

Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. VINCENT JACQUIER

le jeudi 11 décembre 2014

Titre :

APPROCHES GENOMIQUES DES INTERACTIONS ENTRE
L'IMPLANTATION DU MICROBIOTE DIGESTIF CHEZ LE LAPEREAU ET
LA MATURATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage - GenPhySE

Directeur(s) de Thèse :

M. THIERRY GIDENNE

MME CLAIRE ROGEL GAILLARD

Rapporteurs :

M. JEAN-JACQUES GODON, INRA NARBONNE

M. MIGUEL PEREZ ENCISO, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONE

Membre(s) du jury :

Mme SANDRINE GRASTEAU, INRA TOURS, Président

Mme CLAIRE ROGEL GAILLARD, INRA JOUY EN JOSAS, Membre

Mme ISABELLE OSWALD, INRA TOULOUSE, Membre

M. THIERRY GIDENNE, INRA TOULOUSE, Membre

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse de doctorat a été réalisé conjointement au sein de l'équipe NED, UMR GenPhySE (Génétique, Physiologie et Système d'Élevage ; INRA Castanet-Tolosan), de l'équipe GIS, UMR GABI (Génétique Animale et Biologie Intégrative ; INRA Jouy-en-Josas) et de l'équipe E5 IMT, UMR ToxAlim (Toxicologie Alimentaire ; INRA Saint-Martin du Touch).

Je tiens tout d'abord à remercier les personnes qui ont accepté de participer à mon jury de thèse M. Perez-Enciso (Institutio Catalana de Recerca I Estudis Avançats, Universitat Autònoma de Barcelona) et J.J. Godon (Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement) qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse, et S. Grasteau (Unité de Recherches Avicoles, INRA) d'avoir accepté de participer à ce jury.

J'exprime ma profonde gratitude à mes directeurs de thèse Claire Rogel-Gaillard et Thierry Gidenne, ainsi qu'à ma co-encadrante Isabelle Oswald, pour leurs précieux conseils, leurs expertises et la confiance qu'ils ont su m'attribuer, qui m'ont permis de mener à bien - et dans de très bonnes conditions - l'ensemble des travaux présentés dans cette thèse. Je souhaite également remercier Xavier Fernandez, directeur de GenPhySE, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

J'adresse ensuite mes remerciements aux membres du comité de pilotage, qui m'ont donné de leur temps et prodigué de précieux conseils pour structurer ce travail de thèse : Jordi Estellé (UMR GABI, INRA), Sylvie Combes (UMR GenPhySE, INRA), Patricia Lepage (UMR MICALIS, INRA), Christophe Klopp (UR MIAT, INRA), et François Meurens (VIDO-InterVac, University of Saskatchewan).

Mes remerciements vont ensuite aux différentes personnes que j'ai pu côtoyer pendant ma thèse dans différents laboratoires, et qui ont fait que ces trois années ont filé à une vitesse considérable, alliant convivialité et rigueur scientifique :

- Aux personnels de l'UMR GenPhySE, équipe NED et SYSED (INRA Castanet-Tolosan), avec Muriel Segura pour sa gentillesse, son écoute et ses connaissances en analyse des AGV, NH₃ et NDSF ; Carole Bannelier pour les multiples analyses physico-chimiques et ses conseils prodigués au cours de ces 3 ans ; Béatrice Gabinaud pour son appui technique lors des séquençages MiSeq, son sourire et ses innombrables connaissances botaniques ; Laurent Cauquil et Géraldine Pascal, pour leur gros travail bioinformatique et leur disponibilité ; Laurence Lamothe et Michèle Theau-Clément, pour leur bonne humeur, leurs conseils enrichissants et leurs délicieux gâteaux ; Olivier Zemb, pour ses réflexions scientifiques, ses phrases du jour et ses noms de projets capillotractés;

Viviane Batailler et Valérie Lozano pour leur bienveillance et leur soutien administratif qui m'a simplifié bon nombre de démarches chronophages ; Nathalie Marty-Gasset, Asma Zened, Christine Julien et Véronique Tartié, pour les bons moments passés à leurs côtés.

- Aux personnels de l'UMR GABI, équipe GIS (INRA Jouy-en-Josas), avec Catherine Denis, dixit la Cat', pour son éternelle bonne humeur, ses conseils et son aide en extraction d'ADN / ARN ; Gaëtan Lemonnier, pour son aide précieuse en qPCR et les descentes de VTT ; Jérôme Lecardonnel et Marco Moroldo (CRB Gadie) pour leurs expertises approfondies en microarray. A toutes les personnes suivantes avec lesquelles j'ai passé de très bons moments : Bertrand, Emmanuelle, Fanny, Vivi, Françoise, Déborah, Sophie, Sylvain, Nico, Abdel, Jean-Luc, Titi, Fab, et Jean-jacques.

- Aux personnels de l'UMR ToxAlim, équipe E5 IMT (INRA Saint-Martin du Touch), avec Philippe Pinton, pour m'avoir appris les rudiments de la culture cellulaire ; Anne-Marie Cossalter et Joëlle Laffitte pour leur amabilité et leur aide lors des extractions d'ARN.

- Aux personnels de l'UE PECTOUL (INRA Castanet-Tolosan), avec Elodie Balmisse, Patrick Aymard, Michel Moulis, Jean-Marie Bonnemere, Aneth Debrusse, David Labatut et François Richard, sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Merci pour votre investissement

Je remercie également l'Ecole Internationale de Recherche d'Agreenium (EIR-A), qui m'a non seulement donné le privilège d'effectuer un stage de 3 mois au sein du *Broad Institute of MIT and Harvard*, mais également de m'avoir donné la possibilité de rencontrer des doctorants d'horizons différents avec qui j'espère garder contact professionnellement et humainement parlant.

Je souhaite adresser une dédicace toute particulière à mes deux acolytes de bureau Christelle Knudsen (Wesh CK !) et Tehya Read, sans qui cette thèse n'aurait pas eu la même saveur. J'ai, grâce à vous, passé de très bons moments durant ces trois années et je vous en remercie chaleureusement !

A tous les doctorant(e)s avec qui j'ai partagé un bout de chemin : Michou, Edin, Nada, Asma, Julie, Juliette, Céline, Julien, Clémentine, Clément, et tant d'autres.

A mon vieux potos Adrien Raballand : j'ai croisé ta route un matin de septembre 2005 et tu as su me donner l'envie de me plonger dans les productions animales (et pas que ça...). Merci pour tous ces bons moments passés à tes côtés et c'est en quelque sorte grâce à toi vieux bouc si j'en suis arrivé là aujourd'hui.

Je dédie cette thèse à l'ensemble de ma famille, particulièrement à mon frère Romain, pour leur amour et leur soutien, ainsi qu'à toi Emilie, qui a su être présente auprès de moi malgré la distance, qui m'a supporté, motivé et donné de la joie au cours de ces années. Merci à vous !

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE

Publications dans des revues à comité de lecture de rang A

Article 1 - Early modulation of the cecal microbial activity in the young rabbit with rapidly fermentable fiber: impact on health and growth (Journal of Animal Science, publié).

Article 2 - Genome-wide immunity studies in the rabbit: transcriptome variations in PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA/ionomycin (BMC Genomics, accepté).

Article 3 - Does the digestive microbiota interact with the immune status? A combined transcriptomic and metagenomic approach in the young rabbit (en préparation).

Communications lors de congrès et journées d'animation

Jacquier V., Combes S., Moroldo M., Oswald I.P., Rogel-Gaillard C., Gidenne T. (2014). **Impact of antibiotherapy on growing rabbits assessed by a whole-blood transcriptomic approach.** In Proc: 65th EAAP conference, 25-28 Aug., Copenhagen, Denmark, p123 (*Présentation orale*).

Jacquier V., Combes S., Oswald I.P., Rogel-Gaillard C., Gidenne T. (2014). **Incorporation of rapidly fermentable fiber in the diet: impact on growth, health and cecal microbiota activity of rabbits.** Management Committee and Working Group Meeting of COST action RGB-net, 7-8 May, Zagreb, Croatia (*Présentation orale*).

Jacquier V., Combes S., Oswald I.P., Rogel-Gaillard C., Gidenne T. (2013). **Incorporation de fibres rapidement fermentescibles dans un aliment périsévrage : impact sur la digestion, la croissance et l'état sanitaire du lapin.** In Proc: 15ème Journées de la Recherche Cunicole, Bolet G. (Ed.), ITAVI, publ., 19-20 Novembre, Le Mans., France, p55-58 (*Présentation orale*).

Jacquier V., Estellé J., Panneau B., Lecardonnel J., Moroldo M., Lemonnier G., Gidenne T., Oswald I., Duranthon V., Rogel-Gaillard C. (2013). **Validation of a new rabbit microarray: transcriptome variation in PBMCs after in vitro stimulation.** In Proc: 64th EAAP conference, 26-30 Aug., Nantes, France, p547 (*Poster*).

Jacquier V., Estellé J., Panneau B., Lecardonnel J., Moroldo M., Lemonnier G., Gidenne T., Oswald I., Duranthon V., Rogel-Gaillard C. (2013). **Validation of a rabbit expression array suitable for genome-wide immunity studies.** Management Committee and Working Group Meeting of COST action RGB-net, 9-10 April, Uppsala, Sweden (*Présentation orale*).

Jacquier V., Oswald I., Gidenne T., Rogel-Gaillard C. (2013). **Genomic approaches of the interactions between the microbiota establishment and the maturation of the immune system in the young rabbit.** 16ème Séminaire des thésards du département de génétique animale de l'INRA, 2-3 Avril, Amboise, France (*Présentation orale*).

Jacquier V., Oswald I., Gidenne T., Rogel-Gaillard C. (2012). **Genomic approaches of the interactions between the microbiota establishment and the maturation of the immune system in the young rabbit.** 15ème Séminaire des thésards du département de génétique animale de l'INRA, 26-27 Mars, Ile d'Oléron, France (*Poster*).

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS..... | 3 |
| PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE..... | 5 |
| SOMMAIRE | 7 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 11 |
| LISTE DES FIGURES..... | 13 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 15 |
| INTRODUCTION GENERALE | 17 |
| ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... | 21 |
| CHAPITRE I : INGENIERIE DES ECOSYSTEMES DIGESTIFS – APPLICATION AU MICROBIOTE CAECAL DU LAPIN. | 23 |
| I. Le microbiote : mise en place et structuration | 23 |
| 1. Stérilité in-utero et naissance | 23 |
| 2. Colonisation microbienne du tractus digestif..... | 23 |
| 3. Structuration jusqu’à deux semaines d’âges | 25 |
| II. Pilotage des écosystèmes microbiens..... | 26 |
| 1. Les périodes d’action | 26 |
| 2. Facteurs de variations de l’équilibre de la biocénose caecale..... | 28 |
| CHAPITRE II – L’IMMUNITE DIGESTIVE ET SON ACQUISITION PAR LE JEUNE LAPIN : INTERACTIONS AVEC LE MICROBIOTE | 35 |
| I. L’immunité digestive : plusieurs acteurs de défense à différents niveaux..... | 35 |
| 1. La barrière physico-chimique : première ligne de défense | 35 |
| 2. Les récepteurs de type Toll (TLR)..... | 36 |
| 3. Les tissus lymphoïdes associés à l’intestin : GALT | 37 |
| 4. Les immunoglobulines | 39 |
| 5. Compétition entre bactéries commensales et pathogènes..... | 40 |
| 6. Le rôle des bactéries filamenteuses segmentées | 41 |
| II. Mise en place de l’immunité chez le jeune animal..... | 41 |
| 1. L’immunité passive : un héritage maternel | 41 |
| 2. Acquisition de l’immunité active | 42 |
| III. Les cytokines impliquées dans les processus inflammatoires | 43 |
| CHAPITRE III – AVANCEES SUR LE GENOME DU LAPIN ET DE SON MICROBIOTE DIGESTIF..... | 46 |
| I. Connaissances sur le génome du lapin et outils d’analyse disponibles..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Génomique | 46 |
| 2. Transcriptomique..... | 49 |
| 3. Protéomique et Métabolomique..... | 52 |
| II. Le microbiote | 54 |
| 1. Caractérisation par empreinte moléculaire..... | 54 |
| 2. Essor de la métagénomique | 54 |
| OBJECTIFS ET ETUDE EXPERIMENTALE..... | 59 |
| ARTICLE I - MODULATION PRECOCE DE L'ACTIVITE MICROBIENNE CAECALE DU JEUNE LAPIN PAR L'INCORPORATION DE FIBRES RAPIDEMENT FERMENTESCIBLES | 65 |
| I. Abstract..... | 68 |
| II. Introduction | 69 |
| III. Materials and Methods..... | 70 |
| 1. Diets | 70 |
| 2. Animal and Housing..... | 70 |
| 3. Collection of Samples and Data | 72 |
| 4. Analytical Methods | 72 |
| 5. Statistical Analysis..... | 73 |
| IV. Results..... | 74 |
| 1. Nutrient Digestion..... | 74 |
| 2. Growth and Feed Intake Parameters..... | 74 |
| 3. Health Status..... | 75 |
| 4. Cecal Ecosystem and Microbial Activity | 76 |
| V. Discussion..... | 80 |
| 1. Early Modulation of the Cecal Activity | 80 |
| 2. Effects of Diets on Growth and Intake..... | 81 |
| 3. Fiber vs. Antibiotics: What Impact on the Health Status? | 81 |
| VI. Conclusion..... | 82 |
| VII. References..... | 83 |
| ARTICLE II - ETUDE DE L'IMMUNITE A PARTIR DE L'ENSEMBLE DU GENOME DU LAPIN : VARIATIONS DU TRANSCRIPTOME DES PBMC STIMULEES IN VITRO AVEC LPS PMA/IONOMYCINE | 89 |
| I. Abstract..... | 92 |
| II. Introduction | 93 |
| III. Materials and Methods..... | 94 |
| 1. Enrichment and annotation steps | 94 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 2. | PBMCs: isolation and stimulation | 94 |
| 3. | RNA extraction | 95 |
| 4. | RNA labeling and microarray processing | 95 |
| 5. | Statistical analysis | 96 |
| 6. | Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR | 96 |
| IV. | Results | 97 |
| 1. | A well-annotated gene expression platform enriched in immunity-related genes for the rabbit species | 97 |
| 2. | Clustering of samples and comparative effect of LPS and PMA-Ionomycin stimulations | 97 |
| 3. | Genes and biological functions affected by LPS stimulation | 100 |
| 4. | Genes and biological functions affected by PMA-ionomycin stimulation | 104 |
| 5. | Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR | 111 |
| V. | Discussion | 111 |
| 1. | Cytokine profile induced by LPS stimulation in rabbit PBMCs..... | 111 |
| 2. | Sets of genes commonly affected by LPS stimulation in various mammalian species . | 113 |
| 3. | PMA-Ionomycin stimulation affects many more genes than LPS stimulation..... | 115 |
| 4. | PMA-ionomycin stimulation induced early Th2, iTreg (induced Tregs) and Th17 responses at T4 followed by an increase in the Th1 response at T24 | 115 |
| 5. | A strong up-regulation of CSF2 and a down-regulation of IL16 induced by PMA-ionomycin stimulation in favor of cell proliferation | 116 |
| VI. | Conclusion | 117 |
| VII. | Acknowledgements | 117 |
| VIII. | References..... | 118 |
| | ANALYSE TRANSVERSALE DE LA RELATION ENTRE MICROBIOTE ET IMMUNITE CHEZ LE JEUNE LAPIN : APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUES ET METAGENOMIQUES | 125 |
| I. | Matériels et méthodes..... | 125 |
| 1. | Aliment des animaux et conditions d'élevage | 125 |
| 2. | Collecte des échantillons | 126 |
| 3. | Extraction d'ARN et étapes de traitement des microarrays | 126 |
| 4. | Analyses statistiques des microarrays | 126 |
| 5. | Extraction d'ADN du contenu caecal | 127 |
| 6. | Amplification d'ADN..... | 127 |
| II. | Résultats des études transcriptomiques..... | 128 |
| 1. | Expression des gènes dans le sang..... | 128 |

| | | |
|------|--|------------|
| 2. | Expression des gènes dans le tissu iléal..... | 131 |
| 3. | Les principales fonctions biologiques exprimées dans le sang et le tissu iléal pour chaque groupe entre 29 et 45 jours | 132 |
| III. | Résultats de l'étude méta-monogénique | 134 |
| 1. | Mise au point de la chaîne de traitement des données de séquençage MiSeq | 134 |
| 2. | Représentation nMDS des échantillons sur la totalité des OTUs | 137 |
| 3. | Effet de l'aliment des mères sur la composition du microbiote caecal des lapereaux (J15)..... | 137 |
| 4. | Evolution de l'écosystème caecal en fonction de l'âge et de l'aliment..... | 138 |
| 5. | Corrélations entre les OTUs majoritaires et des paramètres fermentaires et morphologiques..... | 140 |
| 6. | Corrélations entre expressions des gènes et OTUs majoritaires..... | 144 |
| | DISCUSSION GENERALE | 147 |
| | CHAPITRE I - ANALYSE CRITIQUE DE LA METHODOLOGIE | 150 |
| I. | Puce à ADN pour l'analyse de la réponse immunitaire | 150 |
| 1. | Amélioration de l'outil existant | 150 |
| 2. | Biais inhérents à cette technique rencontrés dans la thèse..... | 150 |
| II. | Le séquençage Miseq pour l'analyse phylogénétique du microbiote | 151 |
| 1. | Biais inhérents à cette technique rencontrés dans la thèse..... | 151 |
| | CHAPITRE II - IMPACT DES FIBRES RAPIDEMENT FERMENTESCIBLES DISTRIBUEES PRECOCEMENT CHEZ LE LAPEREAU : APPROCHE MULTIDISCIPLINAIRE | 154 |
| I. | Quels sont les impacts des fibres rapidement fermentescibles sur les performances zootechniques des lapereaux ? | 154 |
| II. | Quels sont les impacts des fibres rapidement fermentescibles sur les paramètres fermentaires et la composition du microbiote des lapereaux ? | 155 |
| III. | Quels sont les impacts des fibres rapidement fermentescibles sur l'expression des gènes des lapereaux ?..... | 157 |
| | CHAPITRE III : L'AVENIR DE LA GENOMIQUE CHEZ LE LAPIN | 160 |
| I. | Nouvelles connaissances sur l'activation in vitro de PBMC..... | 160 |
| II. | La transcriptomique et la métagénomique au service du phénotypage moléculaire | 160 |
| | CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 163 |
| | REFERENCES | 169 |
| | ABSTRACT | 187 |
| | RESUME | 188 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Sélection de cytokines et de leurs activités primaires | 44 |
| Tableau 2 : Cytokines pro- et anti-inflammatoires | 44 |
| Tableau 3 : Comparaison des méthodes d’empreintes moléculaire pour la caractérisation des écosystèmes microbiens. | 55 |
| Tableau 4 : Comparatifs des trois principaux séquenceurs utilisés en métagénomique | 57 |
| Tableau 5 : Composition of the experimental diets..... | 71 |
| Tableau 6 : Fecal digestibility according to addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet | 74 |
| Tableau 7 : Performance traits of rabbits including ADFI, BW, ADG and G:F after weaning, according to addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet. | 75 |
| Tableau 8 : Health status of rabbits (%) ¹ , according to addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet..... | 76 |
| Tableau 9 : Cecal traits, according to age and addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet. | 78 |
| Tableau 10 : Number of genes found up or down-regulated (FDR<0.05) after stimulation, and percentage of probe annotation. | 97 |
| Tableau 11 : Top-ten DE genes after LPS or PMA-Ionomycin stimulation, T4 and T24. | 99 |
| Tableau 12 : List of the 10 genes found DE at T4 and T24 upon LPS stimulation. | 103 |
| Tableau 13 : Transcription profile of cytokines in PMBCs stimulated by LPS at T4 and T24 | 104 |
| Tableau 14 : Transcription profiles of cytokines and transcription factors in PMBCs stimulated by PMA-Ionomycin at T4 and T24. | 109 |
| Tableau 15 : Top-dix des gènes DE pour FRF, c et C+AB entre 29 et 45 jours | 129 |
| Tableau 16 : Principales fonctions biologiques des gènes DE. ¹ Nombre de gènes DE affectés à la fonction biologique. ² % du nombre total de gènes DE. | 133 |
| Tableau 17 : Bilan du nombre de séquences conservées ou éliminées après application de la chaîne de traitement MiSeq..... | 136 |
| Tableau 18 : Abondance relative (%) des principaux phyla dans le caecum des lapereaux à J15. | 138 |
| Tableau 19 : Influence de l’âge sur l’abondance relative des principaux phyla bactériens dans le caecum des lapins à J29 et J45. | 138 |
| Tableau 20 : Influence de l’âge sur l’abondance relative des principales familles bactériennes dans le caecum des lapins à J29 et J45..... | 139 |
| Tableau 21 : Influence de l’âge sur l’abondance relative des principales familles bactériennes dans le caecum des lapins à J29 et J45..... | 140 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Tractus digestif du lapin | 24 |
| Figure 2 : Activité fibrolytique des bactéries caecales, en fonction de l'âge du lapereau..... | 25 |
| Figure 3 : Représentation par positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) des profils CE-SSCP de communautés bactériennes caecales pour des lapins âgés de 7 à 70 jours d'âge. | 26 |
| Figure 4 : Principaux polysaccharides de la cellule végétale et leurs méthodes de quantification utilisées en alimentation animale | 31 |
| Figure 5 : Rôle des TLR dans l'homéostasie intestinale | 36 |
| Figure 6 : Représentation schématique des différentes structures lymphoïdes organisées associées à l'appareil digestif | 37 |
| Figure 7 : Composantes anatomiques du tractus digestif et réponse immunitaire associée | 38 |
| Figure 8 : Structure d'une IgA sécrétoire | 39 |
| Figure 9 : Mécanismes et acteurs impliqués dans un état de tolérance | 42 |
| Figure 10 : Réseau cytokinique entre les principales cellules effectrices de l'immunité..... | 45 |
| Figure 11 : Les différents niveaux de la génomique..... | 46 |
| Figure 12 : Résumé du projet Ensembl sur l'annotation du génome lapin..... | 47 |
| Figure 13 : Etapes pour convertir les données de séquençage de nouvelle génération en SNP ou génotype..... | 48 |
| Figure 14 : Représentation schématique d'une expérimentation microarray bi-couleur | 50 |
| Figure 15 : Représentation schématique du principe de séquençage d'ARN..... | 51 |
| Figure 16 : Représentation schématique d'une expérimentation protéomique..... | 53 |
| Figure 17 : Représentation schématique d'une expérimentation métabolomique | 53 |
| Figure 18 : Schéma simplifié de l'étude expérimentale..... | 62 |
| Figure 19 : Weights of cecal contents (in g) according to age and addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet..... | 77 |
| Figure 20 : Evolution of the VFA concentrations in the cecum, in mMol·L ⁻¹ | 78 |
| Figure 21 : VFA fermentation pattern (C2, C3 and C4) in %..... | 79 |
| Figure 22 : Principal Component Analysis of microarray data, classified by biological replicates. | 98 |
| Figure 23 : Top biological functions classified by the IPA system, with corresponding number of molecules after LPS and PMA-ionomycin activation..... | 101 |
| Figure 24 : Venn diagram of probes differentially expressed after LPS or PMA-Ionomycin stimulation at 4 and 24 hours. | 102 |
| Figure 25 : LPS-related gene networks identified by the IPA system: network at T4 (A) and network at T24 (B)..... | 105 |

| | |
|---|-----|
| Figure 26 : PMA-Ionomycin-related gene networks identified by the IPA system at T24 (A and B). | 110 |
| Figure 27 : Comparison between microarray-based (Log ₂ (CT)) and qRT-PCR based results (Log ₂ (FC)) by Spearman correlation scattered plots. | 111 |
| Figure 28 : Diagramme de Venn des gènes DE pour FRF et C, entre 29 et 45 jours..... | 130 |
| Figure 29 : Diagramme de Venn des gènes DE pour chaque groupe, entre 29 et 45 jours. | 132 |
| Figure 30 : Identifiant d'une séquence après déréduplication..... | 135 |
| Figure 31 : Représentation nMDS des distances entre les profils taxonomiques des communautés bactériennes caecale des lapereaux à J15 (impact de la mère), J29 et J45..... | 137 |
| Figure 32 : Abondance relative des Protéobactéries en fonction de l'âge et du groupe. | 139 |
| Figure 33 : Abondance relative des Ruminococcaceae en fonction de l'âge et du groupe. | 140 |
| Figure 34 : Matrice de corrélation (Pearson) entre les 638 OTUs majoritaires..... | 141 |
| Figure 35 : Matrice de corrélation (Pearson) entre les 13 paramètres | 141 |
| Figure 36 : Corrélation canonique régularisée | 141 |
| Figure 37 : Matrice de similarité entre OTUs et paramètres fermentaires et morphologiques après une analyse des corrélations canoniques régularisée (rCCA). | 142 |
| Figure 38 : Matrice de corrélations entre les OTUS majoritaires et les paramètres fermentaires | 143 |
| Figure 39 : Matrice de corrélation (Pearson) faisant intervenir les 185 gènes les plus sous- ou sur- exprimés et les 99 OTUs les plus abondants. | 144 |
| Figure 40 : Matrice de similarité entre les 185 gènes les plus sous- ou sur-exprimés et les 99 OTUs les plus abondants, après une analyse des corrélations canoniques régularisée (rCCA). . | 145 |
| Figure 41 : Structuration des principaux résultats | 154 |
| Figure 42 : Schéma récapitulatif des principaux résultats avec l'incorporation de fibres rapidement fermentescibles..... | 159 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|-----------|---|
| AB : | Antibiotiques |
| ADF : | Acid Detergent Fiber |
| ADFI : | Average Daily Feed Intake |
| ADG : | Average Daily Gain |
| ADL : | Acid Detergent Lignin |
| AFLP : | Amplified Fragment-Lengh Polymorphism |
| ADN/DNA : | Acide Désoxyribonucléique |
| AGV : | Acide Gras Volatil |
| ARISA : | Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis |
| ARN/RNA : | Acide Ribonucléique |
| BW : | Body Weight |
| C2 : | Acide acétique / acétate |
| C3 : | Acide propionique / propionate |
| C4 : | Acide butyrique / butyrate |
| C5 : | Acide valérique / valérate |
| CE-SSCP : | Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism |
| CMH : | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CP : | Crude Protein |
| DE : | Différentiellement exprimé |
| DGGE : | Denaturing Gradient Gel Electrophoresis |
| DM : | Dry Matter |
| EEL/ERE : | Entérocolite Epizootique du Lapin |
| FAE : | Follicle-Associated Epithelium |
| FRF/RFF : | Fibres Rapidement Fermentescibles |
| G:F : | Gain-to-Feed ratio |
| GALT : | Gut Associated Lymphoïd Tissue |
| GE : | Gross Energy |
| GMQ : | Gain Moyen Quotidien |
| HRI : | Health Risk Index |
| IC : | Indice de Consommation |
| IDF : | Insoluble Dietary Fiber |
| Ig : | Immunoglobuline |

IL : Interleukine
LPS : Index de Risque Sanitaire
IRS : Lipopolysaccharide
nMDS : Nonmetric Multidimensional scaling
NDF : Neutral Detergent Fiber
NDSF : Neutral Detergent Soluble Fiber
OM : Organic Matter
OTU : Operational Taxonomic Unit
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR : Polymerase Chain Reaction
PMA : Phorbol Myristate Acetate
rCCA : Regularized Canonical Correlation Analysis
RNAseq : RNA sequencing
SDF : Soluble Dietary Fiber
SEM : Somme des Ecart à la Moyenne
TGGE : Temporal Gradient Gel Electrophoresis
TDF : Total Dietary Fiber
T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
WICW : Water-Insoluble Cell Wall

INTRODUCTION GENERALE

Le jeune mammifère d'élevage (veau, porc, lapin, ..) est souvent sensible aux troubles de la digestion autour du sevrage, en relation avec une immunité digestive immature et probablement associée à une implantation incomplète de son microbiote digestif. Les prescriptions vétérinaires à base d'antibiotique sont alors fréquentes pour réduire la fréquence des pathologies digestives post-sevrage. Ainsi, l'enquête ANSES (2013) sur la consommation d'antibiotiques en élevage a révélé que, rapporté au poids de viande produite, les élevages cynicoles étaient les premiers consommateurs d'antibiotiques en France en 2012, devant les élevages de volailles et de porcs. Il s'avère donc indispensable, en particulier en cyniculture, de trouver des alternatives à l'usage des antibiotiques tout en renforçant la résistance du jeune mammifère aux pathologies digestives.

Pour cela, une des possibilités serait de favoriser le développement du système immunitaire du jeune animal. De récentes études ont mis en évidence les interactions positives que pouvait avoir le microbiote digestif sur le système immunitaire du lapin (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007 ; Sekirov et al., 2010). Un des moyens d'action, qui serait applicable en élevage, serait de stimuler précocement (avant sevrage) l'activité du microbiote caecal, par exemple via l'incorporation de fibres rapidement fermentescibles (FRF) dans l'alimentation du lapereau et dès le début de l'ingestion d'aliment solide.

De plus, le lapin est couramment utilisé dans le domaine de la recherche médicale, et particulièrement pour les études immunologiques. Bien qu'une séquence de référence du génome du lapin soit disponible (couverture >7X, OryCun 2.0 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=oryctolagus%20cuniculus>) et que des outils de génomique existent chez le lapin, les études d'expression du génome du lapin ciblant la réponse immunitaire restent limitées dans cette espèce. Pour des analyses d'expression, le séquençage complet du transcriptome devient courant, suite au développement de méthodes de séquençage nouvelle génération à très haut débit. En parallèle, les puces d'expression (microarray) restent des outils facilement utilisables et relativement bon marché pour analyser l'expression des gènes (Mantione et al., 2014).

Mon projet de thèse a donc des objectifs complémentaires :

- Stimuler l'activité microbienne caecale du lapereau par le biais de l'alimentation et d'en mesurer les conséquences sur son statut immunitaire, ainsi que sur sa croissance et sa santé. Pour ce faire, nous avons mis en place une expérimentation dans laquelle ont été comparés : *i*) un aliment enrichi en fibres rapidement fermentescibles (FRF) permettant une stimulation de la

biocénose caecale, *ii*) un aliment standard classiquement utilisé en élevage cunicole, considéré comme témoin (C), et *iii*) ce même aliment témoin dans lequel des antibiotiques (Tiamuline et Apramycine) ont été ajoutés, agissant alors comme des inhibiteurs de la biocénose microbienne caecale.

- Mettre au point des approches génomiques pour caractériser le statut immunitaire et le microbiote digestif du lapin. Le statut immunitaire a été étudié par une approche transcriptomique. Pour cela, un travail préliminaire a été réalisé en enrichissant une puce d'expression existante avec des gènes de la réponse immunitaire. Dans un premier temps, cette nouvelle puce a été exploitée pour caractériser les réponses immunitaires de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) stimulées *in vitro* par divers agents de stimulation. Dans un second temps, elle a permis d'étudier le transcriptome sanguin et intestinal des animaux de l'expérimentation de cette thèse. L'annotation globale du microarray a pu être améliorée grâce à des données de séquençage d'ARN, en partenariat avec le Broad Institute (Boston, USA) où j'ai réalisé un stage de trois mois dans le cadre de l'Ecole Internationale de Recherche d'Agreenium (EIRA, <http://www.agreenium.org/Recherche-et-formation/EIR-A-un-parcours-doctoral-d-excellence>).

- La caractérisation du microbiote caecal a été réalisée par affiliation phylogénétique après un séquençage haut débit de l'ARNr 16S. Cette approche, définie comme une approche métamonogénomique permet ainsi de compléter les approches phénotypiques et transcriptomiques énoncées précédemment.

Le manuscrit sera tout d'abord consacré à une étude bibliographique, avec une mise à jour des connaissances en matière d'ingénierie des écosystèmes digestifs. L'immunité digestive et ses interactions avec le microbiote seront ensuite abordées, suivies des avancées technologiques en matière d'étude du génome du lapin et de son microbiote. Après avoir défini les enjeux de la thèse, les résultats seront présentés dans la deuxième partie sous la forme d'articles scientifiques. Enfin, une discussion générale sera proposée afin de synthétiser les résultats obtenus et d'envisager des perspectives à ce travail de thèse.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : INGENIERIE DES ECOSYSTEMES DIGESTIFS – APPLICATION AU MICROBIOTE CAECAL DU LAPIN.

Le microbiote est un ensemble de micro-organismes (bactéries, archées, champignons et protozoaires) qui peuple un milieu de vie bien défini (caecum, intestin, colon, ...). Que ce soit chez l'homme ou chez le lapin, le microbiote digestif joue un rôle clé dans la physiologie de son hôte, aussi bien au niveau de la santé que de l'efficacité digestive (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007 ; Lin et al., 2014).

I. Le microbiote : mise en place et structuration

1. Stérilité in-utero et naissance

Le tractus digestif des mammifères est considéré comme étant stérile in-utero. Une colonisation se met en place dès la naissance puisque des bactéries telles que *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli* ont été isolées dans le méconium de nouveau-nés (Lembet et al., 2003). La prédominance des bactéries aérobies à la naissance est modifiée pendant le développement péri et post-natal. La colonisation initiale coïncide avec l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, qui a un impact sur le système nerveux entérique, innervant le tractus gastro-intestinal (Foster et McVey Neufeld, 2013). Puis le microbiote se diversifie pendant les premières semaines de vie pour former un complexe microbien majoritairement anaérobique.

2. Colonisation microbienne du tractus digestif

Le processus développemental du microbiote intestinal des lapereaux est similaire à celui des humains et la plupart des animaux (Mackie et al., 1999). Les bactéries maternelles et environnementales colonisent en premier le tractus digestif du nouveau-né, favorisées par différents processus tels que les soins de la mère lors de la délivrance (léchages) ou l'allaitement. Il a également été suggéré que les premières bactéries implantées dans le tractus digestif créent un environnement favorable pour l'établissement de phylum tels que *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* (Conway, 1995 ; Stewart, 1997).

Chez l'homme, la période de colonisation est caractérisée par une prédominance des genres *Bifidobacterium* et *Bacteroides* (Gournier-Château et al., 1994). Pour l'espèce porcine, les bactéries *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Lactobacillus sobrius*, *Lactobacillus reuteri* et *Lactobacillus acidophilus* sont retrouvées dans le tractus digestif du porcelet dès l'âge de 2 jours (Konstantinov et al., 2006). Chez le lapin, les phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* sont retrouvés

abondamment dans le caecum dès 2 jours d'âge (Combes et al., 2011). Ces résultats, obtenus par CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism), sont en accord avec ceux de Gouet et Fonty (1979), qui ont montré une prédominance des bactéries anaérobies strictes grâce à des méthodes de culture bactérienne.

Les analyses de la biocénose caecale conduites avec des méthodes de culture sont bien représentées dans la littérature et portent sur des animaux de tous âges, y compris sur des nouveau-nés. Ces méthodes ont cependant une faille conséquente puisque, outre le fait d'être fastidieuses, elles n'intègrent pas la grande majorité des bactéries digestives puisque l'on estime que 80 à 90% de ces bactéries ne sont pas cultivables (Suau et al., 1999).

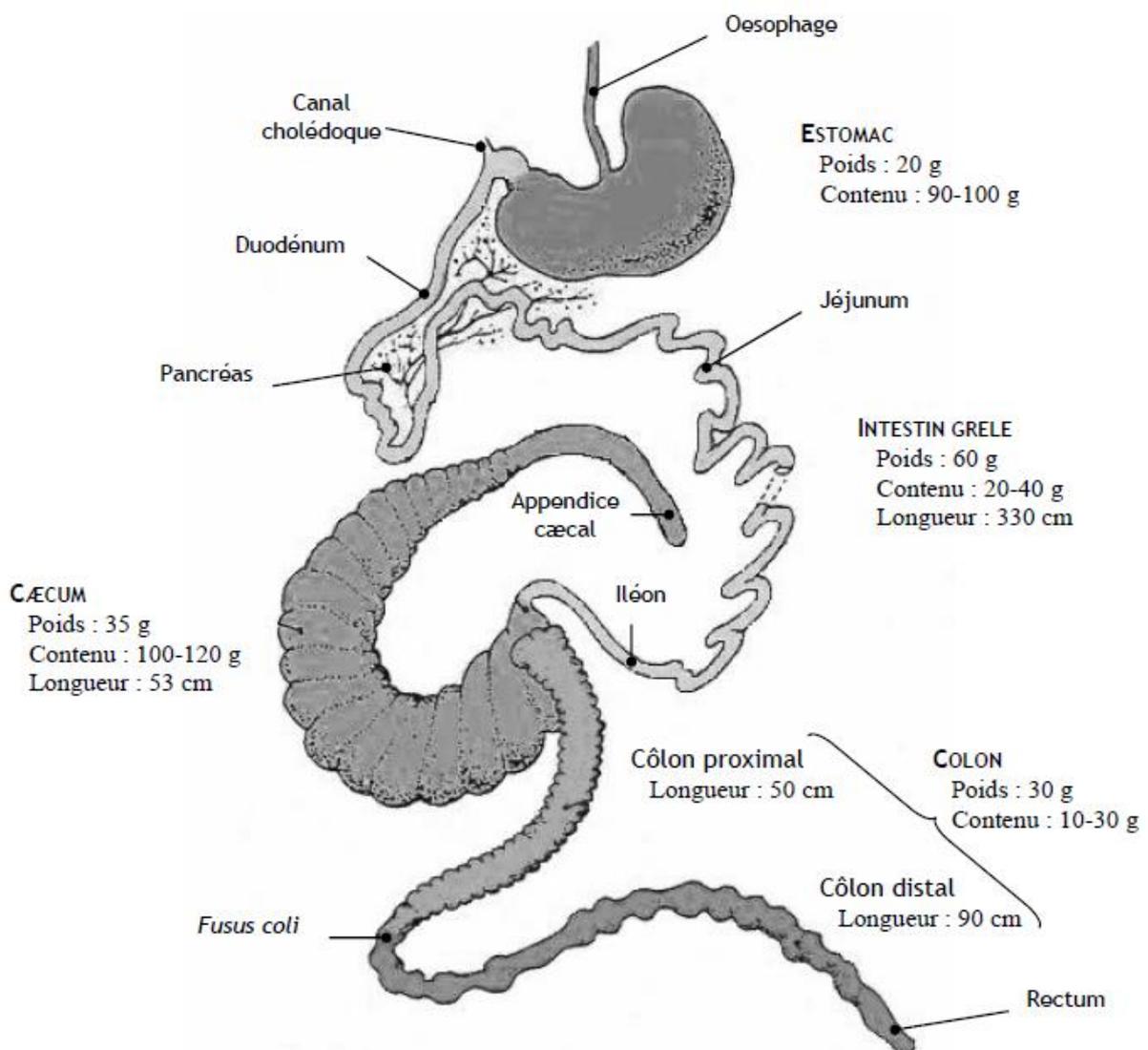


Figure 1 : Tractus digestif du lapin (d'après Lebas et al., 1996)

3. Structuration jusqu'à deux semaines d'âges

Contrairement à l'homme et au porc, l'estomac et l'intestin grêle du lapereau (figure 1) sont pratiquement stériles jusqu'à la fin de la première semaine de vie. A cette même période, la population bactérienne du caecum présente une forte variabilité inter-individus et oscille entre 10^7 et 10^9 bact./g de contenu caecal frais. Le nombre de bactéries augmente ensuite au cours de la deuxième semaine de vie pour atteindre une quantité comprise entre 10^9 et 10^{10} bact./g mais avec une faible variation inter-individus. Pendant toute cette période, les bactéries anaérobies facultatives et anaérobies strictes peuvent être présentes en équi-proportions (entre 10^7 et 10^{10} bact./g). Une étude récente utilisant une approche moléculaire (Combes et al., 2014) a montré que *Bacteroidetes* était le phylum majoritairement présent dans le caecum de lapins âgés de 14 jours (abondance relative de 63,3%), suivi de *Firmicutes* (29,0%), *Proteobacteria* (6,9%) et dans une moindre mesure *Actinobacteria* (0,7%).

