraîne une baisse du pH due à une augmentation de la concentration ruminale en AGV totaux engendrée par la prolifération des bactéries amylolytiques et des bactéries utilisatrices de lactate. Le régime déficient en fibres entraîne chez ces derniers, une augmentation du potentiel redox ruminal qui est fortement corrélé au pH.

II. FACTEUR BIOTIQUE : EFFET DE LA LEVURE SUR L'ECOSYSTEME CAECAL ET RUMINAL

L'apparition des troubles digestifs serait liée à la rupture de l'équilibre dynamique de l'écosystème digestif. Prévenir ces troubles digestifs, serait synonyme du maintien de cet équilibre, par exemple via un renforcement de la biocénose ayant une action bénéfique pour la santé digestive de l'animal. Il a été montré que la levure probiotique (*S. cerevisiae*) favoriserait le maintien de l'équilibre des bactéries cellulolytiques, ainsi que les activités

enzymatiques fibrolytiques chez l'agneau (Chaucheyras-Durand & Fonty, 2001). Nos travaux montrent que l'addition de levure *S. cerevisiae* dans la ration du lapin tend à augmenter la diversité de 10%, mais elle ne semble pas produire d'effet remarquable sur la structure de la communauté bactérienne, dont la similarité atteint parfois 100% dans le cas de l'application d'un stress nutritionnel (**Figure 56**).

L'absence d'effet des levures sur la biocénose bactérienne s'expliquerait peut être par la grande "stabilité" du microbiote bactérien caecal entre des lapins témoins ou soumis à un stress (similarité= 91%). La biocénose caecale serait déjà « stable » ou « équilibrée », et l'apport de levure ne pourrait donc plus engendrer de modifications. Les levures pourraient plutôt maintenir cet équilibre ou avoir une action inhibitrice sur les microorganismes anaérobies facultatifs responsables de troubles digestifs ou potentiellement pathogènes ; comme nous le verrons plus loin, le taux de mortalité du lot T10 (1% levure) est 2 fois inférieures au lot T0 (0% levure). Il pourrait aussi y avoir une croissance de certaines bactéries agissant dans le maintien de cet équilibre grâce à leurs activités fibrolytiques ; il s'agirait notamment de *R. albus* dont la proportion augmenterait avec l'addition de levure dans l'alimentation du lapin (Bennegadi, 2002; Gidenne *et al.*, 2008).

Dans le cas du caecum, il reste néanmoins à explorer l'équilibre des communautés des *Archaea*, pour lesquelles des outils d'analyse sont en cours de mise au point.

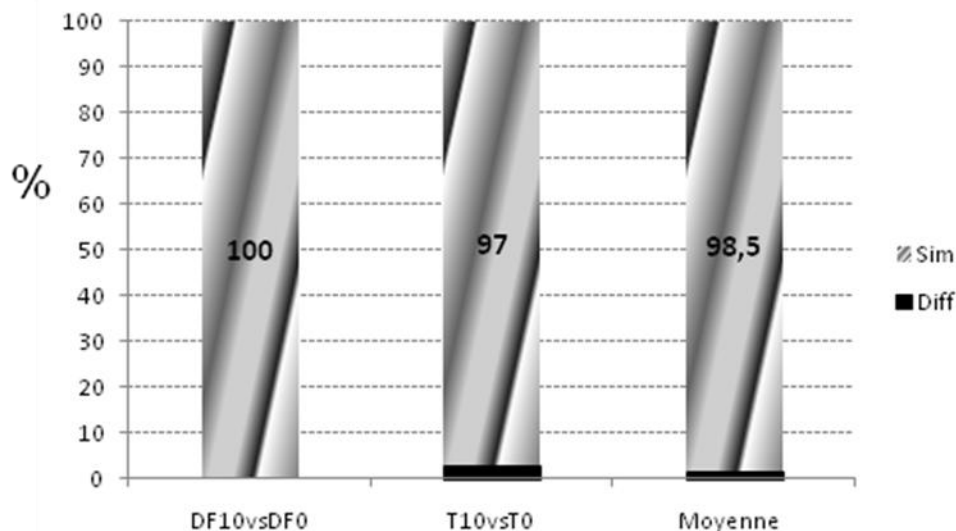


Figure 56: Effet levure sur la similarité en fonction du statut nutritionnel

T10 : régime témoin+1% de levure ; T0 : régime témoin sans levure ; DF10 : régime déficient en fibres + 1% levure ; DF0 : régime déficient en fibres sans levure ; Moyenne=(DF10+DF0) vs (T0+T10)

Une étude menée chez le porcelet a montré que *S. cerevisiae* SC47 avait une action antimicrobienne par la réduction de la concentration de bactéries totales, et surtout des lactobacilles (Heugten *et al.*, 2003).

L'impact de la levure sur le biotope est l'aspect le plus étudié chez les animaux, hors mis la zootechnie. Ces études ont été effectuées pour la grande majorité sur les ruminants et rarement voir une seule chez le lapin à notre connaissance. La capacité de la levure à influencer le biotope proviendrait de son action sur le microbiote chez les ruminants. A l'aide d'une ration équilibrée complétement en levure (*S. cerevisiae*), il a été observé *in vitro* une augmentation des bactéries cellulolytiques et parallèlement une concentration plus importante en AGV totaux dans le rumen grâce à une hausse de la dégradabilité des fibres de 9% (Lila *et al.*, 2006). Malgré la hausse de la concentration en AGV en présence de la levure, le pH reste stable. La proportion de propionate augmente contrairement au butyrate. En *ex-vivo*, Marden (2007) a aussi constaté en présence de la levure SC47, une augmentation de la concentration en AGV totaux dans le rumen ainsi que le pH de +0,2 unité, sans que cela n'atteigne le niveau de l'acidose bien que celui-ci ai travaillé avec un régime déficient en fibres. Cet auteur a attribué l'effet de la levure sur le profil fermentaire ruminal (hausse d'AGV, baisse du rapport C₂/C₃ et la réduction de lactate), à l'augmentation de l'activité des seules bactéries anaérobies cellulolytiques et des bactéries utilisatrices de lactate. Chez le lapin, malgré la tendance de la levure à augmenter la diversité microbiote de 10%, aucun effet significatif n'est observé sur le profil fermentaire et le pH caecal dans notre étude. Ce qui est une confirmation des résultats de Bennegadi (2002) qui a par ailleurs constaté une hausse de +13% de la proportion d'acétate et une baisse de -16% de celle du butyrate par rapport au témoin.

Si l'effet des probiotiques sur le biotope est attribué à une action en amont sur la biocénose, la biocénose elle-même pourrait dépendre fortement du niveau d'anaérobiose du milieu. En effet comme nous venons de le voir, la levure pourrait favoriser la croissance de certaines bactéries anaérobies strictes notamment *R. albus* qui interviennent dans la production des AGV et la stabilisation du pH. Le niveau d'anaérobiose peut être estimé à travers le potentiel redox. L'apport de levure diminuerait le E_h ruminal selon Mathieu *et al.* (1996) de -18 mV. Ce qui a été confirmé par Marden (2007) qui constate une baisse de -20 mV. Le contenu ruminal en présence de la levure devient ainsi plus réducteur traduisant une anaérobiose plus accentuée. Selon cet auteur, la stabilisation du pH avec l'apport de levure, pourrait être due à un renforcement du pouvoir réducteur du rumen qui se répercute sur l'activité des bactéries anaérobies strictes, dont certaines assurent la transformation du lactate en propionate. Chez le

lapin, le E_h caecal augmente avec l'apport de levure de 25 mV en moyenne dans ce travail pour des mesures effectuées sur 6 lapins/lot (alimentation équilibrée en fibre) et de 12 mV (moyenne de toutes les mesures avec les régimes DF et T), contrairement au rumen dont le E_h baisse de -20 mV selon Marden (2007). Ceci montre que si la consommation de l'oxygène par la levure est évaluée à travers le E_h chez les ruminants, les résultats sont variables chez le lapin et évoluent dans le sens contraire à ceux du rumen. Cependant certaines données de la littérature révèlent que la levure *S. cerevisiae*, tout comme chez le lapin, a peu d'effet sur le biotope ruminal (Doreau & Jouany, 1998; Giger-Reverdin *et al.*, 2004).

En résumé, l'apport de levure *S. cerevisiae* dans l'alimentation du lapin ou du ruminant entraîne des modifications de l'écosystème caecal et ruminal. Chez le lapin, l'ingestion de levures vivantes tend à augmenter la diversité bactérienne de 10%, mais les biocénoses restent tout de même fortement similaires (97-100%). Sur le biotope, la levure entraînerait parfois une hausse du E_h caecal de +25 à +12 mV. La levure n'a aucun effet sur le pH, sur le profil fermentaire et le NH_3 .

*Elle pourrait avoir cependant, un rôle stabilisateur de l'écosystème caecal et favoriserait la croissance de bactéries fibrolytiques notamment *R. albus*. Chez les ruminants, la levure serait responsable de la hausse du pH, de la concentration en AGV totaux et une baisse du E_h tout en favorisant également la croissance des bactéries cellulolytiques.*

III. INTERACTIONS BIOTOPE BIOCENOSE

La plupart des facteurs caractérisant le biotope (potentiel redox, pH, AGV etc.) influencent les espèces microbiennes qui sont dans ce milieu. Ces paramètres peuvent varier fortement selon les espèces animales, mais pour une espèce donnée et pour une alimentation donnée ces paramètres sont relativement stables (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). Il existe aussi une relation entre ces paramètres du biotope.

III.A. INTERACTIONS ENTRE LES PARAMETRES DU BIOTOPE

Dans ce travail, nous avons suivi l'évolution de 5 paramètres principaux en fonction de la nature de régime. Il s'agit du pH, le E_h , les AGV, NH_3 et la MS du contenu caecal. Comme on pouvait s'y attendre, nous avons observé des corrélations significatives entre le pH et les

AGV (AGV totaux, C₂, C₃ et C₄), et entre le NH₃ et le C₂, C₃ et C₄ ou entre le pH et le NH₃. Les coefficients de corrélation (R²) entre les différents paramètres sont résumés dans le **tableau 43**. Plusieurs études ont montrée que le pH et le NH₃ sont liés à la concentration en AGV qui est dépendante de la teneur en fibres du régime (Carabaño *et al.*, 1997; Gidenne *et al.*, 2004; Castellini *et al.*, 2007). Ainsi, lorsque la concentration en AGV augmente, la concentration de NH₃ et le pH baissent. Inversement, lorsque le lapin est soumis à un régime déficient en fibres, la concentration caecale en AGV baisse entraînant une hausse du pH et du NH₃ avec également une hausse de la mortalité (Gidenne, 2003; Gidenne *et al.*, 2004). Nos résultats confirment ces observations (*cf.* Tableau 40).

L'agrégation de nos résultats expérimentaux, ne révèle pas de corrélation significative entre le pH et le E_h, bien que nous ayons observé lors des premiers résultats méthodologiques une corrélation significative entre ces 2 paramètres (R²=0,22 ; P < 0,01). Chez les ruminants, de fortes corrélations entre le pH et le E_h ont été observées par Baldwin and Emery (1960), Marounek *et al.* (1987) et Giger-Reverdin *et al.* (2006) (avec R² = 0,64 à 0,71).

Tableau 43: Corrélations (R²) entre les paramètres du biotope et du taux d'haptoglobine§

	E _h	pH	AGVt	C ₂	C ₃	C ₄	NH ₃	MS	Hapto
E _h	1	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,10 (0,02)
pH		1	0,37 (<0,01)	0,32 (<0,01)	0,10 (<0,01)	0,38 (<0,01)	0,13 (<0,01)	0,29 (<0,01)*	0,18 (<0,01)*
AGVt			1	0,96 (<0,01)	NS	0,59 (0,01)	NS	NS	NS
C ₂				1	NS	NS	0,23 (<0,01)	NS	NS
C ₃					1	0,30 (<0,01)	0,28 (<0,01)	NS	NS
C ₄						1	0,30 (<0,01)	NS	NS
NH ₃							1	NS	NS
MS								1	NS
Hapto									1

NS : corrélation non significatives (R<0,10 et P>0,05) ; * : corrélation significative au 2^{ème} essai ; Hapto : taux d'haptoglobine ; AGVt : AGV totaux ; () : P>F

§ : Agrégation des résultats issus de l'ensemble de nos expérimentations.

III.B. INTERACTION ENTRE LES PARAMETRES DU BIOTOPE ET LA BIOCENOSE

Le biotope est influencé par la nature de l'aliment et sa qualité, et constitue le substrat pour la biocénose. La composition (diversité) et la structure de la communauté bactérienne varie en fonction de son environnement (Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007). Toute modification du biotope caecal qui constitue l'environnement de sa biocénose engendrera une perturbation de cette communauté bactérienne. En effet, chez le lapin, plusieurs études ont montré que le taux de fibres avait un impact favorable sur l'activité microbienne caecale et sur la santé digestive (Gidenne, 2003; Gidenne & Garcia, 2006). Dans cette étude, bien que les variations des AVG totaux, du NH₃ et du pH soient liées, la structure et la diversité de la communauté bactérienne ne semblent pas varier en fonction de ces paramètres (**Tableau 44**). Cela expliquerait aussi l'absence d'effet d'une déficience en fibres sur la biocénose bactérienne. L'absence de lien entre la biocénose et le biotope pourrait être aussi due à l'âge des lapins, dont la communauté bactérienne se stabiliserait après le sevrage (Gidenne *et al.*, 2008).

Tableau 44: Corrélations entre biotope et biocénose

	Diversité		Profil CE-SSCP	
	R ²	P>F	R ²	P>F
E _n mV	0,07 (0,01)	0,05 (0,6)	0,02 (0,01)	0,9 (0,09)
pH	0,02 (0,01)	0,35 (0,3)	0,05 (0,01)	0,08 (0,6)
AGV totaux (mmol/l)	0,02	0,34	0,06	0,01
C ₂ %	0,01	0,53	0,06	0,01
C ₃ %	0,17	<0,01	0,10	<0,01
C ₄ %	0,13	<0,01	0,12	<0,01
NH ₃ (mmol/l)				
MS %	0,01 (0,02)	0,65 (0,16)	0,02 (0,02)	0,51 (0,14)
Haptoglobine (mg/ml)	0,03 (0,06)	0,25 (0,02)	0,03	0,26

() valeur de R² et P>F observée à la 2^{ème} série de mesure

IV. PHYSIOPATHOLOGIE ET ECOSYSTEME DIGESTIF : IMPACT DE LA LEVURE SUR UN INDICATEUR DE L'INFLAMMATION GENERALE (HAPTOGLOBINE), LA SANTE DIGESTIVE, LA CROISSANCE ET L'EFFICACITE ALIMENTAIRE

Dans les conditions de stress alimentaire, le profil microbien de l'écosystème caecal peut être perturbé et des espèces exogènes indésirables peuvent émerger et conduire à des troubles digestifs. Ils s'accompagnent d'importantes perturbations tant au niveau de l'écosystème

qu'au niveau des indicateurs de l'inflammation, ou encore plus largement au plan des performances zootechniques de l'animal ou de santé.

Chez le lapin en croissance, la chute de l'ingestion durant les entérites peut provoquer une forte baisse de la concentration caecale en AGV totaux (-50%), probablement en relation avec la réduction du flux de substrats fermentescibles dans le caecum. Ceci entraîne à son tour la hausse du pH de +0,7 et du potentiel redox de + 10 mV en moyenne ainsi que du NH₃ de 77% (**Tableau 45**), et une inversion du ratio C₃/C₄ qui passe de 0,7 à 1,8. Par contre, l'apparition des troubles digestifs n'entraîne pas de variation de la diversité ni de la structure de la communauté bactérienne caecale. La similarité entre la biocénose des lapins malades et celle des lapins sains est même élevée (96%). A l'avenir, ces premiers résultats mériteraient d'être confirmés, d'une part avec un plus grand nombre de mesures, mais aussi en explorant la communauté des *Archaea*.

Tableau 45: Caractéristiques physiopathologiques des lapins morbides

	Morbide	Sain
Haptoglobine (mg/ml)	2,6	1,5
E _h (mV)	200	210
pH	6,7	6,0
MS %	13,0	23,5
NH ₃ (mMol/l)	24,6	13,9
AGV total	37,1	82,8
C ₂	77,4	79,2
C ₃	13,7	8,3
C ₄	7,5	11,7
C ₃ /C ₄	1,8	0,7

Au point de vue physiologique, lors des troubles digestifs, il y a une élévation du niveau d'inflammation générale à l'origine d'une hausse de 73% de la libération d'haptoglobine par les hépatocytes. Le taux sérique moyen observé chez les lapins sains est de 1,5 mg/ml. Il augmente fortement lors de troubles digestifs (+70%), comme cela a aussi été rapporté pour le veau. En effet, la concentration d'haptoglobine observée sur des veaux sains est de 0,9 mg/ml, ce taux passe à 3,6 mg/ml lorsque les animaux sont malades (Genheim *et al.*, 2007). De même, chez les porcelets élevés dans des conditions de risque sanitaire élevé, le taux sérique d'haptoglobine augmente de +0,6 mg/ml Le Floch (2004). Cependant, si l'apport de levure permet de réduire considérablement ces risques sanitaires (Hollister *et al.*, 1990; Luick *et al.*, 1992; Maertens & De Groote, 1992), elle n'a par contre aucun effet majeur sur le taux

sérique d'haptoglobine du lapin sain. Cela suggère que le taux d'haptoglobine n'aurait pas de qualité "prédictrice" du risque sanitaire, mais qu'il serait un bon indicateur du statut sanitaire instantané des animaux.

Bien que l'utilisation de régime déficient en fibres n'a pas permis d'observer d'effets majeurs sur le risque sanitaire (mortalité et morbidité) entre la complémentation en levure et le témoin, elle permet globalement la réduction du risque de 45% environ ainsi que la mortalité et la morbidité de 50 et 35% (**Tableau 46**). Ces résultats confirment l'impact positif de la levure sur la santé digestive. La levure pourrait donc être utilisée pour prévenir les potentiels troubles qui pourraient subvenir pendant les périodes de stress alimentaire notamment au sevrage. Cependant, au cours des différentes études réalisées, la levure n'a apportée aucune amélioration de l'ingestion, ni de la croissance ou de l'efficacité alimentaire. Ces résultats sont en accord avec ceux de Sonbol & El-Gendy (1992) et Kamra et *al.*(1996) qui n'ont observé aucune amélioration de la croissance ou de l'efficacité alimentaire du lapin avec l'apport de 1 à 5 g/kg levure (*S. cerevisiae*). En revanche, ces résultats contredisent les observations faites par Onifade & Babatunde (1996), Gippert et *al.*(1996) ou de Maertens & De Groote (1992) (en conditions d'élevage défavorables).

Tableau 46: Effet de la levure probiotique sur les paramètres zootechniques* du lapin

	Témoin	Levure
Ingestion (g/j)	145	143
GMQ (g/j)	47	47
IC	2,9	2,8
Mortalité (%)	33	16
Morbidité (%)	22	14
Risque sanitaire (%)	55	30

*Moyennes arithmétiques issues de 2 protocoles

Pendant les troubles digestifs, le biotope caecal subit des perturbations significatives : chute de la MS (45%) de la concentration en AGV totaux (55%), inversion du ratio C₃/C₄ et hausse du NH₃ (77%). En revanche, ni la diversité ni la structure de la biocénose n'est modifiée ; la similarité entre la biocénose des lapins malades et celle des lapins sains atteint 96%.

Le taux d'haptoglobine dans le sang semble être un bon indicateur du statut sanitaire du lapin. Pendant les périodes de troubles digestifs sa concentration augmente de 70% environ (1,5 mg/ml chez les lapins sains). La validité de cet indicateur chez le lapin reste néanmoins à confirmer par un nombre plus important de mesures.

L'apport de levure améliore la santé digestive de lapin avec la réduction de 50% du risque sanitaire pendant les périodes de forte mortalité, mais elle est sans effet sur la croissance et l'ingestion. La levure est aussi sans effet sur le taux sérique d'haptoglobine chez les lapins sains.

V. MODES D'ACTION DE LA LEVURE PROBIOTIQUE – HYPOTHESES APPLICABLES AU CAS DE L'ECOSYSTEME CAECAL DU LAPERAU

Selon la synthèse de Fonty & Chaucheyras-Durand (2008), le mode d'action des probiotiques pourrait se résumer en 3 points essentiels. Il s'agit de la capacité des probiotiques à s'adhérer aux cellules épithéliales intestines, de la production de facteurs antimicrobiens et la modulation de la réponse de l'hôte aux pathogènes. Chez la vache, selon les conclusions de Marden (2007), la levure probiotique (*S. cerevisiae*) incorporée dans une ration riche en glucide rapidement fermentescible a pour effet d'abaisser le E_h et de le maintenir au niveau de celui enregistré avec une ration normale à base de fourrage (environ -190 mV). La levure aurait un pouvoir réducteur dont le niveau serait équivalent à celui d'une biocénose cellulolytique. Cet auteur a mis en évidence une hausse du E_h du contenu ruminal lorsque le régime est acidogène.

Chez le lapin, cette hypothèse n'est pas totalement à écarter, mais au vu de nos résultats, la levure n'a eu aucun effet sur le E_h . Son addition à un régime témoin entraîne une hausse du potentiel redox de 20 mV. Chez le ruminant, il a été montré que la ration témoin ne peut pas acidifier le milieu ruminal, par conséquent, la levure ne peut pas exprimer ces capacités intrinsèques (Marden, 2007). Toutefois il est probable que bien que la levure ait provoqué dans certains cas la hausse du E_h et dans d'autres cas un effet nul, elle pourrait servir de stabilisateur de l'écosystème caecal. Cela expliquerait la hausse du potentiel redox à l'apport de la levure dans régime normal à -204 mV, proche de la valeur attendue dans les conditions normales qui est environ de -220 mV (résultats d'étude méthodologique). Cette stabilisation pourrait permettre de garder un équilibre entre les différentes espèces microbiennes du caecum. Car dans un milieu très réduit où le potentiel redox est très bas, seul les *Archaea* (méthanogènes) seraient favorisés. Pour mieux apprécier l'importance de rôle de stabilisation, il suffit d'observer les perturbations physico-chimiques et microbiologiques qui apparaîtraient lors de troubles digestifs (**Figure 57**).