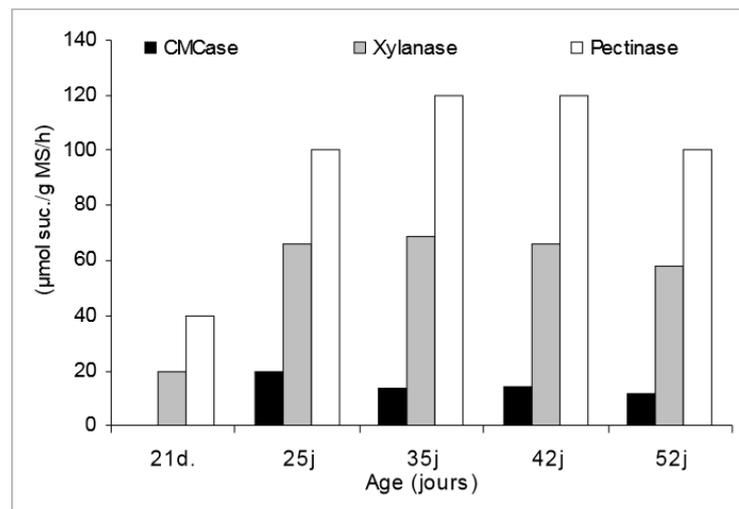


Figure 2 : *Activité fibrolytique des bactéries caecales, en fonction de l'âge du lapereau.*
CMCase : *carboxymethyl cellulase* (d'après Gidenne et al., 2007)

A la fin de la deuxième semaine de vie, le caecum se développe linéairement pour devenir l'organe le plus important du tractus digestif vers 5-6 semaines d'âge (40% de la masse digestive ; Gidenne et al., 2007). Parallèlement, la concentration en bactéries anaérobies facultatives diminue fortement (10^2 à 10^4 bact./g) et tend à disparaître au sevrage (35 jours d'âge) au profit des bactéries fibrolytiques qui sont déjà développées à près de 80% dès 4 semaines d'âge. Cette inversion est observée suite à l'ingestion d'aliment solide par le lapereau qui débute vers 15-20 jours d'âge. Les activités pectinolytiques et xylanolytiques sont présentes dès 21 jours et triplent entre 21 et 35 jours d'âge (figure 2). Au sevrage (entre 4 et 5 sem. d'âge), le microbiote caecal est alors essentiellement composé de *Firmicutes* (65,3%), suivi de *Bacteroidetes* (32,9%), *Proteobacteria* (1,3%) et *Actinobacteria* (0,4%).

Enfin, Combes et al. (2011) ont démontré par approche moléculaire que les communautés bactériennes caecales sont très hétérogènes en début de vie du lapin, et tendent vers un état d'équilibre à 70 jours d'âge (figure 3).

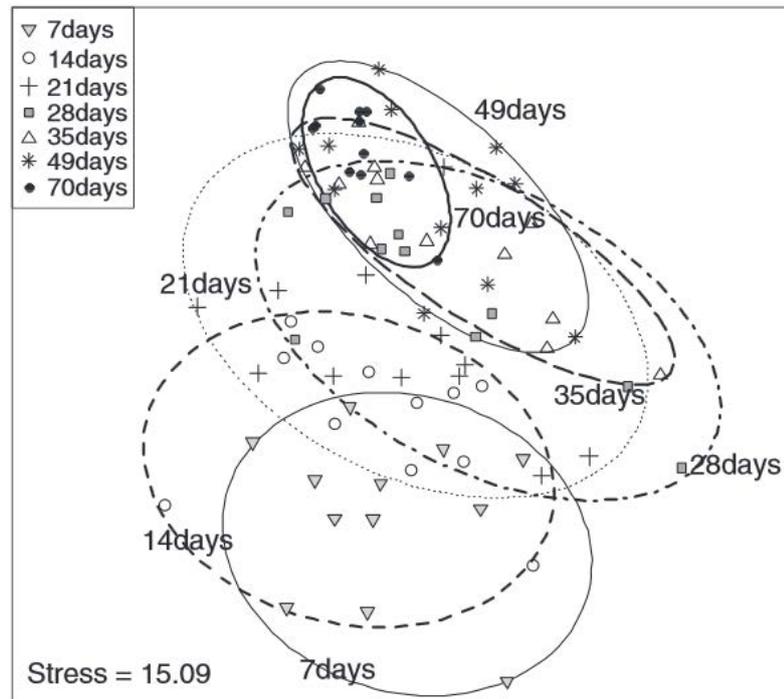


Figure 3 : Représentation par positionnement multidimensionnel non-métrique (nMDS) des profils CE-SSCP de communautés bactériennes caecales pour des lapins âgés de 7 à 70 jours d'âge (d'après Combes et al., 2011).

II. Pilotage des écosystèmes microbiens

1. Les périodes d'action

a. Lors de l'implantation du microbiote après la naissance

Ce serait à priori la période la plus favorable pour piloter le microbiote car il est encore très hétérogène et n'a pas encore atteint un état de stabilité. L'ingestion de quelques fèces de la mère par le lapereau pendant la première période de vie semble accélérer l'implantation du microbiote dans le caecum. Ainsi, Combes et al. (2014) ont montré que des lapereaux n'ayant pas ingéré de fèces présentaient un retard d'implantation du microbiote. De plus, les lapereaux qui n'ont pas accès aux fèces de la mère ont une abondance réduite de *Ruminococcaceae* mais une abondance plus forte de *Bacteroidaceae* que ceux ayant accès aux fèces maternelles. Par ailleurs, une inoculation précoce avec un cocktail bactérien "favorable" permettrait de moduler l'implantation de l'écosystème microbien. Cette approche, encore expérimentale, est à l'étude sur différentes espèces animales dont le lapin (Huybens et al., 2009 ; Yin et al., 2010).

La modification de la composition de l'aliment permet également de faire varier l'activité microbienne caecale. La qualité des fibres, et particulièrement leur fermentescibilité, module l'activité microbienne caecale. Ainsi une augmentation de la teneur en pectines d'un aliment par incorporation de pulpe de betterave augmente la concentration d'acides gras volatiles (AGV) dans le caecum, ainsi qu'une diminution des proportions de butyrate (Gidenne, 2014).

D'un point de vue qualitatif, la fermentescibilité des fibres est le principal facteur de modulation de l'activité microbienne. De plus, Garcia et al. (2002) ont montré une corrélation positive entre la concentration caecale en AGV et la teneur en acide uronique, le principal constituant des pectines. Ainsi, l'ingestion de pectines ou d'hémicelluloses stimule l'activité du microbiote caecal (Garcia et al., 2000 ; Gidenne et al., 2004) et stabiliserait plus rapidement l'activité fermentaire chez le lapin en croissance (Candau et al., 1978). De même, une hausse de la teneur en fibres solubles (critère NDSF : Neutral Detergent-Soluble Fiber) très rapidement fermentescibles par les bactéries, pourrait être favorable à la santé digestive du lapin sevré précocement (Gómez-Conde et al., 2004, 2006). L'apport de NDSF modifierait l'équilibre microbien et réduirait la proportion de lapereaux porteurs de *Clostridium perfringens* (caecum) et de *Campylobacter* (iléon et caecum). De plus, un aliment enrichi en NDSF à hauteur de 12% entraînerait une diminution de la mortalité due à l'Entéropathie Epizootique du Lapin (EEL ; Gómez-Conde et al., 2005). Néanmoins, la méta-analyse de Gidenne (2014) indique une absence de corrélation entre la teneur en fibres solubles dans l'aliment et la mortalité post-sevrage. Le rôle des fibres solubles sur la santé digestive du lapin en croissance reste donc à confirmer.

b. Autour du sevrage

Le sevrage est une période critique pour le jeune mammifère, puisqu'il y a une séparation mère-jeune et un changement de régime alimentaire. Ainsi, le jeune animal passe d'une alimentation lactée à une alimentation solide. Cette transition alimentaire est associée à une fréquence assez élevée de troubles digestifs (ballonnements, diarrhées, ...) susceptibles d'entraîner la mort de l'animal. L'âge du sevrage est un élément à prendre en compte afin de moduler l'activité microbienne caecale. En effet, Kovács et al. (2012) ont montré que des lapins sevrés précocement à 21 jours enregistraient des concentrations en AGV plus élevées que les lapins sevrés à 28 ou 35 jours, puisqu'ils consommaient plus précocement un aliment solide. De même, les proportions d'acide acétique (C2) et butyrique (C4) sont plus importantes alors que celles d'acide propionique (C3) diminuent, réduisant donc le ratio C3/C4. Aucune différence n'a cependant été montrée entre les trois âges de sevrage par rapport aux bactéries cultivables strictement anaérobies.

c. Après sevrage, sur un écosystème stabilisé

Cette période est plus difficilement pilotable, étant donné que le microbiote du lapin devient mature et donc plus stable. L'un des leviers d'action résiderait dans la restriction alimentaire. Outre l'impact positif sur l'indice de consommation et les paramètres de santé, la restriction alimentaire pratiquée en post-sevrage chez le lapin permet, en moyenne, un pH caecal plus faible et une augmentation de la concentration caecale en AGV (Gidenne et al., 2012). De plus, la restriction alimentaire provoque une grande amplitude du cycle d'ingestion du lapin et par conséquent amplifie aussi l'amplitude des variations nycthémérales de l'activité microbienne caecale et de la composition du biotope. Néanmoins, la restriction alimentaire ne semble pas affecter la structure et la diversité du microbiote caecal analysé par empreinte moléculaire (Martignon et al., 2010) ou par séquençage haut débit 454 (Massip et al., 2012). Les probiotiques et prébiotiques ont également une action bénéfique sur le microbiote intestinal et sa composition. Chez l'homme, ils sont principalement utilisés sur des écosystèmes microbiens perturbés, participant ainsi à la réduction de l'inflammation intestinale (Hemarajata et Versalovic, 2013), ou chez des sujets âgés chez qui les populations de bifidobactéries - des inhibiteurs de microbes pathogènes - diminuent nettement. Une diminution de leurs activités peut augmenter la sensibilité aux infections, d'où l'intérêt de compenser cette diminution par une ingestion régulière de probiotiques (Toward et al., 2012).

2. Facteurs de variations de l'équilibre de la biocénose caecale

a. Les fibres et leur importance dans la ration (Gidenne, 2014)

Les fibres alimentaires désignent des polymères végétaux présents dans le cytoplasme ou dans la paroi de la cellule végétale. Ces polysaccharides pariétaux sont hydrolysés puis fermentés par les microorganismes du tube digestif (rumen, gros intestin, caecum, ...). Pour le lapin, herbivore monogastrique, les fibres sont l'un des principaux constituants des aliments commerciaux, et représentent la principale source glucidique pour les bactéries caecales. Généralement incorporées entre 35 et 50 % (TDF) dans l'aliment, les fibres ne constituent pas seulement un apport de nutriments dans la nutrition des lapins. En effet, elles jouent également un rôle clé dans la régulation du transit digestif, le contrôle de l'activité microbienne digestive et le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale.

Parmi les constituants pariétaux, on différencie les polysaccharides non-amylacés solubles dans l'eau (substances pectiques, β -glucanes, arabinoxylanes, etc...) des polymères insolubles dans l'eau tels que la cellulose, les hémicelluloses et les pectines insolubles. La solubilité des polysaccharides est généralement déterminée par une solubilité dans de l'eau chaude à 80°C. Le

cytoplasme cellulaire contient des composants solubles et insolubles tels que des oligosaccharides (degré de polymérisation < 15), des fructanes, des amidons ou des mannanes.

i. La cellulose

La cellulose est le principal composant polysaccharidique des parois cellulaires, et c'est d'une manière générale le polymère le plus présent sur Terre. La cellulose est un homopolymère formé de chaînes linéaires [β (1-4)] d'unités D-glucose. Le degré de polymérisation est élevé (entre 8 000 et 10 000). Les microfibrilles de cellulose constituent l'ossature de la paroi cellulaire. Elles sont réunies entre elles par une matrice constituée de pectines et d'hémicelluloses.

ii. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses regroupent plusieurs polysaccharides, et peuvent être estimées dans les aliments pour animaux par la différence entre NDF (Neutral Detergent Fiber) et ADF (Acide Detergent Fiber). Elles sont composées d'une ossature homopolymère d'unités xylose, mannose, ou glucose liées en β (1-4), pouvant former des liaisons hydrogènes étendues avec la cellulose. Elles possèdent un degré de polymérisation plus faible que la cellulose. Les xyloglucanes sont les hémicelluloses majoritaires des parois cellulaires primaires des plantes dicotylédones (légumes et graines), alors que les β -glucanes et les arabinoxylanes sont majoritaires dans les graines de céréales. Les hémicelluloses incluent également d'autres hétéropolymères tels que les arabinogalactanes (présents dans le soja), les galactomannanes (graines de légumes) ou encore les glucomannanes. Les hémicelluloses sont présents à hauteur de 100 à 250 g/kg de MS dans les fourrages et les sous-produits agro-industriels (sons, graines d'oléagineuses et de légumineuses, coques et pulpes), et entre 20 et 120 g/kg de MS pour les graines et les racines. Les hémicelluloses sont pour la plupart insolubles, excepté certaines fractions comme les arabinoxylanes (présentes dans les sons).

iii. Les substances pectiques

Les substances pectiques sont présentes dans la lamelle moyenne et dans les parois cellulaires primaires des plantes dicotylédones telles que le soja et les pois, ainsi que dans les fruits. Les substances pectiques correspondent à plusieurs classes de polymères, incluant les pectines (ossature rhamnogalacturonane et chaînes latérales d'arabinose et de galactose ou de xylose), les polysaccharides neutres (arabinanes, galactanes et arabinogalactanes) couramment associées avec les pectines. Elles sont solubles dans les détergents acides et dans l'eau (en fonction du type de polymère).

iv. Les lignines

Les lignines sont des polymères polyphénoliques insolubles présents dans la paroi cellulaire secondaire. Composées d'unités phenyl-propane, ce sont des polymères très ramifiés, formant

des réseaux complexes. Les lignines sont résistantes à la quasi-totalité des agents chimiques ou enzymatiques (bactéries incluses), et jouent un rôle de renforcement pariétal. La plupart des aliments concentrés ou des jeunes fourrages contiennent moins de 50 g de lignines par kg. Le degré de lignification des parois des cellules végétales peut atteindre 120 g/kg pour des fourrages âgés, ou jusqu'à 590 g/kg dans la farine de pépins de raisins.

b. Les méthodes d'estimation des fibres rapidement fermentescibles (FRF)

Par opposition aux fibres insolubles (à fermentation plus lente), les fibres solubles sont rapidement fermentescibles dans le tractus digestif. Ces fibres FRF regroupent l'ensemble des polysaccharides non-amylacés solubles dans l'eau chaude (et donc non pris en compte dans l'analyse NDF), soit : les substances pectiques solubles, les arabinoxylanes solubles (fraction des hémicelluloses), les β -Glucanes, les fructanes, les gommes (Hall, 2003), et les oligosaccharides solubles. Cette fraction fibreuse, très digeste, est plus difficile à estimer que les fibres insolubles et peut être estimée par les principales méthodes suivantes (figure 4) :

- La méthode enzymatique et gravimétrique de l'AOAC (Prosky et al., 1992) permet de déterminer la valeur SDF (*soluble dietary fiber*). La première étape consiste en une solubilisation des carbohydrates dans un tampon phosphate ou tampon TRIS/MES (acide morpholine-4 éthanesulfonique). Les α -glucanes sont ensuite hydrolysés par une amyloglucosidase et les fibres insolubles sont séparées par filtration. Les fibres alimentaires solubilisées sont précipitées dans une solution d'éthanol et mesurées par gravimétrie, après déduction des protéines et des cendres.
- D'après Van Soest et al. (1991), la teneur en fibres rapidement fermentescibles peut également être déterminée par la différence entre TDF et NDF (corrigé des protéines et des cendres). On pourrait aussi déterminer la teneur en fibres solubles par le calcul suivant : Fibres solubles = matière organique – (protéines + graisses + sucres solubles + amidon + NDF + pectines insolubles).
- Lorsqu'elles sont mesurées avec la méthode d'Hall et al. (1999), les fibres rapidement fermentescibles sont obtenues à partir du paramètre NDSF, qui représente la différence entre les résidus insolubles dans l'eau ou l'éthanol avec l'amidon, par rapport à la fraction NDF et corrigé par les protéines et les cendres. On peut résumer cette estimation comme étant la somme des pectines solubles et insolubles, les β -glucanes, les fructanes et les oligosaccharides (DP < 15). La mesure NDSF est complexe et peut être affectée par l'accumulation d'erreurs dans les mesures des différents composants, ou par l'erreur liée à la valeur utilisée pour la correction des protéines ($N \times 6,25$) (Hall, 2003 ; Martínez-Vallespín et al., 2011).

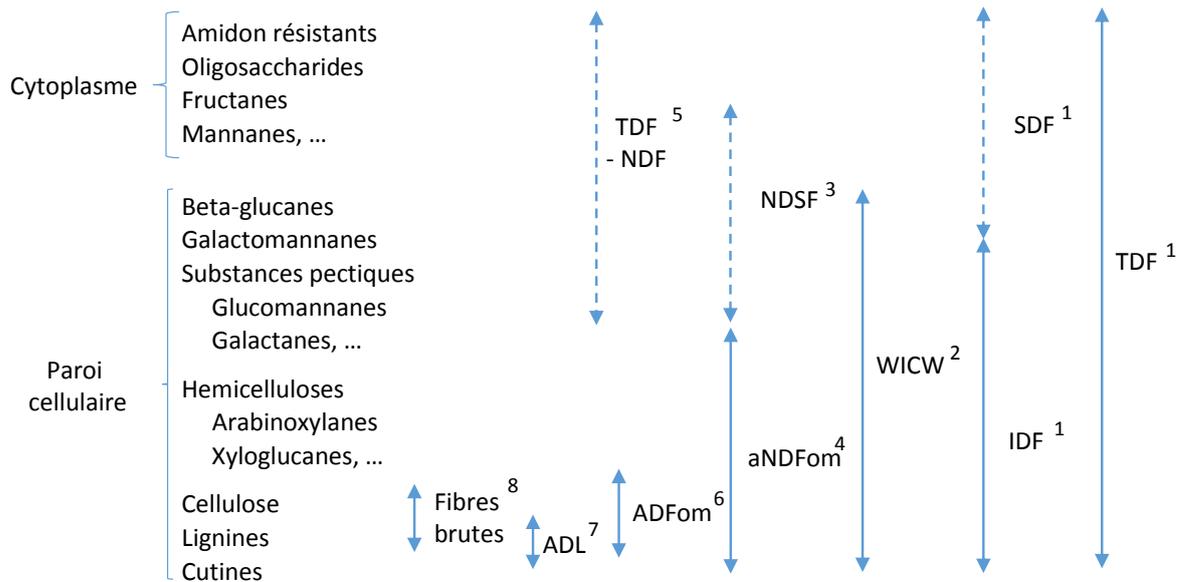


Figure 4 : Principaux polysaccharides de la cellule végétale et leurs méthodes de quantification utilisées en alimentation animale

1 : *Total dietary fiber* (McClearly et al., 2010, AOAC 985.29 et 991.43), correspond à l'ensemble de fibres dans la cellule végétale et inclut les amidons résistants. IDF correspond aux fibres insolubles et peuvent être obtenues à partir des méthodes AOAC 993.19 et 991.42. Les SDF sont une estimation des fibres solubles et s'obtiennent par la différence TDF-IDF.

2 : *Water Insoluble Cell-Wall* (Carré et Brillouet, 1989).

3 : *Neutral Detergent Soluble Fiber* (Hall et al., 1997).

4 : *Neutral Detergent Fiber*. Cette fraction est dosée avec une amylase thermostable et est exempte de cendres.

5 : Ce paramètre permet d'estimer les fibres rapidement fermentescibles (Van Soest et al., 1991).

6 : *Acid Detergent Fiber*. Cette fraction est exprimée exempte de cendres (Van Soest et al., 1991).

7 : *Acid Detergent Lignin* (Van Soest et al., 1991).

8 : Les fibres brutes sont obtenues à partir de la méthode AOAC 962.10.

c. Impact des fibres digestibles sur la croissance et la santé des lapins

Le terme "fibres digestibles" a été initialement défini par Gidenne (2003) pour estimer la part des fibres les plus digestes chez le lapin, par opposition aux fractions peu digestes (ADF: lignines et cellulose Van-Soest). La fraction fibres digestibles correspond ainsi à la somme des hémicelluloses (NDF-ADF) et des pectines insolubles dans l'eau, sachant que ces dernières sont le plus souvent estimées à l'aide de la littérature. En effet, l'analyse des pectines reste complexe et ne peut être exécutée dans un laboratoire de contrôle en alimentation animale. Différentes études se sont penchées sur l'effet des fibres digestibles sur la croissance, la santé ou les paramètres de fermentation caecale des lapins, et montrent que ces fibres digestibles ont un rôle nutritionnel différent des fractions peu digestes des fibres (Gidenne, 2014). Ainsi, en comparaison avec un

aliment standard, on relève que l'augmentation de la teneur en fibres solubles d'un aliment permet une augmentation du gain de poids quotidien et du poids vif à 76 jours d'âge (Trocino et al., 2010). Les résultats sont plus contrastés sur les paramètres d'ingestion. En effet, Trocino et al. (2010) enregistrent une diminution de l'ingestion avec un aliment riche en fibres solubles. Lorsque l'amidon est remplacé par des fibres digestibles (avec un apport de pulpe de betterave supérieur à 35%), une augmentation de l'ingestion et un ralentissement de la croissance sont alors observés (Garcia et al., 1993). A l'inverse, Gidenne et al. (2004) ont rapporté des effets négatifs à la fois sur l'ingestion et la croissance, mais uniquement autour du sevrage (25-38 jours) et avec une incorporation très élevée de pulpe de betterave (50%).

En ce qui concerne les paramètres de santé, différentes équipes de recherche ont mis en évidence une diminution du taux de morbidité et de mortalité à la suite d'un remplacement de fibres peu digestibles (lignocellulose « ADF ») par une forte teneur en fibres digestibles (Xiccato et al., 2006). Le même constat a été observé dans des aliments iso-ADF, où les fibres digestibles ont remplacé l'amidon (Perez et al., 2000 ; Soler et al., 2004), les hémicelluloses (Gómez-Conde et al., 2009) ou les protéines brutes (Gidenne et al., 2001).

d. Les autres facteurs de variation

Il existe également d'autres facteurs qui peuvent moduler la composition de la biocénose caecale, comme la génétique de l'hôte et l'environnement. C'est actuellement un fort enjeu cognitif de différencier les effets respectifs de ces facteurs. Nous précisons l'impact de l'antibiothérapie en se focalisant spécifiquement sur les effets d'antibiotiques prescrits en cuniculture pour lutter contre l'EEL.

i. La génétique de l'hôte

Il existe des études contrastées quant à l'influence de la génétique de l'hôte sur la composition du microbiote digestif. Plusieurs études sur la mise en place des communautés bactériennes ont été réalisées chez des jumeaux (homme) et ont conclu à une plus forte proximité des profils bactériens dominants chez les jumeaux (Reyes et al., 2010 ; Lepage et al., 2011). Des études descriptives également menées chez l'homme montrent que des mutations dans des gènes de l'immunité ou du métabolisme sont associées à des modifications dans la diversité du microbiote intestinal (Khachatryan et al., 2008 ; Benson et al., 2010 ; Spor et al., 2011). A contrario, de récents travaux utilisant les nouvelles techniques de métagénomique, plus résolutive pour la détection d'espèces sous-dominantes montrent qu'il n'existe pas plus de similarité entre les microbiotes fécaux provenant de jumeaux monozygotes, génétiquement plus proches, que de dizygotes (Yatsunenkov et al., 2012). Enfin, il semble que la transmission verticale d'espèces bactériennes, de la mère à

l'enfant, observée dans les premiers stades de colonisation chez le nouveau-né, s'estompe dans les mois suivant la naissance. Le profil d'analyse des séquences des gènes de l'ARNr 16s chez les jeunes adolescents vivant avec leurs parents, ne s'avère pas plus proche de celui de la mère que de celui du père (Vaishampayan et al., 2010 ; Yatsunencko et al., 2012). La cohabitation se révèle même être un facteur plus déterminant que la génétique et l'appartenance à la même famille, suggérant, en conditions physiologiques, un fort impact de l'environnement et des habitudes de vie sur la composition du microbiote. Ainsi, autant l'impact de l'environnement et de l'alimentation sont bien établis, autant celui de la génétique de l'hôte reste à analyser finement.

ii. L'environnement de l'hôte

L'environnement immédiat du nouveau-né conditionne les espèces et genres bactériens capables de coloniser rapidement le tractus digestif. Des travaux comparant les selles d'enfants dans les premiers jours de vie montrent que le microbiote d'enfants nés par césarienne contient moins de bifidobactéries que celui d'enfants nés par voie basse (Huurre et al., 2008 ; Dominguez-Bello et al., 2010). Ainsi, la naissance par voie basse favoriserait la colonisation par les espèces identifiées dans la muqueuse vaginale de la mère (*Lactobacillus*, *Prevotella* et *Sneathia*), alors que l'accouchement par césarienne favoriserait plutôt une colonisation précoce par les bactéries présentes sur la peau maternelle (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium* ; Reid et al., 2011).

Un autre facteur susceptible de perturber l'établissement du microbiote intestinal est l'hygiène. La théorie "hygiéniste" qui s'est développée dans les années 1990, suggère qu'une faible exposition à des agents infectieux durant l'enfance favoriserait l'émergence des maladies atopiques par défaut de mise en place des mécanismes de régulation du système immunitaire (Strachan, 1989). Chez le lapin, une étude récente a mis en évidence une modification du microbiote et une diminution de la réponse immunitaire spécifique en hygiène de logement dégradée (Massip et al., 2012), qui pourraient être expliquées par un effet barrière accentué du microbiote intestinal.

iii. Les antibiotiques utilisés pour lutter contre l'EEL

Depuis l'apparition de l'EEL en Europe vers les années 1996-1997, ce syndrome digestif est devenu la principale cause de mortalité en élevage cynicole (Licois et al., 2005). De plus, l'EEL s'exprime le plus souvent à un âge où d'autres troubles digestifs sont observés, rendant le diagnostic différentiel délicat. La tiamuline (famille des pleuromutilines) et l'apramycine (famille des aminosides) sont deux antibiotiques classiquement utilisés en élevage afin de réduire l'impact de l'entérocologie. Ces deux molécules sont couramment prescrites pour lutter contre les infections secondaires comme les clostridioses et les colibacillooses.

Il a été démontré que la tiamuline, incorporée dans l'aliment à hauteur de 100 ppm, réduit la biodiversité caecale du lapin en croissance (Abecia et al., 2004) et de la lapine en lactation (Abecia et al., 2007a), mais ne modifie pas le pH caecal et les activités pectinasiques et cellulolytiques des bactéries anaérobies (Bónai et al., 2010). Il en est de même pour l'apramycine (100 ppm) qui réduit la diversité du microbiote caecal, et réduit le taux de mortalité chez des lapins après sevrage (Chamorro et al., 2007).

Ce chapitre nous a permis de comprendre la complexité de la structuration du microbiote du lapin. De nombreux facteurs peuvent impacter cette dynamique d'implantation, que ce soit positivement ou négativement. Malgré la difficulté pour les estimer, les fibres rapidement fermentescibles (pulpe de betterave ou marc de pomme) apparaissent comme très prometteuses pour moduler l'activité microbienne caecale, et ce, principalement autour du sevrage. De plus, il n'y a pour l'instant aucune étude analysant le rôle des fibres rapidement fermentescibles sur le microbiote caecal et son activité chez le lapin lors d'une distribution avant sevrage, dans le but d'orienter le microbiote et de stimuler son activité. De même, l'impact d'une antibiothérapie n'a jamais été analysé sur le microbiote à l'aide de technique moderne de séquençage.

Enfin, l'un des enjeux est également de corrélérer l'implantation du microbiote avec l'activité précoce du système immunitaire du jeune lapin. Le prochain chapitre présente les acteurs et les mécanismes de l'immunité digestive, ainsi que leurs interactions avec le microbiote.

CHAPITRE II – L'IMMUNITÉ DIGESTIVE ET SON ACQUISITION PAR LE JEUNE

LAPIN : INTERACTIONS AVEC LE MICROBIOTE

Le système immunitaire digestif des mammifères est un exemple élaboré de relations symbiotiques, résultant de la coévolution des vertébrés et de leur microbiote (Ley et al., 2008). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux principaux composants biologiques de l'immunité digestive, et dans la mesure du possible, appliqués au lapin. La mise en place de l'immunité chez le jeune animal sera ensuite abordée, suivie d'un point sur les cytokines impliquées dans les réponses pro- ou anti-inflammatoires.

I. L'immunité digestive : plusieurs acteurs de défense à différents niveaux

Le tractus intestinal (figure 1) est la plus grande barrière du corps humain avec une surface spécifique d'environ 300 m² chez l'adulte. Il s'agit donc de la plus grande porte d'entrée pour les bactéries commensales ou pathogènes. La stratégie est celle d'une défense à plusieurs niveaux qui intègre une muqueuse stratifiée, un épithélium relativement impénétrable - mais très sensible - et une lamina propria peuplée de cellules immunitaires impliquées dans les réponses innées et adaptatives.

1. La barrière physico-chimique : première ligne de défense

L'acidité gastrique est néfaste au développement d'agents pathogènes (Martinsen et al., 2005), et constitue une première barrière limitant leur passage vers l'intestin grêle. Le tractus digestif dispose également d'autres barrières à l'entrée d'agents indésirables. C'est le cas des jonctions serrées qui sont spécifiques des cellules épithéliales. Elles préviennent le passage intercellulaire de substances potentiellement néfastes et agissent comme barrière physique, tout comme les mouvements péristaltiques intestinaux qui réduisent le contact des agents pathogènes avec les cellules épithéliales. De plus, le renouvellement cellulaire permet l'élimination des pathogènes adhérents aux cellules épithéliales (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

Au niveau des barrières chimiques dont dispose l'organisme, il existe différentes substances aux propriétés antimicrobiennes sécrétées au niveau du tube digestif. C'est le cas des cellules de Paneth, regroupées à la base des glandes de Lieberkühn, qui élaborent des grains de sécrétion contenant du lysozyme et des α -défensines (Cunliffe, 2003). Le pancréas et les glandes salivaires participent aussi à cette protection avec la sécrétion de lactoferrine (Caccavo et al., 2002). Enfin, l'intestin grêle sécrète les mucines (Montagne et al., 2004), composantes du mucus qui protège la surface de l'épithélium. Le mucus contient également des peptides anti-microbiens, des molécules cytoprotectives et les IgA sécrétoires.

2. Les récepteurs de type Toll (TLR)

Les récepteurs de type Toll (TLR : *Toll-Like Receptors*) appartiennent à la famille des récepteurs de motifs moléculaires notamment microbiens. L'épithélium intestinal est pourvu de TLR aussi bien au niveau apical que basal, contribuant ainsi à l'homéostasie de l'hôte (figure 5). Les TLR opèrent en première ligne de la réponse innée par reconnaissance des motifs moléculaires conservés au sein de différents types de micro-organismes baptisés PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern* ; Kawai et Akira, 2010). Les PAMP comprennent différents composants de la paroi cellulaire, tels que les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycanes (PGN) ou les lipopeptides. Alors que les TLR4 sont principalement activés par le LPS, les TLR9 reconnaissent des motifs CpG (C-phosphodiester-G) non méthylés, répandus dans l'ADN génomique bactérien. Les TLR permettent donc d'initier et d'orienter les réponses immunes dirigées contre les pathogènes, en activant différentes voies de signalisation par l'intermédiaire du facteur de différenciation myéloïde-88 MyD88 (Johnson et al., 2005). Ainsi, les TLR participent à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP1, qui régulent l'expression des cytokines inflammatoires comme TNF α , IL1 ou IL6 (Moynagh, 2005). De plus, ils contribuent à l'activation des caspases impliquées dans l'apoptose des cellules infectées (Lehner et al., 2007).

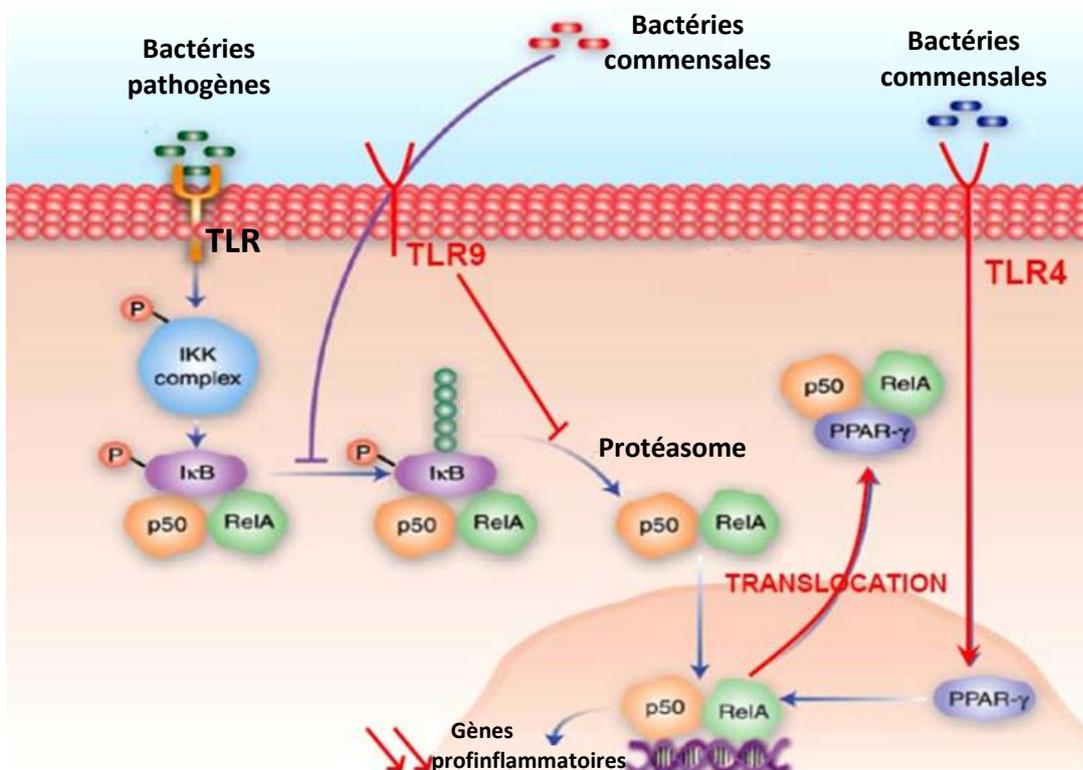


Figure 5 : Rôle des TLR dans l'homéostasie intestinale (adapté de Wang et al., 2014)

Dans le cas de l'inhibition des TLR, Slack et al. (2009) ont observé une colonisation de la rate par les bactéries digestives. Ces bactéries sont passées dans la circulation par franchissement de la barrière épithéliale (sans rupture de cette dernière). De plus, l'inhibition des TLR augmente la production d'anticorps en présence de bactéries commensales. L'immunité adaptative est alors activée dans une situation où elle ne devrait théoriquement pas l'être (Slack et al., 2009).

3. Les tissus lymphoïdes associés à l'intestin : GALT

La structure du tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT : *Gut Associated Lymphoid Tissue*) est globalement commune à tous les mammifères et est à l'origine des défenses immunitaires spécifiques (figure 6). En plus des cellules lymphoïdes dispersées et des follicules lymphoïdes, le GALT comporte les plaques de Peyer réparties à intervalles réguliers dans la partie terminale de l'iléon, et l'appendice vermiforme situé à l'extrémité distale du caecum (Lanning et al., 2000b). Les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques se développent avant la naissance, tandis que les follicules lymphoïdes se développent après la naissance (Cherrier et Eberl, 2012).