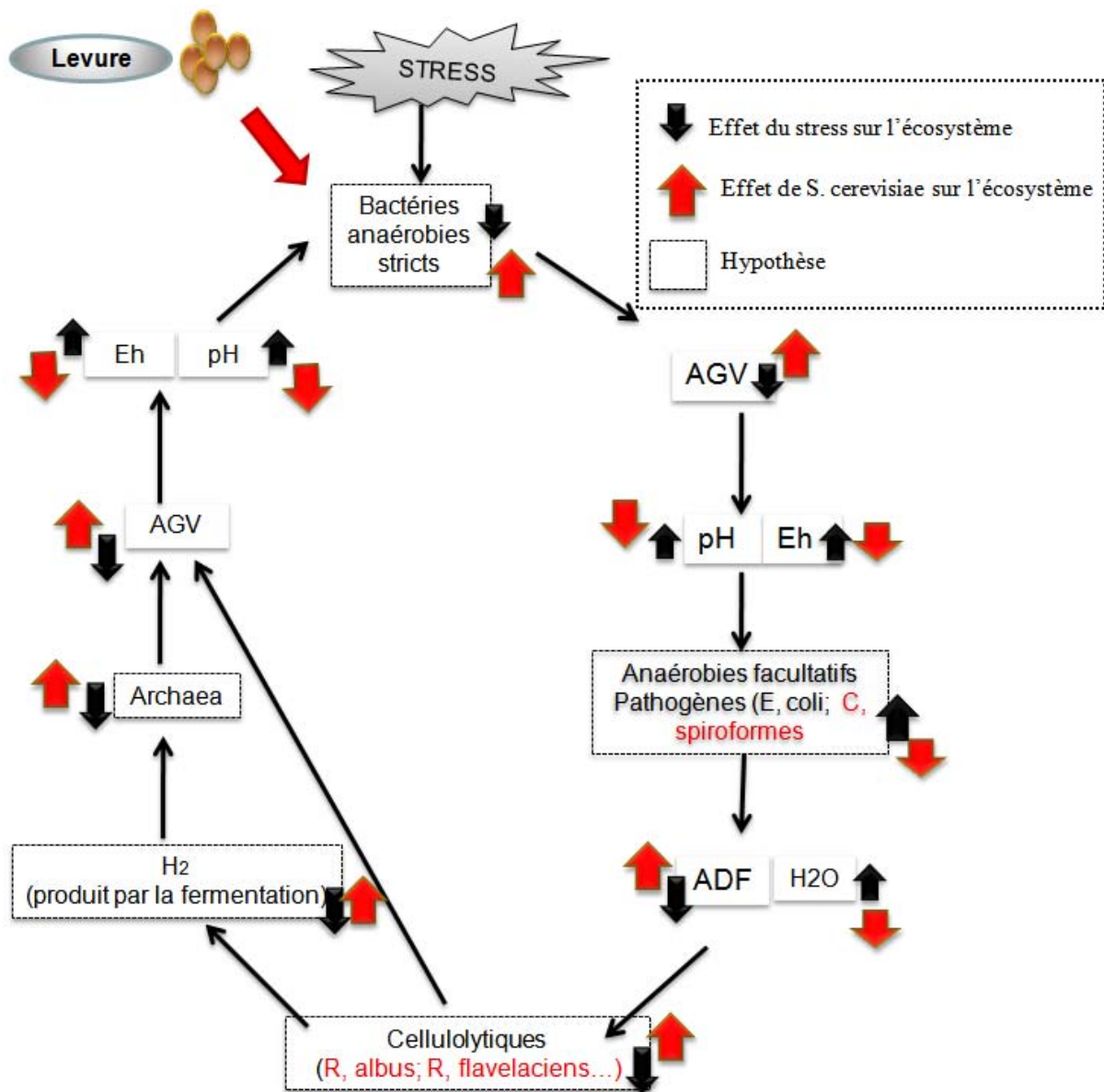


Figure 57: Mécanisme d'action du stress et l'apport de levure sur l'écosystème digestif du lapin

Lorsque les lapins sont soumis à un stress suffisant pour créer des perturbations digestives, il pourrait s'en suivre une baisse des bactéries totales et des anaérobies strictes (bactéries cellulolytiques) à l'origine de la baisse de la concentration en AGV totaux. Il y a une remontée du pH et du E_h due à la chute de cette concentration en AGV. Ce changement du biotope serait favorable à la prolifération des bactéries anaérobies facultatives dont certaines sont des pathogènes (*E. coli*). Ce qui serait à l'origine de la hausse de l'indicateur de l'inflammation (haptoglobine) comme ce qui a été observé chez le porc et chez le bovin (Le Floc'h *et al.*, 2004; Nikunen *et al.*, 2007). Le milieu s'oxyde avec la baisse de l'ingestion et la hausse probable de la consommation d'eau par rapport à l'ingestion. Il y a une chute plus

importante des bactéries cellulolytiques (*Ruminococcus*). La baisse des bactéries cellulolytiques et des substrats fermentescibles dans le milieu entraînerait également la baisse des *Archaea* due au manque d'hydrogène produit par la fermentation des substrats fibreux et utilisé par ces derniers pour réduire le CO₂ en méthane (Morvan, 1995). Cette baisse des bactéries fibrolytiques et des *Archaea* aurait pour conséquence, la chute plus accentuée des AGV qui associée à l'hydrolyse des protéines endogènes augmenteraient le pH (environ 7) et le potentiel redox (en dessous de -200 mV). La hausse du E_h et le pH à leur tour, accentuent la baisse des bactéries anaérobies strictes (fibrolytiques).

Par contre chez le lapin sain, nous pensons que l'apport de levure aurait pour conséquence le maintien du E_h en dessous de -200 mV et le pH autour de 6. Ce rôle proviendrait du fait que la levure fournirait à la biocénose des facteurs de croissance d'une part et d'autre part contribuerait à l'installation d'un milieu très réduit par la consommation probable des traces d'oxygène présentes dans le caecum ou encore par d'autres voies non encore élucidées. Dans ces conditions, les variations des différents paramètres de l'écosystème digestif décrit au cours des troubles digestifs s'inversent. On assiste à la baisse du pH et du E_h ainsi que la hausse de la concentration en AGV au niveau du biotope caecal, et au niveau de la biocénose à la croissance des bactéries anaérobies strictes notamment les bactéries fibrolytiques et les *Archaea* et à la régression des anaérobies facultatives potentiellement pathogènes (**Figure 57**).

La levure probiotique *S. cerevisiae* en alimentation animale aurait pour effet de stabiliser le potentiel redox et le pH du milieu. La levure aurait un pouvoir réducteur qui serait équivalent aux besoins des bactéries cellulolytiques du tube digestif. Elle empêcherait ainsi le développement des microorganismes anaérobies facultatifs tels que les pathogènes dans le milieu, d'où la réduction de la mortalité et de la morbidité souvent associé à l'apport de levure dans l'alimentation animale.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons pour objectif de contribuer à une meilleure compréhension des relations entre le biotope et la biocénose digestive, en développant de nouveaux critères physico-chimiques et microbiologiques, et en réalisant une approche comparative de l'effet de la levure probiotique *S. cerevisiae* sur l'écosystème caecal et ruminal.

L'originalité de notre travail réside en la mise au point de la mesure d'un nouveau paramètre de caractérisation du biotope caecal: **le potentiel redox**; associée à l'utilisation de techniques de **microbiologie moléculaire (approche fingerprint)** pour caractériser la biocénose. En parallèle, nous avons aussi développé l'utilisation d'un nouveau critère de **physiopathologie : l'haptoglobine sérique**, comme candidat potentiel en tant que prédicteur de la santé digestive du lapin.

Nous avons pu ainsi, grâce à une adaptation de la technique de mesure du E_h ruminal de Marden et (2006), fournir des données originales de potentiel redox dans le caecum du lapin en croissance. Ainsi, le E_h caecal est estimé à -220 mV, il confirme que le biotope caecal est très réducteur et donc plus anaérobie que le biotope ruminal.

Nous avons évalué l'impact d'un facteur abiotique (taux de fibres) et celui d'un facteur biotique (*S. cerevisiae*) sur l'écosystème caecal et sur un indicateur d'inflammation générale (taux d'haptoglobine sérique).

Nous avons ainsi constaté que la réduction du taux de fibres dans la ration, contrairement au ruminant, provoque chez le lapin une hausse du pH et la baisse de la concentration caecale en AGV totaux. Le ratio C_3/C_4 inférieur à 1, s'inverse lorsque le taux de fibres dans la ration passe de 20% ADF à 9%. En revanche, ces profondes modifications du biotope, ne semblent pas affecter le potentiel redox caecal. De même, la diversité et la structure de la biocénose bactérienne ne diffèrent pas non plus de celles observées avec les témoins (20% ADF). Le taux d'haptoglobine n'est pas non plus influencé par la teneur en fibres de l'aliment.

L'apport de levure n'a pas d'effet majeur sur le biotope bien que nous ayons observé dans certains cas (1 cas sur 2) une hausse légère du E_h . La levure a peu d'impact sur le pH, le E_h et les AGV du contenu caecal chez le lapereau sain, en opposition au ruminant chez lequel, la levure dans une ration déficiente en fibres, favoriserait la stabilisation du pH, l'augmentation de la concentration en AGV et la baisse du E_h ruminal. Sur la biocénose, *S. cerevisiae* tend à augmenter la diversité d'environ 10%. Elle n'a cependant pas d'effet perceptible sur la

structure du microbiote, où la similarité atteint 100% lorsque la levure est apportée à un régime déficient en fibres et 97% lorsqu'il s'agit de régime normal. Nous avons aussi constaté que la levure n'avait pas d'effet sur le taux d'haptoglobine sérique du lapin. Tandis que, du point de vue zootechnique, la levure peut réduire d'environ 50% la mortalité ou le risque sanitaire, en période de forte mortalité (post sevrage).

Au cours des pathologies digestives, nous avons observé d'importantes variations au niveau de l'écosystème notamment pour le biotope, et le taux sérique d'haptoglobine. Au niveau physiologique, le taux sérique d'haptoglobine augmente en moyenne de 70% chez les lapins morbides. Il n'augmente que pendant les périodes de risque sanitaire élevées. Ceci suggère que l'haptoglobine est un bon indicateur du statut sanitaire de l'animal, mais ne possède pas de caractère prédictif, puisque les concentrations en haptoglobine restent similaires chez l'animal sain témoin ou soumis à un stress nutritionnel. Nous avons aussi constaté une hausse du E_h et du pH ainsi que le NH_3 dont la concentration double pendant les diarrhées. En revanche, les concentrations en AGV et la MS baissent de moitié. Le ratio C_3/C_4 s'inverse également et tend vers 2. A l'inverse, la structure des profils microbiologiques de la biocénose des lapins morbides est à plus de 96% similaire à celles des lapins sains, et sans impact sur la diversité bactérienne caecale.

En perspectives, dans un souci de mieux cerner la biocénose digestive, il serait intéressant d'associer aux précédentes mesures, la PCR en temps réel (qPCR) afin d'analyser au plan quantitatif différents groupes de bactéries et des *Archaea* qui auraient un rôle non négligeable dans l'écosystème caecal, en relation avec l'application d'un stress nutritionnel ou l'apport d'une flore exogène (*S. cerevisiae*).

Nous avons aussi observé que l'haptoglobine est un bon indicateur du statut sanitaire du lapin. Toutefois, il serait souhaitable de faire la mise au point de la mesure d'un indicateur de l'inflammation localisée (e.g. la myéloperoxydase du côlon et du caecum) pour l'associer à l'impact des facteurs biotiques et abiotiques sur l'écosystème caecal. Il serait aussi intéressant d'estimer l'impact de ces facteurs biotiques et abiotiques sur la muqueuse intestinale et sur les anthérocytes.

Il a été montré chez le ruminant que l'apport de levure *S. cerevisiae* faisait baisser le E_h tout en relevant le pH après le repas. Chez le lapin, l'utilisation de la méthodologie de restriction alimentaire pourrait permettre d'évaluer l'évolution de l'écosystème caecal à la phase

préprandiale et postprandiale ainsi que l'impact du stress nutritionnel et l'apport d'une flore exogène sur cet écosystème pendant ces 2 phases.

L'utilisation de sonde plus « sensibles » pourrait permettre une amélioration de la méthode redox chez le lapin ainsi que le délai de mesure

Enfin, pour mieux évaluer l'impact de la levure sur la santé digestive du lapereau, il serait souhaitable d'utiliser un nombre plus élevé d'animaux qui seront soumis au stress nutritionnel, ce qui permettra de réduire considérablement les variabilités interindividuelles quant à la réponse vis à vis d'un stress nutritionnel.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abecia L (2006) Characterization of caecal microbial population of the rabbit: effect of feeding level and antibiotics supplementation on the biodiversity and nitrogen recycling. PhD, Veterinary faculty.
- Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Lobley GE & McEwan NR (2007) The effect of medicated diets and level of feeding on caecal microbiota of lactating rabbit does. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 787-793.
- Adami A & Cavazzoni V (1999) Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *J Basic Microbiol.* **39**, 3-9.
- Adams DC, Galyean ML, Kiesling HE, Wallace JD & Finkner MD (1981) Influence of Viable Yeast Culture, Sodium Bicarbonate and Monensin on Liquid Dilution Rate, Rumen Fermentation and Feedlot Performance of Growing Steers and Digestibility in Lambs. *Journal of Animal Science* **53**, 780-789.
- Adjiri D, Bouillier Oudot M, Lebas F & Candau M (1992) Simulation in vitro des fermentations caecales du lapin en fermenteur à flux semi-continu. 1) Rôle du prétraitement du substrat alimentaire. *Reproduction Nutrition Development*, **32**, 351-360.
- Adjiri D, Bouillieroudot M, Lebas F & Candau M (1995) In vitro simulation of rabbit caecal fermentation in a semi-continuous flow fermentor .3. Effect of the quantity of dry matter introduced daily and reproductibility of the method. *Reproduction Nutrition Development* **35**, 121-128.
- Ando S, Khan RI, Takahasi J, Gamo Y, Morikawa R, Nishiguchi Y & Hayasaka K (2004) Manipulation of rumen fermentation by yeast: The effects of dried beer yeast on the in vitro degradability of forages and methane production. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **17**, 68-72.
- Andrade PVD, Giger-Reverdin S & Sauvant D (2002) Relationship between two parameters (pH and redox potential) characterising rumen status: Influence of diets In *9th, Rencontres Recherches Ruminants*, pp. 332 Paris, France.
- Andras B, Zsolt S, Zsolt M, Hedvig F, Roland P, Gabor T, Peter H, Ferenc K & Melinda K (2008) Effect of *Bacillus cereus* var. *toyoi* (Toyocerin (R)) on caecal microflora and fermentation in rabbits. *Magyar Allatorvosok Lapja* **130**, 87-95.
- Aoun M, Grenet L, Mousset J & Robart P (1994) Effet d'une supplementation avec de l'oxytetracycline et des levures vivantes sur les performances d'engraissement. In *6ièmes Journées de la Recherche Cunicole*, pp. 277-283.
- Arcos-Garcma JL, Castrejsn FA, Mendoza GD & Pirez-Gavilan EP (2000) Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livestock Production Science* **63**, 153-157.
- Asli MM, Hosseini SA, Lotfollahian H & Shariatmadari F (2007) Effect of probiotics, yeast, vitamin E and vitamin C supplements on performance and immune response of laying hen during high environmental temperature. *International Journal of Poultry Science* **6**, 895-900.
- Asmenskaite L, Juskievics J, Zdunczyk Z, Staniskiene B, Budreckiene R, Sinkeviciene I, Zilinskiene A & Matusевичius P (2007) Influence of chicory flour (*Cichorium intybus* L.) on physiology of digestive tract and health in rabbits. *Veterinarija ir Zootechnika*, 3-8.
- Ayyat MS, Marai IFM & El-Aasar TA (1996) New Zealand White rabbit does and their growing offsprings as affected by diets containing different protein level with or without Lacto-Sacc supplementation. *World Rabbit Science* **4**, 225-230.
- Baldwin RL & Emery RS (1960) The oxidation-. reduction potential of rumen contents. *Dairy sciences* **43**, 506-511.
- Baljit K, Umesh K, Sareen VK & Sudarshan S (2003) Influence of addition of yeast culture (YEA-SACC228) to the diet of buffalo calves on ruminal fermentation and in sacco digestibility of some roughages. *SARAS Journal of Livestock and Poultry Production* **19**, 38-46.
- Baron JH (2000) The pancreas. *Mt Sinai J Med.* **67**, 68-75.
- Barone R, Pavaux C, Blin P.C. & Cuq P (1973) *Atlas d'anatomie du lapin*, Masson et Cie Eds ed. Paris, France.
- Barry TN, Thompson A & Armstrong DG (1977) Rumen fermentation studies on two contrasting diets. 1. Some characteristics of the in vivo fermentation, with special reference to the composition of the gas phase, oxidation/reduction state and volatile fatty acid proportions. *J. Agric. Sci. Camb.* **89**.
- Bellier R (1994) Nutritional control of the caecal fermentative activity in the rabbit. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Institut National polytechnique de Toulouse.
- Bellier R & Gidenne T (1996) Consequences of reduced fibre intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *British Journal of Nutrition* **75**, 353-363.

- Bellier R, Gidenne T, Vernay M & Colin M (1995) In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* **73**, 128-135.
- Bennegadi-Laurent N, Gidenne T & Licois D (2004) Nutritional and sanitary statuses alter postweaning development of caecal microbial activity in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **139**, 293-300.
- Bennegadi N (2002) Les entéropathies non spécifiques du lapin en croissance. Impact des facteurs microbiens et nutritionnels. Thèse de doctorat, ENSAR, Université de Rennes.
- Bennegadi N, Gidenne T & Licois D (2003) Conséquences d'une entéropathie d'origine nutritionnelle sur l'activité microbienne cœcale du lapin en croissance. In *Journées de la Recherche Cunicole, 19-20 nov. 2003, Paris*.
- Biavati B, Vasta M & Ferry JG (1988) Isolation and characterization of *Methanosphaera cuniculi* sp. nov. *Appl Environ Microbiol.* **54**, 768-771.
- Biricik H & Turkmen II (2001) The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fibre of different forage:concentrate ratios in diets. *Veteriner Fakultesi Dergisi, Uludag Universitesi* **20**, 29-33.
- Blas Cd, Garcia J & Alday S (1991) Effects of dietary inclusion of a probiotic (Paciflor(R)) on performance of growing rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research* **14**, 148-150.
- Bohn HL (1969) The EMF platinum electrodes in dilute solutions and its relation to soil pH. . *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* **33**, 639-640.
- Boulahrouf A, Fonty G & Gouet P (1991) Establishment, counts and identification of the fibrolytic bacteria in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. *Current microb.* **22**, 1-25.
- Braegger CP (2002) Probiotika in der Prävention und Behandlung der akuten Gastroenteritis bei Kindern. *Monatsschrift Kinderheilkunde* **150**, 824-828.
- Broberg G (1957) Measurements of the redox potential in rumen contents. III. Investigations into the effect of oxygen on the redox potential and quantitative in vitro determinations of the capacity of rumen contents to consume oxygen. *Nord. Vet. Med.* **9**, 942-950.
- Broudiscou LP, Agbagla-Dohnani A, Papon Y, Cornu A, Grenet E & Broudiscou A (2001) Quantitative effects of alfalfa extract supply on rice straw degradation, fermentation and biomass synthesis by rumen micro-organisms in vitro. *Anim. Res* **50**, 429-440.
- C.A.M. & C.A.P. (1994) Etude des effets d'une supplementation en Biosaf® sur la mortalité et les performances de croissance des lapins en engraissement, en conditions terrain. 1993-1994 [Lesaffre, editor].
- Callaway ES & Martin SA (1997) Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal of Dairy Science* **80**, 2035-2044.
- Carabaño R, Badiola I, Licois D & Gidenne T (2006) The digestive ecosystem and its control through nutritional or feeding strategies. In *Recent advances in rabbit sciences*, pp. 211-228 [LMaP Coudert, editor]. Melle, Belgium: COST (ESF) and ILVO, Melle, Belgium.
- Carabaño R, Motta Ferreira W, De Blas JC & Fraga MJ (1997) Substitution of sugarbeet pulp for alfalfa hay in diets for growing rabbits. *Anim Feed Sci Tech* **65**, 249-256.
- Carabano R & Piquer. J (1998) The Digestive System of the Rabbit. In *The Nutrition of the Rabbit* [CdBaJ Wiseman, editor]. London: CABI Publishing.
- Carro MD, Lebzien P & Rohr K (1992) Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage-based diet. *Livest. Prod. Sci.* **32**, 219-229.
- Carter HE & Phillips GE (1944) The nutritive value of yeast proteins. . *Fed. Proc.* **3**, 123-128.
- Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alio C & Muyzer G (2000) Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* **66**, 499-508.
- Castellini C, Cardinali R, Rebollar PG, Dal Bosco A, Jimeno V & Cossu ME (2007) Feeding fresh chicory (*Chicoria intybus*) to young rabbits: Performance, development of gastro-intestinal tract and immune functions of appendix and Peyer's patch. *Animal Feed Science and Technology* **134**, 56-65.
- Chaucheyras-Durand F & Fonty G (2001) Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development* **41**, 57-68.
- Chaucheyras-Durand F, Madic J., Doudin F. & C. M (2006) Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O15:H7 in ruminant digestive contents. *Applied and environmental microbiology* **72**, 4136-4142.
- Chaucheyras F, Fonty G, Bertin G, Salmon J-M & Gouet P (1996) Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell® SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Canadian journal of microbiology* **42**, 927-933.