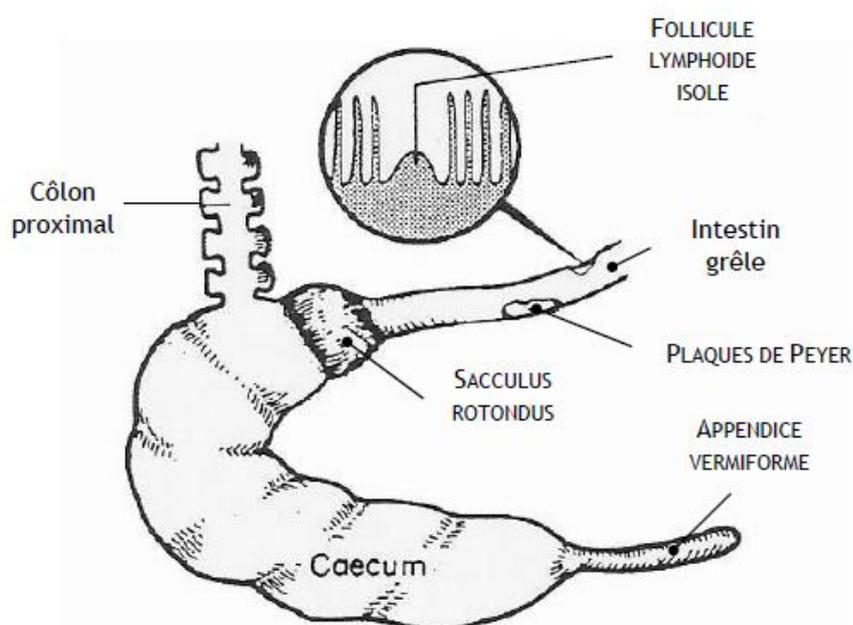


Figure 6 : Représentation schématique des différentes structures lymphoïdes organisées associées à l'appareil digestif (d'après Mage, 1998)

Les plaques de Peyer résultent d'une agrégation de follicules lymphoïdes en dôme faisant saillie dans la lamina propria (figure 7). Un épithélium spécifique recouvre la zone du dôme : le FAE (Follicle Associated Epithelium). Ce FAE diffère de l'épithélium des villosités par des activités enzymatiques réduites, une bordure en brosse moins prononcée, ainsi qu'une large infiltration par des lymphocytes, macrophages et cellules dendritiques. Il contient également des cellules

épithéliales spécialisées, les cellules M (Microfold cells) (Mowat, 2003). Ces cellules présentent de multiples invaginations qui parcourent leur membrane basolatérale, où viennent se loger les lymphocytes et les macrophages. Les cellules M font pénétrer les antigènes luminaux par endocytose puis les transmettent aux cellules dendritiques dans l'épithélium ou dans la région du FAE. Ces cellules dendritiques migrent ensuite vers la zone T-dépendante ou vers les follicules B, où elles interagissent avec des lymphocytes naïfs (Jego et al., 2005). Les cellules M ne présentent pas elles-mêmes les antigènes, n'exprimant pas de molécules du CMH de classe II (Jang et al., 2004).

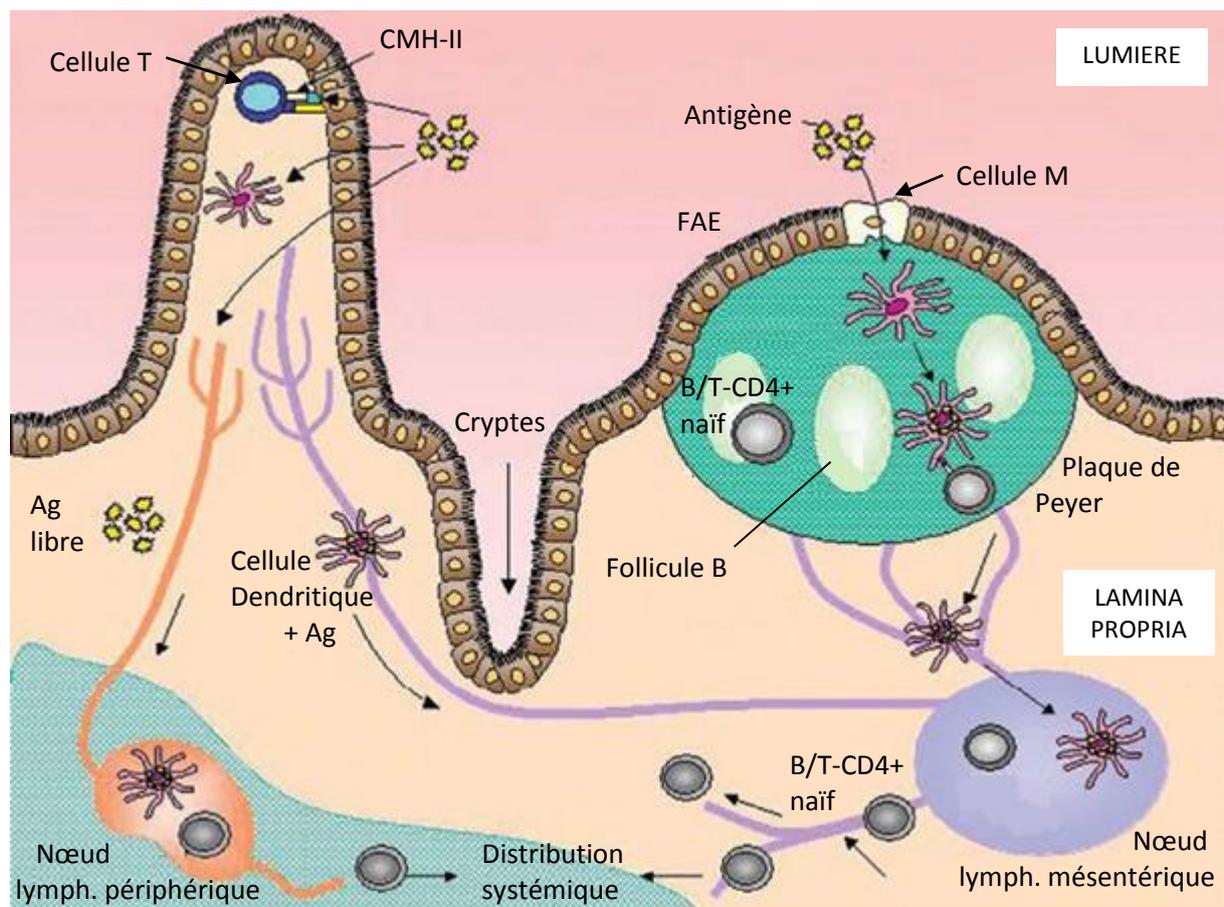


Figure 7 : Composantes anatomiques du tractus digestif et réponse immunitaire associée (d'après Richaud-Patin et al., 2005)

Chez le lapin adulte, l'organisation de l'appendice vermiforme et du *sacculus rotundus* est analogue à celle des plaques de Peyer (Mage, 1998). En plus de ce tissu lymphoïde organisé, de nombreuses cellules lymphoïdes ainsi que des cellules de la défense non spécifique (granulocytes et macrophages) sont disséminées dans la paroi digestive. Quelques lymphocytes, majoritairement des lymphocytes T (entre 80 et 90%), sont dispersés entre les cellules épithéliales intestinales. Il y a également d'autres lymphocytes qui se situent dans la lamina propria :

essentiellement des lymphocytes T (de 40 à 90%), mais également des lymphocytes B qui deviendront pour la plupart des plasmocytes sécréteurs d'IgA (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

4. Les immunoglobulines

Les immunoglobulines M (IgM) sont les premières immunoglobulines présentes à la surface des lymphocytes B. Lors de la différenciation, ces lymphocytes pourront exprimer d'autres classes d'Ig (IgA ou IgG) grâce au mécanisme de commutation isotypique et sous l'action du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), des interleukines 5 et 10 (IL5 et IL10), et de signaux cellulaires délivrés par les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Fagarasan et al., 2001). Les lymphocytes B suivent ensuite la voie lymphatique jusqu'aux noeuds lymphatiques mésentériques, où ils restent un certain temps pour maturation et prolifération. Ils migrent ensuite par voie sanguine via le canal thoracique pour finalement s'accumuler dans la muqueuse (Mage, 1998). Les lymphocytes qui pénètrent dans la muqueuse sont ensuite redistribués dans deux compartiments distincts : la lamina propria ou l'épithélium.

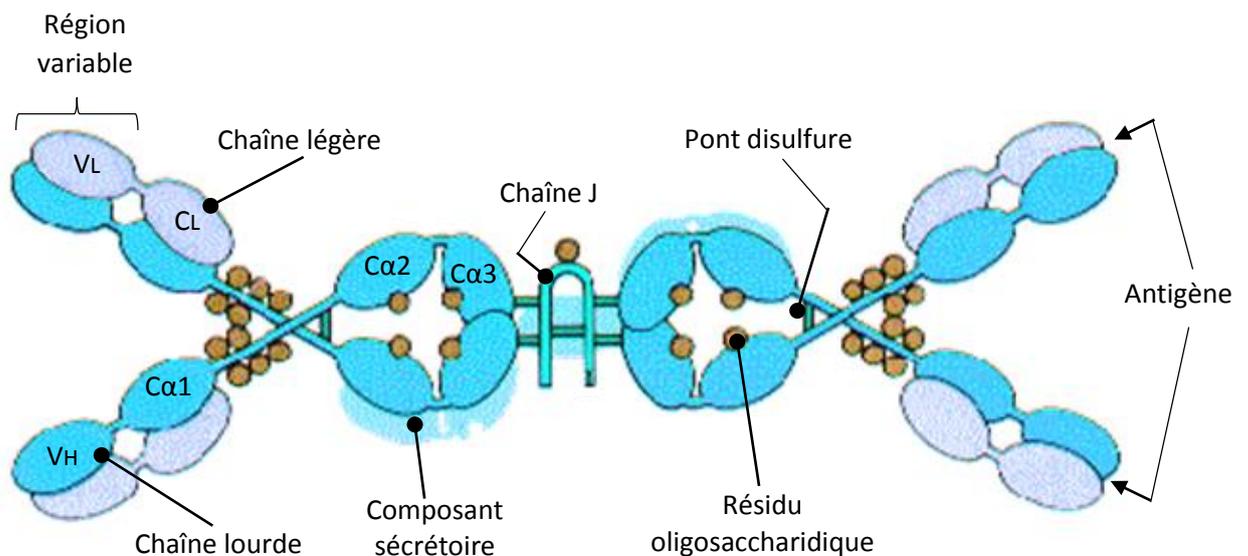


Figure 8 : Structure d'une IgA sécrétoire

La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la production d'IgA nécessite généralement une coopération avec les lymphocytes T auxiliaires, et notamment la co-stimulation de CD40 sur les lymphocytes B et de son ligand CD40L sur les lymphocytes T. La production d'IgA peut être induite par les lymphocytes T, en particulier les lymphocytes T CD4+ (Cong et al., 2009), mais elle peut être également induite indépendamment des lymphocytes T dans le cas de commutation de classe entre IgM et IgA, décrite précédemment.

La fonction des IgA sécrétoires (figure 8) est de prévenir la colonisation et l'invasion bactérienne ou virale des muqueuses, par leur capacité de fixation aux antigènes. La plupart des IgA sont dirigées contre des composés de surface des bactéries. Elles induisent peu ou pas de réaction inflammatoire, qui pourrait occasionner des dommages aux surfaces muco-sales. Les mécanismes de neutralisation des microorganismes par les IgA sécrétoires sont en fait mal connus, et ne correspondent pas à ceux classiquement décrits pour les IgG : elles n'induisent pas d'opsonisation par les macrophages, n'activent pas la voie classique du complément, et donc n'aboutissent pas à la lyse des bactéries (Corthesy et Kraehenbuhl, 1999). Il est alors très probable que des phénomènes immunitaires à médiation cellulaire prennent le relais lorsqu'un agent pathogène parvient à franchir la barrière épithéliale. Les rongeurs et lagomorphes sont dotés d'un système original : la pompe hépatique permettant à des IgA sériques de se retrouver dans la lumière intestinale. Elles sont éliminées par transport actif depuis le sérum vers la bile par le biais des hépatocytes disposant de récepteurs poly-immunoglobulines. Ces IgA d'origine sérique ont une structure semblable aux IgA sécrétoires (Bouvet et Fischetti, 1999). Les relations entre IgA sériques et IgA sécrétoires ne sont pas encore établies chez le lapin. Des essais chez la souris appuient l'existence d'une corrélation mais qui serait antigène type- et dose-dépendante (Externest et al., 2000). Des animaux élevés dans des environnements axéniques présentent des faibles densités de cellules lymphoïdes, des petites structures folliculaires ainsi que de très faibles concentrations circulantes d'immunoglobulines. Après colonisation microbienne, le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux et de la lamina propria augmente considérablement, tout comme les concentrations circulantes d'immunoglobulines (Guarner et Malagelada, 2003). Enfin, Lanning et al. (2000b) ont montré que microbiote digestif stimule également la diversification du répertoire des anticorps chez le lapin.

5. Compétition entre bactéries commensales et pathogènes

Le microbiote, ou flore commensale, n'a pas qu'un rôle de digestion et d'absorption des nutriments, des électrolytes ou de l'eau. En effet, cette flore digestive entre en compétition directe avec les microorganismes pathogènes au niveau des sites d'attachement des cellules épithéliales. Outre cet aspect, des paramètres physico-chimiques ne facilitent pas l'implantation de microorganismes pathogènes. Parmi ces paramètres, on trouve la température, le potentiel d'oxydo-réduction, l'absence de facteurs nutritionnels essentiels à la survie des pathogènes, ou les sécrétions de bactériocines par la flore commensale (Guarner et Malagelada, 2003). L'implantation des pathogènes est donc fortement dépendante de l'environnement que propose l'hôte. L'organisme exogène aura d'autant plus de capacité à s'implanter facilement parmi la flore

commensale de l'hôte qu'il aura été confronté à ce type d'environnement auparavant (Freter, 1974).

6. Le rôle des bactéries filamenteuses segmentées

Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB : *Segmented Filamentous Bacteria*) sont des bactéries Gram positives apparentées au genre *Clostridium*. Il a été montré que les SFB jouent un rôle dans l'induction post-natale de la réponse immunitaire intestinale. Ainsi, La colonisation par SFB induit la production d'interleukines (IL17 et IL10) et de l'interferon gamma (IFN γ) par les cellules CD4 (Ivanov et al., 2009). L'interleukine IL17 permet notamment le recrutement et l'activation des neutrophiles polynucléaires qui jouent un rôle clé dans le contrôle d'une infection bactérienne. L'IFN γ contribue également à ce rôle défensif puisque cette cytokine stimule l'activité antimicrobienne des macrophages. Les SFB s'avèrent alors être un composant du microbiote digestif indispensable à la maturation des lymphocytes T présents dans la muqueuse intestinale et impliqués dans la réponse immunitaire adaptative. De plus, les SFB ont un effet stimulateur sur l'immunité au niveau des plaques de Peyer puisqu'elles induisent également l'expression de IL17, IL10, IFN γ et du ligand de CD40 (Gaboriau-Routhiau et al., 2009).

Malgré l'action bénéfique des SFB dans la réponse immunitaire, elles représentent cependant un danger potentiel pour l'hôte dans la mesure où elles sont susceptibles d'engendrer des réactions inflammatoires délétères pour l'intestin (Simecka, 1998). En effet, les microbes commensaux et pathogènes partagent les mêmes motifs capables d'induire une réponse inflammatoire. Le système immunitaire intestinal doit donc maintenir en permanence un état de tolérance vis-à-vis de la flore commensale (figure 9), tout en étant capable d'induire des réponses immunes pro-inflammatoires protectrices contre les pathogènes gastro-intestinaux. Une déficience de ces mécanismes résulte en une inflammation anormale du tube digestif, aboutissant au développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, telles que la maladie de Crohn. Enfin, il a été montré qu'une expansion trop importante de SFB induisait des maladies intestinales inflammatoires chroniques (Bellavia et al., 2011).

II. Mise en place de l'immunité chez le jeune animal

1. L'immunité passive : un héritage maternel

A la naissance, le nombre de lymphocytes B et T circulants par microlitre de sang est 3 à 4 fois supérieur chez le nouveau-né comparativement à l'adulte (Erkeller-Yuksel et al., 1992). Le nouveau-né, tout comme le lapereau, possède également une quantité importante d'immunoglobulines transmise par la mère au cours de la gestation (Brambell, 1966), qui est

complété par l'ingestion de colostrum à la naissance. Outre cet apport en anticorps, le colostrum et le lait permettent au jeune animal de s'enrichir en facteurs de croissance, macrophages, leucocytes et lymphocytes B et T. Des facteurs antimicrobiens (caséines, glycolipides et oligosaccharides) sont également transmis par le lait maternel (Kolb, 2001). Ces anticorps, principalement des IgA sécrétoires, assurent ainsi le transfert passif de l'immunité de la mère à l'enfant, impactant le développement du système immunitaire du jeune (Maynard et al., 2012). Enfin, des études portant sur l'immunité innée concluent à une atténuation globale des réponses mettant en jeu les récepteurs TLR chez l'homme. Les réponses cytokiniques pro-inflammatoires (IL1 β , IL8, IL12 et TNF α) sont également déficitaires, en raison d'une diminution d'expression de TLR4 et de son corécepteur CD14 (Levy et al., 2006 ; Lavoie et al., 2010).

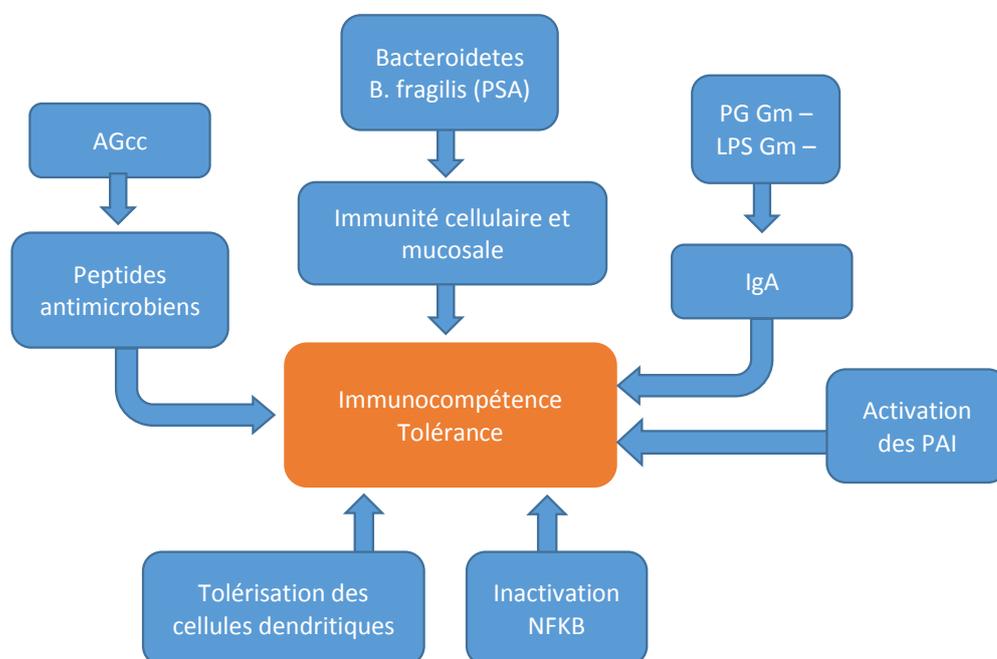


Figure 9 : Mécanismes et acteurs impliqués dans un état de tolérance (d'après Sekirov et al., 2010)

AGcc : Acides gras à chaînes courtes ; PG : peptidoglycane ; LPS : lipopolysaccharide ;
PAI : phosphatase alcaline intestinale

2. Acquisition de l'immunité active

L'immunité active vient ensuite compléter celle transmise par la mère. Ainsi à la naissance, le développement du système immunitaire humoral du lapin n'est pas achevé : la production d'anticorps n'a pas encore débuté et les structures histologiques des tissus lymphoïdes

périphériques sont immatures. L'appendice vermiforme, composant du GALT, est le premier organe lymphoïde à se développer. Il est colonisé par les lymphocytes jusqu'à une semaine d'âge environ, alors que les follicules lymphoïdes peuvent se mettre en place jusqu'à 5 ou 6 semaines.

Les immunoglobulines sont détectables dans le sérum et l'appendice cæcal dès 1 à 2 semaines après la naissance, mais la réponse humorale aux antigènes reste minimale jusqu'à 2 ou 3 semaines d'âge (Knight et Winstead, 1997). Parallèlement au développement de la capacité des lapereaux à synthétiser des immunoglobulines, le répertoire des anticorps doit se diversifier et ainsi accroître sa spécificité aux antigènes environnementaux. Il a été montré que cette diversification, tardive chez le lapin, est sous contrôle du microbiote (Lanning et al., 2000a).

Ce répertoire primaire confère au lapin une collection diversifiée d'anticorps capables d'interagir avec des agents infectieux. Ensuite, ce répertoire peut encore être modifié au cours d'une réponse immunitaire spécifique à une stimulation antigénique. On parle alors de répertoire d'anticorps secondaire. Des hypermutations et des conversions géniques permettront alors d'accroître la spécificité des anticorps à l'antigène rencontré (Lanning et al., 2000a).

III. Les cytokines impliquées dans les processus inflammatoires

La reconnaissance de motifs communs aux pathogènes par les cellules de l'immunité innée ou d'antigènes par les lymphocytes provoque la production de médiateurs polypeptidiques appelés cytokines. Ces petites protéines ont des effets spécifiques sur les interactions et les communications entre cellules (Zang et An., 2007) et sont impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaire. Les cytokines regroupent ainsi les lymphokines (cytokines produites par les lymphocytes), les monokines (cytokines produites par les monocytes), les chemokines (cytokines avec activité chimiotactique), et les interleukines (cytokines produites par des leucocytes et agissant sur d'autres leucocytes). Les cytokines peuvent agir sur la cellule sécrétrice elle-même (action autocrine), sur des cellules voisines (action paracrine), ou dans certains cas sur des cellules éloignées (action endocrine). Le tableau 1 présente les principales cytokines du système immunitaire, les cellules qui les sécrètent, ainsi que leur rôle principal. Les cytokines sont également classées en fonction de leur pouvoir inflammatoire : les cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires (tableau 2), bien que certaines études remettent en cause la distinction entre ces deux types d'activités pour certaines cytokines, comme l'IL2 (Banchereau et al., 2012). Enfin, la figure 10 permet d'avoir une vision d'ensemble des interactions entre les cellules effectrices de l'immunité et des cytokines qu'elles sécrètent.

Tableau 1 : Sélection de cytokines et de leurs activités primaires (d'après Zang et An, 2007)

| Cytokines | Principale source | Activité primaire |
|----------------|--|---|
| CSF2 | Lymphocytes T « helper » | Croissance et différenciation des monocytes et des cellules dendritiques |
| IL1 α | Macrophages et autres cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) | Costimulation des CPAs et des lymphocytes T, inflammation, fièvre, réponse de phase aiguë |
| IL1 β | | Hématopoïèse |
| IL2 | Lymphocytes Th1 activés et NK | Prolifération des lymphocytes B et T, fonctions NK |
| IL3 | Lymphocytes T activé | Cellules progénitrices hématopoïétiques |
| IL4 | Lymphocytes T activé | Prolifération des lymphocytes B, croissance des éosinophiles et des mastocytes, IgE and CMH de classe II, expression sur les lymphocytes B, inhibition de la production de monokine |
| IL5 | Mastocytes et Lymphocytes Th2 | Croissance des éosinophiles |
| IL6 | Lymphocytes Th2 activé et CPAs, autres cellules stomatiques | Réponse de phase aiguë, prolifération des lymphocytes B, thrombopoïèse, en synergie avec IL1 et TNF sur les lymphocytes T |
| IL7 | cellules stromales thymiques et moëlle osseuse | Lymphopoïèse T et B |
| IL8 | macrophages, cellules somatiques | Chemoattractant pour les neutrophiles et lymphocytes T |
| IL9 | Lymphocytes T | Effets hématopoïétiques et thymopoïétiques |
| IL10 | Lymphocytes Th2 activé, Lymphocytes T CD8+ and B, macrophages | Inhibe la production de cytokines, favorise la production des lymphocytes B et la production d'anticorps, supprime l'immunité cellulaire, croissance des mastocytes |
| IL11 | Cellules stromales | Effets synergiques hématopoïétiques et thrombopoïétiques |
| IL12 | Lymphocytes B, macrophages | Prolifération des lymphocytes NK, production d'IFN, favorise les fonctions immunitaires à médiation cellulaire |
| IL13 | Lymphocytes Th2 | Activités IL4-like |
| IL17 | Lymphocytes T CD4 | Induit la sécrétion de chimiokines (IL8), recrutement des neutrophiles |
| IL18 | Macrophages | Puissant inducteur d'interféron par les lymphocytes T et NK |
| IFNA | Macrophages, neutrophiles et certaines cellules somatiques | Effets antiviraux, induction du CMH classe I sur toutes les cellules somatiques, activation des lymphocytes NK et macrophages |
| IFNB | Lymphocytes TH1 activés et NK | Induit le CMH classe I sur toutes les cellules somatiques, induit le CMH classe II sur les CPAs et cellules somatiques, active les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes NK, favorise l'immunité à médiation cellulaire, effets antiviraux |
| IFNG | | Induit le CMH classe I sur toutes les cellules somatiques, induit le CMH classe II sur les CPAs et cellules somatiques, active les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes NK, favorise l'immunité à médiation cellulaire, effets antiviraux |
| MIP-1 α | Macrophages | Chimiotactisme |
| MIP-1 β | Lymphocytes T | Chimiotactisme |
| TNF- α | Lymphocytes T et NK, monocytes, macrophages, mastocytes, neurones sensoriels | Chimiotactisme, synthèse d'IL1 et d'IGA, mort cellulaire, inflammation, douleur |
| TNF- β | Lymphocyte T cytotoxique | Phagocytose, production d'oxyde nitrique, mort cellulaire |

Tableau 2 : Cytokines pro- et anti-inflammatoires (d'après Seruga et al., 2008)

| Activité | Cytokines |
|---|---|
| Immunité à médiation cellulaire (pro-inflammatoire) | IL1, IL2, IL4, IL6, IL7, IL10, IL11, IL12, IL15, IL16, IL17, IL18, IL21, IL23, TNF α , TNF β , IFN α , IFN β , IFN γ |
| Immunité humorale (pro-inflammatoire) | IL1, IL2, IL4, IL5, IL6, IL10, IL12, IL13, IL15, IL21, IL25, TGF β |
| Immunité allergique (pro-inflammatoire) | IL3, IL4, IL5, IL9, IL13, IL25, IFN γ , CSF2 |
| Anti-inflammatoire | IL4, IL5, IL6, IL10, IL13, IL19, IL20, IL22, IL24, IL26, TGF β |

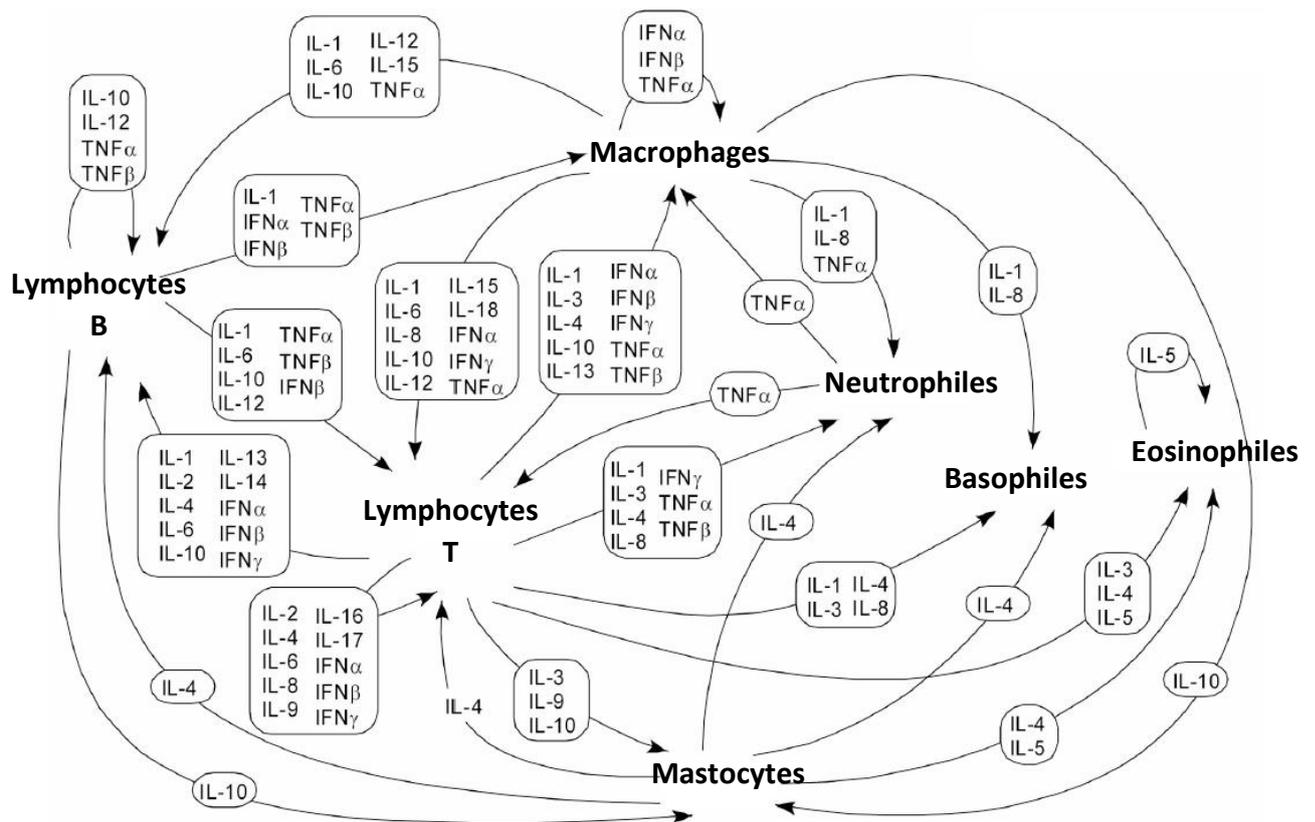


Figure 10 : Réseau cytokinique entre les principales cellules effectrices de l'immunité (d'après Zhang et An, 2007)

L'immunité et sa mise en place chez le jeune animal sont régies par des mécanismes complexes. D'une manière générale, la mise en place de l'immunité est bien documentée chez l'homme (Maynard et al., 2012) mais peu d'études se sont intéressées au lapin. Quoiqu'il en soit, il est clair que l'immunité que va développer le jeune animal pendant sa croissance est dépendante de sa mère (avant et après la naissance) et de son microbiote digestif. Tout l'enjeu est d'avoir les outils permettant de caractériser la réponse immunitaire et de détecter d'éventuels dysfonctionnements.

Dans le prochain chapitre, nous présenterons les avancées en matière de connaissance du génome du lapin ainsi que les principaux outils permettant son étude à différentes échelles. Le parallèle sera fait pour le méta-génome microbien digestif dans la dernière partie de ce chapitre.

CHAPITRE III – AVANCEES SUR LE GENOME DU LAPIN ET DE SON MICROBIOTE DIGESTIF

I. Connaissances sur le génome du lapin et outils d'analyse disponibles

1. Génomique

La génomique est une discipline qui vise l'analyse de l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce. Elle inclut différents niveaux (figure 11) : séquençage, analyse des variations de séquences (polymorphismes), expression des transcrits (transcriptome), des protéines (protéome) et des métabolites (métabolome).

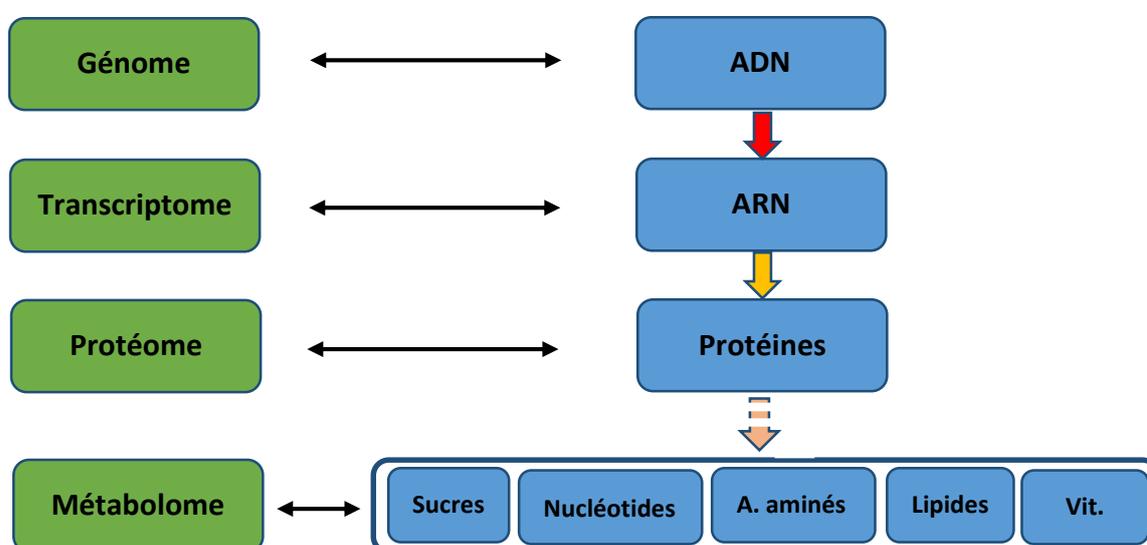


Figure 11 : Les différents niveaux de la génomique

a. Séquence de référence du génome du lapin

Financé par l'Institut américain de recherche sur le génome humain, le « Mammalian Genome Project » avait pour objectif d'améliorer les connaissances sur le génome humain par des approches de génomique comparative, en séquençant avec une faible couverture de 2 à 3X le génome de 29 mammifères (Lindblad-Tho et al., 2011). Le lapin a été inclus dans ce projet de par sa position intéressante sur l'arbre phylogénétique des mammifères. Le séquençage a été réalisé par l'Institut Broad et a conduit en mai 2005 au premier assemblage du génome du lapin, avec une couverture de 1.95X (OryCun1.0). Il couvrait 2.74 gigabases pour une taille estimée du génome de 2.8 gigabases (environ 3 gigabases pour le génome humain). Le lapin étant un animal d'intérêt notamment sur le plan biomédical, l'effort de séquençage a été poursuivi. La couverture initiale a été améliorée pour atteindre désormais une couverture de 6.55X (OryCun2.0)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=oryctolagus%20cuniculus>; Carneiro et al., 2014).

La séquence de référence pour le génome du lapin a été obtenue à partir d'une lapine Néozélandaise Blanche et est actuellement accessible sous l'identifiant GenBank GCA_000003625.1.

b. Annotation du génome

L'annotation du génome consiste à localiser des gènes, des régions codantes et non-codantes, et de leur associer une fonction biologique. En dépit de l'importance du lapin en tant qu'animal modèle pour la recherche, l'annotation de son génome est restée relativement peu travaillée jusqu'à ces dernières années. L'utilisation de nouvelles données d'expression et des annotations manuelles ont alors été effectués pour affiner l'annotation automatisée, basée sur des algorithmes, augmentant la fiabilité et la qualité de l'annotation. Ainsi, l'annotation de l'ensemble du génome lapin a été récemment améliorée par l'institut Broad, en combinant le pipeline d'annotation d'Ensembl (figure 12), des annotations manuelles et des données RNA-seq provenant de différents tissus : sang, cerveau, cœur, rein, foie, poumons, muscle squelettique, testicules, ovaires, glande mammaire, rate, placenta, PBMC et thymus. Cette nouvelle approche a permis de répertorier 19 118 gènes codant pour des protéines (confiance élevée), 881 gènes codant pour des protéines (confiance faible), 1 318 transcrits anti-sens épissés, 2 243 loci anti-sens non épissés, 2 746 gènes codant pour ARN long non-codant (confiance élevée) et 48 794 transcrits non-codant (confiance faible).

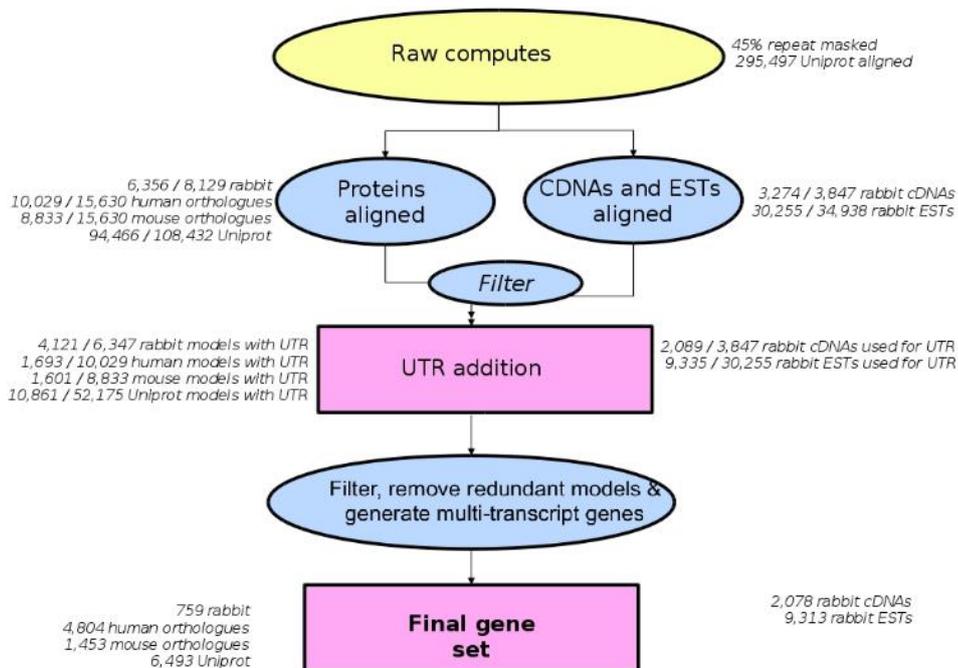


Figure 12 : Résumé du projet Ensembl sur l'annotation du génome lapin

http://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/2011_01_rabbit_genebuild.pdf

c. Le polymorphisme – cas des SNP

Le polymorphisme génétique se définit par l'existence de plusieurs allèles (formes différentes d'une même séquence) au sein d'une population. Les SNP (pour *Single Nucleotide Polymorphism*) correspondent à une variation d'un seul nucléotide (figure 13) et sont actuellement les marqueurs génétiques les plus utilisés en cartographie et analyses d'association, de par leur répartition sur l'ensemble du génome et leur fréquence (en moyenne un SNP tous les 100 à 1000 nucléotides).

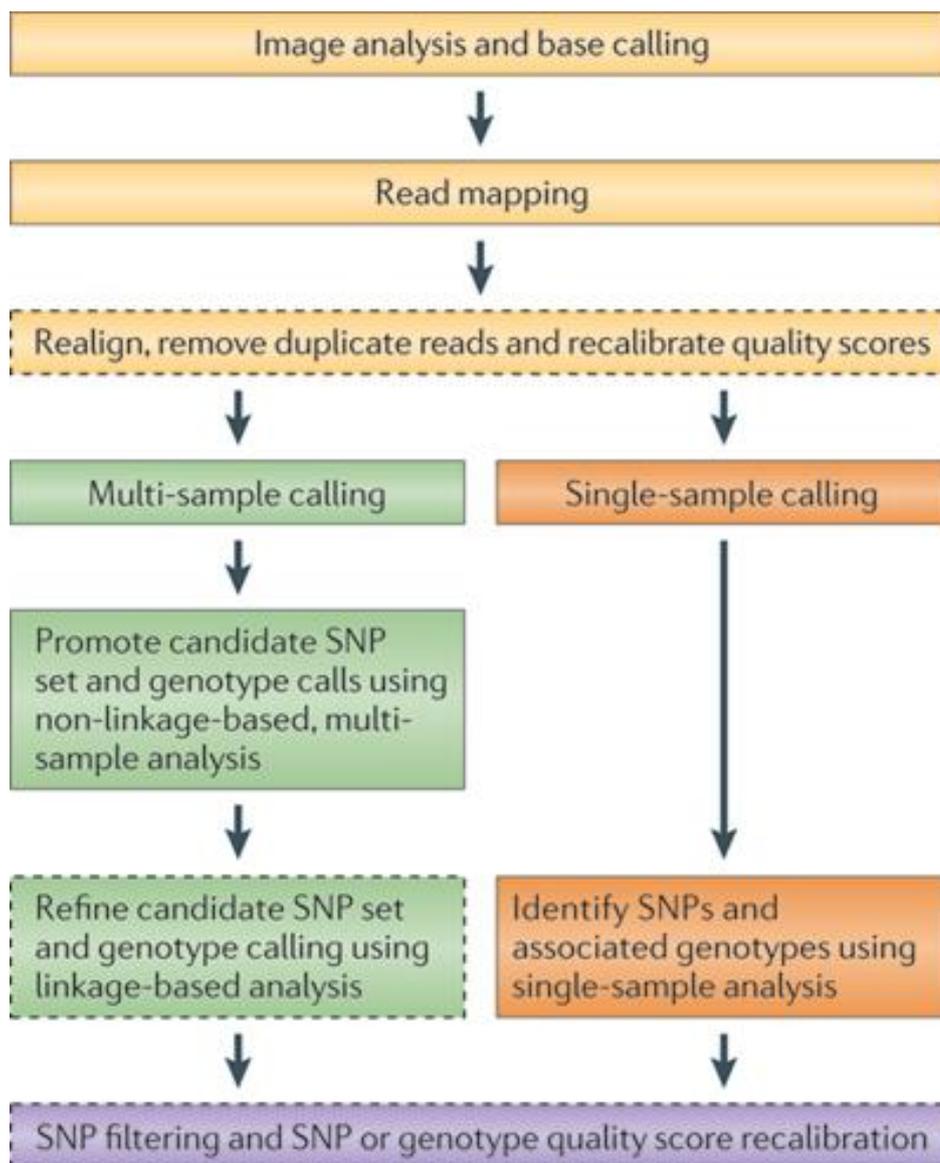


Figure 13 : Etapes pour convertir les données de séquençage de nouvelle génération en SNP ou génotype (d'après Nielsen et al., 2011)

Le lapin est l'un des mammifères les plus polymorphes séquencés à ce jour (Carneiro et al., 2014). Ainsi, il a été identifié près de 51 millions de SNP de haute qualité, ce qui représente environ 1 SNP tous les 55 nucléotides en moyenne. Cette quantité de SNP dépasse largement celle observée chez l'homme (38 millions) lors du séquençage de 1092 génomes humains. La communauté scientifique européenne, rassemblée en réseau COST (<http://www.biocomp.unibo.it/rabbit/>) s'intéresse actuellement au design d'une puce SNP lapin d'une densité d'environ 200 000 SNP. Les SNP sélectionnés sont répartis sur tout le génome, sans à priori sur les fonctions biologiques associées.

2. Transcriptomique

Le transcriptome est l'ensemble des transcrits au sein d'une cellule, à un état physiologique ou un stade de développement spécifique. Les informations fournies par le transcriptome sont essentielles pour l'interprétation des éléments fonctionnels du génome, ainsi que pour la compréhension des différences entre conditions physiologiques contrastées. Les principaux objectifs de l'étude du transcriptome sont : de cataloguer toutes les sortes de transcrits (incluant les ARNm, les ARN non-codant et les petits ARN), de déterminer les éléments de transcription des gènes (sites d'initiation, d'épissage ou modifications post-transcriptionnelles), et de quantifier les changements de niveaux d'expression de chaque transcrit pour chacune des conditions biologiques étudiées. Il existe actuellement différents outils permettant l'étude du transcriptome, tels que les puces à ADN ou le séquençage ARN (RNAseq).

a. Puce à ADN : microarray

Les puces à ADN, également appelés biopuces ou microarrays, sont des outils de génomique permettant de mesurer l'expression d'un panel de gènes. Le microarray doit ses origines aux travaux du professeur britannique Edwin Mellor Southern, de l'université d'Oxford, avec la mise au point en 1975 de la technique du *Southern Blot*. Il faudra ensuite attendre 1994 pour voir apparaître l'un des tous premiers microarrays commercialisé par Affymetrix sous la marque GeneChip®. D'autres fabricants tels que Agilent ou Illumina ont également su s'imposer sur le marché des biopuces.

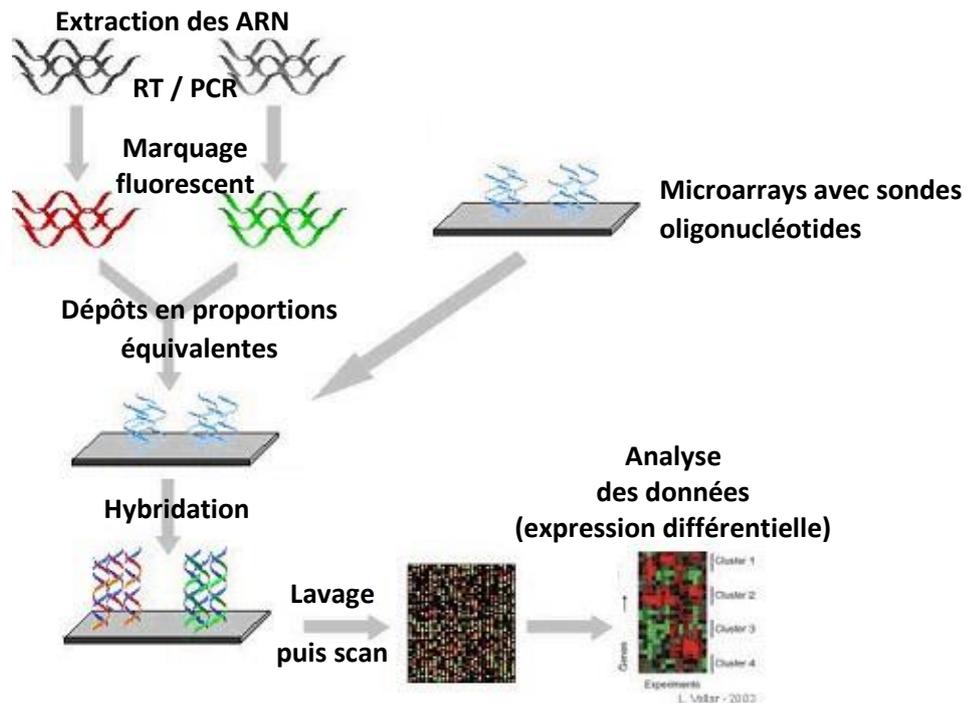


Figure 14 : Représentation schématique d'une expérimentation microarray bi-couleur

La méthode la plus couramment utilisée pour la fabrication des microarrays consiste en la synthèse *in situ* d'oligonucléotides sur des lames en verre spécialement préparées. Ce procédé de synthèse imprime des brins monocaténaire d'ADN, communément appelés « sondes ». Cette méthode permet ainsi de déposer jusqu'à 300 000 sondes dans le cas des microarrays Affymetrix humains. Pour le lapin, il est actuellement possible d'obtenir des microarrays avec une résolution allant jusqu'à 60K (60 000 sondes avec des tailles d'environ 60 nucléotides) avec la technologie Agilent (disponible à partir de l'identifiant de Gene Expression Omnibus : GPL18913). Avec la technologie Agilent, des lames permettant l'hybridation simultanée de huit échantillons sont disponibles. Les différentes étapes d'une expérimentation avec microarrays sont récapitulées dans la figure 14.

b. Le séquençage d'ARN : RNAseq

Une autre possibilité d'étudier le transcriptome est le séquençage de l'ARN (RNAseq), également appelé « Whole Transcriptome Shotgun Sequencing ». Il s'agit d'une méthode récente permettant d'établir un profil complet du transcriptome, par séquençage haut débit. En général, une population d'ARN (total ou fractionné, comme les poly(A)+) est convertie en une banque de fragments d'ADNc avec des adaptateurs fixés à une ou aux deux extrémités.

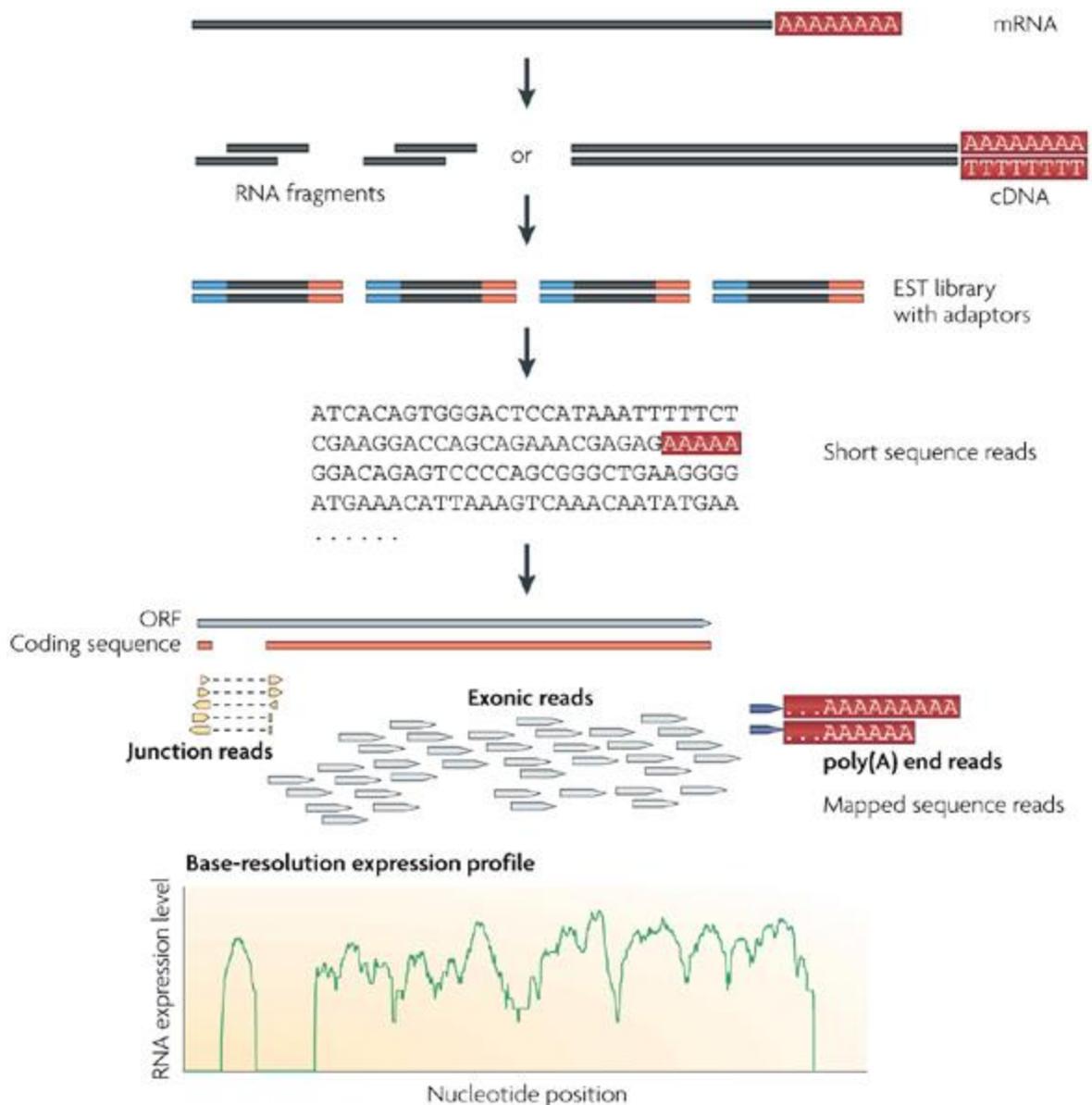


Figure 15 : Représentation schématique du principe de séquençage d'ARN (d'après Wang et al., 2009)

Les ADNc, avec ou sans amplification, sont ensuite séquençés à l'aide de technologies de séquençage à haut débit (Illumina, Roche 454 Life Science, Ion Torrent ou Applied Biosystems SOLiD), permettant ainsi d'obtenir des séquences de 30 à 400 bases selon les technologies, à une ou deux extrémités. Les séquences obtenues (reads) sont soit alignées sur la séquence de référence ou assemblées *de novo* sans la séquence génomique, permettant d'établir des cartes de transcription à l'échelle du génome entier et de quantifier des différentiels d'expression (figure 15). Les séquences générées permettent également de renseigner les polymorphismes, notamment via la détection de SNP, et des expressions spécifiques d'allèles.

c. Microarray vs. RNAseq : des complémentarités

Il est tout d'abord important de rappeler que ces deux technologies permettent d'obtenir des résultats ayant une reproductibilité élevée, avec des corrélations supérieures à 0,99.

A l'heure actuelle, un des premiers avantages conféré au microarray est son coût relativement faible par rapport au RNAseq. En 2011, il fallait compter environ 75 euros par échantillon analysé avec une puce ADN contre près de 750 euros pour le RNAseq, soit 10 fois plus cher que le microarray (Malone et Oliver, 2011). Bien que le coût du séquençage ait fortement diminué ces dernières années, cette différence reste néanmoins présente et est loin d'être négligeable.

Les analyses transcriptomiques par microarray présentent l'avantage d'être rapide, puisqu'il est possible d'obtenir les résultats d'expression seulement 2 jours après l'obtention des ARN. Les microarrays permettent également d'analyser des nombres très élevés d'échantillons (propice aux approches eQTL) contrairement au RNAseq.

Les puces tirent également profit de leur ancienneté puisque les différents biais inhérents à cette technique sont maintenant connus (variabilité entre les appareils de lecture de la fluorescence, dégradation de la fluorescence par l'ozone, etc...) et des solutions analytiques performantes ont été développées. Le RNAseq ne bénéficie pas de la même ancienneté et certains biais restent encore à élucider.

Cependant, les puces ADN n'apportent qu'une information qualitative (variation d'expression du gène). Il est alors difficile de quantifier avec précision l'expression d'un gène contrairement aux données obtenues par RNAseq. Le RNAseq permettent d'obtenir des informations de manière quasi-exhaustive et permet l'identification de nouveaux gènes, transcrits alternatifs, ou encore petits ARNs.

3. Protéomique et Métabolomique

La protéomique est l'étude de l'ensemble des protéines (protéome) exprimées dans un organite, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme à un temps donné et dans des conditions données. La protéomique permet une analyse quantitative des protéomes, mais également qualitative, avec l'identification des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles (figure 16). L'intérêt de la protéomique par rapport à l'analyse transcriptomique est qu'elle permet de statuer sur la production de protéines fonctionnelles et sur leur quantité.

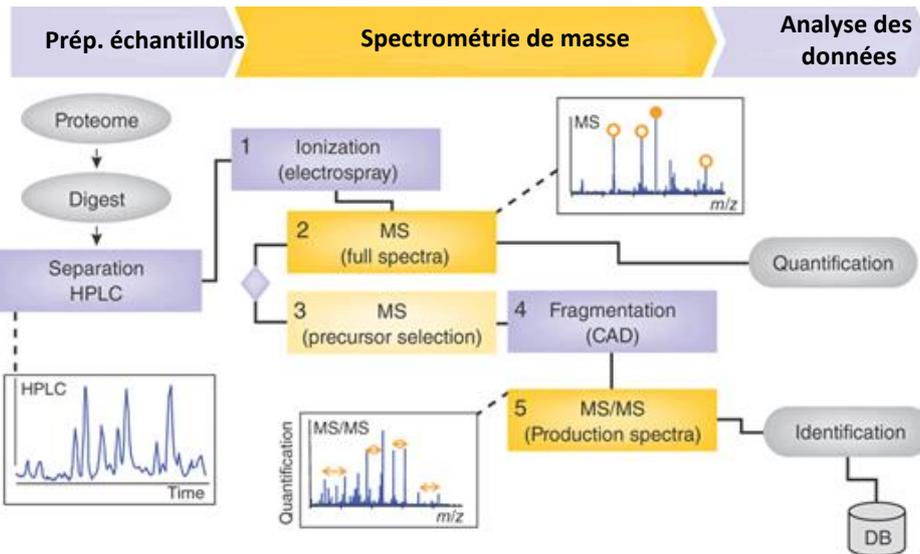


Figure 16 : Représentation schématique d'une expérimentation protéomique (d'après Domon et Aebersold, 2010)

La métabolomique est une démarche qui utilise des méthodes analytiques utilisées en conjonction avec des outils chimiométriques pour la détection des métabolites, le suivi de leur évolution et la détermination de signatures métaboliques spécifiques d'un état biologique (figure 17). Ainsi, elle porte sur l'identification et la quantification exhaustive et non sélective de tous les métabolites d'un système biologique (Fiehn et al., 2000), tels que les acides aminés, les lipides, les acides gras, les sucres ou les vitamines (petites molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 1000 Daltons). Le métabolome, qui correspond à l'ensemble des métabolites, peut alors être considéré comme le point terminal physiologique des produits du génome, du transcriptome et du protéome.

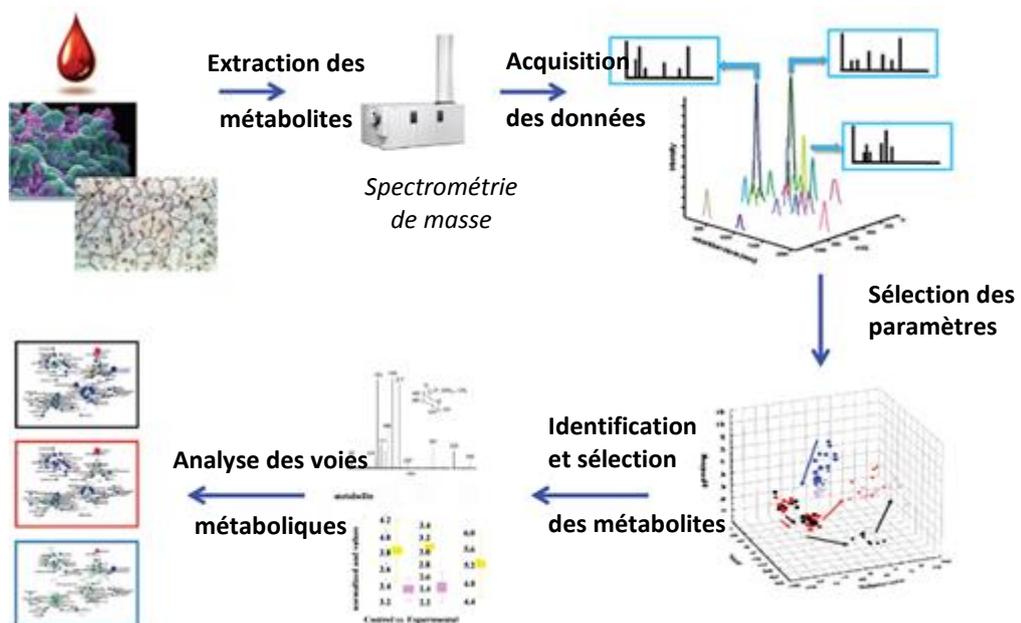


Figure 17 : Représentation schématique d'une expérimentation métabolomique

II. Le microbiote

1. Caractérisation par empreinte moléculaire

Le microbiote digestif a été largement étudié à l'aide de méthodes d'empreintes moléculaires, qui présentent l'intérêt d'être bon marché et de fournir rapidement une image représentative de l'ensemble des communautés bactériennes présentes. Ces méthodes se basent sur la mise en évidence de la variabilité de longueur et/ou de composition des amplicons d'un marqueur de diversité tel que l'ARNr 16S. Le tableau 3 récapitule les principales méthodes d'empreintes moléculaires. Bien qu'encore très utilisées, ces méthodes ne mesurent pas suffisamment les organismes présents en faible abondance (Bent et al., 2007). On assiste cependant à l'essor de nouvelles techniques de caractérisation du microbiote basées sur le séquençage à haut-débit.

2. Essor de la métagénomique

Le terme « métagénomique » a été inventé par Handelsman et al. (1998) pour étudier les génomes d'un ensemble de bactéries dans un environnement particulier, par opposition au génome d'une seule espèce bactérienne, isolée de son environnement et cultivée *in vitro*.

La métagénomique a pour objectif d'analyser l'ensemble du contenu bactérien du microbiote par séquençage, permettant ainsi d'avoir des informations sur la partie cultivable mais également non cultivable des bactéries (70 à 90% des bactéries du tube digestif ne sont pas cultivables). L'accès à la portion non cultivable des bactéries constitue une sorte de révolution en termes de connaissances. Les approches de méta-génomique constituent des avancées majeures pour explorer les différents écosystèmes microbiens, comme par exemple, la flore gastro-intestinale des animaux d'élevage.

a. A partir de l'ARN 16S : métagénomique monogénique

Actuellement, la manière la plus répandue d'estimer le contenu taxonomique d'une communauté bactérienne est d'utiliser des marqueurs phylogénétiques comme le gène codant pour l'ARNr 16S. Les séquences d'ARNr 16S sont regroupées entre elles en unités taxonomiques opérationnelles (OTU). Une OTU est donc un regroupement de bactéries appartenant à une même espèce dont les séquences d'ARNr 16S présentent une similitude de plus de 97,5%. Cette standardisation internationale permet à des chercheurs d'une même discipline de comparer leurs résultats, mais elle n'a pas forcément une signification biologique et d'autres valeurs de similitude ont été proposées. Une séquence de gène de l'ARNr 16S d'environ 1,5kb possède neuf régions hypervariables courtes qui permettent de distinguer différents taxons bactériens.

Tableau 3 : Comparaison des méthodes d'empreintes moléculaire pour la caractérisation des écosystèmes microbiens (d'après Michelland, 2009).

| Méthodes | Migration | Détection du polymorphisme des amplicons | Identification des espèces | Enzymes de restriction | Etude sur le microbiote digestif |
|------------------|------------|---|----------------------------|------------------------|--|
| DGGE, TGGE, TTGE | Gel | Composition en acide nucléique | Oui (séquençage) | Non | Kocherginskaya et al., 2001 ; Simpson et al., 1999 |
| T-RFLP | Capillaire | Longueur de l'amplicon | Oui | Oui | Nagashima et al., 2003 ; Kaplan et al., 2001 |
| CE-SSCP | Capillaire | Longueur de l'amplicon + composition en acide nucléique | Non | Non | Michelland et al., 2010 ; Tatsuoka et al., 2007 |
| AFLP | Gel | Longueur de l'amplicon | Oui (séquençage) | Oui | Booijink et al., 2010 |
| ARISA | capillaire | Longueur de l'amplicon | non | non | Sundset et al., 2008 ; Scupham, 2007 |

DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ; TGGE : Temporal Gradient Gel Electrophoresis ; TTGE : Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism ; CE-SSCP : Capillary Electrophoresis Single-Stranded Conformation Polymorphism ; AFLP : Amplified Fragment-Length Polymorphism ; ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis.

Avant l'introduction de méthodes de séquençage à haut débit, l'approche utilisée consistait à cloner les gènes codant pour l'ARNr 16S, qui étaient ensuite séquencés par la méthode de Sanger (Martin, 1989), avec des fragments de 100pb. Celle-ci permettait d'identifier les organismes majoritaires au sein d'une communauté, mais l'analyse des organismes moins abondants était limitée. La technique 454 basée sur du pyroséquençage - initialement développée en 1993 (Nyren et al., 1993) puis commercialisée quelques années plus tard par Life Technologies (Ronaghi et al., 1996) - a ensuite pris le relais et permis d'obtenir des fragments plus longs (400bp) tout en réduisant les coûts, mais en acceptant une perte de sensibilité puisqu'une seule région hypervariable ne pouvait être à l'origine séquencée. Par la suite, cette technique a gagné en

sensibilité avec la possibilité de séquencer plusieurs régions hypervariables (Claesson et al., 2010 ; Combes et al., 2014). A partir de 2009, la technologie Illumina a commencé à être utilisée dans plusieurs projets métagénomiques (Lazaveric et al., 2009 ; Claesson et al., 2010 ; Gloor et al., 2010). En raison de l'augmentation exceptionnelle du nombre de séquences produites et de leurs longueurs, de l'amélioration de la sensibilité et de la baisse des coûts associés à la technologie Illumina, elle a su s'imposer pour caractériser les microbiotes à partir de l'ARNr 16S.

b. Approche métagénomique globale

Le séquençage aléatoire global du génome est de plus en plus reconnu comme l'approche la plus complète et la plus robuste pour les études de métagénomique. Des catalogues de gènes microbiens ont ainsi été constitués chez l'homme (projet Metahit ; Li et al., 2014) et sont en cours chez le porc (microbiote intestinal) ou la vache (microbiote du rumen). Ce type de séquençage commence d'ailleurs à être utilisé en routine dans certains domaines, comme pour la microbiologie clinique (Hasman et al., 2014). En comparaison de l'approche 16S, il offre la possibilité d'identifier et de caractériser de nouveaux microorganismes, ou d'estimer les activités des voies métaboliques. Plusieurs projets métagénomiques de grande envergure utilisant cette approche ont été récemment menés ou sont actuellement en cours. Avec la génération de grandes quantités de données, la bioinformatique et l'analyse computationnelle deviennent essentiels pour mener à bien ces projets. Cependant, le nombre très important de données générées vient complexifier les analyses qui s'ensuivent (comprenant l'assemblage du métagénome, la prédiction de gènes, l'identification taxonomique, l'annotation fonctionnelle et les voies de signalisation). De puissants algorithmes et d'autres outils ont été développés spécifiquement pour traiter ces données, dans l'espoir de réduire les temps de calcul et les besoins en stockage (Ma et al., 2014). A l'heure actuelle, la technologie Illumina (MiSeq) est très bien implantée, même si on assiste à la montée en puissance du Ion Torrent, moins cher et tout aussi performant (tableau 4). Le choix du séquenceur reste néanmoins dépendant du type d'analyse effectué.

Tableau 4 : Comparatifs des trois principaux séquenceurs utilisés en métagénomique (d'après Quail et al., 2012 et Loman et al., 2012).

| | 454 GS Junior | Ion Torrent PGM | MiSeq |
|-------------------------|----------------------|--|----------------|
| Coût du séquenceur | 83 000 € | 62 000 € | 96 000 € |
| Coût / run | 850 € | 175 € (314 chip) 330 € (316 chip) 485 € (318 chip) | 580 € |
| Débit minimal | 35 Mb | 10 Mb (314 chip) 100 Mb (316 chip) 1 000 Mb (318 chip) | 1 500 Mb |
| Longueurs des séquences | 400 bases | 100 bases | 2 x 150 bases* |
| Durée / run | 8 h | 3 h | 27 h |
| Coût / Mb | 24 € | 17 € (314 chip) 3 € (316 chip) 0.5 € (318 chip) | 0.4 € |
| % d'erreur | < 1% | 10% | < 1% |

*Ces données ont été obtenues en 2012 et sont susceptibles d'avoir évoluées depuis cette date, comme celles relatives aux coûts ou à la longueur des séquences (Pour MiSeq en 2014 : jusqu'à 2 x 300 bases).

Il n'existe actuellement aucun frein technologique pour l'étude du génome du lapin et de son métagénome. Des outils performants existent déjà, et il y a de plus une volonté marquée de la communauté scientifique cunicole pour en développer de nouveaux et rattraper ainsi son retard par rapport à d'autres espèces d'élevage (vache, porc, ...).

OBJECTIFS ET ETUDE EXPERIMENTALE

L'introduction bibliographique nous a permis de constater que plusieurs études se sont intéressées au rôle des fibres dans l'alimentation du lapin, particulièrement après le sevrage. Les FRF, qui correspondent à l'ensemble des fibres solubles (pectines, béta-glucanes, ...), ont encore été peu étudiées chez le jeune lapin, notamment en termes de santé digestive et d'activité fermentaire caecale. Ces effets n'ont à notre connaissance jamais été mesurés lorsque l'aliment est distribué avant sevrage. C'est donc ce type de fibres que nous allons exploiter comme levier d'action pour stimuler précocement le microbiote digestif.

Nous avons aussi montré que les écosystèmes microbiens digestifs interagissent avec l'immunité digestive. Nous analyserons donc cette relation par des approches moléculaires, en étudiant l'influence de deux leviers d'action : un levier nutritionnel, basé sur l'ingestion précoce de fibres rapidement fermentescibles (FRF) par le lapereau, afin d'obtenir une activité accrue du microbiote caecal et qui permettrait de renforcer les défenses immunitaires ; et un levier « médicamenteux » basé sur l'usage d'une antibiothérapie préventive, en vue d'inhiber l'activité microbienne caecale et d'en mesurer l'impact sur la réponse immunitaire. Pour cela, de nouveaux outils de phénotypage moléculaire spécifiques sont nécessaires.

Pour étudier la réponse immunitaire, nous avons opté pour l'utilisation de microarray, de par le coût raisonnable et la possibilité de traiter un nombre d'échantillons non négligeable. Nous nous sommes appuyés sur la plateforme du CRB GADIE (<http://crb-gadie.inra.fr/>) et nous avons contribué à améliorer l'annotation d'une puce générique et à l'enrichir en gènes de la réponse immunitaires.

Au niveau de la caractérisation du microbiote caecal, nous avons la possibilité d'utiliser différentes technologies (SSCP, Roche 454 ou Illumina MiSeq). Nous avons alors opté pour le séquençage MiSeq, compte-tenu des performances technologiques que procure cette nouvelle technologie, notamment au niveau du nombre de séquences produites. Cela nous permet ainsi d'affiner les connaissances sur la composition taxonomique du microbiote.

Les objectifs du travail sont :

- 1) Caractériser la réponse zootechnique (croissance et santé) et les paramètres fermentaires du caecum chez le jeune lapin à la suite d'une incorporation de fibres rapidement fermentescibles (FRF) par rapport à un aliment standard (C) et un aliment standard avec antibiotiques (C+AB).

- 2) Améliorer une version existante d'un microarray afin de mesurer efficacement la réponse immunitaire d'un lapin.
- 3) Caractériser la réponse immunitaire, avec une approche transcriptomique, des lapereaux des groupes FRF, C et C+AB.
- 4) Caractériser les écosystèmes microbiens du caecum de ces mêmes lapereaux, avec une approche méta-monogénique.

Plus largement, et au regard des éléments précédents, notre travail de thèse propose de contribuer à l'apport de connaissances sur les interactions entre l'implantation du microbiote et la maturation du système immunitaire chez le lapereau. Il se propose aussi de contribuer à l'élaboration de nouvelles stratégies nutritionnelles chez le jeune lapin avant le sevrage, en vue d'améliorer sa santé digestive.

Pour répondre à ces objectifs, une expérimentation a été mise en place sur des lapereaux à l'unité expérimentale PECTOUL de l'INRA d'Auzeville-Tolosane. Cette étude porte sur trois groupes distincts d'animaux (figure 18) ayant chacun une activité microbienne caecale supposée différente.

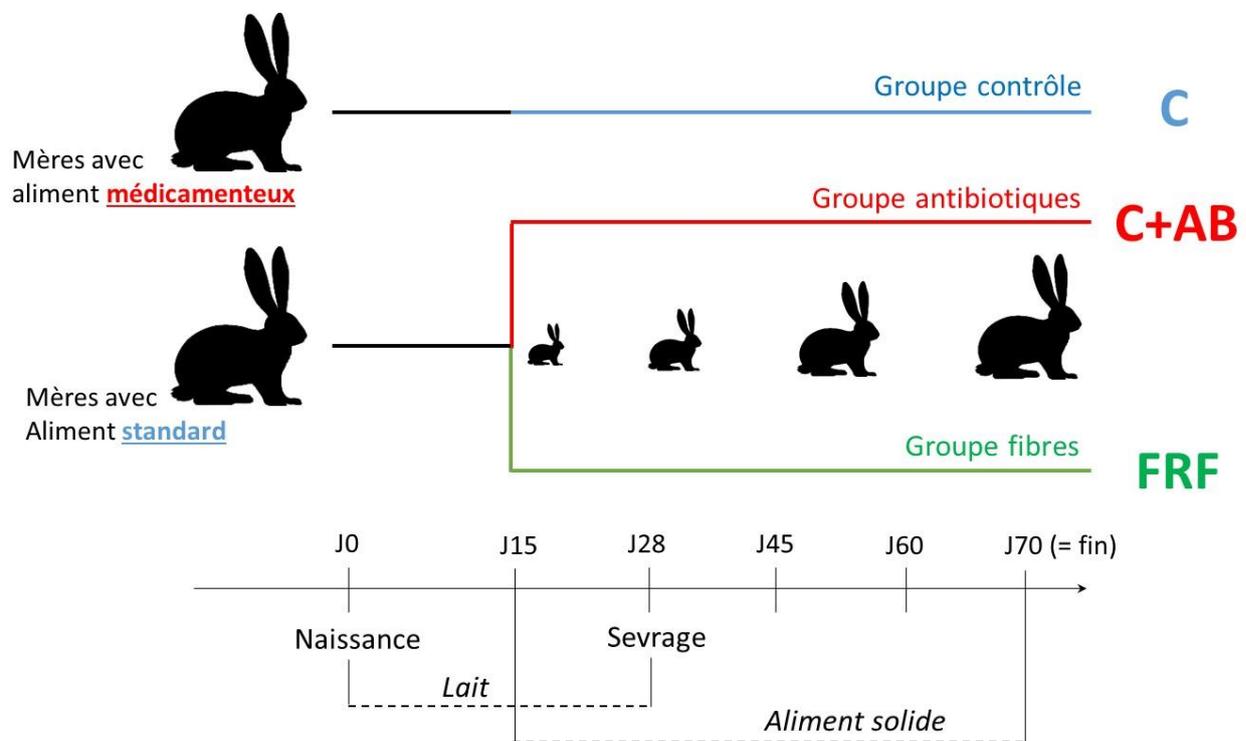


Figure 18 : Schéma simplifié de l'étude expérimentale

Le scénario « C » est celui classiquement observé en élevage cunicole. Les mères reçoivent un aliment standard avec antibiotiques (oxytétracycline 400 mg/kg et colistine 2,4 m UI/kg), tandis que leurs portées reçoivent un aliment expérimental dit « standard » dès 15 jours d'âge.

Pour les scénarii « C+AB » et « FRF », il s'agit là de conditions expérimentales où l'on a cherché à orienter négativement ou positivement les activités du microbiote caecal. Ainsi, les lapereaux du groupe C+AB ont reçu un aliment expérimental avec incorporation de tiamuline (100 ppm) et d'apramycine (32,5 ppm), censées inhiber l'activité du microbiote. Le groupe FRF à quant à lui reçu dès 15 jours un aliment enrichi en fibres rapidement fermentescibles (pulpe de betterave et marc de pomme) afin de stimuler la réponse du microbiote. Afin de ne pas interférer avec les résultats observés pour ces deux groupes, les mères de ces lapereaux ont reçu un aliment standard, sans antibiotique. Tous les lapereaux n'avaient pas accès à l'aliment de leur mère.

Les mesures in-vivo (poids des animaux, quantité d'aliment ingéré, nombre d'animaux morbides ou morts) et les prélèvements de contenu caecal issus de cette expérimentation nous ont tout d'abord permis d'obtenir des résultats sur les paramètres de croissance, d'ingestion, de santé, ainsi que sur l'activité microbienne du caecum (pH, NH₃, AGV, etc...). Dans un second temps, les prélèvements de sang et de tissu épithélial nous ont donné la possibilité de caractériser la réponse immunitaire des lapereaux âgés de 29 et 45 jours grâce à un microarray enrichi en gènes de l'immunité. Enfin, l'ADN 16S extrait des prélèvements de contenu caecal de ces mêmes animaux a été séquencé afin de caractériser le microbiote des lapereaux âgés de 15, 29 et 45 jours.

La suite de cette partie sera consacrée aux résultats de la thèse, présentés sous la forme d'articles (accepté, en révision ou en préparation).

MODULATION PRECOCE DE L'ACTIVITE MICROBIENNE CAECALE DU JEUNE LAPIN PAR L'INCORPORATION DE FIBRES RAPIDEMENT FERMENTESCIBLES

Journal of Animal Science, article accepté

V. Jacquier, S. Combes, I.P. Oswald, C. Rogel-Gaillard, T. Gidenne

Mots clés : Antibiotiques, activité caecale, santé digestive, paramètres de performance, lapin, fibres

Résumé

L'objectif de cette étude était de comparer différents régimes alimentaires censés induire des activités microbiennes caecales différentes chez le jeune lapin, nourri à volonté de 16 à 70 jours d'âge. Pour cela, nous avons formulé un premier régime expérimental enrichi en fibres rapidement fermentescibles (FRF), afin de stimuler la flore microbienne caecale. Un aliment expérimental de composition standard dans lequel ont été ajoutés des antibiotiques (tiamuline et apramycine) (C+AB) a été utilisé pour inhiber l'activité caecale. Enfin, un troisième groupe contrôle (C) n'a reçu que l'aliment standard (sans antibiotiques). Un total de 398 lapereaux issus de 42 portées et sevrés à 28 jours ont été utilisés dans cette expérimentation. Un essai de digestibilité a été réalisé sur 36 lapereaux âgés de 42 à 46 jours et logés dans des cages métaboliques individuelles. L'ingestion et la croissance ont été plus faibles pour le groupe FRF par rapport au groupe C+AB (-15% pour l'ingéré quotidien et -11% pour le GMQ, $P < 0,001$). Le poids final à 70 jours a également été plus faible de 183g pour les lapins FRF ($P < 0,001$). Aucune différence n'a été observée entre les groupes FRF et C pour le GMQ et le poids vif à 70 jours. Le régime FRF permet néanmoins un meilleur indice de consommation (IC) en post-sevrage ($P < 0,01$). La digestion des fibres solubles (TDF – NDF) a été meilleure pour le groupe FRF. Le régime médicamenteux C+AB a eu un effet positif sur le taux de morbidité en post-sevrage ($P > 0,05$), mais n'a pas impacté le taux de mortalité et l'index de risque sanitaire (morbidité + mortalité). Par opposition, l'aliment FRF tend à réduire le taux de mortalité lorsqu'il est comparé au groupe C+AB, particulièrement à 41 jours d'âge. En ce qui concerne l'activité microbienne caecale, une augmentation de la teneur en FRF dans l'aliment augmente les concentrations caecales en AGV totaux (+28% et +22% pour C+AB et C, $P < 0,001$) et diminue également le pH. Le profil fermentaire a été modifié à 45 et 60 jours pour le groupe FRF : +4% par rapport à C+AB et C pour l'acétate ($P < 0,001$), contre -3,6% et -5% par rapport à C+AB et C pour le butyrate ($P < 0,001$). L'addition d'antibiotiques (groupe C+AB) réduit les concentrations en AGV uniquement en post-sevrage (-25% à 45 jours), mais aucune modification du profil fermentaire n'est observée par rapport au groupe C. En conclusion, un apport précoce de FRF chez les jeunes lapins a permis de stimuler l'activité microbienne caecale, de réduire l'ingéré volontaire, permettant ainsi d'obtenir un meilleur IC.