- Chaucheyras F, Millet L, Michalet-Doreau B, Fonty G, Bertin G & Gouet P (1997) Effect of an addition of LEVUCELL[®] SC on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. In *Evolution of the rumen microbial ecosystem* pp. 82 [RR1a INRA, editor. Centre de Clermont-Theix 'Evolution of the rumen microbial ecosystem
- Chaudhary LC, Singh R, Kamra DN & Pathak NN (1995) Effect of oral administration of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on digestibility and growth performance of rabbits fed diets of different fibre content. *World Rabbit Science* **3**, 15-18.
- Chen X, Kokkotou EG, Mustafa N, Bhaskar KR, Sougioultzis S, O'Brien M, Pothoulakis C & Kelly CP (2006a) *Saccharomyces boulardii* Inhibits ERK1/2 Mitogen-activated Protein Kinase Activation Both in Vitro and in Vivo and Protects against *Clostridium difficile* Toxin A-induced Enteritis. *J. Biol. Chem.* **281**, 24449-24454.
- Chen XH, Kokkotou EG, Mustafa N, Bhaskar KR, Sougioultzis S, O'Brien M, Pothoulakis C & Kelly CP (2006b) *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both in vitro and in vivo and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 24449-24454.
- Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK & Gill HS (2000) Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr.* **54**, 849-855.
- Cooke KM, Bernard JK & West JW (2007) Performance of lactating dairy cows fed whole cottonseed coated with gelatinized starch plus urea or yeast culture. *Journal of Dairy Science* **90**, 360-364.
- Corpet DE (1999a) Antibiotiques en élevage et résistances bactériennes : vers une interdiction ? . *Rev Med Vet.* **150**, 165-170.
- Corpet DE (1999b) Antibiotiques en élevage et résistances bactériennes : vers une interdiction ? *Rev Med Vet* **150**, 165-170.
- Corring T & Rerat A (1988) A survey of enzymatic digestion in simple-stomached animals. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* **25**, 9-26.
- Cotta MA (1992) Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Applied and environmental microbiology* **58**, 48-54.
- Crociani F, Biavati B, Castagnoli P & Matteuzzi D (1984) Anaerobic ureolytic bacteria from caecal content and soft faeces of rabbit. *J. Appl. Bacteriology* **57**, 83-88.
- Crociani F, Minardi A, Matteuzzi D, Gioffre & Lebas F (1985) Bactéries uréolytiques et activité uréasique dans le tube digestif du lapin. *MAN, Microbiol Alim Nutr.* **3**, 83-86.
- Czerucka D & Rampal P (2002) Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection* **4**, 733-739.
- Dalmasso G, Cottrez F, Imbert V, Lagadec P, Peyron J-F, Rampal P, Czerucka D & Groux H (2006) *Saccharomyces boulardii* Inhibits Inflammatory Bowel Disease by Trapping T Cells in Mesenteric Lymph Nodes. *Gastroenterology* **131**, 1812-1825.
- Dann HM, Drackley JK, McCoy GC, Hutjens MF & Garrett JE (2000) Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of jersey cows. *Journal of Dairy Science* **83**, 123-127.
- Dawson KA (2000) Some milestones in our understanding of yeast culture supplementation in ruminants and their implications in animal production systems. In *Proceedings of the 16th Annual Symposium.*, pp. 473-486 [BitF Industry, editor]. Nottingham University Press, Nottingham, UK.: T.P. Lyons and K.A. Jacques.
- Dawson KA, Newman. KE & Boling JA (1990) Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage fed microbial activities. *J. Anim. Sci.* **68**, 3392-3398.
- de Vrese M & Marteau PR (2007) Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *Journal of Nutrition* **137**, 803S-811.
- Debray L, Fortun-Lamothe L & Gidenne T (2002) Influence of low dietary starch/fibre ratio around weaning on intake behaviour, performance and health status of young and rabbit does. *Animal Research* **51**, 63-75.
- Delbès C, Godon J-J & Moletta R (1998) 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Anaerobe* **4**, 267-275.
- Denev SA, Peeva T, Radulova P, Stancheva P, Staykova G, Beev G, Todorova P & Tchobanova S (2007) Yeast cultures in ruminant nutrition *Bulg. J. Agric. Sci.* **13**, 357-374.
- DeNigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC & Hamosh P (1988) Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **959**, 38-45.
- Devriese LA, Hommez J, Pot B & Haesebrouck F (1994) Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J Appl Bacteriol.* **77**, 31-36.

- Ding J, Zhou ZM, Ren LP & Meng QX (2008) Effect of monensin and live yeast supplementation on growth performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and ruminal fermentation parameters in lambs fed steam-flaked corn-based diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **21**, 547-554.
- Dolezal J & Dolezal P (2007) Digestibility of organic matter of total mixed rations with the supplementation of yeast culture using the in vitro method. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **55**, 59-64.
- Dolezal P & Dolezal J (2005) The yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* (Strain 47) as manipulator of rumen fermentation in postpartal period of dairy cows. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **53**, 27-33.
- Doreau M & Jouany JP (1998) Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **81**, 3214-3221.
- Dubuquoy L, Bourdon C, Peuchmaur M, D. Leibowitz M, Nutten S, Colombel J-F, Auwerx J & Desreumaux P (2000) Le récepteur activé par les proliférateurs des peroxyosomes (PPAR) γ : une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Gastroenterol Clin Biol* **24**, 719-724.
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO & Cutting SM (2004) Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2161-2171.
- Dugas B, Mercenier A, Lenoir-Wijnkoop I, Arnaud C, Dugas N & Postaire E (1999) Immunity and probiotics. *Immunology Today* **20**, 387-390.
- Durand-Chaucheyras F, Fonty G & Bertin G (1997) L'utilisation de levures vivantes, additif microbiens chez le ruminant : Effets sur la microflore et les fermentations ruminales, effets zootechniques. *Bulletin des G.T.V. n°5B* **576**, 35-52.
- Dutta TK & Kundu SS (2005) In vitro rumen fermentation and gas production as affected by probiotics addition. *Indian Journal of Animal Sciences* **75**, 817-822.
- El-Gaafary MN, Rashwan AA, El-Kerdawy DMA & Yamani KA (1992) Effects of feeding pelleted diet supplemented with probiotic (Lacto-Sacc) on digestibility, growth performance, blood constituents, semen characteristics and reproductive traits of rabbits. *Egyptian Journal of Rabbit Science* **2**, 95-105.
- El-Hindawy MM, Yamani KA & Tawfeek MI (1993) Effect of probiotic (Lacto-Sacc) in diets with different protein levels on growth performance, digestibility and some carcass aspects of growing rabbits. *Egyptian Journal of Rabbit Science* **3**, 13-28.
- El-Waziry AM & Ibrahim HR (2007) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* of Yeast on Fiber Digestion in Sheep Fed Berseem (*Trifolium alexandrinum*) Hay and Cellulase Activity. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **1**, 379-385.
- Emmanuel DGV, Jafari A, Beauchemin KA, Leedle JAZ & Ametaj BN (2007) Feeding live cultures of *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* induces an inflammatory response in feedlot steers. *Journal of Animal Science* **85**, 233-239.
- Erickson KL & Hubbard NE (2000) Probiotic Immunomodulation in Health and Disease. *Journal of Nutrition* **130**, 403.
- Erickson RH & Kim YS (1990) Digestion and Absorption of Dietary Protein. *Annual Review of Medicine* **41**, 133-139.
- Fairbrother JM & Nadeau E (2006) *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* **25**, 555-569.
- Falcao-e-Cunha L, Castro-Solla L, Maertens L, Marounek M, Pinheiro V, Freire J & Mourao JL (2007) Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: A review. *World Rabbit Science* **15**, 127-140.
- Fleige S, Preibinger W, Meyer HHD & Pfaffl MW (2007) Effect of lactulose on growth performance and intestinal morphology of pre-ruminant calves using a milk replacer containing *Enterococcus faecium*. *Animal* **1**, 367-373.
- Fonty G & Chaucheyras-Durand F (2007) Les écosystèmes digestifs In *Monographies de microbiologie*, pp. 311.
- Forsythe SJ & Parker DS (1985) Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *Journal of Applied Microbiology* **58**, 363-369.
- Fortun-Lamothe L & Gidenne T (2001) Feeding strategies for the weaning period in relation to the digestion and the nutritional needs of young rabbits. *9èmes Journées de la Recherche Cunicole* **1**, 173-190.
- Fuller R (1999) Probiotic for farm animals. In *Probiotic: a general review*, pp. 15-22 [GW Tannock, editor]: Horizon scientific press, Wymondham UK.
- Gagnon M, Kheadr EE, Le Blay G & Fliss I (2004) In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *International Journal of Food Microbiology* **92**, 69-78.
- Galand G (1989) Brush border membrane sucrase-isomaltase, maltase-glucoamylase and trehalase in mammals. Comparative development, effects of glucocorticoids, molecular mechanisms, and phylogenetic implications. *Comp Biochem Physiol B.* **94**, 1-11.

- Garcia J, Carabano R, Perez-Alba L & De Blas J (2000) Effect of fiber source on cecal fermentation and nitrogen recycled through cecotrophy in rabbits. *Journal of Animal Science* **78**, 638-646.
- Genheim C, Alenius S & Persson Waller K (2007) Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *The Veterinary Journal* **173**, 645-651.
- Gidenne T (1986) Quantitative variation of bacterial fermentation products in the digestive tract of growing rabbits during the 24-h cycle. Relationships with the dietary lignin content. *Annales de Zootechnie* **35**, 121-136.
- Gidenne T (1994) Effets d'une réduction de la teneur en fibres alimentaires sur le transit digestif du lapin. Comparaison et validation de modèles d'ajustement des cinétiques d'excrétion fécale des marqueurs. *Reproduction Nutrition Development* **34**, 295-306.
- Gidenne T (1997) Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science* **51**, 73-88.
- Gidenne T (2003) Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* **81**, 105-117.
- Gidenne T & Bellier R (1992) Etude in vivo de l'activité fermentaire caecale chez le lapin. Mise au point et validation d'une nouvelle technique de canulation caecale. *Reproduction Nutrition Development* **32**, 365-376.
- Gidenne T, Carabaño R, Badiola I, Garcia J & Licois D (2007a) The caecal ecosystem of the domestic rabbit: impact of nutrition and of some feeding factors – implications for the digestive health of the young rabbit. *12ème J. Rech. Cunicoles*, 59-71.
- Gidenne T, Combe S., Carabaño R, Badiola I, Garcia J & Licois D (2008) Ecosystème caecal et nutrition du lapin: interactions avec la santé digestive. *INRA Prod. Anim.*, **21**, 239-250.
- Gidenne T, Debray L, Fortun-Lamothe L & Le Huerou-Luron I (2007b) Maturation of the intestinal digestion and of microbial activity in the young rabbit: Impact of the dietary fibre:starch ratio. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **148**, 834-844.
- Gidenne T & Garcia J (2006) Nutritional strategies improving the digestive health of the weaned rabbit. In *Recent advances in rabbit sciences*, pp. 229-238 [LMaP Coudert, editor]. Melle, Belgium: ILVO, Melle, Belgium.
- Gidenne T & Jehl N (1999) Réponse zootechnique du lapin en croissance face à une réduction de l'apport de fibres, dans des régimes riches en fibres digestibles. *8ème J. Rech. Cunicoles Fr.*, 109-113.
- Gidenne T & Jehl N (2000) Caecal microbial activity of the young rabbit : incidence of a fibre deficiency and of feed intake level. *7th World Rabbit Congress World Rabbit Sci.*, **8**, suppl.1, vol. C, 223-229.
- Gidenne T, Jehl N, Lapanouse A & Segura M (2004) Inter-relationship of microbial activity, digestion and gut health in the rabbit: effect of substituting fibre by starch in diets having a high proportion of rapidly fermentable polysaccharides. *British Journal of Nutrition* **92**, 95-104.
- Gidenne T & Lebas F (1984) Evolution circadienne du contenu digestif chez le lapin en croissance. Relation avec la caecotrophie. *Proc. 3rd the World Rabbit Congress* **2**, 494-501.
- Gidenne T & Lebas F (2006) Feeding behaviour in rabbits. In *Feeding in domestic vertebrates. From structure to behaviour*, pp. 179-209 [V Bels, editor]. Wallingford, UK: CABI publishing.
- Gidenne T & Licois D (2005) Effect of a high fibre intake on the resistance of the growing rabbit to an experimental inoculation with an enteropathogenic strain of Escherichia coli. *Animal Science* **80**, 281-288.
- Gidenne T, Pinheiro V & Falcao e Cunha L (2000) A comprehensive approach of the rabbit digestion: consequences of a reduction in dietary fibre supply. **64**, 225-237.
- Giger-Reverdin S, Duvaux-Ponter C, Rigalma K & Sauvant D (2006) Effect of chewing behaviour on ruminal redox potential variability in dairy goats. In *13es rencontres autour des recherches sur les ruminants* pp. 452 Paris, FRANCE Institut de l'élevage, Paris, FRANCE.
- Giger-Reverdin S, Sauvant D, Tessier J, Bertin G & Morand-Fehr P (2004) Effect of live yeast culture supplementation on rumen fermentation in lactating dairy goats. *8th International Conference on Goats*, 59-61.
- Gippert T, Bersényi A, Szabó L & Farkas Z (1996) Development of novel feed concentrates supplemented with Salinomycin and Lacto-Sacc for growing rabbit nutrition in small scale farms. In *6th World Rabbit Congress*, pp. 187-190. Toulouse (France).
- Girard D & Dawson KA (1994) Effects of a yeast culture on the growth characteristics of representative ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* **72**, 300 (Abstr.).
- Gomez-Alarcon RA, Dudas C & Huber JT (1990) Influence of Cultures of Aspergillus oryzae on Rumen and Total Tract Digestibility of Dietary Components. *Journal of Dairy Science* **73**, 703-710.
- Gouet P & Fonty G (1979) Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **19**, 553-566.