- ARTICLE I -

EARLY MODULATION OF THE CECAL MICROBIAL ACTIVITY IN THE YOUNG
RABBIT WITH RAPIDLY FERMENTABLE FIBER: IMPACT ON HEALTH AND
GROWTH

V. Jacquier,*†‡ S. Combes,*†‡ I.P. Oswald, §# C. Rogel-Gaillard, ||¶ and T. Gidenne*†‡

Journal of Animal Science, *accepted*

*INRA, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France; †Université de Toulouse INPT ENSAT, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31326 Castanet-Tolosan, France; ‡Université de Toulouse INPT ENVT, UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d’Elevage, F-31076 Toulouse, France; §INRA, UMR 1331 ToxAlim, Research Centre in Food Toxicology, F-31027 Toulouse Cedex 3, France; #Université de Toulouse INP, UMR 1331 ToxAlim, F-31000 Toulouse, France; ||INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350 Jouy-en-Josas, France; ¶AgroParisTech, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78350 Jouy-en-Josas, France

Running head: Early modulation of the rabbit cecal activity

Corresponding author: Thierry.gidenne@toulouse.inra.fr

I. Abstract

This study aimed at comparing various diets predicted to induce different stimulations of the cecal microbial activity of the young rabbit fed ad libitum from 16 to 70 d of age: i)- a diet enriched with rapidly fermentable fiber expected to stimulate the cecal microbial activity (RFF group); ii)- a control diet with a standard composition (C group); iii)- and the same control diet with tiamulin and apramycin antibiotics, expected to inhibit the microbial activity (C+AB group). A total of 398 rabbits were used from 42 litters and weaned at 28 d of age. An in vivo digestibility trial was performed on thirty six rabbits of 42 to 46 d of age housed in individual metabolic cages. The feed intake and growth rates were lower in the RFF group compared to the C+AB group (-15% in ADFI and -11% in ADG, $P < 0.001$), with a lower weight of -183g at 70 d ($P < 0.001$). No significant difference was found on ADG and final BW between the RFF and the C groups, but the RFF diet allowed a better G:F ratio at post-weaning ($P < 0.01$). The digestion of soluble fiber (Total dietary fiber minus NDF) was greater for the RFF group. The C+AB diet had a positive effect on the post-weaning morbidity rate ($P < 0.05$) but did not affect the mortality rate and the health risk index (morbidity and mortality). Conversely, the RFF diet appeared to reduce the mortality rate compared to the C+AB diet, especially before 41 d of age. Concerning the cecal microbial activity, a supply of RFF in the diet increased the cecal VFA concentrations (+28 % vs. C+AB and +22% vs. C, $P < 0.001$) and lowered the pH. The VFA pattern was affected at 45 and 60 d, with a dominance of acetate in the RFF group (+ 4% vs. C+AB and C groups, $P < 0.001$) instead of butyrate in the C+AB and C groups (-3.6% and -5% vs. C+AB and C respectively, $P < 0.001$). Antibiotics addition (C+AB group) reduced the VFA concentration, but only after weaning (-25% at 45d of age) without changing the fermentation pattern. In conclusion, early intake of RFF in young rabbits stimulated the cecal microbial activity, and reduced the voluntary feed intake leading to a reduced G:F ratio.

Keys words: antibiotics, cecal activity, digestive health, performance traits, rabbit, soluble fiber.

II. Introduction

Health preservation of the young is a major issue in livestock, more particularly for polytocous species, such as pigs or rabbits. Around weaning, the current goal is to promote growth and reduce health risks (digestive disorders), while reducing the use of drugs and taking into account that antibiotics as growth promoter has been banned in Europe since 2006. More and more cases of bacterial resistance to aminoglycoside and pleuromutilin antibiotics has appeared for several years, such as *Escherichia coli* in cattle and pigs in France (Chalus-Dancia et al., 1985), in the UK (Wray et al., 1986), and in the USA (Sayah et al., 2004). Strategies aiming at stimulating natural host defenses through the use of substances able to modulate immune functions have been proposed (Gallois et al., 2009). Another alternative is to stimulate the gastro-intestinal microbiota. High proportions of cell wall polysaccharides that are highly digested by the rabbit, such as hemicelluloses and water-insoluble pectin (called digestible fiber "DgF"), stimulated the cecal microbial activity and decreased frequency of diarrhea, possibly through a modulation of the immune status (Gidenne et al., 2004; Fortun-Lamothe and Boullier, 2007). DgF is now widely used in feed formulation to reduce the risk of diarrhea after weaning (Gidenne et al., 2010). In addition to DgF, other cell wall polysaccharides that are soluble in hot water may contribute to the health preservation of the young rabbit because they are rapidly fermented (Trocino et al., 2013), although they are found in small quantities in rabbit feeds (5 to 9%). The modulation of the microbiota and health status should be more effective if dietary change occurs as early as possible before weaning (Combes et al., 2013). Thus, our study has focused on early digestive and growth responses of the young rabbit, fed before weaning either a diet enriched with rapidly fermentable fiber (RFF) to stimulate activity of microbiota and immunity, or a standard diet referred to a control diet, or a medicated standard diet inhibiting the activity of the microbiota.

III. Materials and Methods

All animal housing and handling procedures complied with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 1988).

1. Diets

Two experimental diets were formulated with the aim to modulate the cecal microbial activity of the growing rabbit (Table 5). They were manufactured and pelleted (4mm diameter; Euronutrition, Souches, France). The diet enriched with rapidly fermentable fiber (RFF) was formulated to stimulate the microbial activity through a high supply of water soluble fiber and pectins from dehydrated alfalfa, beet pulp, and apple pomace. The control diet (C) corresponds to a standard diet with a relatively high level of low-digested fiber (ADF) and hemicelluloses, according to the fiber requirements of the growing rabbit (Gidenne et al., 2010).

The C+AB diet is the control diet with two antibiotics to inhibit the cecal bacterial activity. Antibiotics were tiamulin (100 ppm) and apramycin (32.5 ppm), usually used to prevent REE (rabbit epizootic enteropathy) around weaning. These diets were similar in terms of CP and NDF concentration. The sum of soluble fiber (that included the non-starch, non-NDF polysaccharides with soluble pectic substances, β -glucans, fructans, and gums) and water-insoluble pectin, referred to RFF, and was calculated by difference between total dietary fiber (TDF) and NDF (corrected for crude protein). The RFF diet contained nearly 6% more RFF than C+AB and C diets, while the starch level was about 7% lower. RFF level (soluble fiber and water insoluble pectins) has also been estimated with the NDSF method (Neutral detergent-soluble fiber; Hall et al., 1997). The NDSF level was about 5% greater in the RFF diet than in the C diet. The feeds were distributed ad libitum at an early age, from 16 to 70 d of age. Water was freely available throughout the study.

2. Animal and Housing

This experiment was conducted at the PECTOUL Experimental Unit (INRA, Toulouse, France). A total of 398 rabbits (INRA breed) of both sexes were used for this trial. Animals were born from 42 litters, and adjusted between 9 and 10 pups per litter at birth. The 2 days-old pups were allotted in three groups (n = 14 litters per group) and fed one of the experimental diet (n = 137 for RFF, n = 135 for C+AB, and n = 126 for C) from 16 to 70 d of age. The weight of does was assessed at 7, 14, and 28 d of age, and did not differ between groups ($4,747 \pm 363$ g, $5,023 \pm 358$ g, and $5,069 \pm 374$ g, respectively).

Table 5. Composition of the experimental diets

| Item | Experimental diets ¹ | | |
|--|---------------------------------|------|------|
| | RFF | C+AB | C |
| Ingredients, % as-fed | | | |
| Barley | 7.0 | 5.1 | 5.2 |
| Wheat | - | 10.3 | 10.4 |
| Sunflower meal | 15.7 | 17.4 | 17.5 |
| Soybean meal | 11.0 | 7.9 | 8.0 |
| Dehydrated alfalfa | 20.0 | 11.0 | 11.1 |
| Beet pulp | 20.0 | 2.7 | 2.8 |
| Wheat bran | 2.0 | 17.0 | 17.1 |
| Wheat straw | - | 9.0 | 9.1 |
| Apple pomace with pectins | 16.0 | - | - |
| Apple pomace without pectins | - | 12.0 | 12.0 |
| Soybean hulls | 4.4 | - | - |
| Cane molasses | 1.2 | 2.6 | 2.7 |
| Soybean oil | 0.8 | 1.7 | 1.7 |
| Calcium carbonate | - | 0.5 | 0.5 |
| Dicalcium phosphate | 0.7 | 0.4 | 0.5 |
| L-Lysine HCL, 98% | - | 0.2 | 0.2 |
| DL-methionine, 99% | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Mineral-vitamin premix ² | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Apramycin (100 ppm) ³ | - | 0.5 | - |
| Tiamulin (32.5 ppm) ⁴ | - | 0.5 | - |
| Analyzed composition | | | |
| DM, % | 88.5 | 88.0 | 88.0 |
| Ash, % DM | 7.3 | 6.4 | 6.2 |
| CP, % DM | 14.7 | 14.1 | 14.0 |
| Crude fat, % DM | 2.8 | 3.7 | 3.6 |
| Starch, % DM | 4.3 | 10.8 | 11.8 |
| NDF, % DM | 39.2 | 39.5 | 38.8 |
| ADF, % DM | 24.9 | 23.4 | 22.9 |
| Hemicelluloses, % DM | 14.3 | 16.1 | 15.8 |
| Total Dietary Fiber (TDF), % DM | 47.1 | 41.1 | 41.0 |
| TDF - NDF, % DM | 7.9 | 1.5 | 2.2 |
| Neutral detergent-soluble fiber (NDSF), % DM | 22.9 | 19.3 | 18.0 |

¹ RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

² Composition of vitamin and mineral supplement in 1kg: vitamin A 1,000,000 IU; vitamin D₃ 100,000 IU; alpha tocopherol 5,000 mg; vitamin B₁ 200 mg; vitamin K₃ 200 mg; vitamin C 25,000 mg; niacin amide 5,000 mg; choline 20,000 mg; iron 10,000 mg; cobalt 10 mg; copper 1,000 mg; manganese 500 mg; zinc 5,000 mg; selenium 20 mg.

³ Apramycin : apramycin sulfate (Apralan®, Lilly France)

⁴ Tiamulin : tiamulin fumarate (Tiamutine 6.5 Premix, CEVA France)

Does and litters were housed in specific wire cages (width: 61 x length: 68 x height: 35 cm) containing a nest box for pups (width: 39 x length: 27 x height: 35 cm) and maintained in a ventilated breeding unit with a 16 hour light schedule (0600 to 2200 h). Cages were organized to feed the does and pups different diets (Fortun-Lamothe et al., 2000). Rabbits were weaned at 28 d and kept in their cages until 70 d. Much attention was paid to manipulate young animals as less as possible before weaning to limit microbial contamination between litters commonly observed in commercial rabbit breeding. Live-weight measurements started only at weaning. Thirty six rabbits of 35 d of age (12 animals of both sexes per diet, 1 per litter) were randomly assigned into individual metabolic cages (0.2 m² per rabbit) for an in vivo digestibility assay, according to Perez et al. (1995). After 1 week of adaptation to the new housing, the digestibility trial started at 42 d of age with a 4-d collection period.

3. Collection of Samples and Data

Animal performance (weight, growth, and ingestion) as well as morbidity were measured weekly, and further grouped into three periods: from 28 to 42 d of age (28-42d), from 42 to 70 d of age (42-70d), and the whole period (28-70d). A rabbit with a digestive disorder such as mild diarrhea, severe diarrhea or bloating (usually without diarrhea) was considered as morbid. Abnormally lean animals were also recognized as morbid animals. Mortality was assessed daily. The Health Risk Index (HRI) includes dead and morbid animals, each rabbit being counted only once (morbid, or dead). In case of mortality, the remaining feed for the affected cage was weighed. A dead animal was considered not to have consumed any feed during the two days preceding its death. Thus, the feed consumed per animal was recalculated accordingly and the effective feed restriction per diet was obtained. The slaughter was carried out by electrical stunning and exsanguination for 1 rabbit from each litter at 29, 45, 60, and 70 d of age to sample cecal digesta, analyze the pH (Unitrode with Pt 1000; Metrohm, Herisau, Switzerland), and the microbial activity (VFA, NH₃, %DM). The weights of empty cecum and of cecal contents were also determined. For the digestibility trial, feces were collected and analyzed individually. The number of animals available for measurements decreased with time, due to sampling for each slaughter.

4. Analytical Methods

The following chemical analyses were performed at UMR 1289 TANDEM on diets and feces according to ISO methods and considering the recommendations of the European Group on Rabbit Nutrition (EGRAN, 2001): DM (ISO 6496, 1999), OM, CP (N × 6.25, Dumas method, ISO 16634, 2004), crude ash (ISO 5984, 2002), and energy with adiabatic calorimeter (PARR, Moline, IL, USA) (ISO 9831, 1998). Measurements of fiber fractions (NDF and ADF) in diets were made according

to the sequential procedure of Van Soest et al., (1991), and using an amylolytic pre-treatment with a thermostable amylase (AFNOR, 1997; ISO 16472, 2007 and ISO 13906, 2008). The neutral NDSF was estimated according to the method of Hall et al. (1997). The TDF was also determined (Method 985.29; AOAC International, 2007). Starch in the feed was hydrolyzed enzymatically and the resulting released glucose was measured using the hexokinase glucose-6-phosphate dehydrogenase system (D-Glucose[®], Boehringer, Mannheim, Germany). Nitrogen levels were determined in feeds and feces according to the Dumas combustion method using the Leco auto-analyser (model FP-428, Leco Corp., St Joseph, MI, USA) and converted to crude protein ($N \times 6.25$). Crude fat determination was performed using the Soxtec system H+ (after acid hydrolysis pre-treatment) according to the method described by Alstin and Nilsson (1990). The ammonia-nitrogen concentration in the cecal digesta was measured according to the procedure of Verdouw et al. (1977) using an auto-analyzer (Technicon, Domont, France). The VFA concentrations were determined by gas chromatography (CP9000, Chrompack, Middelburg, Netherlands).

5. Statistical Analysis

All statistical analyses were carried out using R version 3.0.1 (R Development Core Team, 2013). Fecal digestibility parameters (OM, CP, GE, NDF, ADF, and hemicelluloses) were treated in a linear one-factor model (the group). ADFI, ADG and G:F ratio were obtained by litters and treated according to a linear one-factor model (the group), with consideration of the weaning weight as a covariate. A Post-hoc pairwise comparison was performed for significant results with a Bonferroni adjustment. The mortality and morbidity rates and the HRI were analyzed by a chi-square test. Variables of microbial activity (pH, NH₃, and VFA concentrations and profiles) and cecal parameters (empty weight, weight of content, and DM) were obtained individually and analyzed using a linear two-factor (age and group) model. Then a Tukey's HSD test was used to determine where among the factor levels the differences occurred.

IV. Results

1. Nutrient Digestion

As expected, the whole tract digestibility of fiber fractions was improved with the RFF diet compared to C+AB and C diets (+5.4 and +7.5% for NDF resp., +3.7 and +8.5% for ADF, +11.9 and +9.9% for hemicelluloses, $P < 0.001$) (Table 6). In contrast, the digestibility of CP was about 7 and 5% lower for RFF diet ($P < 0.001$) compared to C+AB and C diets, respectively. Slight variations were observed for the digestibility of GE and OM, although the addition of antibiotics induced a greater digestion of the control diet (+2.5 %). Consequently, the DE content of the diets were 9.79, 10.13, and 9.71 MJ.kg⁻¹ for RFF, C+AB, and C, respectively. Whereas the digestible CP content were 104, 110, and 106 g.kg⁻¹, respectively.

Table 6. Fecal digestibility according to addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet

| Item, % | Experimental diets ¹ | | | SEM ² | P-value |
|----------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------|
| | RFF ¹ | C+AB | C | | |
| OM | 59.4 ^{ab} | 60.0 ^b | 57.6 ^a | 0.38 | 0.024 |
| CP | 70.8 ^a | 77.7 ^b | 75.6 ^b | 0.63 | <0.001 |
| GE | 58.7 ^{ab} | 60.1 ^b | 57.7 ^a | 0.37 | 0.019 |
| NDF | 35.0 ^b | 29.6 ^a | 27.5 ^a | 0.75 | <0.001 |
| ADF | 21.0 ^b | 17.3 ^b | 12.5 ^a | 0.95 | <0.001 |
| Hemicelluloses | 59.3 ^b | 47.4 ^a | 49.4 ^a | 1.41 | <0.001 |

¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

²n = 10 for C+AB and C, and n = 9 for RFF.

^{a, b}Within a row, means without a common superscript differ ($P < 0.05$).

2. Growth and Feed Intake Parameters

Over the whole fattening period (28-70d) the growth performances were high, with an average daily gain of over 44 g·d⁻¹, and over 50 g·d⁻¹ after weaning (28-42d). The post-weaning feed intake in the RFF group was 15 % lower on average than in the 2 other groups (Table 7), while the greatest intake was recorded for the C+AB group. Therefore, despite a greater content in NDSF and TDF for the RFF diet, the amount of ingested TDF was similar for the three groups (49 g·d⁻¹ for 28-70d old). However as expected, the amount of ingested RFF (estimated from TDF minus NDF) was nearly four times greater for RFF rabbits (8.2 g·d⁻¹ for 28-70d) than for the 2 other groups (2.1 g·d⁻¹).

Table 7. Performance traits of rabbits including ADFI, BW, ADG and G:F after weaning, according to addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet.

| Item | Experimental diets ¹ | | | SEM ² | P-value |
|------------------------|---------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------|
| | RFF | C+AB | C | | |
| ADFI, g | | | | | |
| d 28 to 42 | 87.3 ^a | 104.6 ^b | 97.9 ^{ab} | 2.35 | < 0.01 |
| d 42 to 70 | 132.2 ^a | 153.5 ^b | 151.1 ^b | 2.80 | < 0.01 |
| d 28 to 70 | 117.2 ^a | 137.2 ^b | 133.3 ^b | 2.33 | < 0.001 |
| BW, g | | | | | |
| d 28 | 630 ^a | 608 ^a | 577 ^b | 4.80 | < 0.001 |
| d 42 ³ | 1331 ^{ab} | 1390 ^b | 1302 ^a | 11.64 | < 0.01 |
| d 70 ³ | 2479 ^a | 2662 ^b | 2532 ^a | 21.18 | < 0.01 |
| ADG, g | | | | | |
| d 28 to 42 | 50.2 ^a | 56.5 ^b | 52.3 ^{ab} | 1.03 | 0.034 |
| d 42 to 70 | 42.4 ^a | 46.4 ^b | 44.1 ^{ab} | 0.57 | 0.012 |
| d 28 to 70 | 44.3 ^a | 49.6 ^b | 46.8 ^{ab} | 0.64 | < 0.01 |
| G:F, g·g ⁻¹ | | | | | |
| d 28 to 42 | 1.74 ^a | 1.85 ^b | 1.88 ^b | 0.02 | < 0.01 |
| d 42 to 70 | 3.12 | 3.30 | 3.43 | 0.05 | 0.058 |
| d 28 to 70 | 2.65 | 2.77 | 2.85 | 0.03 | 0.082 |

¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

²The data are processed collectively for ADFI, ADG and G:F with an average of 329 rabbits between 28 and 42 d, 229 rabbits between 42 and 70, and an average of 263 rabbits for the whole period. For the BW, data are processed individually, with 398 rabbits at d 28, 306 rabbits at d 42 and 163 rabbits at the end of the experiment (d 70). The decrease in the number of rabbits over time is due to slaughtering of rabbits (d 29, 45, 60, and 70), reducing the number of animals available for these measurements.

³The BW at 28 d of age was used as a covariate.

^{a, b}Within a row, means without a common superscript differ ($P < 0.05$).

During the course of the experiment (28-70d), the DE (-17% vs. C+AB and -11% vs. C, $P < 0.001$) and the CP intake (-15% vs. C+AB and -12% vs. C, $P < 0.001$) were lower for RFF group compared to the 2 other groups. The daily gain of the RFF group did not significantly differ from that of the control and was about 8 % lower than that of the C+AB group, leading to a 190g lower body weight ($P < 0.05$). Finally, G:F ratio was reduced by the addition of RFF, and particularly during the post-weaning period, from weaning to 42 d of age (-6 and -8% for RFF compared to C+AB and C, respectively).

3. Health Status

The mortality before weaning was very low (<4%) and did not differ between groups : from birth to weaning, we recorded only 5, 6, and 5 dead pups for RFF, C+AB, and C, respectively. After weaning, the overall mortality rate remained below 14% and did not differ between the three groups (Table 8). However, the mortality kinetics differed according to the diet during the post-

weaning phase: at 41 d of age, the number of dead rabbits being lower ($P = 0.05$) for diets without antibiotics (RFF and C; 1 and 2 dead rabbits, respectively) compared to C+AB group (6 dead rabbits). In addition, from 28 to 45 d of age, mortality was recorded in only 1 litter out of 14 in the RFF group, whereas mortality was detected in 3 and 4 litters in C+AB and C groups, respectively. Morbidity rate was similar between RFF and C groups, and was greater after weaning. The addition of antibiotic to the diet has resulted in a lower morbidity rate, particularly after weaning, between 28 and 42 d of age (-9% on average, $P < 0.05$). Accordingly, the HRI was not significantly affected by the diet or antibiotic addition at any age.

Table 8. Health status of rabbits (%)¹, according to addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet

| Item | Experimental diets ¹ | | | P-value |
|------------------------|---------------------------------|------------------------|-------------------------|---------|
| | RFF | C+AB | C | |
| Mortality | | | | |
| d 28 to 42 | 1.8 (114) | 6.4 (112) | 4.0 (103) | 0.26 |
| d 42 to 70 | 8.7 (82) | 10.5 (77) | 4.4 (70) | 0.60 |
| d 28 to 70 | 9.7 (93) | 13.5 (89) | 8.6 (81) | 0.55 |
| Morbidity | | | | |
| d 28 to 42 | 9.8 (114) ^a | 0.9 (112) ^b | 10.9 (103) ^a | 0.038 |
| d 42 to 70 | 7.5 (82) | 2.6 (77) | 3.0 (70) | 0.29 |
| d 28 to 70 | 18.3 (93) ^a | 3.4 (89) ^b | 16.0 (81) ^a | 0.015 |
| HRI³ | | | | |
| d 28 to 42 | 11.6 (114) | 7.3 (112) | 14.8 (103) | 0.22 |
| d 42 to 70 | 16.2 (82) | 9.2 (77) | 7.5 (70) | 0.19 |
| d 28 to 70 | 25.8 (93) | 16.8 (89) | 22.2 (81) | 0.34 |

¹Average number of live rabbits during the period is given in parentheses.

²RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

³HRI: Health Risk Index = Mortality + Morbidity.

^{a, b}Within a row, means without a common superscript differ ($P < 0.05$).

4. Cecal Ecosystem and Microbial Activity

Two weeks after weaning, the weight of the cecal content was 20% greater for RFF rabbits than for the other 2 groups (102 vs. 80 g at 45 d of age, $P < 0.001$), and this difference remained constant thereafter (at 60 and 70 d; Fig. 19). The weight of the empty cecum, which increase with age, was also found greater for RFF ($P < 0.001$; Table 9). The dry matter percentage of the cecal digesta was greater for the RFF group (+3% on average, $P < 0.001$) and no interaction with age was found.

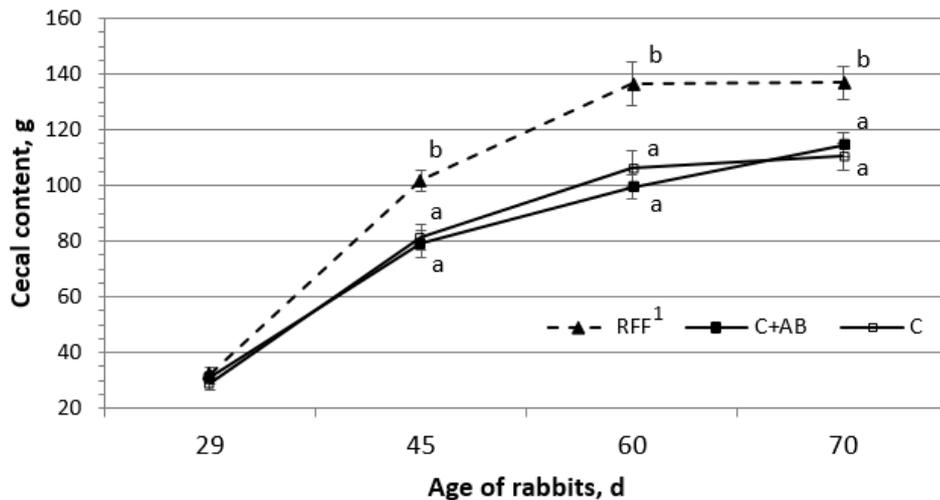


Figure 19: Weights of cecal contents (in g) according to age and addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet.

Errors bars represent the SEM. For d29, d45, and d60: n=15 for C+AB and RFF, and n=14 for C. For d70: n=14 for each diets. ^{a,b}Means without a common superscript differ ($P < 0.05$). ¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

The acidity of the cecal content at weaning was on average 3% greater in the RFF group, and the pH difference (Table 9 and Supplementary data S1) increased at 45 and 60 d of age (5.38 vs. 5.80 for RFF, and C+AB and C groups resp., $P < 0.001$). Conversely, ammonia concentrations were similar for the three groups, but were greatest at 45 d of age, and then decreased (by 30%) until 70 d. At weaning, the cecal VFA concentration (Fig. 20) was already high for RFF rabbits (98 mM) compared to the 2 other groups (73 mM). At all ages, a 20% greater VFA concentration was observed for RFF rabbits, that tended to peak at 45 d of age. Antibiotic addition lowered the fermentative activity at 45d of age where the VFA level was 20% lower than in the control and almost 30% lower than in the RFF group. The fermentation pattern (Fig. 21) revealed that the acetate (C2) and butyrate (C4) proportions were reversed with age. The percentage of C2 for RFF peaked at 45 d then decreased until 70 d of age.

For C and C+AB groups, the proportions decreased linearly during the course of the experiment. Moreover, the percentage of C2 was greater for RFF at 45 and 60 d of age (+5% on average, $P < 0.001$) whereas it was the opposite for C4 at the same ages. The propionate (C3) proportions were affected neither by the diets nor by the age. A significant interaction between the effect of the diet and the age was detected for the C4/C3 ratio. The C4/C3 ratio increased quickly from weaning to 60d old for C and C+AB groups ($P < 0.001$), while it remained lower for RFF rabbits particularly at 60 d of age: 2.6 vs. 4.1 for C+AB and C groups ($P < 0.001$).

Table 9. Cecal traits, according to age and addition of rapidly fermentable fiber or antibiotics in the diet.

| Item | Diets ¹ | | | Age, d | | | | SEM | P-values | | |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------|----------|---------|------------|
| | RFF (n = 59) | C+AB (n = 59) | C (n = 56) | 29 (n = 44) | 45 (n = 44) | 60 (n = 44) | 70 (n = 42) | | Diet | Age | Diet x Age |
| pH | 5.53 ^a | 5.80 ^b | 5.75 ^b | 5.75 | 5.67 | 5.66 | 5.69 | 0.02 | < 0.001 | 0.47 | 0.23 |
| NH ₃ , mmol·L ⁻¹ | 5.54 | 6.55 | 6.19 | 6.26 ^{ab} | 7.42 ^a | 5.47 ^b | 5.17 ^b | 0.27 | 0.27 | 0.013 | 0.25 |
| Cecum empty, g | 22.3 ^a | 20.7 ^b | 20.2 ^b | 8.6 ^a | 20.1 ^b | 26.3 ^c | 30.2 ^d | 0.68 | < 0.001 | < 0.001 | 0.17 |
| Cecal content, g | 101.2 ^a | 80.1 ^b | 81.3 ^b | 30.8 ^a | 87.7 ^b | 113.9 ^c | 120.4 ^c | 3.16 | < 0.001 | < 0.001 | 0.012 |
| Cecal DM, % | 19.3 ^a | 22.7 ^b | 22.4 ^b | 22.3 ^a | 21.2 ^b | 20.9 ^b | 21.1 ^b | 0.18 | < 0.001 | < 0.001 | 0.53 |

¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet

^{a-d}Within a row, means without a common superscript differ ($P < 0.05$)

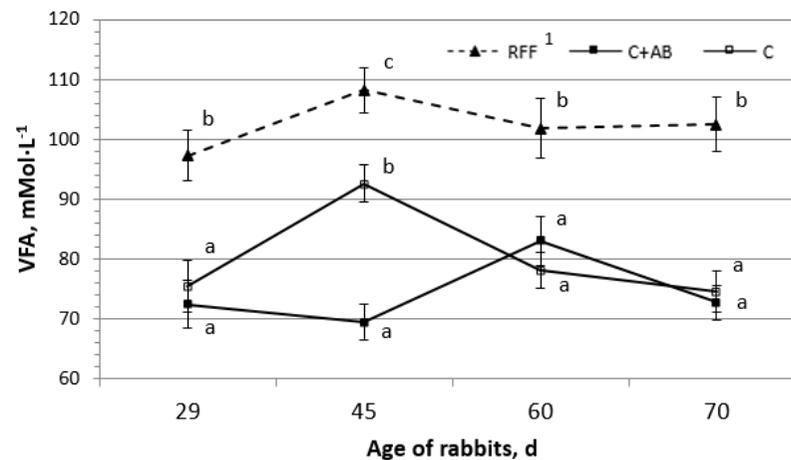


Figure 20: Evolution of the VFA concentrations in the cecum, in mMol·L⁻¹.

Errors bars represent the SEM. For d29, d45, and d60: n=15 for C+AB and RFF, and n=14 for C. For d70: n=14 for each diets. ^{a-c}Means without a common superscript differ ($P < 0.05$). ¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

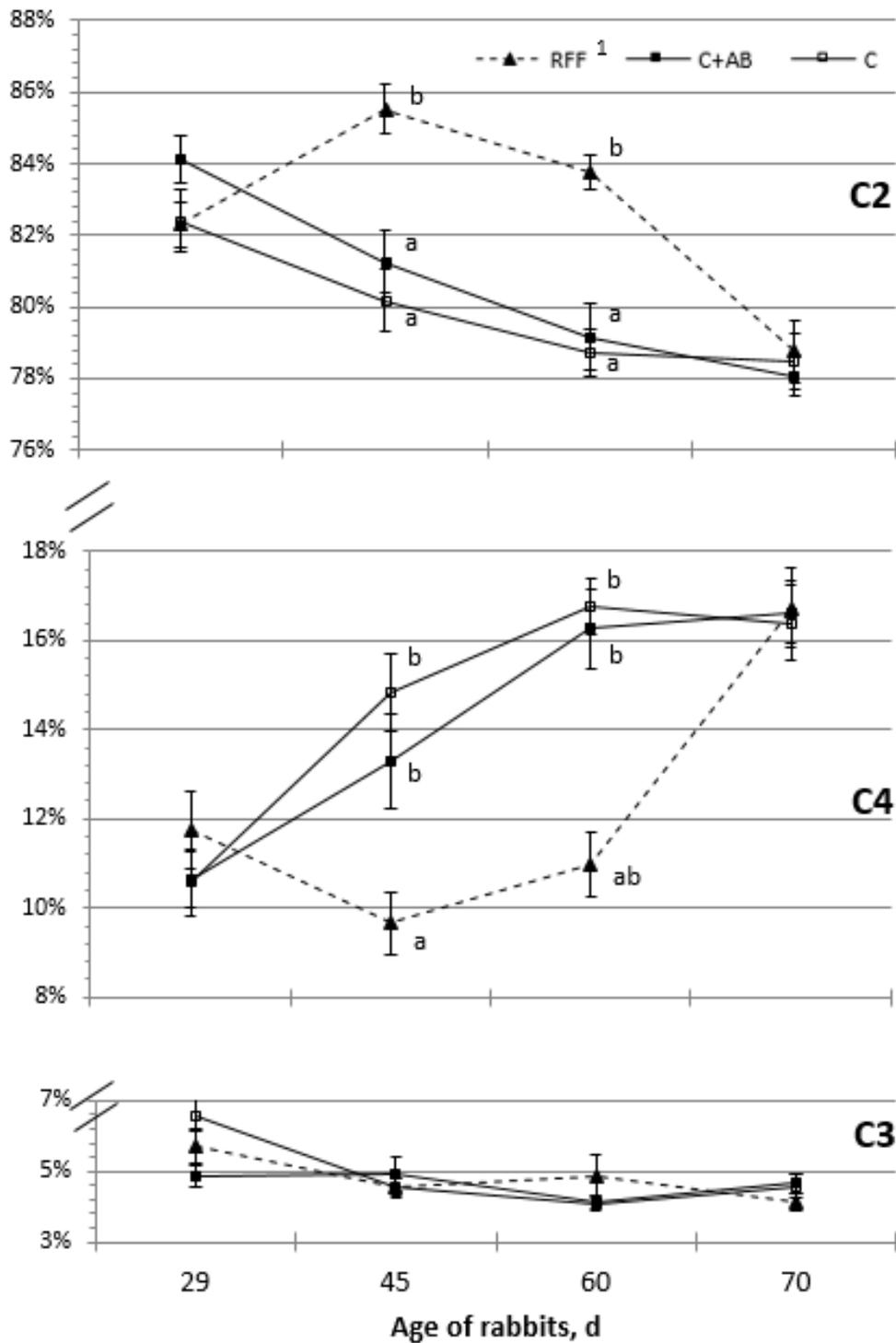


Figure 21: VFA fermentation pattern (C2, C3 and C4) in %.

Errors bars represent the SEM. For d29, d45, and d60: n=15 for C+AB and RFF, and n=14 for C. For d70: n=14 for each diets. ^{a-c}Means without a common superscript differ ($P < 0.05$). ¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet. ²C2 = acetic acid; C3 = propionic acid; C4 = butyric acid.

V. Discussion

1. Early Modulation of the Cecal Activity

The stimulation of the microbial activity in the cecum is identified as a strategy to improve the digestive health of 25-d-old rabbits by increasing the barrier effect of the commensal microbiota against potential pathogenic bacteria, or by modulating other physiological parameters of the gut, such as the mucosa quality (Gomez-Conde et al., 2007). Among factors that positively influence cecal activity, the supply of rapidly fermentable polysaccharides is a good candidate. Dietary pectin or soluble fiber (estimated as TDF minus NDF) are correlated with in-vivo cecal VFA concentrations (Garcia et al., 2002; Trocino et al., 2013). According to Combes et al. (2013), the modulation of the microbiota is more effective if dietary changes occur as early as possible before weaning. Accordingly, through an early supply of soluble fiber, the microbial activity was already activated in the cecum of animals of the RFF groups at weaning. As described in previous studies, a greater VFA concentration in the cecum was observed, together with a greater acidity, and an inversion of the acetate and butyrate percentages compared to the 2 other diets (Falcão-e-Cunha et al., 2004; Gidenne et al., 2004; Xiccato et al., 2011). Other studies have reported contrasting results (Gomez-Conde et al., 2009; Trocino et al., 2010, 2011; Belenguer et al., 2011) showing that an increase in soluble fiber linearly decreased the pH or had no effect on ammonia-N, total VFA concentration, and VFA molar proportions. Our results show that a supply of RFF in the diet increased the concentration of acetate at the expense of butyrate, in agreement with previous studies (Xiccato et al., 2011; Grueso et al., 2013). The novelty of our results relies in the early stimulation of the microbial activity, already at 4 weeks old, associated with a high intake of RFF. Beet pulp and apple pomace, which are rich in rapidly fermentable fiber fractions (Carabaño et al., 1997; Falcão-e-Cunha et al., 2004), are very likely responsible for increasing the cecal acidity and VFA concentrations.

Conversely, the effects of insoluble fiber that are highly digestible (DgF = hemicelluloses and water-insoluble pectin) are variable on the development of the hind-gut (Jehl and Gidenne, 1996; Garcia et al., 1993; Carabaño et al., 1997; Gidenne et al., 2004). Here, with a greater intake of soluble fiber and pectin (from apples and beets), a higher weight of the cecal content and a lower dry matter level were recorded after weaning, suggesting a specific role of water-soluble polysaccharides on digestive segments contrary to insoluble ones (Garcia et al., 2000; Molist et al., 2009).

2. Effects of Diets on Growth and Intake

In our conditions, the RFF diet reduced the G:F ratio and the ADFI compared to the control diet. Contrary to the study of Falcão-e-Cunha et al. (2004), there was no negative effect of high soluble fiber levels on ADG and final BW. Classically, the addition of growth promoter antibiotics in the diet increased the ADG (Zhao et al., 2012) and the final BW (Falcão-e-Cunha et al., 2007; Hughes and Heritage, 2004) without modifying the feed intake. Our results show that antibiotics used for REE prevention do not reduce the G:F ratio although the growth was improved. In contrast, a lower G:F ratio was observed for the RFF group compared to the C+AB group from 28 to 45 d of age.

Classically, when low digestible fiber are incorporated in the diet, the growing rabbit increased its feed intake to maintain its DE intake (Xiccato et al., 2010), within a range of 9 to 11 MJ of DE·kg⁻¹. In contrast, the incorporation of RFF even reduced the feed intake as found in our experimental conditions and in agreement with two previous studies (Marguenda et al., 2006; Gidenne et al., 2013). Accordingly, the DE intake was lower for RFF rabbits explaining their lower growth rate than that of the C+AB group. The lower feed intake and the greater cecal development, associated with a higher humidity level of its content, could be related to the high water retention capacity of ingredients (gel formation), such as apple or beet pulp, supplying the dietary soluble fiber (Molist et al., 2009).

3. Fiber vs. Antibiotics: What Impact on the Health Status?

A larger consumption of RFF did not globally modify the digestive health of rabbits compared to the control diet. This contrasted with a recent review showing that dietary soluble fiber tended to improve the mortality rate (Trocino et al., 2013). This suggests that soluble fiber might have a role on the digestive health, but should be confirmed.

Providing antibiotics in feed reduced the morbidity rate of animals, but no major beneficial effect on the mortality rate were detected, contrary to the study of Chamorro et al. (2007) made in an REE context with a higher mortality rate. Although our experiment was not designed specifically to assess the health status precisely (because of the relatively small number of animals). Adding antibiotics seemed not beneficial just after weaning, since the mortality rate (till 41d) was higher compared to the two other diets. This high mortality rate observed 2 weeks after weaning for C+AB rabbits was linked to a high pH and a low concentration of VFA in the cecum. Dietary supplements with antibiotics, such as tiamulin, would exert a selection within the commensal flora, thus reducing the microbiota diversity (Abecia et al., 2005; Bovera et al., 2010; Combes et al., 2013) and particularly when antibiotics are used before 8 weeks of age. The concentrations of

VFA in the cecum would thus be reduced and it has been hypothesized that a high cecal VFA concentration provides beneficial effects on digestive health (Gidenne, 1996), such as a decreased risk of the epizootic rabbit enteropathy (Gruesco et al., 2013) or the protection of enteric *E. coli*-infections by the action of inhibitors with an acidic pH (Prohászka, 1980).

VI. Conclusion

An early intake of RFF (from 16 d of age) stimulated the cecal microbial activity and modify the fermentation pattern already from weaning (28d) to 60 d of age. Antibiotics addition reduced transitorily the microbial activity (only at 45d of age) in association with a greater mortality. The early supply of dietary RFF also reduced the post-weaning voluntary feed intake with a slight growth impairment thus leading to a better G:F ratio. RFF could therefore be recommended at post-weaning to regulate the feed intake of the ad-libitum fed young rabbit and to avoid digestive disorders originating in a too high intake after weaning.

VII. References

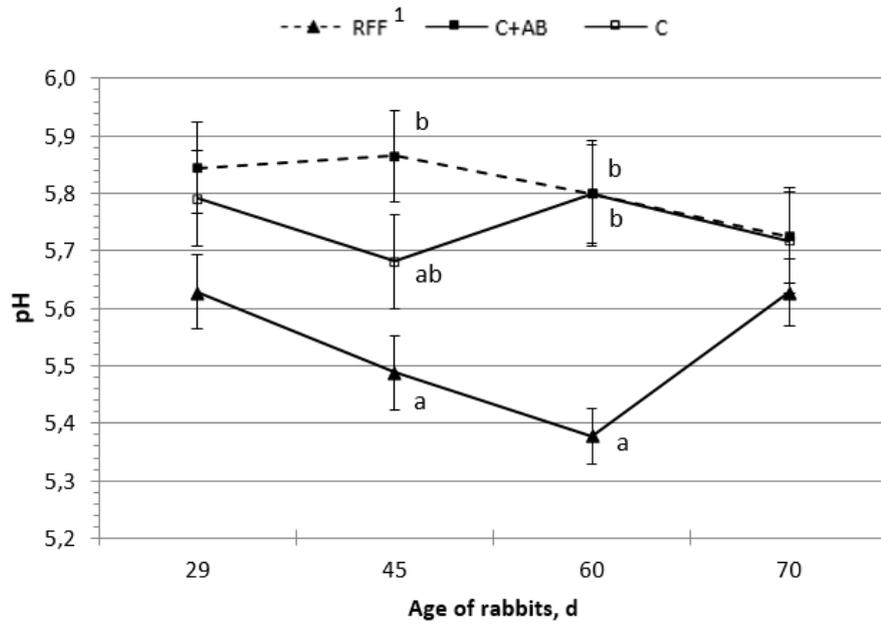
- Abecia, L., J. Balcells, M. Fondevila, A. Belenguer, and L. Calleja. 2005. Effect of therapeutic doses of antibiotics in the diet on the digestibility and caecal fermentation in growing rabbits. *Anim. Res.* 54:307-314.
- AFNOR. 1997. NF V18–122, Animal feeding stuffs—Determination of sequential cell-wall - Method by treatment with neutral and acid detergent and sulfuric acid. Assoc. Française Normalisation, Paris.
- Alstin, F., and M. Nilsson. 1990. The Soxtec(R) hydrolysis system improves the official methods for determining total fat content. *Ind. Aliment. Agric.* 107:1271-1274.
- Anonymous. 1988. Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *J. Off. Repub. Fr. Ed. Lois Decrets*: 5608-5610.
- AOAC International. 2007. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Rev. 2. W. Hortwitz and G. W. Latimer Jr., ed. AOAC Int., Gaithersburg, MD.
- Belenguer, A., M. Fondevila, J. Balcells, L. Abecia, M. Lachica, and M.D. Carro. 2011. Methanogenesis in rabbit caecum as affected by the fermentation pattern: in vitro and in vivo measurements. *World Rabbit Sci.* 19:75-83.
- Bovera, F., S. Marono, C. Di Meo, G. Piccolo, F. Iannaccone, and A. Nizza. 2010. Effect of mannanoligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits. *Animal* 4:1522-1527.
- Carabaño, R., W. Motta Ferreira, J. C. De Blas, and M. J. Fraga. 1997. Substitution of sugarbeet pulp for alfalfa hay in diets for growing rabbits. *Animal Feed Sci. Technol.* 65:249-256.
- Chamorro, S., R. Carabaño, I. Badiola, J. Garcia, and J. C. De Blas. 2007. Effect of the dietary supplementation of glutamine and arginine on the intestinal health, ileal and caecal microbiota and fattening performance in weaned rabbit affected by ERE. In: 12ème J. Rech. Cunicoles, Le Mans, France. p. 89-92.
- Chaslus-Dancla, E., and J.P. Lafont. 1985. Resistance to gentamicin and apramycin in *Escherichia coli* from calves in France. *Vet. Rec.* 117:90-91.
- Combes, S., L. Fortun-Lamothe, L. Cauquil, and T. Gidenne. 2013. Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. *Animal* 7:1429-1439.

- EGRAN. 2001. Technical note: attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. *World Rabbit Sci.* 9:57-64.
- Falcão E Cunha, L., H. Peres, J. P. B. Freire, and L. Castro-Solla. 2004. Effects of alfalfa, wheat bran or beet pulp, with or without sunflower oil, on caecal fermentation and on digestibility in the rabbit. *Animal Feed Sci. Technol.* 117:131-149.
- Falcão E Cunha, L., L. Castro-Solla, L. Maertens, M. Marounek, V. Pinheiro, J. Freire, and J.L. Mourao. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: A review. *World Rabbit Sci.* 15:127-140.
- Fortun-Lamothe, L., T. Gidenne, A. Lapanouse, and J. De Dapper. 2000. Technical note: An original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother-young relations. *World Rabbit Sci.* 8:177-180.
- Fortun-Lamothe L., and S. Boullier. 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livest. Sci.* 107:1-18.
- Gallois M., H.J. Rothkötter, M. Bailey, C.R. Stokes, and I.P. Oswald. 2009. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: Can immunomodulators play a role? *Animal.* 3:1644-1661.
- Garcia, G., J. F. Galvez, and J. C. De Blas. 1993. Effect of Substitution of Sugarbeet Pulp for Barley in Diets for Finishing Rabbits on Growth Performance and on Energy and Nitrogen Efficiency. *J. Animal Sci.* 71:1823-1830.
- Garcia, J., R. Carabaño, L. Perez-Alba, and J.C. De Blas. 2000. Effect of fiber source on cecal fermentation and nitrogen recycled through cecotrophy in rabbits. *J. Animal Sci.* 78:638-646.
- Garcia, J., T. Gidenne, L. Falcão E Cunha, and J.C. De Blas. 2002. Identification of the main factors that influence cecal fermentation traits in growing rabbits. *Animal Res.* 51:165-173.
- Gidenne, T. 1996. Conséquences digestives de l'ingestion de fibres et d'amidon chez le lapin en croissance: vers une meilleure définition des besoins. *INRA Prod. Anim.* 9:243-254.
- Gidenne, T., N. Jehl, A. Lapanouse, and M. Segura. 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 Jour. Nutr.* 92:95-104.

- Gidenne, T., J. Garcia, F. Lebas, and D. Licois. 2010. Nutrition and feeding strategy: Interactions with pathology. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) Nutrition of the rabbit. p 179-199. CABI, Wallingford, UK.
- Gidenne, T., V. Kerdiles, N. Jehl, P. Arveux, B. Eckenfelder, C. Briens, S. Stephan, H. Fortune, S. Montessuy and G. Murez. 2013. Protein replacement by digestible fibre in the diet of growing rabbits: 2-Impact on performances, digestive health and nitrogen output. *Animal Feed Science and Technology* 183:142-150.
- Gómez-Conde, M. S., J. Garcia, S. Chamorro, P. Eiras, P.G. Rebollar, A.P. De Rozas, I. Badiola, C. De Blas, and R. Carabaño. 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J. Animal Sci.* 85:3313-3321.
- Gómez-Conde, M. S., A.P. De Rozas, I. Badiola, L. Pérez-Alba, J.C. De Blas, R. Carabaño, J. Garcia. 2009. Effect of neutral detergent soluble fibre on digestion, intestinal microbiota and performance in twenty five day old weaned rabbits. *Livestock Science* 125:192-198.
- Gruesco, I., J.C. De Blas, P. Cachaldora, J. Mendez, B. Losada, and P. García-Rebollar. 2013. Combined effects of supplementation of diets with hops and of a substitution of starch with soluble fiber on feed efficiency and prevention of digestive disorders in rabbits. *Animal Feed Sci. Technol.* 180:92-100.
- Hall, M.B., B.A. Lewis, P.J. Van Soest, and L.E. Chase. 1997. A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fibre. *J. Sci. Food Agric.* 74:441-449.
- Hughes, P., and J. Heritage. 2004. Antibiotic growth-promoters in food animals. *FAO Animal Production and Health Paper.* p. 129-152.
- ISO. 1998. Animal feeding stuffs, animal products, and feces or urine—Determination of gross calorific value. Bomb calorimeter method. ISO 9831:1998. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 1999. Animal feeding stuffs—Determination of moisture and other volatile matter content. ISO 6496:1999. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 2002. Animal feeding stuffs—Determination of crude ash. ISO 5984:2002. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 2004. Cereals, pulses, milled cereal products, oilseeds, oilseed residues and animal feeding stuffs—Determination of total nitrogen and crude protein contents by combusting according

- to the Dumas principle. ISO 16634:2004. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 2007. Animal feeding stuffs—Determination of amylase-treated neutral detergent fibre content (aNDF). ISO 16472:2007. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 2008. Animal feeding stuffs—Determination of acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) contents. ISO 13906:2008. International Organisation for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
- Jehl, N., and T. Gidenne. 1996. Replacement of starch by digestible fibre in the feed for the growing rabbit. 2. Consequences for microbial activity in the cecum and on incidence of digestive disorders. *Animal Feed Sci. Technol.* 61:193-204.
- Marguenda, I., R. Carabaño, P. García-Rebollar, C. De Blas, and A.I. García-Ruiz. 2006. Effect of the substitution of starch sources or wheat straw with apple pulp on growth performance, mortality and carcass yield, under field conditions. In: 3rd Rabbit congress of the America, Maringa, Parana state, Brasil. p. 1-6.
- Molist, F., A. Gómez de Segura, J. Gasa, R.G. Hermes, E.G. Manzanilla, M. Anguita, and J.F. Pérez. 2009. Effects of the insoluble and soluble dietary fibre on the physicochemical properties of digesta and the microbial activity in early weaned piglets. *Animal Feed Sci. Technol.* 78:638-646.
- Perez J.M., F. Lebas, T. Gidenne, L. Martens, G. Xiccato, R. Parigi-Bini, A. Dalle Zotte, M.E. Cossu, A. Carazzolo, M.J. Villamide, R. Carabano, M.J. Fraga, M.A. Ramos, C. Cervera, E. Blas, J. Fernandez, L. Falcao E Cunha, and J. Bengala Freire. 1995. European reference method for in vivo determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci.* 3:41-43.
- Prohászka, L. 1980. Antibacterial effect of volatile fatty acids in enteric E. coli-infections of rabbits. *Zentralbl. Vet. B.* 27:631-639.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, <http://www.R-project.org>, Vienna, Austria.
- Sayah, R.S., J.B. Kaneene, Y. Johnson, and R. Miller. 2005. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1394-404.

- Trocino, A., M. Fragkiadakis, G. Radaelli, and G. Xiccato. 2010. Effect of dietary soluble fibre level and protein source on growth, digestion, caecal activity and health of fattening rabbits. *World Rabbit Sci.* 18:199-210.
- Trocino, A., M. Fragkiadakis, D. Majolini, R. Carabaño, and G. Xiccato. 2011. Effect of the increase of dietary starch and soluble fibre on digestive efficiency and growth performance of meat rabbits. *Animal Feed Sci. Technol.* 165:265-277.
- Trocino, A., J. Garcia, R. Carabaño, and G. Xiccato. 2013. A meta-analysis of the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. *World Rabbit Sci.* 21:1-15.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583.
- Verdouw, H., C. J. A. Van Echteld, and E. M. J. Dekkers. 1977. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12:399-402.
- Wray, C., R.W. Hedges, K.P. Shannon, and D.E. Bradley. 1986. Apramycin and gentamicin resistance in *Escherichia coli* and salmonellas isolated from farm animals. *J. Hyg.* 97:445-56.
- Xiccato, G., and A. Trocino. 2010. Energy and protein metabolism and requirements. In: C. De Blas and J. Wiseman (eds.) *Nutrition of the rabbit*. p 83-118. CABI; Wallingford; UK.
- Xiccato, G., A. Trocino, D. Majolini, M. Fragkiadakis, and M. Tazzoli. 2011. Effect of decreasing dietary protein level and replacing starch with soluble fibre on digestive physiology and performance of growing rabbits. *Animal* 5:1179-1187.
- Zhao, P. Y., J. H. Jung, and I. H. Kim. 2012. Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. *J. Animal Sci.* 90:833-839.



Supplementary data S1. pH of rabbits, according to age and addition of fermentable fiber or antibiotics in the diet.

Errors bars represent the SEM. For d29, d45, and d60: n=15 for C+AB and RFF, and n=14 for C. For d70: n=14 for all diets. ^{a,b}Means without a common superscript differ ($P < 0.05$). ¹RFF = diet rich in rapidly fermentable fiber; C+AB = antibiotic diet; C = control diet.

ETUDE DE L'IMMUNITE A PARTIR DE L'ENSEMBLE DU GENOME DU LAPIN :
VARIATIONS DU TRANSCRIPTOME DES PBMC STIMULEES IN VITRO AVEC LPS
ET PMA/IONOMYCINE.

BMC Genomics, Article en révision

V. Jacquier, J. Estellé, B. Schmaltz-Panneau, J. Lecardonnel, M. Moroldo, G. Lemonnier, J. Turner-Maier, V. Duranthon, I.P. Oswald, T. Gidenne, C. Rogel-Gaillard

Mots clés : lapin, transcriptome, réponse immunitaire, microarray, cellules mononuclées du sang périphérique, stimulation in vitro, LPS, PMA-Ionomycine.

Résumé

L'objectif de notre travail était d'obtenir des données d'expression sur l'ensemble du génome lapin, à partir de la réponse de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), après stimulation in vitro par du lipopolysaccharide (LPS) ou du phorbol myristate acétate (PMA) et de la ionomycine. Ces profils transcriptomiques ont été réalisés grâce à des puces à ADN enrichies avec des gènes de l'immunité et annotées avec les données les plus récentes disponibles pour le génome du lapin. Le LPS a affecté l'expression de 15 à 20 fois moins de gènes que la PMA/Ionomycine après 4 heures (T4) et 24 heures (T24) de stimulation, par comparaison avec des PBMC non-stimulées. Le LPS a induit une réponse inflammatoire, avec une sur-régulation de l'IL12A et CXCL11 à T4, suivi d'une augmentation de la transcription de l'IL6, IL1B, IL1A, IL36, IL37, TNF et CCL4 à T24. Étonnamment, nous n'avons pas trouvé de sur-régulation de l'IL8 que ce soit à T4 ou à T24, et de sous-expression de DEFB1 et BPI à T24. Une régulation à la hausse de SAA1, S100A12 et F3 a été observée lors de la stimulation par LPS. La PMA/Ionomycine induit une expression précoce des réponses Th1, Th2, Treg et Th17 par les PBMC à T4. La réponse Th1 a été amplifiée à T24 avec l'augmentation de la transcription de l'IFNG, et en contraste des autres cytokines qui ont subi une diminution d'expression de T4 à T24 (IL2, IL4, IL10, IL13, IL17A et CD69). Le facteur de stimulation de colonie 2 granulocyte-macrophage (CSF2) a été de loin le gène le plus surexprimé à T4 et T24 par rapport aux cellules témoins. Cela confirme l'impact important de PMA/Ionomycine sur la croissance et la prolifération cellulaire. Une sous-régulation importante de l'IL16 a été observée à T4 et T24, en accord avec le rôle apoptotique de l'IL16 sur les PBMC. En conclusion, nous avons apporté de nouvelles données sur la stimulation de PBMC par LPS et PMA/Ionomycine pour l'espèce lapin, élargissant ainsi le nombre d'espèces pour lesquels ces rapports existent déjà. La disponibilité du génome du lapin et les nouveaux outils de génomique devrait ouvrir la voie à d'intenses études génomiques pour cette espèce, connue pour être un modèle biomédical très pertinent en immunologie et en physiologie.

- ARTICLE II -

GENOME-WIDE IMMUNITY STUDIES IN THE RABBIT: TRANSCRIPTOME
VARIATIONS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AFTER IN VITRO
STIMULATION BY LPS OR PMA-IONOMYCIN

Vincent Jacquier^{1,2,3,4,5}, Jordi Estellé^{1,2}, Barbara Schmaltz-Panneau⁶, Jérôme Lecardonnel^{1,2}, Marco Moroldo^{1,2}, Gaëtan Lemonnier^{1,2}, Jason Turner-Maier⁷, Véronique Duranthon⁶, Isabelle P. Oswald^{8,9}, Thierry Gidenne^{3,4,5}, Claire Rogel-Gaillard^{1,2,5}

BMC Genomics, *accepted article*

¹ INRA, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

² AgroParisTech, UMR 1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

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

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

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

⁶ INRA, UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy-en-Josas, France

⁷ Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts 02142, USA

⁸ INRA, UMR1331, Toxalim, Research Center in Food Toxicology, 180 chemin de Tournefeuille, BP 93173, F-31027 Toulouse, France

⁹ Université de Toulouse, INP, UMR1331, Toxalim, Research Center in Food Toxicology, F-31000 Toulouse, France

Corresponding author: Claire.rogel-gaillard@jouy.inra.fr

I. Abstract

Background: Our purpose was to obtain genome-wide expression data for the rabbit species on the responses of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after in vitro stimulation by lipopolysaccharide (LPS) or phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin. This transcriptome profiling was carried out using microarrays enriched with immunity-related genes, and annotated with the most recent data available for the rabbit genome.

Results: The LPS affected 15 to 20 times fewer genes than PMA-Ionomycin after both 4 hours (T4) and 24 hours (T24), of in vitro stimulation, in comparison with mock-stimulated PBMCs. LPS induced an inflammatory response as shown by a significant up-regulation of IL12A and CXCL11 at T4, followed by an increased transcription of IL6, IL1B, IL1A, IL36, IL37, TNF, and CCL4 at T24. Surprisingly, we could not find an up-regulation of IL8 either at T4 or at T24, and detected a down-regulation of DEFB1 and BPI at T24. A concerted up-regulation of SAA1, S100A12 and F3 was found upon stimulation by LPS.

PMA-Ionomycin induced a very early expression of Th1, Th2, Treg, and Th17 responses by PBMCs at T4. The Th1 response increased at T24 as shown by the increase of the transcription of IFNG and by contrast to other cytokines which significantly decreased from T4 to T24 (IL2, IL4, IL10, IL13, IL17A, CD69) by comparison to mock-stimulation. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF2) was by far the most over-expressed gene at both T4 and T24 by comparison to mock-stimulated cells, confirming a major impact of PMA-Ionomycin on cell growth and proliferation. A significant down-regulation of IL16 was observed at T4 and T24, in agreement with a role of IL16 in PBMC apoptosis.

Conclusions: We report new data on the responses of PBMCs to LPS and PMA-Ionomycin in the rabbit species, thus enlarging the set of mammalian species for which such reports exist. The availability of the rabbit genome assembly together with high throughput genomic tools should pave the way for more intense genomic studies for this species, which is known to be a very relevant biomedical model in immunology and physiology.

Keys words: rabbit, transcriptome, immune response, microarray, peripheral blood mononuclear cells, in vitro stimulation, LPS, PMA-Ionomycin.

II. Introduction

The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is a wild and domesticated species that is used for many purposes including production for meat and fur, biotechnological applications (e.g. antibody production, cloning), and as a tool for the study of nutrition, reproduction, toxicology, pharmaceutical research, and pathologies [1-4]. In fact, the rabbit has been extensively used as a model to study infectious diseases such as tuberculosis, syphilis, anthrax, tularemia, poxvirus diseases, and hepatitis E. Rabbits are also used for research on autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus [5]. The rabbit immune system generates antibody diversity and optimizes affinity through mechanisms that are more efficient than those of mice and other rodents. Due to their high specificity and affinity, rabbit antibodies are commercially available for a large number of target antigens.

The rabbit has been included in the Mammalian Genome Project [6] and a 2X followed by a 7X coverage version of the rabbit genome sequence has been released in 2005 and 2009, respectively. The reference genomic assembly OryCun2.0 (AAGW00000000.2, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=oryctolagus%20cuniculus>) has provided insights to decipher the impact of the domestication process on shaping genomes [7]. Genomic tools are growing for the rabbit species, complementary to the onset of more and more cost-effective high throughput sequencing methodologies, paving the way to large scale genome-wide expression studies [4]. However, very few genome-wide expression studies have been reported to date in the rabbit and most of which have focused on early embryogenesis [8-10] pluripotent stem cells [11], implantation during gestation [12], ocular research [13,14] and response of different organs to *Eimeria* infections [15-17]. Although rabbits have proven very useful in immunological and infectious disease research, genome-wide expression studies targeting the immune response to various challenges are still limited. Our aim was to create genome-wide gene expression datasets representative of various in vitro stimulations of immune cells in rabbit in order to increase knowledge on the rabbit immune responses, to provide new rabbit-specific data for comparative immunology, and to promote that transcriptomics-based approaches are efficient to provide molecular phenotype information to analyze immunity in the rabbit species. We chose to study variations of the transcriptome in rabbit peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using two different stimulations expected to induce either an innate immune response (lipopolysaccharide (LPS stimulation)) or a lymphocyte proliferation (mixture of phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin (PMA-Iono stimulation)). LPS is part of the outermost layer of gram-negative bacteria and is a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) used for in vitro studies of the innate immune response after bacterial infection. PMA, in conjunction with ionomycin, act preferentially

on growth and proliferation of immune cells, and stimulate the intracellular production of the cytokines IL2 and IL4. Both stimulations were chosen as they are classically used to induce distinct types of immune responses for further characterization. This study stands as the rabbit counterpart of a similar study that was conducted in pig [18], and that has provided much new data on the main gene pathways that were modified following each stimulation. For this purpose, we have designed a rabbit long oligonucleotide-based DNA microarray, by enriching a previously customized gene expression design (GPL16482) with a set of well-annotated genes known to be involved in immune and inflammatory responses. We report the striking features of gene expression changes in response to both stimulations over time, relying on gene expression microarrays that are informative, cost-effective and easy to use for genome-wide expression studies in the rabbit. To our knowledge, our study reports for the first time the modifications of transcriptome profiling of PBMCs upon LPS of PMA-Ionomycin stimulation in the rabbit species.

III. Materials and Methods

1. Enrichment and annotation steps

The first step was to compare the existing Agilent customized microarray design 8x60K (GPL16482) with the set of genes involved in the pig immune response [18] and then using the Gene Ontology term GO:0002376 (immune system process) on rabbit, pig, mouse and human species. Immunity-related rabbit sequences were retrieved by GeneID and RefSeq search or by analysis for sequence similarity by BLAST. All 60-mer length oligonucleotide probes were designed using eArray (Agilent technologies). All new probes were spotted in triplicates. The platform was registered under the GEO accession number GPL16709.

The second step was the annotation of the probes present on the microarray. Preliminary work based on chromosomal coordinates was made. Then we performed a BLAST search of the rabbit probe sequences versus a new RNAseq annotated database (Broad Institute, Cambridge, MA, USA).

2. PBMCs: isolation and stimulation

All experiments involving animals complied with the institutional guidelines of the French Ethical Committee. All animals were bred and slaughtered in an approved animal facility (UCEA, approval number A-78-322-4). Experimental protocols were conducted under the supervision of the animal welfare committee in charge of this animal facility (Protocol registered under number 272). V. Duranthon holds an authorization certificate issued by the French governmental administration to experiment on animals (Authorization number B78-101). PBMCs were obtained from 13 mL of

heparinized whole blood of four adult female New Zealand White rabbits (numbered 1, 2, 4, and 5) by density gradient separation using ficoll-histopaque. A total of 5×10^5 cells were suspended into RPMI 1640 medium (BioWhittaker, Belgium) supplemented with 200 mM/L of L-glutamine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 10% heat inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin and streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PBMCs were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS (Sigma, France) or a mixture of PMA (Sigma, France) at 10 ng/mL and ionomycin (Sigma, France) at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For mock-stimulation, a buffer without stimulation agents was added to the cells similarly to stimulation conditions. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ and harvested 4 and 24 hours post-stimulation for further RNA extraction.

3. RNA extraction

Total RNA was extracted from PBMCs using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and residual contaminating genomic DNA was cleaned by using RNase-free DNase I (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA samples were quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA integrity was then assessed on a Bioanalyzer 2100 using RNA 6000 Nano chips (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

4. RNA labeling and microarray processing

Transcriptional profiling was performed using the previously described custom array. A total of 24 samples was processed. All steps were performed by the CRB GADIE facility (INRA Jouy-en-Josas, France, <http://crb-gadie.inra.fr/>). Cyanine-3 (Cy3) labeled cRNA were prepared using 200 ng of total RNA using the One-Color Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) following the recommended protocol. Specific activities and cRNA yields were determined using the NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

For each sample, 600 ng of Cy3-labeled cRNA (specific activity > 6.0 pmol Cy3/ μg of cRNA) were fragmented at 60°C for 30 minutes in a reaction volume of 25 μl containing 25x Agilent Fragmentation Buffer and 10x Agilent Blocking Agent, following the manufacturer's instructions. Subsequently, 25 μl of 2x Agilent Hybridization Buffer were added to the fragmentation mixture and hybridized to the Rabbit Custom Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies, design ID : 042421) for 17 hours at 65°C in a rotating Agilent hybridization oven (Agilent Technologies). After hybridization, microarrays were washed 1 minute at room temperature with the GE Wash Buffer 1 (Agilent Technologies) and 1 minute at 37°C using the GE Wash Buffer 2 (Agilent Technologies), then dried instantly.

Immediately after washing, the slides were scanned using a G2565CA Scanner System (Agilent Technologies), which used a scan protocol with a resolution of 3 μm and a dynamic range of 20 bit. The resulting .tiff images were analyzed with the Feature Extraction Software v10.7.3.1 (Agilent Technologies), using the GE2_107_Sep09 protocol. The microarray data were submitted to the GEO and received the accession number GSE59263.

5. Statistical analysis

Microarray data were analyzed using the R/Bioconductor software package Limma (Linear Models for Microarray Data)[72]. The median signals of all probes were first Log 2-transformed, and then these data were normalized by a median normalization. After averaging the normalized data of the probes targeting the same genes, a linear model was fitted for all probes using lmFit function, with type of stimulation and time as factors. As we had a low number of biological replicates, we also used the empirical Bayes approach to compute moderated t-statistics and log-odds of differential expression. The differential analysis was done with averaged and single probes, and DE genes were identified based on contrasts for the (stimulation \times time levels) interactions. The P-values were corrected for multiple testing using a false discovery rate method (q-value < 0.05), which provides an estimate of the fraction of false discoveries among the significant terms. A PCA and an HCA were performed. In the results and discussion, the FC values were transformed into linear values for a better biological understanding. Venn diagrams were produced using the Limma package [72]. Finally, the significant DE genes were analyzed with IPA (Ingenuity Systems, Mountain View, CA; <http://www.ingenuity.com>) to obtain the top biological functions and relevant networks.

6. Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR

For real-time PCR analyses, 100 ng of DNase I treated total RNAs were reverse-transcribed using Superscript III with random hexamers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Triplicate reactions were performed in a final volume of 20 μL , mixing 20 μL cDNA, 120 nM primers and 10 μL SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), using a QuantStudio 12K Flex system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Primers were defined either using the Primer3 Software (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) or manually designed (Additional file 9). The genes B2M and GAPDH were chosen as housekeeping genes and the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method was used to calculate the fold change in gene expression. For comparison with microarray data, a Spearman correlation was calculated between the Log2 (FC) provided by the microarray study and the Log2 (Ct) provided by the RT-qPCR study [64].

IV. Results

1. A well-annotated gene expression platform enriched in immunity-related genes for the rabbit species

The rabbit gene expression microarray used in this study combines the customized microarray design (GPL16482) with a set of 453 specific rabbit genes involved in the immune system process (GO: 0002376), and identified to be missing on the previous array. Gene set information is available in the additional file 1. This custom microarray has been updated with the latest annotation generated by the rabbit sequencing consortium [7].

The resulting microarray platform includes 61655 probes, 50443 of which have chromosome coordinates (82%) and 44670 are annotated (72%). These annotated probes specify 11899 genes with a symbol approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee. Indeed, the majority of probes found differentially expressed (DE) after LPS or PMA-Ionomycin treatment were annotated, as shown on Table 10.

Table 10: Number of genes found up or down-regulated ($FDR < 0.05$) after stimulation, and percentage of probe annotation.

| Stimulation | Genes Up-regulated | Genes Down-regulated | Total DE genes | Percentage of annotation |
|----------------------|--------------------|----------------------|----------------|--------------------------|
| LPS at T4 | 35 | 281 | 316 | 90.82 % |
| LPS at T24 | 212 | 165 | 377 | 90.98 % |
| PMA-Ionomycin at T4 | 2273 | 2477 | 4750 | 80.93 % |
| PMA-Ionomycin at T24 | 3414 | 4039 | 7453 | 75.51 % |

2. Clustering of samples and comparative effect of LPS and PMA-Ionomycin stimulations

PBMCs were isolated from four rabbit blood samples and either mock-stimulated or stimulated with LPS or PMA-Ionomycin for 4 (T4) and 24 (T24) hours. The principal component analysis (PCA; Figure 22) revealed that all samples stimulated by PMA-Ionomycin clustered according to the treatment and the time of stimulation (T4 or T24). The two time-based clusters were clearly separated from mock-stimulated or LPS-stimulated samples. Conversely, mock-stimulated and LPS-stimulated samples defined two close clusters at T4 but a unique cluster that consisted of samples from both treatments at T24. The hierarchical clustering analysis (HCA; Additional file 2) confirmed the PCA results. Since no sample was found as an outlier, all biological samples were considered for the following steps of the analysis.

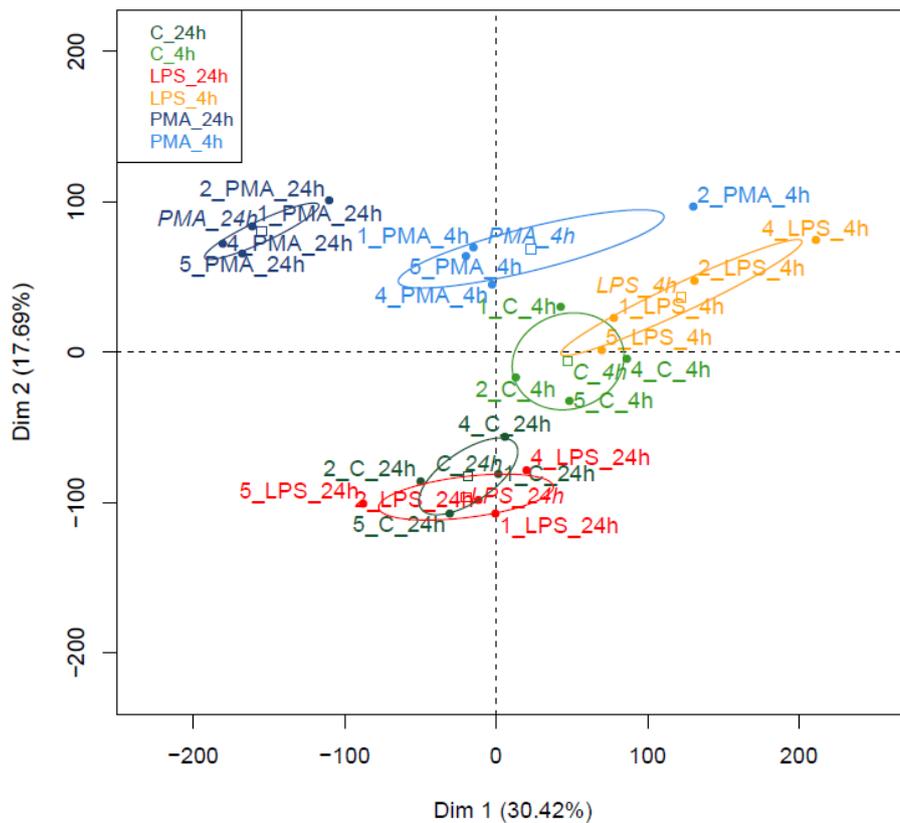


Figure 22: Principal Component Analysis of microarray data, classified by biological replicates.

The differential expression analysis revealed that the number of DE genes increased with time for both stimulations (Table 10). However, the number of DE genes after LPS stimulation at T4 and T24 was approximately 15 to 20 times lower than after PMA-Ionomycin stimulation. Sets of 316 and 377 DE genes were found after LPS stimulation at T4 and T24, respectively (FDR < 0.05). By contrast, sets of 4750 and 7453 DE genes were detected at T4 and T24, respectively, after PMA-Ionomycin stimulation (FDR < 0.05). In addition, the fold change (FC) values with LPS-stimulation varied from -3.38 to 3.20 at T4 and from -9.64 to 50.10 at T24, compared to mock-stimulation.

For PMA-Ionomycin stimulation, the FC values ranged from -48.36 to 227.98 at T4 and from -146.61 to 57.58 at T24 (Table 11). The differential analysis showed that the transcriptome profile of PBMCs varied considerably after PMA-Ionomycin treatment in comparison to the LPS treatment. The striking differences in the number of DE genes and the FC values between LPS and PMA-Ionomycin treatments might explain the close clustering between LPS and mock-stimulated samples.

Table 11: Top-ten DE genes after LPS or PMA-Ionomycin stimulation, T4 and T24.

| | | T4 | | T24 | | | |
|------------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------|-----------|
| | | Gene symbol | FC ¹ | Adj.P.Val | Gene symbol | FC ¹ | Adj.P.Val |
| LPS | Up-regulation | CXCL11 | 3.20 | 4.11E-02 | F3 | 50.10 | 2.91E-04 |
| | | LMTK2 | 2.69 | 1.45E-02 | IL6 | 26.96 | 2.09E-04 |
| | | RETN | 2.35 | 3.11E-02 | SAA1 | 26.27 | 9.37E-04 |
| | | IL12A | 2.29 | 3.85E-02 | IL1B | 18.12 | 2.96E-03 |
| | | HENMT1 | 2.28 | 4.87E-02 | IL10 | 17.61 | 6.48E-04 |
| | | UBE2D2 | 2.11 | 4.44E-02 | IL36G | 17.11 | 9.49E-05 |
| | | EVA1B | 2.10 | 4.96E-02 | S100A12 | 15.74 | 4.69E-02 |
| | | SPTBN4 | 1.95 | 3.85E-02 | TNIP3 | 11.33 | 1.57E-03 |
| | | PKHD1L1 | 1.56 | 4.11E-02 | HBEGF | 9.67 | 2.49E-05 |
| | NOS2 | 1.47 | 4.72E-02 | CCL4 | 9.10 | 4.12E-02 | |
| | Down-regulation | CTSE ² | -3.38 | 3.11E-02 | PALLD | -9.64 | 2.33E-05 |
| | | CHI3L1 | -2.90 | 3.44E-02 | MLANA | -8.12 | 4.55E-07 |
| | | SAMHD1 | -2.90 | 3.85E-02 | DEFB1 | -6.9 | 3.05E-03 |
| | | CLEC4D | -2.89 | 3.28E-02 | ATP6V0D2 | -6.59 | 4.25E-06 |
| | | ALDOA | -2.83 | 1.92E-02 | CLEC7A | -6.23 | 6.12E-06 |
| | | TKT | -2.82 | 2.25E-02 | SLAMF7 | -6.09 | 1.86E-04 |
| | | ATP6V0B | -2.79 | 1.25E-02 | ASPA | -5.15 | 3.65E-04 |
| | | PGAM1 | -2.78 | 3.84E-02 | CTBS | -4.98 | 3.24E-04 |
| | | COMT | -2.78 | 6.21E-03 | BPI | -4.92 | 5.73E-03 |
| FHOD1 | | -2.78 | 1.63E-02 | MPEG1 | -4.46 | 1.65E-03 | |
| PMA-Ionomycin | Up-regulation | CSF2 ³ | 227.98 | 5.78E-12 | CSF2 ³ | 57.58 | 1.99E-10 |
| | | IL13 ³ | 144.98 | 4.40E-18 | BCO2 ⁴ | 51.95 | 1.07E-13 |
| | | IL4 ³ | 105.19 | 7.22E-12 | CD70 ⁴ | 34.74 | 2.65E-11 |
| | | NFKBID ³ | 61.72 | 3.67E-14 | RGCC ³ | 31.77 | 4.15E-12 |
| | | TBX21 ³ | 57.61 | 1.40E-14 | SPRY1 ³ | 29.99 | 6.87E-17 |
| | | SPRY1 ³ | 53.40 | 2.41E-18 | ZBTB32 ³ | 29.31 | 1.26E-11 |
| | | IL2 ³ | 40.01 | 9.61E-18 | CCNB1 ⁴ | 21.20 | 3.78E-11 |
| | | RGCC ³ | 33.61 | 5.83E-12 | I2 ³ | 20.36 | 1.07E-15 |
| | | MMP3 ³ | 33.33 | 3.67E-14 | LAG3 ³ | 19.70 | 7.93E-12 |
| | IL10 ³ | 33.33 | 2.28E-06 | NCAPG ⁴ | 18.80 | 2.07E-12 | |
| | Down-regulation | FAM26F | -48.36 | 3.10E-11 | S100A8 ³ | -146.61 | 4.01E-08 |
| | | RBP4 ³ | -32.07 | 2.32E-08 | RBP4 ³ | -67.53 | 4.27E-10 |
| | | TRAF3IP3 ³ | -21.39 | 6.70E-11 | MGP | -58.62 | 4.98E-13 |
| | | IL16 ³ | -18.62 | 4.17E-10 | DEFB1 | -51.43 | 6.61E-09 |
| | | LTB ³ | -18.29 | 1.24E-07 | S100A12 ³ | -42.78 | 1.89E-04 |
| | | TM4SF5 ³ | -16.79 | 1.27E-09 | ACTA2 | -40.95 | 1.71E-12 |
| | | CD79B | -16.07 | 1.37E-06 | LTB ³ | -33.98 | 2.45E-09 |
| MYRFL ³ | | -15.90 | 3.67E-14 | PID1 ³ | -33.27 | 7.21E-09 | |
| TLR10 | -15.62 | 7.66E-11 | TM4SF5 ³ | -32.16 | 2.12E-11 | | |
| TNFAIP8L2 ³ | -14.95 | 6.25E-05 | CYBB ³ | -31.07 | 8.87E-12 | | |

¹ FC: fold change

² Genes found to be DE in the same direction (either down or up-regulated compared to mock-stimulation) at both T4 and T24 post-stimulation by LPS.