- Gournier-chateau N, Larpent JP, Castellanos MI & Larpent JL (1994) *Les probiotiques en alimentation animale et humaine*, Lavoisier ed.
- Guerra NP, Bernardes PF, Mendez J, Cachaldora P & Pastrana Castro L (2007) Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology* **134**, 89-107.
- Harrison GA, Hemken RW, Dawson KA, Harmon RJ & Barker KB (1988) Influence of Addition of Yeast Culture Supplement to Diets of Lactating Cows on Ruminal Fermentation and Microbial Populations. *Journal of Dairy Science* **71**, 2967-2975.
- He T, Priebe MG, Zhong Y, Huang C, Harmsen HJM, Raangs GC, Antoine JM, Welling GW & Vonk RJ (2008) Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 595-604.
- Heugten Ev, Funderburke DW & Dorton KL (2003) Growth performance, nutrient digestibility, and faecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *Journal of Animal Science* **81**, 1004-1012.
- Hollister AG, Cheeke PR, Robinson KL & Patton NM (1990) Effects of dietary probiotics and acidifiers on performance of weaning rabbits. *J. Appl. Rabbit res.* **13**, 6-9.
- Hornich M & Chrastova V (1981) Redox potential of the large intestine of swine in relation to swine dysentery. *Veterinarni Medicina* **26**, 593-598.
- Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Kita M, Ueda Y, Iwakura Y, Kataoka K, Okanoue T & Mazda O (2006) Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical & Experimental Immunology* **146**, 330-338.
- Jacob P, Mueller MH, Hahn J, Wolk I, Mayer P, Nagele U, Hennenlotter J, Stenzl A, Konigsrainer A & Glatzle J (2007) Alterations of neuropeptides in the human gut during peritonitis. *Langenbecks Archives of Surgery* **392**, 267-271.
- Jouany JP (2000) Twenty years of research into yeast culture, now a standard in ruminant diets around the world. In *Proceedings from Alltech's 15th Annual European*, pp. 44-68. Middle Eastern and African Lecture Tour. .
- Jouany JP, Gobert J, Medina B, Bertin G & Jullian V (2008) Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J. Anim Sci.* **86**, 339-347.
- Jouany JP, Lassalas, B., Bertin G. (1995) In vitro study of the dose effect of *Saccharomyces cerevisiae* on rumen digestion of a mixed diet. *Ann. Zootech.* **44** 155-155
- Kamamma, Krishnamoorthy U & Krishnappa P (1996) Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc1026) on rumen fermentation in vitro and production performance in crossbred dairy cows *Animal Feed Science and Technology* **57**, 247-256.
- Kamra DN, Chaudhary LC, Singhi R & Pathak NN (1996) Influence of feeding probiotics on growth performance and nutrient digestibility in rabbits. *World Rabbit Science* **4**, 85-88.
- Kermauner A & Strucklec M (1996) Addition of a probiotic to feeds with different energy and ADF content in rabbits. 1. Effect on the digestive organs. *World Rabbit Science* **4**, 187-193.
- Khadem AA, Pahlavan M, Afzalzadeh A & Rezaeian M (2007) Effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on fermentation parameters and microbial populations of rumen, total tract digestibility of diet nutrients and on the in situ degradability of alfalfa hay in Iranian Chall sheep. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **10**, 590-597.
- Kim HS, Ahn BS, Chung SG, Moon YH, Ha JK, Seo IJ, Ahn BH & Lee SS (2006) Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. *Animal Feed Science and Technology* **126**, 23-29.
- Kogan G & Kocher A (2007) Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* **109**, 161-165.
- Kolgazi M, Jahovic N, Yuksel M, Ercan F & Alican I (2007) Lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **22**, 1859-1865.
- Konturek S, Konturek P, Pawlik T, Sliwowski Z, Ochmański W & Hahn E (2004) Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms. *J Physiol Pharmacol.* **55 Suppl 2**, 5-17.
- Kumagai H, Kumagai S, Mitani K & Endo T (2004) Effects of supplementary probiotics on dry matter intake, daily gain, digestibility, ruminal pH, faecal microbial populations and metabolites of two different diets of ewes. *Animal Science Journal* **75**, 219-224.
- Kyriakis SC, Tsilyiannis VK, Vlemmas J, Sarris K, Tsinas AC, Alexopoulos C & Jansegers L (1999) The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. . *Res-Vet-Sci.* **67**, 223-228.

- Laplace JP (1978) Le transit digestif chez les monogastriques 3) Comportement (prise de nourriture, caecotrophie), motricité et transit digestif et pathogénie des diarrhées chez le lapin. *Annales de Zootechnie* **27**, 225-265.
- Laszlo K, Viktor J, Attila T, Laszlone T, Hedvig F, Jozsef K & Endre B (2007) Comparative examination of the biological effects of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cultures in dairy cows. *Magyar Allatorvosok Lapja* **129**, 400-409.
- Laukova A, Strompfova V, Skrivanova V, Volek Z, Jindrichova E & Marounek M (2006) Bacteriocin-producing strain of *Enterococcus faecium* EK 13 with probiotic character and its application in the digestive tract of rabbits. *Biologia* **61**, 779-782.
- Le Floch N, Jondreville C, Melchior D, Sève B & Matte J (2004) Impact du statut sanitaire en post-sevrage sur les performances de croissance et les niveaux plasmatiques d'acides aminés, de minéraux et de vitamines. In *Journées Recherche Porcine*, pp. 159-164.
- Lebas F, Coudert P., De Rochambeau, H., Thébault, R.G. (1996) Nutrition et alimentation. In *Le lapin : Elevage et pathologie*, pp. 21-50 [FAO, editor]. Rome, Italie.
- Lebas F, Marionnet D. & Henaff R. (1991) La production du lapin. In *Association Française de Cuniculture*, pp. 206 [Lavoisier, editor].
- Lesmeister KE, Heinrichs AJ & Gabler MT (2004) Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science* **87**, 1832-1839.
- Lessard M (2004) Utilisation des probiotiques chez le porc-modulateurs potentiels de la santé intestinale. In *Colloque sur la production porcine: 25 ans d'évolution!*, pp. 1-14 [CRAAQ, editor. Saint-Hyacinthe.
- Licois D, Marlier, D. (2008) Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Prod. Anim.* **21**, 257-268.
- Licois D, Reynaud A, Federighi M, Gaillard-Martinie B, Guillot JF & Joly B (1991) Scanning and transmission electron microscopic study of adherence of *Escherichia coli* O103 enteropathogenic and or enterohemorrhagic strain GV in enteric infection in rabbits. *Infection and Immunology* **59**, 3796-3800.
- Lila ZA, Mohammed N, Takahashi T, Tabata M, Yasui T, Kurihara M, Kanda S & Itabashi H (2006) Increase of ruminal fiber digestion by cellobiose and a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells in vitro. *Animal Science Journal* **77**, 407-413.
- Lila ZA, Mohammed N, Yasui T, Kurokawa Y, Kanda S & Itabashi H (2004) Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *Journal of Animal Science* **82**, 1847-1854.
- Luick BR, El-Sayaad GAE & Cheeke PR (1992) Effect of fructooligosaccharides and yeast culture on growth performance of rabbits. *Journal of Applied Rabbit Research* **15**, 1121-1128.
- Maertens L (1992) Rabbit nutrition and feeding: a review of some recent developments. *Proc. 5th Congr. of World Rabbit Science Assoc., 27-30 July, Corvallis, Oregon. J. Appl. Rabbit Res.* **15**, 889-913.
- Maertens L & De Groote G (1992) Effect of a dietary supplementation of live yeast on the zootechnical performances of does and weanling rabbits. *J. Appl. Rabbit res.* **15**, 1079-1086.
- Maertens L, Van Renterghem R & De Groote G (1994) Effects of dietary inclusion of paciflor (*Bacillus CIP 5832*) on the milk composition and performances of does and on caecal and growth parameters of their weanling. *World Rabbit Science* **2**, 67-73.
- Majtan J, Kogan G, Kovacova E, Bilikova K & Simuth J (2005) Stimulation of TNF-alpha release by fungal cell wall polysaccharides. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **60**, 921-926.
- Mao L, Dong H, Yang P, Zhou H, Huang X, Lin X & Kijlstra A (2008) MALDI-TOF/TOF-MS Reveals Elevated Serum Haptoglobin and Amyloid A in Behcet's Disease. *Journal of Proteome Research* **7**, 4500-4507.
- Marc B, Dubucquoy L, Garcia S, Gasmi M, Desreumaux P, Colombel Jean-Frédéric, Grimaud J-C, Iovanna J & Dagorn J-C (2003) Pancreatic changes in TNBS-induced colitis in mice. *Gastroentérologie clinique et biologique* **27**, 895-900
- Marden JP (2007) Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant: Approche thermodynamique chez la vache laitière, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.
- Marden JP, Bayourthe C, Enjalbert F & Moncoulon R (2005) A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cow. *Journal of Dairy Science* **88**, 1-5.
- Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R & Bayourthe C (2008) How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *Journal of Dairy Science* **91**, 3528-3535.
- Marounek M, Bartos S & Kalachnyuk G.I (1982) Dynamics of the redox potential and rH of the rumen fluid of goats. *Physiol. Bohemoslovaca Physiol. Bohemoslov.* **31**, 369-374.