³ Genes found to be DE in the same direction (either down- or up-regulated compared to mock-stimulation) at both T4 and T24 post-stimulation by PMA-Ionomycin.

⁴ Genes that were down-regulated at T4 in contrast to T24

3. Genes and biological functions affected by LPS stimulation

At T4, most DE genes were down-regulated (89% of DE genes) as shown in Table 10 and Figure 2. The most down-regulated gene was the Cathepsin E gene (CTSE), which is an aspartyl protease, followed by the chitinase 3-like 1 gene (CHI3L1) which encodes a glycoprotein. Other genes of interest that were down-regulated include the SAM domain and HD domain 1 gene (SAMHD1), the C-type lectin domain family 4, member D gene (CLEC4D), which encodes a member of the C-type lectin/C-type lectin-like domain (CTL/CTLD) superfamily, and the aldolase A, fructose-bisphosphate gene (ALDOA).

The top ten down-regulated genes at T4 are listed in Table 11. The CD14 molecule gene, known to encode a surface antigen expressed on monocytes and macrophages and involved in mediating the innate immune response to LPS, was found to be down-regulated with a FC value of -2.31 (Additional file 3). The most up-regulated genes were the chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (CXCL11), the lemur tyrosine kinase 2 (LMTK2), which is involved in endosomal membrane trafficking, and the resistin gene (RETN). Other genes that were up-regulated include the interleukin 12A (IL12A) together with the nitric oxide synthase 2, inducible gene (NOS2) which is inducible by LPS in the presence of IL12, and the ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBE2D2).

At T24, the LPS activation revealed a switch towards a majority of genes being up-regulated (212 up vs. 165 down-regulated genes; see Table 10 and Figure 23), with higher FC value than at T4, ranging from -9.64 to 50.10 (Table 11). The most up-regulated gene was the coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor) (F3; FC = 50.10). Among the top ten up-regulated genes (Table 11), an important subset of genes was connected to the inflammation process, and included genes that encode the proinflammatory cytokines IL6, IL1B, and IL36G, the Serum Amyloid A1 protein (SAA1), the chemokine (C-C motif) ligand 4 (CCL4), and the interleukin 10 (IL10) known to have pleiotropic effects on immunoregulation and inflammation. TNF was also found to be up-regulated (Additional file 4) together with the gene encoding the TNFAIP3 Interacting Protein 3 (TNIP3). In addition, the heparin-binding EGF-like growth factor (HBEGF) and the S100 calcium binding protein A12 (S100A12) were in the top ten up-regulated genes.

The HBEGF gene has been reported to encode a cell surface binding protein potentially involved in macrophage-mediated cellular proliferation, and the S100A12 gene has been shown to be involved in cell cycle progression and differentiation.

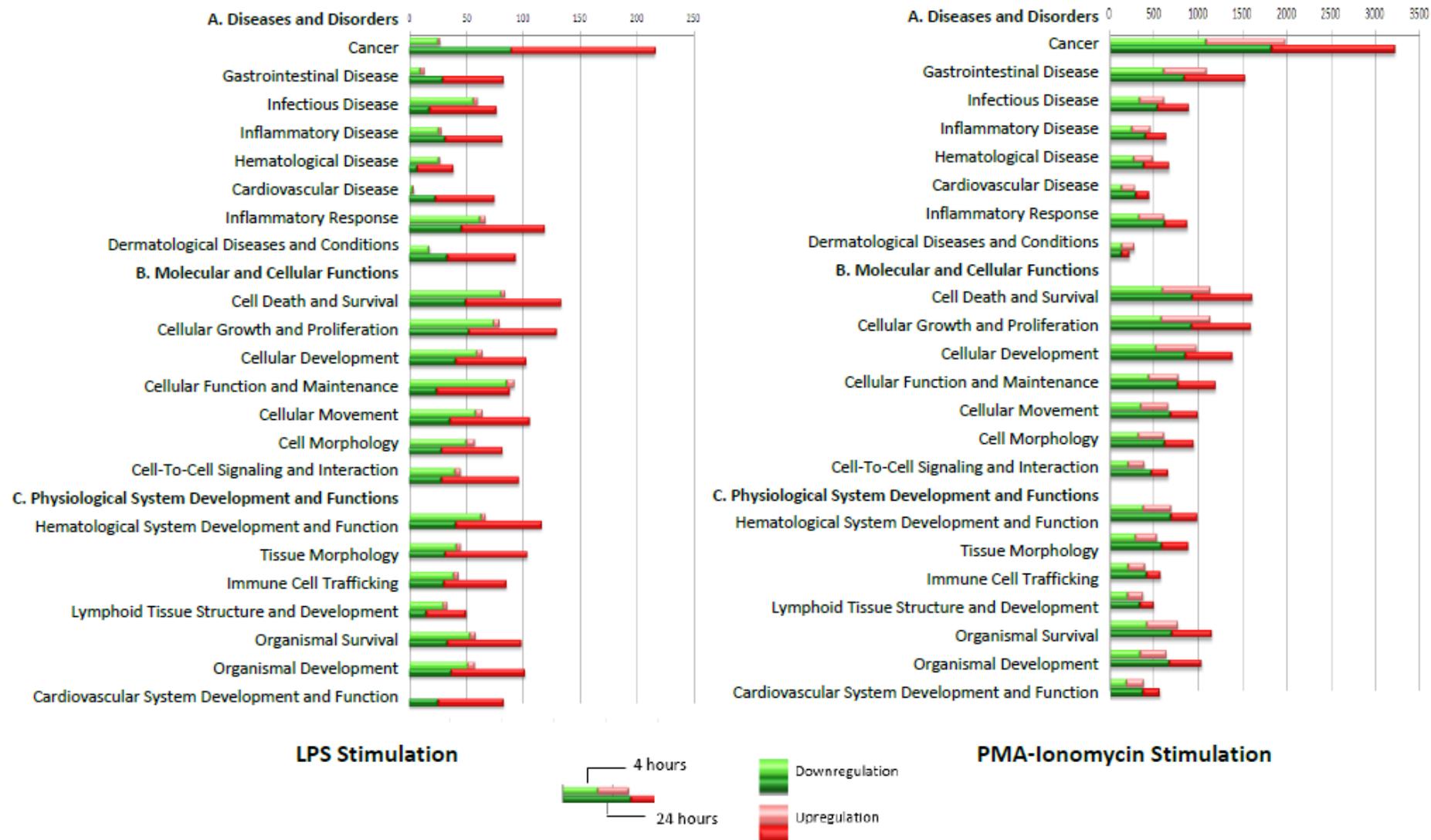


Figure 23: Top biological functions classified by the IPA system, with corresponding number of molecules after LPS and PMA-Ionomycin activation.

The most down-regulated gene was the Palladin Cytoskeletal Associated Protein gene (PALLD). The top-ten down-regulated genes (Table 11) also included the bactericidal/permeability-increasing protein gene (BPI) and the defensin beta 1 gene (DEFB1). BPI encodes a LPS binding protein and has bactericidal activity on gram-negative organisms. DEFB1 belongs to the defensins reported to form a family of microbicidal and cytotoxic peptides made by neutrophils, and encodes an antimicrobial peptide involved in the resistance of epithelial surfaces to microbial colonization.

A very limited set of 10 genes corresponding to eight annotated genes mostly involved in cellular metabolism was DE at both T4 and T24 following LPS stimulation (Figure 24). Four genes were down-regulated at both times (Table 12), including the cathepsin E (CTSE), which encodes an asparatyl protease, the acid phosphatase 5, tartrate resistant gene (ACP5), the lamin A/C gene (LMNA), and the interferon regulatory factor 5 (IRF5). Five probes specifying three genes were found to be DE in opposite orientations at T4 (down-regulation) and T24 (up-regulation). These genes are the membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa gene (MPP1) that encodes a palmitoylated membrane phosphoprotein, the member RAS oncogene family gene (RAB5C), that is a small GTPase, the serologically defined colon cancer antigen 8 (SDCCAG8), and the putative phytanoyl_CoA 2-hydroxylase (PHYH).

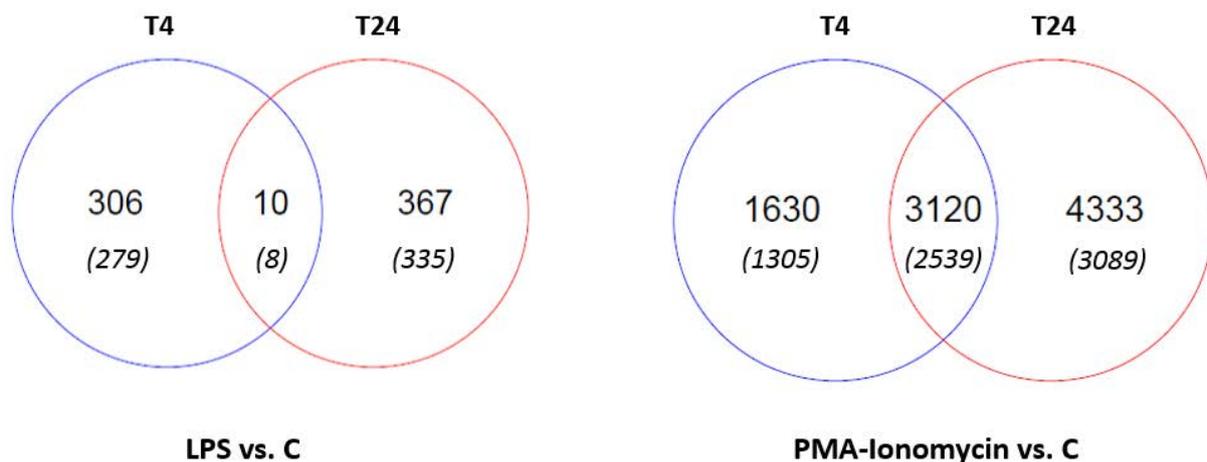


Figure 24: Venn diagram of probes differentially expressed after LPS or PMA-Ionomycin stimulation at 4 and 24 hours.

The value between parentheses indicates the number of well-annotated genes.

For the global analysis of biological functions affected by LPS stimulation, the DE gene lists were submitted to the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) system. From this analysis 262 (82.9% of DE genes) and 322 (85.4% of DE genes) genes were identified by IPA at T4 and T24, respectively. The global picture provided by Figure 23 highlights that most genes were found down-regulated at T4 conversely to T24. The foremost over-represented down-regulated biological functions ($P < 0.05$) at T4 were related to Molecular and Cellular Functions (Cellular Function and Maintenance, Cell Death and Survival, Cellular Growth and Proliferation). However, a number of genes involved in biological functions related to inflammatory disease or response were repressed at T4.

By contrast, at T24, there was a significant enrichment of up-regulated genes associated with biological functions related to Diseases and Disorders such as inflammatory response, Inflammatory Disease and Infectious Disease. For the Molecular and Cellular Functions, the most represented functions were Cell Death and Survival, Cellular Growth and Proliferation, Cellular Movement, Cellular Development and Cell-to-Cell Signaling and Interactions. For the Physiological System Development and Functions, the most represented function was the Hematological System Development and Function.

Table 12: List of the 10 genes found DE at T4 and T24 upon LPS stimulation.

| Gene name | T4 | | T24 | |
|---------------------------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | FC ¹ | Adj.P.Val | FC ¹ | Adj.P.Val |
| CTSE | -3.38 | 3.11E-02 | -2.81 | 3.88E-02 |
| ACP5 | -2.17 | 2.98E-02 | -1.87 | 4.57E-02 |
| LMNA | -2.16 | 3.85E-02 | -2.08 | 3.51E-02 |
| IRF5 | -1.98 | 4.87E-02 | -2.23 | 1.36E-02 |
| lcaw0026.b.03.a_5.1.fwd2 ⁴ | 1.97 | 1.45E-02 | 2.12 | 5.87E-04 |
| MPP1 | -2.41 | 3.85E-02 | 2.19 | 4.85E-02 |
| ENSOCUT00000015242 ² | -2.00 | 1.92E-02 | 2.24 | 8.45E-04 |
| lcaw0079.e.09.a_5.1.fwd1 ³ | -1.82 | 1.92E-02 | 1.83 | 3.26E-03 |
| RAB5C | -1.80 | 3.85E-02 | 1.72 | 3.51E-02 |
| SDCCAG8 | -1.32 | 3.11E-02 | 1.29 | 2.20E-02 |

¹FC: fold change

²Putative annotation following BLAST search for sequence similarities: *Oryctolagus cuniculus* phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (NCBI Accession number: LOC100338511, info on BLAST score)

³Putative annotation following BLAST search for sequence similarities: *Oryctolagus cuniculus* phytanoyl-CoA 2-hydroxylase (NCBI Accession number: LOC100344679; info on BLAST score)

⁴No available annotation

The IPA system identified 17 and 21 gene networks at T4 and T24, respectively. The gene network that groups cytokines and chemokines known to be involved in inflammation responses is

presented in Figure 25 and draws a picture of the kinetics of inflammatory response to LPS stimulation. At T4, the LPS-related network shown in Figure 25A is involved in Inflammatory Response, Cell Death and Survival, and Cellular Movement. This network grouped 9 DE genes, which included two connected genes, CXCL11 and IL12A, listed in the top-ten up-regulated genes (Figure 25A). They are reported to be directly under the control of IRF5 by IPA.

At T24, the LPS-related network shows the interactions of 24 DE genes (Figure 25B), and provides a picture of the intensification of the inflammatory response together with an increase in the number of up-regulated molecules involved in this process (IL1B, IL6, IL36G, IL37, and CCL4). In addition, a cell differentiation toward a Th2 phenotype is provided by this gene network (GATA3 gene linked to Th2 cytokine cluster and IL10). The variation in cytokine profiling upon stimulation by LPS with time is summarized in Table 13. Unexpectedly, CXCL8 (also known as IL8) was not found to be up-regulated in our experimental conditions.

Table 13: Transcription profile of cytokines in PMBCs stimulated by LPS at T4 and T24

| Condition | ID | FC ¹ | adj.P.Val |
|-----------|-------------------|-----------------|-----------|
| LPS T4 | CXCL11 | 3.20 | 4.11E-02 |
| | IL12A | 2.29 | 3.85E-02 |
| | NOS2 | 1.47 | 4.72E-02 |
| | CD14 ² | -2.31 | 4.52E-02 |
| LPS T24 | IL6 ² | 26.96 | 2.09E-04 |
| | IL1B ² | 18.12 | 2.96E-03 |
| | IL10 ² | 17.61 | 6.48E-04 |
| | IL36G | 17.11 | 9.49E-05 |
| | IL1A | 9.01 | 2.20E-02 |
| | IL37 | 7.02 | 4.16E-05 |
| | TNF | 5.92 | 1.18E-02 |
| | IL1RAP | 2.82 | 2.26E-02 |
| | IL12RB2 | 2.23 | 1.14E-03 |
| | IL23R | 1.76 | 1.69E-03 |
| | CCL27 | -1.42 | 3.49E-02 |

¹FC: fold change

² Genes used for qRT-PCR validation

4. Genes and biological functions affected by PMA-Ionomycin stimulation

Two large sets of genes were found DE at T4 and T24 (Table 10), with a slight tendency toward more up-regulated genes than down-regulated genes at both times (2273 down- versus 2477 up-regulated probes at T4; 3414 down- versus 4039 up-regulated probes at T24). As shown in Table

11 (and Additional files 5 (T4) and 6 (T24)), there was a decrease over time in the FC values for up-regulated genes (maximum FC was 227.98 and 57.58 at T4 and T24, respectively) but an increase

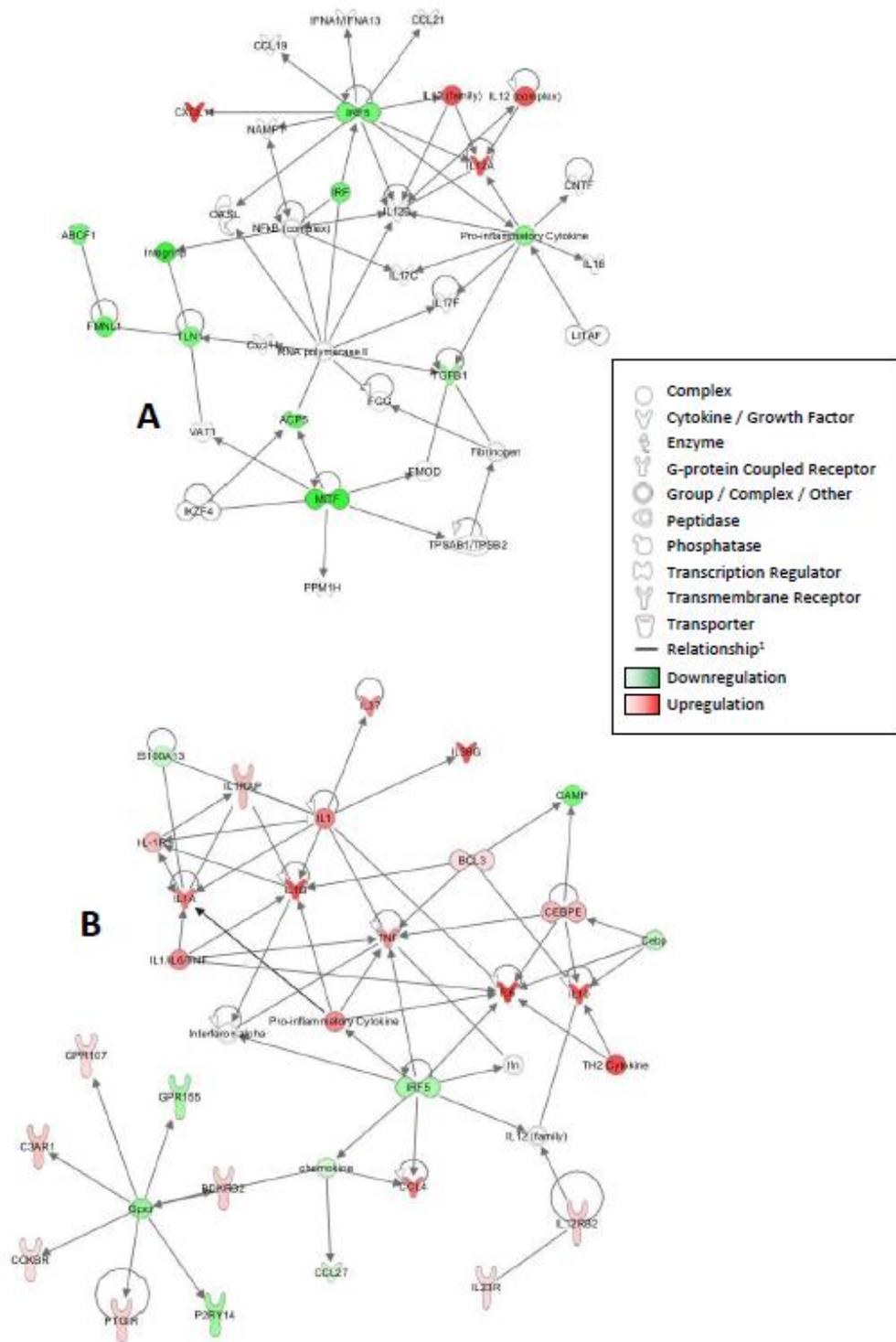


Figure 25: LPS-related gene networks identified by the IPA system: network at T4 (A) and network at T24 (B).

¹All relationships are direct interactions.

over time in the FC of down-regulated genes (minimum FC was -48.36 and -146.61 at T4 and T24, respectively). A set of 3120 DE probes was shared at both times, and could be divided into a subset of 2378 probes that were continually DE in the same directions at T4 and T24 (1091 probes down-regulated and 1287 probes up-regulated), a subset of 515 probes that were down-regulated at T4 and up-regulated at T24, and a third subset of 227 probes that were up-regulated at T4 but down-regulated at T24.

The genes CSF2, IL2, and RGCC (gene regulator of cell cycle) were among the top ten genes found over-expressed at T4 and T24. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF2) was by far the most over-expressed gene with a positive FC of 227.98 at T4 and 57.58 at T24 (Table 11). CSF2 encodes a cytokine that controls the production, differentiation, and function of granulocytes and macrophages, and the RGCC gene encodes a protein thought to regulate cell cycle progression. All top ten over-expressed genes at T4 were still up-regulated at T24. Conversely, the genes BCO2, CD70, CCNB1, and NCAPG found in the top ten over-expressed genes at T24 were found to be down-regulated at T4, showing a switch in gene regulation between T4 and T24.

The beta-carotene oxygenase 2 gene (BCO2) encodes an enzyme, which oxidizes beta-carotene during the biosynthesis of vitamin A. CD70 molecule gene (CD70) encodes a cytokine that belongs to the TNF ligand family. CD70 is a ligand for TNFRSF27/CD27 and a surface antigen on activated B and T lymphocytes, and contributes to T cell activation. The cyclin B1 gene (CCNB1) encodes a regulatory protein involved in mitosis. The non-SMC condensin I complex, subunit G gene (NCAPG) encodes a subunit of the condensin complex, which is responsible for the condensation and stabilization of chromosomes during mitosis and meiosis.

The genes LTB and FPR1 were both found in the top ten most repressed genes at T4 and T24 post stimulation. The lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3) (LTB) encodes a protein which is an inducer of the inflammatory response system and is involved in normal development of lymphoid tissue. In addition, there was an intensification of the repression of the two genes S100A8 (S100 calcium binding protein A8) and S100A12 (S100 calcium binding protein A12) which encode proteins of the S100 family containing 2 EF-hand calcium-binding motifs, involved in cell cycle progression and differentiation. The defensin beta 1 (DEFB1) gene was repressed only at T24.

The cytokine and chemokine profiles revealed a continued up-regulation over time of CSF2, IL2, IL4, IL10, IL13, IL17A, IL31, IL9, IFNG, CCL1, CCL2, and CCL20 (Table 14), and a down-regulation of IL16, IL37, IL36G, and IL15. The CD69 molecule gene (CD69), known to be induced by the activation of T lymphocytes, was found to be over-expressed at T4 (FC=12.1) and T24 (FC=5.07). At T4, there was a notable opposite regulation between over-expressed IL13, IL4, IL2, and IL10, and repressed IL16 and LTB.

This opposite regulation was maintained at T24. IL13 is an immunoregulatory cytokine primarily produced by activated Th2 cells reported to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines. IL16 is a pleiotropic cytokine that functions as a chemoattractant and a modulator of T cell activation.

At T4, a specific up-regulation of IL17F, CXCR7, IL21, IL22, IL33, and TNFRSF21, together with a repression of IL18 and CXCL10 were detected. At T24, a specific up-regulation of CCL4, CCL22, CCL27, IL34, TNF, IL12A, and IL6, together with a repression of IL1R2, CXCR4, IL1B, TNFSF13, and IL1RAP were shown.

The transcription factors TBX21, STAT5A, and STAT5B were up-regulated at T4 and T24, whereas GATA1 was slightly repressed at both times (Table 14). TBX21 is the T-box 21 gene that stands as the human ortholog of the mouse Tbx21/Tbet gene. This gene was reported to act as a Th1 cell-specific transcription factor and controls the expression of IFNG [19]. STAT5A and STAT5B are both members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family of transcription factors that respond to cytokines and growth factors. STAT5A encodes a protein that is activated by IL2 and CSF2, and STAT5B encodes a protein reported to mediate the signal transduction triggered by various cell ligands, such as IL2 and IL4.

At T24, two additional members of the STAT family of transcription factors, STAT4 (FC=9.66) and STAT1 (FC=1.89), were found up-regulated and two other members of the GATA families were slightly repressed (GATA2, FC=-1.64 and GATAD2B, FC=-1.51). FOXP3 was not found affected by the PMA-Ionomycin stimulation. We checked the differential expression of the thrombospondin gene (THBS1) that was found to be the most repressed gene in porcine PBMCs stimulated for 24 hours by PMA-Ionomycin [18]. In rabbit PBMCs, the THBS1 gene was repressed only at T24 and with a limited FC of -4.75.

The genes encoding class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC) were found to be repressed. The most repressed genes belong to the DR series followed by DM, DQ and DP. This repression was initiated early after stimulation since DMA, DMB and DRB1 were already

found down-regulated at T4 (Additional file 7). In addition, few probes corresponding to MHC class I transcripts were found down-regulated.

Interestingly, and in agreement with data obtained in pig [18], we observed an up-regulation of genes encoding heat shock proteins (HSPs) and many genes involved in the cascade of peptide processing before loading to the MHC molecule binding groove (components of the proteasome (PSMB gene series), calnexin (CANX), tapasin (TAP1)), despite an overall down-regulation of genes encoding class I and II molecules (Additional file 7).

At T4 and T24, subsets of 3575 (75.3%) and 5153 (69.1%) DE genes were mapped into the IPA system. The relative representation of biological functions between T4 and T24 was quite similar (Figure 23). By excluding all genes associated to Cancer, IPA revealed an enrichment of genes principally related to Molecular and Cellular Functions (cell death and survival, cellular growth and proliferation, cellular development, cellular function and maintenance), followed by an enrichment of genes associated with Diseases and Disorders (gastrointestinal disease, infectious disease, inflammatory response), and Physiological System Development and Function (organismal survival, organismal development, hematological system development and function). These observations were reinforced by the analysis of the set of 3123 genes found to be DE at both T4 and T24, and showed a predominance of genes associated with Molecular and Cellular Functions.

The 515 genes found down-regulated at T4 and up-regulated at T24 were predominantly associated to the biological functions Cell Cycle, DNA Replication Recombination and Repair, and Cellular Assembly and Organization. For the 227 genes found up-regulated at T4 and down-regulated at T24, there was an enrichment in biological functions relating to Cell Death and Survival, Cell Growth and Proliferation, Cell Development, Tissue Morphology, and Hematological System Development and Function. For these two gene sets, the enriched biological functions aligned well with those found for the genes that revealed no inverted regulation compared to mock-stimulation at T4 and T24.

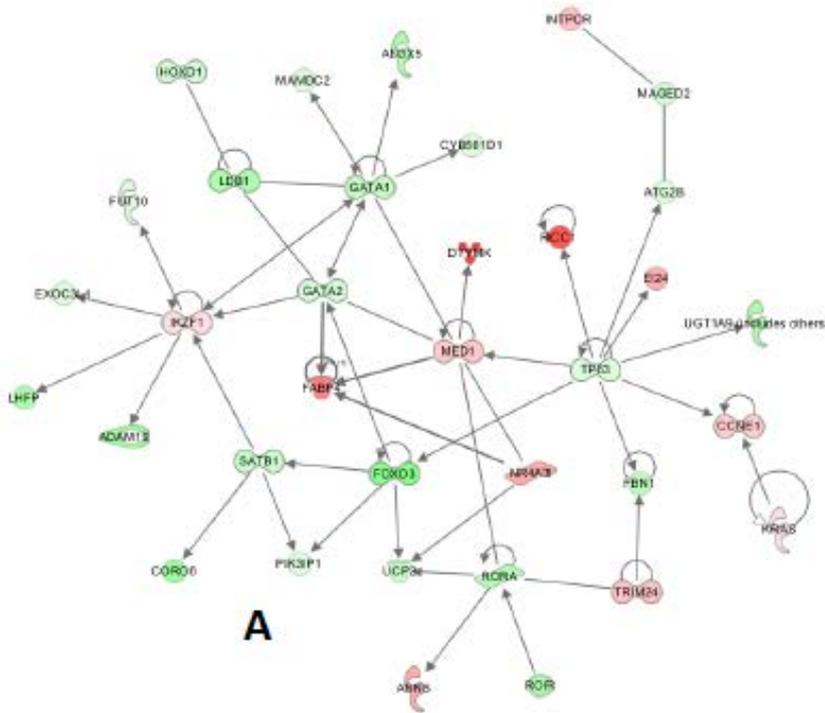
The PMA-Ionomycin network analysis was deliberately limited to 25 networks, including up to 25 genes each. The network shown in figure 26A highlights transcription factors GATA1 and GATA2, down-regulated at T24 and involved in many aspects of cell growth and immune tolerance. In the second network (Figure 26B), STAT4 is up-regulated and in a central position, inhibiting IL10RA but activating RGCC. This transcription factor STAT4 is required for the development of Th1 cells from naïve CD4+ T cells and IFNG production in response to IL12.

Table 14: Transcription profiles of cytokines and transcription factors in PMBCs stimulated by PMA-Ionomycin at T4 and T24.

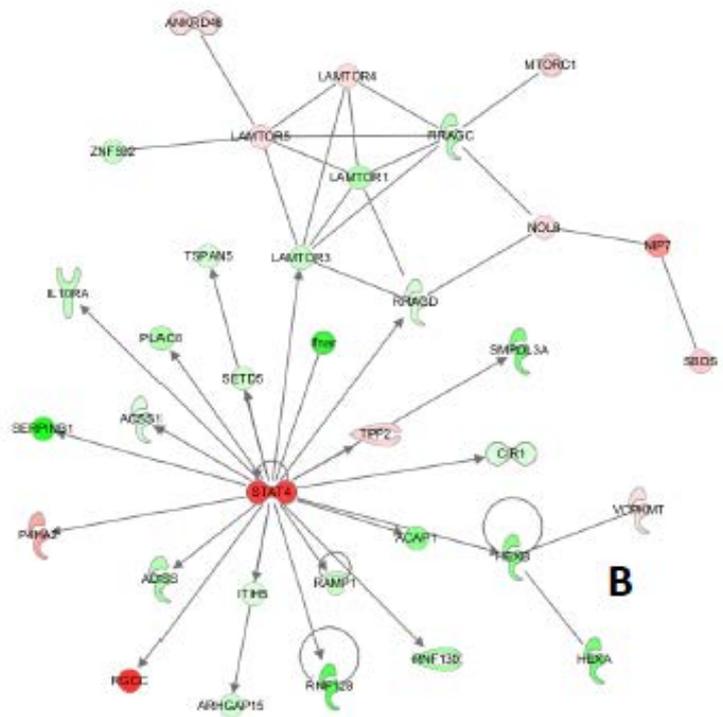
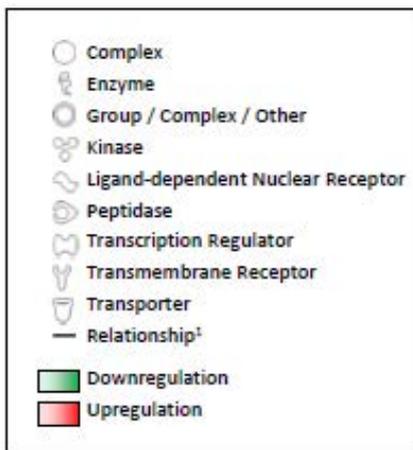
| ID | FC ¹ | | ID | FC ¹ | ID | FC ¹ |
|-------------------|-----------------|-------|----------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | T4 | T24 | | T4_specific | | T24_specific |
| CSF2 | 227.98 | 57.58 | IL17F | 7.80 | CCL4 ² | 5.02 |
| IL13 | 144.98 | 4.68 | CXCR7 | 5.35 | CCL22 | 2.99 |
| IL4 | 105.19 | 18.23 | IL21 | 4.75 | CCL27 | 1.99 |
| IL2 ² | 40.01 | 20.36 | IL22 | 4.50 | IL34 | 5.91 |
| IL10 ² | 33.33 | 3.46 | IL33 | 2.33 | TNF ² | 5.15 |
| IL17A | 19.34 | 4.27 | TNFRSF21 | 1.65 | IL12A | 4.03 |
| CD69 | 12.11 | 5.08 | IL17RE | -1.37 | IL6 ² | 4.03 |
| IFNG ² | 8.50 | 12.31 | ILDR2 | -1.68 | ILF3 | 2.24 |
| CCL2 | 6.95 | 5.06 | CXCL9 | -1.71 | TNFRSF25 | 1.78 |
| TNFRSF12A | 6.90 | 3.53 | IL12RB2 | -1.77 | TNFRSF13B | 1.62 |
| CCL1 | 5.40 | 13.78 | IL18 | -1.91 | TNFRSF8 | 1.60 |
| TNFSF14 | 5.07 | 2.49 | IL18R1 | -1.92 | ILDR1 | -1.18 |
| CCL20 | 4.28 | 5.05 | IFNAR1 | -1.94 | CCL14 | -1.32 |
| IL31 | 3.05 | 1.88 | IFNGR1 | -2.12 | IL1RAPL2 | -1.35 |
| IL6ST | 2.93 | -2.44 | TNFSF10 | -2.48 | IL27RA | -1.43 |
| TNFRSF9 | 2.87 | 2.71 | IL18RAP | -2.64 | IL18BP | -1.68 |
| ILF2 | 2.26 | 2.04 | IFNAR2 | -2.71 | IL22RA2 | -1.77 |
| IL9 | 1.90 | 1.95 | IFNGR2 | -2.79 | CCL21 | -1.83 |
| TNFSF11 | 1.46 | 2.12 | CXCL10 | -6.13 | IL1RN | -2.04 |
| IL6R | -1.77 | -1.52 | | | TNFRSF11B | -2.06 |
| TNFSF8 | -1.90 | -3.19 | | | TNFRSF1B | -2.13 |
| IL3RA | -1.95 | -5.05 | | | IL7R | -2.57 |
| IL10RA | -2.08 | -2.15 | | | TNFAIP3 | -2.61 |
| IL1RL1 | -2.18 | -2.66 | | | IL13RA1 | -2.86 |
| TNFRSF17 | -2.28 | -1.64 | | | TNFAIP8L3 | -2.97 |
| TNFRSF1A | -2.35 | -3.27 | | | IL2RG | -4.09 |
| IL15 | -2.46 | -2.91 | | | IL1RAP | -6.58 |
| IL17RA | -2.54 | -4.57 | | | TNFSF13 | -8.80 |
| IL36G | -4.84 | -2.97 | | | IL1B ² | -11.68 |
| IL37 | -5.31 | -2.17 | | | CXCR4 | -14.72 |
| TNFAIP8L2 | -13.00 | -9.72 | | | IL1R2 | -16.48 |
| IL16 | -18.62 | -7.92 | | | STAT4 | 9.67 |
| TBX21 | 57.61 | 12.01 | | | STAT1 | 1.89 |
| STAT5A | 3.41 | 1.70 | | | GATAD2B | -1.51 |
| STAT5B | 3.14 | 2.09 | | | GATA2 | -1.64 |
| GATA1 | -1.45 | -2.12 | | | THBS1 | -4.75 |

¹FC: fold change

² Genes used for qRT-PCR validation



A



B

Figure 26: PMA-Ionomycin-related gene networks identified by the IPA system at T24 (A and B).

¹All relationships are direct interactions.

5. Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR

A set of eight genes was chosen for microarray data validation by real time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR). These genes were selected according to their expression level (up- or down-regulated), in order to test genes found DE at T4 and T24 for both LPS and PMA-Ionomycin stimulations (Additional file 8). The B2M and GAPDH genes were included as reference genes for data normalization. A linear regression was performed between the $\log_2(\text{fold change})$ values of microarray and qRT-PCR data. A significant Spearman correlation coefficient ($R^2 = 0.8829$) was calculated between the two techniques (Figure 27), thus validating the microarray data and confirming the reliability of the transcriptome analyses.

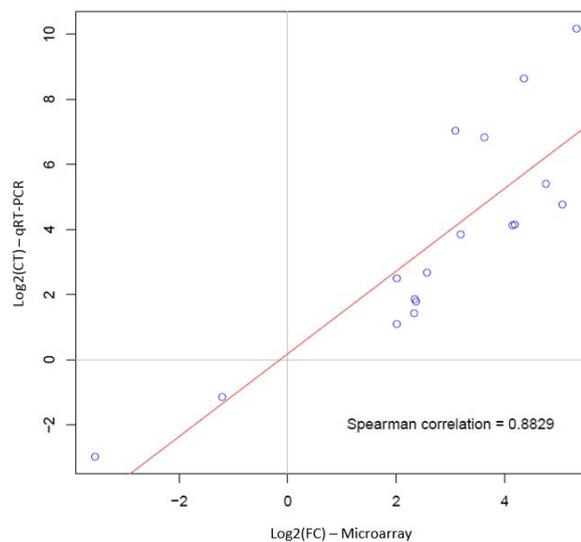


Figure 27: Comparison between microarray-based ($\text{Log}_2(\text{CT})$) and qRT-PCR-based results ($\text{Log}_2(\text{FC})$) by Spearman correlation scattered plots.