- Marounek M, Roubal P & Bartos S (1987) The redox potential, rH and pH values in the gastrointestinal tract of small ruminants. *Physiol. Bohemoslov.* **36**, 71-74.
- Marrero Y, Galindo J, Aldama AI, Moreira O & Cueto M (2006) In vitro effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the microbial rumen population and fermentative indicators. *Cuban Journal of Agricultural Science* **40**, 313-320.
- Marteau P & Shanahan F (2003) Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 725-740.
- Martignon M, Combes S & Gidenne T (2008) Effect of age and feed intake level on structure and diversity of caecal bacterial community of the young rabbits. In *Gastrointestinal Tract Microbiology Symp.* [JM RRI-INRA, editor. Clermont-Ferrand, France.
- Martinsen TC, Bergh K & Waldum HL (2005) Gastric juice: a barrier against infectious diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **96**, 94-102.
- Mathieu F, Jouany J, Sénaud J, Bohatier J, Bertin G & Mercier M (1996) The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reproduction Nutrition Development* **36** 271-287.
- Matsuzaki T & Chin J (2000) Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol Cell Biol.* **78**, 67-73.
- Medina B, Girard ID, Jacotot E & Julliand V (2002) Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J. Anim Sci.* **80**, 2600-2609.
- Melchior D, Mézière N, Sève B & Le Floc'h N (2004) La réponse inflammatoire diminue-t-elle la disponibilité du tryptophane chez le porc ? In *Journées Recherche Porcine*, pp. 165-172.
- Melchior D, Sève B & Le Floc'h N (2002) Conséquences d'une inflammation chronique sur les concentrations plasmatiques d'acides aminés chez le porcelet : Hypothèses sur l'implication du tryptophane dans la réponse immunitaire. In *Journées de la Recherche Porcine*, pp. 341-347.
- Michalet-Doreau B, Morand D & Martin C (1997) Effect of the microbial additive LEVUCELL[®] SC on microbial activity in the rumen microflora during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diet. In *Evolution of the rumen microbial ecosystem*, pp. 81 [RRIa INRA, editor. Centre de Clermont-Theix
- Michelland RJ, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Monteils V & Fortun-Lamothe L (2008) Characterization of bacterial communities in cæcum, hard and soft feces of rabbit using 16S rRNA genes capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). *9th World Rabbit Congress* **72**, 1025-1030 + <http://world-rabbit-science.org/>.
- Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Lamothe L & Cauquil L (2009) Statfingerprints: a friendly graphical interface program for microbial fingerprint profiles processing and analysis *Molecular Ecology Resources* **in press**.
- Miled N, Canaan S, Dupuis L, Roussel A, Rivihre M, Carrière F, de Caro A, Cambillau C & Verger R (2000) Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. *Biochimie* **82**, 973-986.
- Miller-Webster T, Hoover WH, Holt M & Nocek JE (2002) Influence of Yeast Culture on Ruminant Microbial Metabolism in Continuous Culture. *J. Dairy Sci.* **85**, 2009-2014.
- Mir Z & Mir PS (1994) Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets and on feed digestibility and in situ degradability. *Journal of Animal Science* **72**, 537-545.
- Miranda RLA, Mendoza MGD, Barcena-Gama JR, Gonzalez MSS, Ferrara R, Ortega CME & Cobos PMA (1996) Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology* **63**, 289-296.
- Moloney AP & Drennan MJ (1994) The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. *Animal Feed Science and Technology* **50**, 55-73
- Moncoulon R & Auclair E (2001) Utilisation du BIOSAF[®] Sc 47 pour la production de viande de taurillon. Rapport de recherche. In Marden (2007), pp. 17.
- Moreau H, Gargouri Y, Lecat D, Junien J & Verger R (1988) Purification, characterization and kinetic properties of the rabbit gastric lipase. *Biochim Biophys Acta* **960**, 286-293.
- Morisse JP, Boilletot E & Maurice R (1985) Alimentation et modifications du milieu intestinal chez le lapin (AGV,NH₃,pH,flore). *Rec. Med. Vet.* **161**, 443-449.
- Morvan B (1995) Ecologie et physiologie des microorganismes hydrogénéotrophes des écosystèmes digestifs. Etude particulière de l'écosystème ruminal, Claude-Bernard-Lyon I.
- Mu H & Hxy C-E (2004) The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research* **43**, 105-133.
- Mummy KL, Chen X, Kelly CP & McCormick BA (2008) *Saccharomyces boulardii* interferes with *Shigella* pathogenesis by postinvasion signaling events. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G599-609.

- Muyzer G, de Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology* **59**, 695-700.
- Nagaraja TG (2002) Ruminal microorganisms and digestive disorders in cattle. In *Gastrointestinal Microbiology in Animals*, pp. 41-60. Trivandrum 695008: Research Signpost.
- Newbold CJ & Wallace RJ (1992) The effect of yeast and distillery by-products on the fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *Anim. Prod.* **54**, 504.
- Newbold CJ & Wallace RJ (1988) Effects of ionophores monensin and tetronasin on stimulated development of ruminal acidosis in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2981-2985.
- Newbold CJ, Wallace RJ & McIntosh FM (1996) Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition* **76**, 249-261
- Nikunen S, Härtel H, Orro T, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä S-L, Sankari S, Ahog P, Pyörälä S, Saloniemi H & Soveri T (2007) Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **30**, 143-151.
- Nisbet DJ & Martin SA (1990) Effect of Dicarboxylic Acids and *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract on Lactate Uptake by the Ruminal Bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Applied and environmental microbiology* **56**, 3515-3518.
- Nordstrom DK (1977) Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **41**, 1835-1841.
- Nordstrom DK & Wilde FD (1998) Reduction-oxidation potential (electrode method). In *National Field Manual for the Collection of Water Quality Data*, pp. 3-15. U. S. Geological Survey techniques of Water Resources Investigations.
- Ohashi K, Sato Y, Kawai M & Kurebayashi Y (2008) Abolishment of TNBS-induced visceral hypersensitivity in mast cell deficient rats. *Life Sciences* **82**, 419-423.
- Onifade AA & Babatunde GM (1996) Supplemental value of dried yeast in a high-fibre diet for broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology* **62**, 91-96.
- Onifade AA, Obiyan RI, Onipede E, Adejumo DO, Abu OA & Babatunde GM (1999) Assessment of the effects of supplementing rabbit diets with a culture of *Saccharomyces cerevisiae* using growth performance, blood composition and clinical enzyme activities. *Animal Feed Science and Technology* **77**, 25-32.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K & Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci.* **86**, 2766-2770.
- Ouweland AC, Tuomola EM, Tvikk S & Salminen S (2001) Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 119-126.
- Padilha MTS, Licois D, Gidenne T, Carré B & Fonty G (1995) Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction Nutrition Development* **35**, 375-386.
- Parvez S, Malik KA, Kang SA & Kim HY (2006) Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 1171-1185.
- Paryad AR, M. (2009) Effect of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on Apparent Digestibility and Nitrogen Retention of Tomato Pomace in Sheep. *Pakistan Journal of Nutrition* **8**, 273-278.
- Peeters JE (1987) Etiology and pathology of diarrhoea in weanling rabbits. In *Rabbit production systems including welfare.*, pp. 127-137 [T Auxilia, editor]: Commission of the European Communities.
- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G & Gobbato N (1995) Immune System Stimulation by Probiotics. *Journal of Dairy Science* **78**, 1597-1606.
- Perret JP (1982) Gastric lipolysis in the young rabbit: origin and physiological importance of the lipase. *Journal de Physiologie* **78**, 221-230.
- Petersen B, Knura-Deszczka S, Pvnsgen-Schmidt E & Gymnich S (2002) Computerised food safety monitoring in animal production. *Livestock Production Science* **76**, 207-213.
- Piattoni F, Demeyer D & Maertens L (1997) Fasting effects on In Vitro Fermentation pattern of rabbit caecal contents. *World Rabbit Science*, **5**, 23-26.
- Piattoni F, Maertens L & Demeyer D (1995) Age dependent variation of caecal contents composition of young rabbits. *Arch. Anim. Nutr.* **48**, 347-355.
- Pinheiro V (2002) Contribution to the study of the rabbit digestion: effect of the dietary fibre level and nature of the starch. Thèse de doctorat, Univ. Vila Real, UTAD.
- Plata FP, M GDM, Barcena-Gama JR & M SG (1994) Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Animal Feed Science and Technology* **49**, 203-210.
- Portsmouth J (1997) The nutrition of rabbit. In *Nutritional and climatic environment*, pp. 93-111 [Butterworths, editor]. London: UK.

- Raeth-Knight ML, Linn JG & Jung HG (2007) Effect of Direct-Fed Microbials on Performance, Diet Digestibility, and Rumen Characteristics of Holstein Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 1802-1809.
- Rambaud J-C, Buts J-P, Corthier G & Flourié B (2004) *Flore microbienne intestinale: Physiologie et pathologie digestives*, John Libbey Eurotext ed: John Libbey Eurotext.
- Ramirez A, Ortega ME, Gonzalez S, Becerril C & Ayala J (2003) Effect of supplementation of two *Saccharomyces cerevisiae* strains on the performance of growing cows. *Cuban Journal of Agricultural Science* **37**, 131-136.
- Rampal P (1996) Les levures : classification, propriete, utilisations technologiques et therapeutiques. *Journal de Pediatrie et de Puericulture* **9**, 185-186.
- Rezaee M, Rezaeian M, Shahrehabak MM & Mirhadi SA (2006) The effects of strain and doses of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on performance, total rumen bacterial population and blood serum metabolites in male Holstein calves. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran* **61**, 63-69.
- Rogalska E, Ransac S & Verger R (1990) Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J. Biol. Chem.* **265**, 20271-20276.
- Rose AH (1987) Yeast culture, a microorganism for all species: A theoretical look at its mode of action. In: *Biotechnology in the Feed Industry*. , pp. 113-118. Nicholasville, Kentucky, U.S.A.
- Roselli M, Finamore A, Britti MS, Bosi P, Oswald I & Mengheri E (2005) Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. *Animal Research* **54**, 203-218.
- Russell JB & Strobel HJ (1989) Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1-6.
- Russell JB & Wilson DB (1996) Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science* **79**, 1503-1509
- Sadet S (2008) Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen: effet du régime alimentaire, Université Blaise Pascal.
- Saha SK, Senani S, Padhi MK, Shome BR, Shome R & Ahlawat SPS (1999) Microbial manipulation of rumen fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* as probiotics. *Current Science* **77**, 696-697.
- Santos FAP, Carmo CD, Martinez JC, Pires AV & Bittar CMM (2006) Supplementing yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) for late lactating dairy cows fed diets varying in starch content. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* **35**, 1568-1575.
- Saremi B, Naserian AA, Bannayan M & Shahriary F (2004) Effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on rumen bacterial population and performance of Holstein female calves. *Agricultural Sciences and Technology* **18**, Pe91-Pe103.
- Sauer FD & Teather RM (1987) Changes in oxidation reduction potentials and volatile fatty acid production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited. *J. Dairy Sci.* **70**, 1835-1840.
- Sauvant D, Martin, C., Peyraud, J. L. (2006) Introduction générale. In : Dossier, L'acidose chez les ruminants. . *INRA Productions Animales* **19** 69-78.
- Sauvant D, Meschy F & D. M (1999) Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. . *INRA Prod. Anim.* **12**, 49-60.
- Serteyn D, Grulke S., Franck T., Mouithys-mickalad A. & Deby-dupont G. (2003) La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Annales de médecine vétérinaire* **147**, 79-93.
- Shanmuganathan T, Samarasinghe K & Wenk C (2004) Supplemental enzymes, yeast culture and effective microorganism culture to enhance the performance of rabbits fed diets containing high levels of rice bran. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **17**, 678-683.
- Shu Q & Gill HS (2001) A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. **189**, 147-152.
- Sirotek K, Marounek M, Rada V & Benda V (2001) Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria. *Folia Microbiologica* **46**, 79-82.
- Sobhani S, Valizade R, Naserian AA, Shahroudi FE, Tahmorespour M & Behgar M (2006) The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on milk yield and composition and performance of Holstein dairy cow. *Agricultural Sciences and Technology* **20**, Pe53-Pe60.
- Sonbol SM & El-Gendy KM (1992) Effects of dietary probiotics on performance of weaning New Zealand White rabbits. *Egyptian Journal of Rabbit Science* **2**, 135-144.
- Sougioultzis S, Simeonidis S, Bhaskar KR, Chen X, Anton PM, Keates S, Pothoulakis C & Kelly CP (2006) *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-[kappa]B-mediated IL-8 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **343**, 69-76.
- Stewart CS (1997) microorganisms in hindgut fermentors. In *Gastrointestinal microbiology*, pp. 142-186 [R Mackie, White BA., editor]. Londre: Chapman and Hall.

- Tardy Y, Mercury L, Roquin C & Vieillard P (1999) Le concept d'eau ice-like : hydratation-déshydratation des sels, hydroxydes, zéolites, argiles et matières organiques vivantes ou inertes. *C. R. Acad. Paris, Sci de la terre et des planètes* **329**, 377-388.
- Thomson AB, Schoeller C, Keelan M, Smith L & Clandinin M (1993) Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Can J Physiol Pharmacol.* **71**, 531-555.
- Trocino A, Xiccato G, Carraro L & Jimenez G (2005) Effect of diet supplementation with Toyocerin((R)) (Bacillus cereus var. toyoi) on performance and health of growing rabbits. *World Rabbit Science* **13**, 17-28.
- Underdahl NR, Torres-Medina A & Doster AR (1983) Effect of Streptococcus faecium C-68 in control of Escherichia coli-induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* **43**, 2227-2232.
- Ushe TC & Nagy B (1985) Inhibition of small intestinal colonization of enterotoxigenic Escherichia coli by streptococcus faecium M74 in pigs. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [B]* **181**, 374-382.
- Valsaraj KT (2000) *Elements of Environmental Engineering: Thermodynamics and Kinetics*, 2 ed: Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Van Soest PJ (1963) Use of detergents in the analysis of fibrous feed. 2) A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass Off Agric. Chem*, **46**, 829-835.
- van Winsen RL, Urlings BAP, Lipman LJA, Snijders JMA, Keuzenkamp D, Verheijden JHM & van Knapen F (2001) Effect of Fermented Feed on the Microbial Population of the Gastrointestinal Tracts of Pigs. *Applied and environmental microbiology* **67**, 3071-3076.
- Vernay M & Marty J (1984) Absorption and metabolism of butyric acid in rabbit hind-gut. *Comp Bioc Physiol.* **77**, 89-96.
- Vernay M & Raynaud P (1975) Répartitions des acides gras volatils dans le tube digestif du lapin domestique. 2) Lapins soumis au jeune. *Ann. Rech. Vét.* **6**, 369-377.
- Wallace RJ & Newbold CJ (1993) Rumen fermentation and its application: the development of yeast cultures as feed additives. In *Biotechnology in the Feed Industry*, pp. 173-192 [LT P, editor. Nicholasville, Kentucky, U.S.A.: Alltech Technical Publications.
- Wendakoon CN, Fedio W, Macloed A & Ozi- mek L (1998) In vitro inhibition of Helicobacter pylori by dairy starter cultures. *Milchwissenschaft* **53**, 499-502. In *Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte / Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults.* AFSSA. **Février/February 2005**, 77-78.
- Wenus C, Goll R, Loken EB, Biong AS, Halvorsen DS & Florholmen J (2008) Prevention of antibiotic-associated diarrhoea by a fermented probiotic milk drink. *European Journal of Clinical Nutrition* **62**, 299-301.
- Wiedmeier RD, M.J. Arambel & J.L. Walters (1987) Effect of yeast culture and/or Aspergillus oryzae fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* **70**, 2063-2068.
- Williams PE, Tait CA, Innes GM & Newbold CJ (1991) Effects of the inclusion of yeast culture (Saccharomyces cerevisiae plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci* **69**, 3016-3026.
- Williams PEV & Newbold CJ (1990) Rumen Probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. . In *Recent Advances in Animal Nutrition* pp. 211-227. Butterworths, London, UK.
- Wolter R (1990) *Probiotiques: les règles du jeu.*
- Wright EM, Martmn MG & Turk E (2003) Intestinal absorption in health and disease--sugars. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **17**, 943-956.
- Wylegala S, Nowak W & Mikula R (2005) The effect of Saccharomyces cerevisiae on the in vitro degradability of maize grain, cellulose and wheat straw dry matter. *Journal of Animal and Feed Sciences* **14**, 315-318.
- Yueh SCH, Wang YH, Lin KY, Tseng CF, Chu HP, Chen KJ, Wang SS, Lai IH & Mao SJT (2008) Low levels of haptoglobin and putative amino acid sequence in Taiwanese Lanyu miniature pigs. *J Vet Med Sci* **70**, 379-387.
- Zanini K, Marzotto M, Castellazzi A, Borsari A, Dellaglio F & Torriani S (2007) The effects of fermented milks with simple and complex probiotic mixtures on the intestinal microbiota and immune response of healthy adults and children. *International Dairy Journal* **17**, 1332-1343.
- Zemb O, Haegeman B, Vanpeteghem D, Harmand J, Lebaron P. & Godon JJ (2007) safum: statistical analysis of SSCP fingerprints using PCA projections, dendrograms and diversity estimators. *Molecular Ecology Note.*
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI & Gaskins HR (2004) Molecular Ecological Analysis of the Gastrointestinal Microbiota: A Review. *Journal of Nutrition* **134**, 465-472.

Zumstein E, Moletta R & Godon J-J (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* **2**, 69-78.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE CAECAL ECOSYSTEM AND DIGESTIVE HEALTH IN RABBIT: NUTRITIONAL CONTROL AND INTERACTION WITH THE PROBIOTIC YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

The digestive ecosystem is influenced by abiotics and biotics factors that determined its balance and consequently influenced the host digestive health. In the young rabbit, caecal ecosystem disorders are largely responsible for nonspecific enteropathies that cause livestock losses. Understanding biotope/biocenosis interrelationships would allow the development of new strategies that preserve the ecosystem balance. Thus, the role of biotic factors that stabilise the digestive ecosystem, such as probiotics is extensively studied, however their effects on biocenosis and biotope remain unclear.

The aim of our work is to improve our understanding of the caecal ecosystem functioning, submitted or not to a nutritional stress and with or without addition of an exogenous flora. We also aimed to compare the effects of the same probiotic (*S. cerevisiae*) in the caecum and in the rumen (dairy cow), to improve our knowledge on the mechanisms of action of yeast probiotic on biocenosis and biotope.

We have developed and validated the measure of redox potential in the caecum. We also validated for the growing rabbit, a new indicator of the general inflammation (haptoglobin) in response to the application of nutritional stress or under a deficient sanitary status.

Compared to the rumen, the caecal biotope is very anaerobic, since its redox potential is meanly of -220mV, and do not vary with age (35-63d old). The biodiversity of the bacterial community in the caecum, calculated from fingerprint technique (SSCP), reached meanly 5.0 (Simpson index).

In the rabbit having a digestive trouble, the seric haptoglobin concentration increased by 70%, while caecal fermentative activity dropped by 50%. In parallel, the caecal pH increased (+0,7 unit) whereas the redox potential and the bacterial diversity remain unaffected in the caecum.

When the young rabbit is submitted to a nutritional stress (fibre deficiency), the caecal volatile fatty acids concentration dropped by 25%, while the pH increased by 0.1 unit. However, the fibre deficiency did not affect the caecal redox potential (meanly -210 mV). Similarly, the bacterial biodiversity in the caecum was not modified (5,3) according to dietary fibre intake, as well the bacterial community structure. Besides, the haptoglobin concentration remained similar with fibre intake.

The live yeast added in the diet tended to increase the bacterial diversity (+10%), and could slightly increase the caecal Eh (+25 mV). Yeast have no effect on the structure of rabbit caecal microbiota (bacteria only), where the similarity is 99%. It does not change the serum haptoglobin level. In return, yeast addition improved the digestive health by reducing mortality rate by 50%, particularly during periods of high mortality, when the serum haptoglobin increased by 70%.

The effect of yeast described in the rabbit caecum differed from that found for the cow rumen: yeast decreased the redox potential and increased the pH that favors the strict anaerobic bacterial activity. The live yeast thus would stabilise the biotope (pH, Eh) and would favor the growth and activity of specific bacteria. However, this hypothesis still remains to be confirmed for the rabbit caecal ecosystem, using pertinent methodology.

Keywords: Rabbit, caecal ecosystem, bacterial diversity, inflammation, redox potential, probiotic

RESUME

CARACTERISATION DE L'ECOSYSTEME CAECAL ET SANTE DIGESTIVE DU LAPIN: CONTROLE NUTRITIONNEL ET INTERACTION AVEC LA LEVURE PROBIOTIQUE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L'écosystème digestif est sous l'influence de facteurs abiotiques et biotiques qui déterminent son équilibre et par conséquent influencent la santé digestive de l'hôte. Chez le lapin en croissance, un déséquilibre de l'écosystème caecal est associé aux entéropathies, responsables de mortalités importantes en élevage. La compréhension des interactions biotope – biocénose digestive permettra la mise en œuvre de stratégies pour garantir l'équilibre de cet écosystème. Ainsi, le rôle des facteurs biotiques de stabilité l'écosystème digestif, tels que des microorganismes exogènes probiotiques, fait actuellement l'objet de nombreuses études, mais leur mode d'action sur la biocénose et le biotope reste encore peu clair.

L'objectif de notre travail est de contribuer à la compréhension du fonctionnement de l'écosystème caecal chez le jeune lapin, soumis ou non à un stress nutritionnel et en présence ou non d'une flore exogène ajoutée. Il s'agit aussi, de faire une approche comparative des effets d'un même probiotique (*S. cerevisiae*) dans cet écosystème et dans le rumen de la vache, pour mieux décrire les mécanismes d'action d'une levure probiotique sur les relations biocénose-biotope.

Dans ce but, nous avons mis au point et validé pour le caecum du lapin la mesure du potentiel redox (E_h), pour mieux juger de l'état d'anaérobiose du biotope caecal. Nous avons également validé un nouvel indicateur de l'inflammation générale (haptoglobine sérique) en réponse à l'application d'un stress nutritionnel ou d'un état sanitaire déficient.

Comparé au rumen, le biotope caecal est un milieu très anaérobie, puisque son potentiel redox moyen est de -220 mV et ne varie pas avec l'âge (de 28 à 64 jours). La biodiversité de la biocénose bactérienne caecale, calculée à partir de leur empreinte moléculaire (CE-SSCP) est en moyenne de 5,0 (indice de Simpson).

Chez l'animal touché par un dysfonctionnement digestif, nous observons une élévation du niveau général de l'inflammation (+70% du taux d'haptoglobine sérique), associée à une chute de l'activité fermentaire caecal (-50%) et une hausse du pH (+ 0,7), mais qui n'est pas associée à des variations d' E_h caecal ou de la diversité bactérienne.

L'application d'un stress nutritionnel (déficience en fibres) entraîne chez le lapin une baisse de la concentration caecale en AGV totaux (-25%) et une hausse du pH (+0,1). Cependant, la déficience en fibres n'a pas d'effet marqué sur le E_h caecal, dont la moyenne est de -210 mV. De même, la diversité bactérienne n'est pas modifiée (5,3) par la réduction de la teneur en fibres de l'aliment et la similarité observée est de 76%. La teneur de fibres dans l'aliment n'influence pas non plus le niveau d'inflammation générale.

L'apport de levures vivantes dans la ration du lapin tend à augmenter la diversité bactérienne (+10%), et peut élever le potentiel redox caecal de 25 mV caecal. Il n'affecte cependant pas la structure du microbiote bactérien caecal (similarité= 99%). Elle n'entraîne pas non plus de variation du taux d'haptoglobine. L'ingestion de levures vivantes a permis l'amélioration de la santé digestive par la réduction de la mortalité (jusqu'à -50%) pendant les périodes de forte mortalité où le taux d'haptoglobine sérique augmente d'environ 70%.

L'effet de la levure observé ici dans le caecum du lapin diffère de celui observé dans le rumen de la vache, pour lequel on observe une baisse du potentiel redox et une hausse du pH, ce qui favoriserait l'activité des bactéries anaérobies strict transformant le lactate en propionate. La levure stabiliserait donc le biotope (pH, potentiel redox) qui favoriserait la croissance ou l'activité de certaines bactéries. Cette hypothèse reste encore à confirmer pour l'écosystème caecal du lapin, à l'aide méthode appropriées.

Mots clés : Lapin, écosystème caecal, biodiversité bactérienne, inflammation, potentiel redox, probiotique