V. Discussion

1. Cytokine profile induced by LPS stimulation in rabbit PBMCs

LPS is an outer membrane component of Gram-negative bacteria and the crystal structure of the trans-envelope protein complex inserting LPS in the outer leaflet of the outer envelope has been very recently described [20,21]. Lipid A is the main PAMP of LPS. Interactions between LPS and TLR4, a sensor for LPS [22], at the surface of macrophages and dendritic cells trigger the expression of proinflammatory cytokines and activate the innate immune system by MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene) dependent or MyD88 independent pathways [23]. In our study, an early up-regulation of IL12A and CXCL11 together with a slight repression of CD14 was found at T4. This LPS-induced CD14 repression observed at T4 was comparable to *in vivo* human

studies [24], highlighting the immunodepressive effect of LPS on rabbit PBMCs. Up-regulation of a wider range of inflammatory cytokines was observed at T24 with a differential expression between mock-stimulation and LPS-stimulation for IL6, IL1A, IL1B, and TNF. In LPS-stimulated human whole blood [25], it has been reported that gene activations of both IL6 and TNF were induced early, after only 2-4 hours and then rapidly declined. Several studies have shown the synergy between IL1B and TNF [26,27]. When both cytokines were administered to healthy humans, they induced fever, inflammation, tissue destruction, or resulted in the development of sickness behavior, and depressed mood when combined with IL6 [28,29]. Moreover, IL1B and TNF have been shown to stimulate the expression of IL36G in keratinocytes [30,31], confirming results at T24. Our results suggest a significant triggering of the MyD88 dependent pathway in dendritic cells that is characterized by IL12 production and followed by a T cell differentiation toward Th1 phenotype [32,33], as represented in figure 25A. The onset of the inflammation process was detected at T4 but clearly amplified at T24 as represented in figure 25B, showing that the data obtained at T4 did not provide an accurate overall picture of gene expression picture upon LPS stimulation. In addition, gene transcription levels did not return to basal levels at T24, as already shown in pigs [18]. This late increase in inflammatory cytokine transcription contrasts with results on bovine PBMCs for which the inflammation process was triggered much earlier with a maximal expression of inflammation gene expression at T4 [34]. For both T4 and T24 after LPS activation, the interferon regulatory factor 5 (IRF5) was found to be under-expressed. In 2011, Krausgruber et al. [35] highlighted a critical role for the transcription factor IRF5 in human M1 macrophage polarization and defined it as a transcriptional repressor. Moreover, an activation of the Th1 response by IRF5 has been reported.

2. Putative specific features of rabbit PBMCs upon LPS stimulation

Unexpectedly, IL8 (CXCL8 in human) was not DE in our experimental conditions at the transcript level at both T4 and T24, whereas nucleotide probes specific for this gene are available on the microarrays used for the transcriptome analyses. Indeed IL8 is a chemokine known to act as one of the major mediators of the inflammatory response and has been reported to be up-regulated after LPS stimulation in many mammals including cattle [34,36] and pig [37,18]. As opposed to other species, the possibility that T4 might be too late a time point for detecting an up-regulation of IL8 in rabbits cannot be excluded. Recent reports have shown that bacterial-host interactions affect histone acetylation, phosphorylation and methylation state at the TLR4, and IL8 promoter in host cells [38,39]. In cattle, it has been hypothesized that host individual variability in response to LPS stimulation could be due to epigenetic variations modulating individual IL8 expression in PBMCs [34] and in dermal fibroblasts [36]. In addition, DEFB1 and BPI were down-regulated at T24

compared to mock-stimulation, whereas they were expected to be up-stimulated due to their bactericidal activity [40-42]. Defensins form a family of microbicidal and cytotoxic peptides, and DEFB1 encodes an antimicrobial peptide implicated in the resistance of epithelial surfaces to microbial colonization [43]. Beta defensins have thus an antimicrobial activity that defend epithelial surfaces including the skin, gastrointestinal, and respiratory tracts. BPI encodes a LPS binding protein associated with neutrophil granules in humans, and has bactericidal activity on gram-negative organisms [44]. Upon LPS activation, BPI may have several functions, as inhibition of endothelial cell growth and inhibition of dendritic cell maturation, or as an anti-angiogenic, chemoattractant or opsonization agent [45]. To our knowledge, no study has shown down-regulation of DEFB1 or BPI in rabbit PBMCs upon LPS activation. However, a down-regulated expression of DEFB1 has been shown following infections by several pathogens (*Shigella* and *Cryptosporidium parvum*) in epithelial cells of the digestive and respiratory tracts in humans or mice [46-48]. In our experimental model, we do not have a clear explanation for the down-regulation of DEFB1 and BPI, but our results suggest the onset of an immune escape mechanism upon LPS stimulation that needs further investigation. We cannot rule out that both genes are induced early after stimulation, before the time window chosen for this study. Additional data are required to better assess why no increase of IL8 transcription was detected during the global inflammatory process induced by LPS stimulation in rabbit PBMCs between 4 and 24 hours post stimulation, and why a down-regulation of bactericidal activity-related genes was found at T24. It could be interesting to carry out new kinetics studies that include earlier time points (e.g. one hour post-stimulation), as well as a mid-time point (e.g. 12 hours post stimulation) and a late time point at 48 hours post-stimulation, thus providing new data to validate or not the hypothesis that rabbits differ from mice and humans for the *in vitro* production of IL8, and up-regulation of DEFB1 and BPI by PBMCs upon LPS stimulation.

3. Sets of genes commonly affected by LPS stimulation in various mammalian species

Our results have confirmed a wide range of genes, other than cytokines and chemokines, which were affected by LPS stimulation in rabbit PBMCs. This has already been reported in other species, thus illustrating shared innate immunity responses among mammals. The SAA1 gene belongs to the family encoding the serum amyloid A (SAA) proteins. As reported in pigs [18], the SAA1 gene was found up-regulated upon LPS stimulation in PBMCs at T24. The association of increased levels of SAA proteins with inflammatory states has been largely reported [49], but the precise functions of SAA proteins still need clarification. SAA has been reported to be involved in the establishment and maintenance of inflammation, and as an opsonin it facilitates phagocytosis of Gram-negative bacteria [50]. SAA acts as an antiapoptotic agent for neutrophils [51], and directly drives a

regulatory program in neutrophils by stimulating them to produce IL10 that has anti-inflammatory effects [52]. The strong up-regulation of IL10 detected in rabbit PBMCs at T24 might be related to this role of SAA. In addition, SAA was recently shown to induce mitogenic signals in regulatory T cells, by enhancing the secretion of IL1B and IL6 by monocytes, and driving them towards a phenotype resembling immature dendritic cells [53]. Indeed, IL6 and IL1B genes were both strongly up-regulated together with SAA1. Our results suggest that the rabbit is an interesting species for further study of SAA-associated regulatory mechanisms, which could be shared across mammals. The S100A12 gene was strongly up-regulated in rabbit LPS-stimulated PBMCs at T24, as reported in pig PBMCs under similar LPS stimulation conditions [18]. S100A12 gene belongs to the family that encodes the S100 proteins. Approximately 25 different S100 proteins have been characterized so far [54]. A common feature shared by all the S100 proteins is the presence of a pair of calcium-binding helix-loop-helix domains referred to as EF-hand calcium-binding regions towards either end of the protein and separated by a hinge region [55]. The broad diversity of S100 proteins is related to a multitude of biological functions such as cell growth, cell differentiation, and cell survival in numerous physiological and pathological conditions in all cells of the body. Furthermore, all S100 proteins are likely to induce some changes in the actin cytoskeleton organization [54]. S100A12 is expressed in the myeloid cell lineage, and is found in abundance in granulocytes, monocytes, and lymphocytes in human. Extracellular S100A12 can induce directional migration and chemotactic responsiveness of monocytes and neutrophils *in vitro* [54].

At T24 post LPS stimulation, we detected a very strong transcription increase of the gene F3 that encodes the coagulation factor III or thromboplastin, a cell surface glycoprotein that enables cells to initiate the blood coagulation cascades. It has been long reported that blood cells generate thromboplastin activity upon incubation with LPS or Gram-negative bacteria [56]. It has been further established that monocytes are the blood cells that possess this property [57], and that collaboration with lymphocytes is required for a rapid induction of procoagulant activity [58]. Induction of pro-coagulant activity of hepatic macrophages by LPS has already been demonstrated in rabbits [59]. In this paper, we demonstrate by a genome-wide and a non-focused approach that a pro-coagulant activity is also strongly induced by LPS in PBMCs in the rabbit.

A concerted action of S100A12, SAA, and thrombotic functions during inflammatory diseases has been reported in humans [60]. Here, we clearly show that in rabbit PBMCs stimulated *in vitro* by LPS, a strong combined increase in the expression of the corresponding rabbit genes (S100A12, SAA1, F3) is detected.

4. PMA-Ionomycin stimulation affects many more genes than LPS stimulation

PMA is a diester of phorbol and a potent tumor promoter often used in biomedical research to activate the signal transduction enzyme protein kinase C (PKC). For *in vitro* cell stimulation, PMA is used in conjunction with ionomycin, a Ca²⁺ ionophore produced by the bacterium *Streptomyces conglobatus*. The number of DE genes after PMA-Ionomycin stimulation was found to be 15 and 20 times higher at T4 and T24, respectively, by comparing to the number of DE genes after LPS stimulation. These findings are in agreement with a similar study in swine in which we reported that ten times more genes were DE after PMA-Ionomycin stimulation than after LPS stimulation [18]. This difference is consistent with the dynamics of the responses to LPS and PMA-Ionomycin, since it was observed at T4 and maintained at T24. As previously discussed [18], this observation might reflect that LPS targets only a limited set of monocytes and macrophages expressing CD14 [61], while PMA-Ionomycin has a much wider spectrum of target cells. We found 515 probes that were down- and up-regulated at T4 and T24, respectively, and vice versa for another 227 probe set. All these genes relate to the same biological functions than those associated to genes found only up- or down-regulated at both T4 and T24, thus likely reflecting a dynamic process that includes combined actions of genes toward a concerted immune response.

5. PMA-Ionomycin stimulation induced early Th2, iTreg (induced Tregs), and Th17 responses at T4 followed by an increase in the Th1 response at T24

At T4, the cytokine profile revealed a very strong up-regulation of IL13 and IL4, which are produced by Th2 population subsets [61]. Both cytokines were still up-regulated at T24 in comparison to mock-stimulated cells but with a much lower fold-change than at T4 (Table 5). We could not detect up-regulation of transcription factors that induce cells to commit to a Th2 phenotype such as STAT6 and GATA3. Similarly, IL10 could be detected at T4 but the up-regulation was decreased at T24, as previously described in pigs [62]. This cytokine is identified as a hallmark of iTreg lymphocytes [61]. The *Foxp3* gene known to be involved in iTreg lymphocyte differentiation was not found to be affected by PMA-Ionomycin stimulation. In addition, IL17F was moderately up-regulated at T4 (Table 5) in comparison to mock-stimulated PBMCs, and IL17A was found to be DE at both T4 and T24 with a decrease in the FC between stimulated and non-stimulated PBMCs at T24 in comparison to T4. All these results suggest a very early expression of Th2, iTreg, and Th17-associated cytokines with a progressive slow-down after T4.

Conversely, we detected an increase in Th1 phenotypes between T4 and T24. Indeed, the two lineage-defining transcription factors STAT4 and TBX21 (or T-bet) were significantly up-regulated at T4, and at T4 and T24, respectively. STAT4 and TBX21 genes drive the Th1 cell commitment and IFNG is the main Th1 cytokine. These data show that PMA-Ionomycin stimulation induces a Th1 response that is not only maintained, but was found to increase at T24. This coincides with results we have previously reported, where a predominance of a Th1 response after PMA-Ionomycin treatment of PBMCs was seen in swine for T24. Our results in rabbits suggest that the Th1 response induced by PMA-Ionomycin might be maintained on a longer term than other responses, thus confirming a predominance of a Th1 response after 24h stimulation as previously shown in pigs [18]. Recent reports have demonstrated a plasticity of T-helper cell differentiation [61], thus suggesting that T cell differentiation is not always the result of a direct differentiation from naïve T cells but that new cell commitments may also occur after a reprogramming of differentiated cells [61]. From our data, we cannot determine whether the observed Th1 phenotype increase is due to the reprogramming of differentiated T cells or to the direct differentiation of naïve T cells.

6. A strong up-regulation of CSF2 and a down-regulation of IL16 induced by PMA-Ionomycin stimulation in favor of cell proliferation

The most up-regulated gene at T4 and T24 after PMA-Ionomycin stimulation was CSF2, a cytokine that functions as a white blood cell growth factor. CSF2 stimulates stem cells to produce granulocytes (neutrophils, eosinophils, and basophils) and monocytes [63]. By contrast, the cytokine IL16 was down-regulated at both T4 and T24, with a high negative fold-change.

Several studies have shown that IL16 is constitutively expressed in peripheral blood monocytes and that there is a direct link between IL16 expression and apoptosis [64,65], and with autoimmune and allergic diseases [66]. Whereas some genes (including IL10, IL16, and TLR6) have been shown to be down-regulated during Fas-mediated or camptothecin-induced apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes [67], our results confirmed previous studies where down-regulation of IL16 is associated with T cell activation and proliferation [68,69]. IL16 has also been described as an important growth-promoting factor in multiple myeloma [70].

VI. Conclusion

In this report, we have characterized the gene profiling modification of rabbit PBMCs upon *in vitro* stimulation by either LPS or a mixture of PMA and ionomycin, thus providing genome-wide expression data on immune responses for the rabbit species. Our results were consistent with data previously cited for other mammalian species, thus confirming that the rabbit is a relevant model for immunity studies.

Presently, the rabbit is no longer a species lacking genomic tools. The availability of a 7X coverage of the genome sequence [7], together with the progress of related information on annotation and SNP variations, constitute highly valuable tools for launching large-scale genome-wide studies in this species [4]. For transcriptomic studies, it is now widely acknowledged that RNAseq approaches are well adapted to exhaustively detect all transcription variations between different conditions together with SNP variations among individuals. The rabbit is a very useful model in biomedical research [4,71]. As a livestock species, there is a need for large scale studies on resistance to disease and reduction of the use of antibiotics in production systems. The rabbit species does not have the same financial means as other species such as cattle. This study shows that a commercial well-annotated microarray is now available for rabbits, and can be used in combination with RNAseq approaches. Due to their efficiency in the study of immune responses, as well as their cost-effectiveness, the use of microarrays can be easily expanded to large cohorts of animals either for biomedical research or for improving knowledge on immunity and resistance to diseases to promote safe and efficient farm systems.

VII. Acknowledgements

The authors are grateful to Federica Di Palma, Jessica Alföldi, and Jeremy Johnson (Broad Institute, Cambridge, MA, <https://www.broadinstitute.org>) for their scientific support on the annotation of the rabbit genome. We would like to acknowledge the SIGENAE platform (<http://www.sigena.org/>) for their support on the microarray annotation and the CRB GADIE for their help in submitting the data. The project was funded by the Carnot Institute ICSA (AGIS project). VJ's PhD fellowship is jointly funded by the three INRA divisions: Animal Genetics, Animal Health, and Animal Physiology.

VIII. References

1. Fortun-Lamothe L., Gidenne T: Recent advances in the digestive physiology of the growing rabbit. In *Recent Advances in Rabbit Sciences*. Edited by Maertens L., Coudert P. ILVO: Melle, Belgium; 2006:201-210.
2. Rogel-Gaillard C, Ferrand N, Hayes H: Rabbit. In *Genome Mapping and Genomics in Domestic Animals*. Edited by C. Kole and N. Cockett. Springer Berlin Heidelberg. 2009:165-230.
3. Fischer B, Chavatte-Palmer P, Viebahn C, Navarrete Santos A, Duranthon V: Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction* 2012, 144:1-10.
4. Miller I, Rogel-Gaillard C, Spina D, Fontanesi L, De Almeida AM: The rabbit as an experimental and production animal: from genomics to proteomics. *Curr Protein Pept Sci* 2014, 15:134-145.
5. Rai G, Ray S, Milton J, Yang J, Ren P, Lempicki R, Mage RG: Gene expression profiles in a rabbit model of systemic lupus erythematosus autoantibody production. *J Immunol* 2010, 185:4446-4456.
6. Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, Lin MF, Parker BJ, Washietl S, Kheradpour P, Ernst J, Jordan G, Mauceli E, Ward LD, Lowe CB, Holloway AK, Clamp M, Gnerre S, Alföldi J, Beal K, Chang J, Clawson H, Cuff J, Di Palma F, Fitzgerald S, Flicek P, Guttman M, Hubisz MJ, Jaffe DB, Jungreis I, Kent WJ, Kostka D, Lara M, et al: A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature* 2011, 478:476-82.
7. Carneiro M, Rubin CJ, Di Palma F, Albert FW, Alföldi J, Martinez-Barrío A, Pielberg G, Rafati N, Sayyab S, Tuner-Maier J, Younis S, Afonso S, Aken B, Alves JM, Barrell D, Bolet G, Boucher S, et al. The rabbit genome provides new insight into the genetics of animal domestication. *Science*, in press.
8. Léandri RD, Archilla C, Bui LC, Peynot N, Liu Z, Cabau C, Chastellier A, Renard JP, Duranthon V: Revealing the dynamics of gene expression during embryonic genome activation and first differentiation in the rabbit embryo with a dedicated array screening. *Physiol Genomics* 2009, 36:98-113.
9. Naturil-Alfonso C, Vicente JS, Peñaranda DS, Marco-Jiménez F: Up-regulation of insulin-like growth factor I and uteroglobin in in vivo-developed parthenogenetic embryos. *Reprod Domest Anim* 2013, 48:126-130.
10. Saenz-de-Juano MD, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Joly T, Vicente JS: Effects of slow freezing procedure on late blastocyst gene expression and survival rate in rabbit. *Biol Reprod* 2012, 87:91.

11. Osteil P, Tapponnier Y, Markossian S, Godet M, Schmaltz-Panneau B, Jouneau L, Cabau C, Joly T, Blachère T, Gócza E, Bernat A, Yerle M, Acloque H, Hidot S, Bosze Z, Duranthon V, Savatier P, Afanassieff M: Induced pluripotent stem cells derived from rabbits exhibit some characteristics of naïve pluripotency. *Biol Open* 2013, 2:613-628.
12. Saenz-de-Juano MD, Marco-Jimenez F, Schmaltz-Panneau B, Jimenez-Trigos E, Viudes-de-Castro MP, Peñaranda DS, Jouneau L, Lecardonnel J, Lavara R, Naturil-Alfonso C, Duranthon V, Vicente JS: Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction* 2014, 147:789-801.
13. Popp MP, Liu L, Timmers A, Esson DW, Shiroma L, Meyers C, Berceci S, Tao M, Wistow G, Schultz GS, Sherwood MB: Development of a microarray chip for gene expression in rabbit ocular research. *Mol Vis* 2007, 13:164-173.
14. Ker-Woon C, Abd Ghafar N, Hui CK, Mohd Yusof YA: Effect of acacia honey on cultured rabbit corneal keratocytes. *BMC Cell Biol* 2014, 15:19.
15. Dkhil MA, Abdel-Maksoud MA, Al-Quraishy S, Abdel-Baki AA, Wunderlich F: Gene expression in rabbit appendices infected with *Eimeria coecicola*. *Vet Parasitol* 2012, 186:222-228.
16. Al-Quraishy S: Exogenous and endogenous stages of *Eimeria perforans* naturally infected domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Saudi Arabia: Light microscopic study. *Saudi J Biol Sci* 2012, 19:31-34.
17. Dkhil MA, Al-Quraishy S, Abdel-Baki AA, Delic D, Wunderlich F: *Eimeria coecicola*: spleen response of *Oryctolagus cuniculus*. *Exp Parasitol* 2013, 133:137-143.
18. Gao Y, Flori L, Lecardonnel J, Esquerré D, Hu ZL, Teillaud A, Lemonnier G, Lefèvre F, Oswald IP, Rogel-Gaillard C: Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA-ionomycin using an expression array targeting the pig immune response. *BMC Genomics* 2010, 11:292.
19. O'Shea JJ, Paul WE: Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010, 327:1098-1102.
20. Qiao S, Luo Q, Zhao Y, Zhang XC, Huang Y: Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane. *Nature* 2014, 511:108-111.
21. Dong H, Xiang Q, Gu Y, Wang Z, Paterson NG, Stansfeld PJ, He C, Zhang Y, Wang W, Dong C: Structural basis for outer membrane lipopolysaccharide insertion. *Nature* 2014, 511:52-56.
22. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998, 282:2085-2088.

23. Lu J, Bai L, Sun H, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, Qiu S, Miller RS, Yi H, Shangary S, Sun Y, Meagher JL, Stuckey JA, Wang S: SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP. *Cancer Res* 2008, 68:9384-9393.
24. Hojman H, Lounsbury D, Harris H, Horn JK: Immunodepressive effects of LPS on monocyte CD14 in vivo. *J Surg Res* 1997, 69:7-10.
25. DeForge LE, Remick DG: Kinetics of TNF, IL-6, and IL-8 gene expression in LPS-stimulated human whole blood. *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 174:18-24.
26. Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000, 118:503-508.
27. Raices RM, Kannan Y, Sarkar A, Bellamkonda-Athmaram V, Wewers MD: A synergistic role for IL-1beta and TNFalpha in monocyte-derived IFNgamma inducing activity. *Cytokine* 2008, 44:234-241.
28. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW: From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008, 9:46-56.
29. Hannestad J, Subramanyam K, Dellagioia N, Planeta-Wilson B, Weinzimmer D, Pittman B, Carson RE: Glucose metabolism in the insula and cingulate is affected by systemic inflammation in humans. *J Nucl Med* 2012, 53:601-607.
30. Carrier Y, Ma HL, Ramon HE, Napierata L, Small C, O'Toole M, Young DA, Fouser LA, Nickerson-Nutter C, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K, Medley QG: Inter-regulation of Th17 cytokines and the IL-36 cytokines in vitro and in vivo: implications in psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* 2011, 131:2428-2437.
31. Lian LH, Milora KA, Manupipatpong KK, Jensen LE: The double-stranded RNA analogue polyinosinic-polycytidylic acid induces keratinocyte pyroptosis and release of IL-36 γ . *J Invest Dermatol* 2012, 132:1346-1353.
32. Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S: Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int Immunol* 2002, 14:695-700.
33. Cekic C, Casella CR, Sag D, Antignano F, Kolb J, Suttles J, Hughes MR, Krystal G, Mitchell TC: MyD88-dependent SHIP1 regulates proinflammatory signaling pathways in dendritic cells after monophosphoryl lipid A stimulation of TLR4. *J Immunol* 2011, 186:3858-3865.
34. Doherty R, O'Farrelly C, Meade KG: Epigenetic regulation of the innate immune response to LPS in bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Vet Immunol Immunopathol* 2013, 154:102-110.

35. Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA: IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 2011, 12:231-238.
36. Green BB, Kerr DE: Epigenetic contribution to individual variation in response to lipopolysaccharide in bovine dermal fibroblasts. *Vet Immunol Immunopathol* 2014, 157:49-58.
37. Lin G, Pearson AE, Scamurra RW, Zhou Y, Baarsch MJ, Weiss DJ, Murtaugh MP: Regulation of interleukin-8 expression in porcine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1994, 269:77-85.
38. Schmeck B, Beermann W, van Laak V, Zahlten J, Opitz B, Witzenrath M, Hocke AC, Chakraborty T, Kracht M, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S: Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification. *J Immunol* 2005, 175:2843-2850.
39. Raymond B, Batsche E, Boutillon F, Wu YZ, Leduc D, Balloy V, Raoust E, Muchardt C, Goossens PL, Touqui L: Anthrax lethal toxin impairs IL-8 expression in epithelial cells through inhibition of histone H3 modification. *PLoS Pathog* 2009, 5:e1000359.
40. Chadebecq P, Goidin D, Jacquet C, Viac J, Schmitt D, Staquet MJ: Use of human reconstructed epidermis to analyze the regulation of beta-defensin hBD-1, hBD-2, and hBD-3 expression in response to LPS. *Cell Biol Toxicol* 2003, 19:313-324.
41. Chen QX, Lv C, Huang LX, Cheng BL, Xie GH, Wu SJ, Fang XM: Genomic variations within DEFB1 are associated with the susceptibility to and the fatal outcome of severe sepsis in Chinese Han population. *Genes Immun* 2007, 8:439-443.
42. Shuyi Y, Feng W, Jing T, Hongzhang H, Haiyan W, Pingping M, Liwu Z, Zwahlen RA, Hongyu Y. Human beta-defensin-3 (hBD-3) upregulated by LPS via epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways to enhance lymphatic invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011, 112:616-625.
43. Diamond DL, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Ganz T, Dale BA: Detection of beta-defensins secreted by human oral epithelial cells. *J Immunol Methods* 2001, 256:65-76.
44. Alexander S, Bramson J, Foley R, Xing Z: Protection from endotoxemia by adenoviral-mediated gene transfer of human bactericidal/permeability-increasing protein. *Blood* 2004, 103:93-99.
45. Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, Chakravorty D: Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate Immun* 2013, 19:339-347.

46. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, Gudmundsson G: Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med* 2001, 7:180-185.
47. Zaalouk TK, Bajaj-Elliott M, George JT, McDonald V: Differential regulation of beta-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 2004, 72:2772-2779.
48. Sperandio B, Regnault B, Guo J, Zhang Z, Stanley SL Jr, Sansonetti PJ, Pédrón T: Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J Exp Med* 2008, 205:1121-1132.
49. Obici L, Merlini G: Amyloidosis in autoinflammatory syndromes. *Autoimmun Rev* 2012, 12:14-17.
50. Shah C, Hari-Dass R, Raynes JG: Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* 2006, 108:1751-1757.
51. Christenson K, Björkman L, Tängemo C, Bylund J: Serum amyloid A inhibits apoptosis of human neutrophils via a P2X7-sensitive pathway independent of formyl peptide receptor-like 1. *J Leukoc Biol* 2008, 83:139-148.
52. De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, Salio M, Middleton M, Cerundolo V: Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* 2010, 11:1039-1046.
53. Nguyen KD, Macaubas C, Truong P, Wang N, Hou T, Yoon T, Mellins ED: Serum amyloid A induces mitogenic signals in regulatory T cells via monocyte activation. *Mol Immunol* 2014, 59:172-179.
54. Gross SR, Sin CG, Barraclough R, Rudland PS: Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell Mol Life Sci* 2014, 71:1551-1579.
55. Barraclough R, Savin J, Dube SK, Rudland PS: Molecular cloning and sequence of the gene for p9Ka. A cultured myoepithelial cell protein with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J Mol Biol* 1987, 198:13-20.
56. Lerner KG, Glick B, McDuffie FC: Role of the bursa of Fabricius in IgG and IgM production in the chicken: evidence for the role of a non-bursal site in the development of humoral immunity. *J Immunol* 1971, 107:493-503.
57. Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL: The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol* 1975, 30:311-316.
58. Levy GA, Leibowitz JL, Edgington TS: Induction of monocyte procoagulant activity by murine hepatitis virus type 3 parallels disease susceptibility in mice. *J Exp Med* 1981, 154:1150-1163.

59. Maier RV, Ulevitch RJ: The induction of a unique procoagulant activity in rabbit hepatic macrophages by bacterial lipopolysaccharides. *J Immunol* 1981, 127:1596-1600.
60. Chung YM, Goyette J, Tedla N, Hsu K, Geczy CL: S100A12 suppresses pro-inflammatory, but not pro-thrombotic functions of serum amyloid A. *PLoS One* 2013, 8:e62372.
61. Piriou-Guzylack L, Salmon H: Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet Res* 2008, 39:54.
62. Ledger TN, Pinton P, Bourges D, Roumi P, Salmon H, Oswald IP: Development of a microarray to specifically analyze immunological gene expression in swine. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11:691-698.
63. Lehtonen A, Matikainen S, Miettinen M, Julkunen I: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol* 2002, 71:511-519.
64. Elssner A, Doseff AI, Duncan M, Kotur M, Wewers MD: IL-16 is constitutively present in peripheral blood monocytes and spontaneously released during apoptosis. *J Immunol* 2004, 172:7721-7725.
65. Benoit M, Fenollar F, Raoult D, Mege JL: Increased levels of circulating IL-16 and apoptosis markers are related to the activity of Whipple's disease. *PLoS One* 2007, 2:e494.
66. Bowler RP, Bahr TM, Hughes G, Lutz S, Kim YI, Coldren CD, Reisdorph N, Kechris KJ: Integrative omics approach identifies interleukin-16 as a biomarker of emphysema. *OMICS* 2013, 17:619-626.
67. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR: Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 2003, 170:3357-3368.
68. Feske S, Giltnane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A: Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2001, 2:316-324.
69. Wilson KC, Center DM, Cruikshank W: The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. *Growth Factors* 2004, 22:97-104.
70. Atanackovic D, Hildebrandt Y, Templin J, Cao Y, Keller C, Panse J, Meyer S, Reinhard H, Bartels K, Lajmi N, Sezer O, Zander AR, Marx AH, Uhlig R, Zustin J, Bokemeyer C, Kröger N: Role of interleukin 16 in multiple myeloma. *J Natl Cancer Inst* 2012, 104:1005-1020.
71. Fontanesi L, Martelli PL, Scotti E, Russo V, Rogel-Gaillard C, Casadio R, Vernesi C: Exploring copy number variation in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genome by array comparative genome hybridization. *Genomics* 2012, 100:245-251.

72. Smyth GK, Michaud J, Scott HS: Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005, 21:2067-2075.
73. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM: Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol Proced Online* 2006, 8:175-193.

ANALYSE TRANSVERSALE DE LA RELATION ENTRE MICROBIOTE ET IMMUNITE CHEZ LE JEUNE LAPIN : APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUES ET METAGENOMIQUES

Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps les matériels et méthodes utilisés pour les études transcriptomiques et méta-monoméniques. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux résultats obtenus récemment sur les études transcriptomiques, avec l'expression des gènes dans le sang (n=48 animaux) et dans l'iléon (n=24 animaux), ainsi que leurs fonctions biologiques associées. Pour les résultats de l'étude méta-monoménique (n=78 animaux), nous présenterons tout d'abord la chaîne de traitement mise au point pour les données de séquençage MiSeq, qui sera suivie de la caractérisation des microbiotes du caecum à différents âges.

I. Matériels et méthodes

1. Aliment des animaux et conditions d'élevage

Pour notre étude, 45 mères des futures portées ont été réparties en deux groupes avant l'insémination. Ainsi, 30 femelles ont reçu un aliment standard (Cm) et 15 femelles ont reçu ce même aliment standard, enrichi avec des antibiotiques (oxytétracycline 400 mg/kg et colistine 2,4 m UI/kg ; ABm). A partir de 15 jours après la naissance, les lapereaux provenant des mères ABm ont reçu un aliment standard expérimental (C) contenant un niveau relativement élevé en fibres faiblement digestibles (ADF) et en hémicelluloses, en accord avec les besoins en fibres du lapin en croissance (Gidenne et al., 2014). Ce schéma est couramment observé en élevage cunicole.

Les lapereaux issus des mères Cm ont été divisés en deux groupes à partir de 15 jours d'âge : 1) la moitié des portées ont reçu le même aliment standard expérimental mais avec incorporation d'antibiotiques (C+AB) classiquement utilisés pour réduire les risques liés à l'EEL autour du sevrage (tiamuline (100 ppm) et apramycine (32.5 ppm)). Cette condition expérimentale a pour objectif d'impacter négativement la réponse immunitaire du jeune animal au travers de l'inhibition de son activité microbienne caecale ; 2) Les autres portées ont reçu un aliment expérimental riche en fibres rapidement fermentescibles (FRF), censé stimuler l'activité du caecum au travers d'un apport important en fibres solubles dans l'eau et en pectines (pulpe de betterave et marc de pomme). Les caractéristiques des aliments et les conditions d'élevage sont disponibles dans l'article I.

2. Collecte des échantillons

Les animaux ont été abattus par électroanesthésie puis exsanguination, conformément à la législation en vigueur (Anonyme, 1998). Le sang a été collecté dans des tubes protecteurs d'ARN PAXGene PreAnalytiX (Qiagen, Valencia, CA, USA) pour 1 animal par portée à l'âge de 29 et 45 jours. Des échantillons de tissus iléaux ont été également prélevés à ces mêmes âges, puis immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Le contenu caecal a été prélevé de façon stérile à 15, 29 et 45 jours. L'ensemble des échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'extraction d'ARN.

3. Extraction d'ARN et étapes de traitement des microarrays

Les extractions d'ARN de sang total ont été réalisées à l'aide du kit PAXgene PreAnalytiX, version 2 (Qiagen, Valencia, CA, USA), en accord avec les recommandations du fabricant. Pour le tissu iléal, les ARN totaux ont été extraits avec les mini kits RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). L'ADN génomique résiduel a été éliminé en utilisant la DNase I RNase-free (Qiagen, Valencia, CA, USA). Tous les ARN extraits ont ensuite été quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop ND-100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). L'intégrité des ARN a été obtenue à partir du BioAnalyzer 2100 et en utilisant des puces ARN 6000 nano (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La puce ADN 60 K, bien annotée pour les études de la réponse immunitaire du lapin et détaillée dans l'article II, a été utilisée pour obtenir les profils transcriptomiques. Pour le sang, l'ensemble des échantillons (n=48) ont été traités sur la plateforme du CRB-Gadie (INRA Jouy-en-Josas, France, <http://crb-gadie.inra.fr/>). Les ARN provenant des tissus iléaux (n=24) ont quant à eux été traités sur la plateforme Get-TRiX (INRA ToxAlim UMR1331, Toulouse, France, <http://get.genotoul.fr/index.php?id=176>). Ces deux expérimentations ont suivies exactement le même protocole opératoire, également décrit dans l'article II.

4. Analyses statistiques des microarrays

Les données d'expression ont été analysées sous le logiciel R en utilisant le package Limma de Bioconductor (Linear Models for Microarray Data; Smyth et al., 2005). Les données ont tout d'abord subies une transformation logarithmique de base 2, puis elles ont été normalisées par la méthode des quantiles. Après avoir moyenné les sondes codant pour le même gène, un modèle linéaire a été ajusté pour chaque gène grâce à la fonction lmFit. Les gènes différentiellement exprimés ont été identifiés à partir des contrastes entre les différents niveaux des groupes (C, C+AB et FRF) et ceux des âges (29 et 45), avec un taux de faux positif (FDR) inférieur à 5%. Un modèle empirique de Bayes a également été utilisé pour contrecarrer le nombre relativement peu élevé d'échantillons. Enfin, les principales fonctions biologiques des gènes différentiellement

exprimés ont été obtenues à l'aide du logiciel Ingenuity Pathways Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Mountain View, CA; www.ingenuity.com).

5. Extraction d'ADN du contenu caecal

Environ 200mg (± 10 mg) de contenu caecal ont été transférés dans un tube de 2ml et dans lequel ont été ajoutés 250 μ l de guanidine thiocyanate et 40 μ l de N-lauryl sarcosine (10%). Après un repos de 10 minutes, chaque échantillon a reçu 500 μ l de N-lauryl sarcosine (5%). Ils ont ensuite été successivement mélangés par tourbillonnement, centrifugé brièvement, puis chauffé à 70°C pendant 1 à 2 heures. 750 μ l de billes de verre de 0.1 mm préalablement stérilisées par autoclavage (Sigma, St Louis, MO, USA) ont été ajoutées puis chaque tube a été agité à raison de 30 cycles/s pendant 5 min (Bead-Beater™, amalgamateur: Biospec Products, USA), suivi d'un repos de 10 min, puis remis 5 min au Bead-Beater. Afin de précipiter les molécules à noyaux aromatiques, 15 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ont été ajoutés dans les tubes, qui ont ensuite été vortexés et centrifugés pendant 3 min à 12000g. Après récupération des surnageants, le culot a été lavé avec 500 μ l de solution TENP (50 mM Tris-HCL [pH 8], 20 mM EDTA [pH 8], 100 mM NaCl, 1% poly-vinyl-poly-pyrrolidone), puis centrifugé pendant 3 min à 12000g. Ce nouveau surnageant a ensuite été mélangé au premier. Les étapes de lavage ont été répétées 3 fois. L'équivalent de 2 ml de surnageant ont été ainsi récupérés puis centrifugés brièvement pour éliminer les particules, avant d'être transférés dans un nouveau tube de 2 ml. Les acides nucléiques ont été précipités par addition d'un volume équivalent d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante, puis centrifugés pendant 15 min à 20000 g. Les culots sont ensuite re-suspendus et mélangés avec 450 μ l de tampon phosphate 100 mM (pH=8) et 50 μ l d'acétate de potassium 5 M. Les tubes sont alors placés dans de la glace pendant 90 min et centrifugés à 16000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube contenant 2 μ l de RNase (10 mg/ml) et incubé à 37°C pendant 30 min. Les acides nucléiques sont précipités par addition de 50 μ l d'acétate de sodium 3 M and 1 ml d'éthanol absolu. Les tubes ont été incubés pendant 10 min à température ambiante, et les acides nucléiques ont été récupérés par centrifugation à 20000 g pendant 3 min. Les culots d'ADN ont finalement été lavés avec de l'éthanol à 70%, séché, puis remis en suspension dans 100 à 400 μ l de tampon TE, en fonction de la taille du culot d'ADN.

6. Amplification d'ADN

Les régions hypervariables V3 et V4 du gène codant pour l'ARN 16S ont été amplifiées grâce aux amorces F343 (CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTACGGRAGGCAGCAG) et R784 (GGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT), et en utilisant 30 cycles

d'amplification et une température d'hybridation de 65°C. La longueur moyenne des amplicons est de 510 bases, bien que la longueur exacte soit variable en fonction des organismes. Puisque le MiSeq permet la réalisation de séquences paire-end 2 x 250 bases, les extrémités de chaque de ces séquences se chevauchent et peuvent être accolées pour former de très longues séquences de haute qualité, couvrant la totalité des régions V3 et V4 en un seul séquençage. Un multiplexage simple a été réalisé à l'aide des index de 6 bases, qui ont été ajoutés à l'amorce R784 pendant la seconde PCR qui comprend 12 cycles, l'amorce sens (AATGATACGGCGACCACCGAGATCTCACTCTTCCCTACACGAC) et l'amorce anti-sens (CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-index-GTGACTGGAGTTCAGACGTGT). Les produits de PCR obtenus ont été purifiés et chargés sur la cartouche Illumina MiSeq d'après les instructions du fabricant. La qualité du séquençage a été vérifiée à l'aide de PhiX Control Library (V3), puis toutes les séquences paire-end ont été assignées à leur propre échantillon à l'aide de l'index précédemment intégré.

II. Résultats des études transcriptomiques

1. Expression des gènes dans le sang

Une comparaison de l'expression des gènes a tout d'abord été effectuée intra-âge (29 et 45 jours) pour les 3 groupes (C, C+AB et FRF). Une légère différence d'expression (DE) a été enregistrée à 29 jours, avec la sous-expression de 9 gènes (dont 6 annotés) pour le groupe C+AB et par rapport au contrôle C. Ainsi le gène majoritairement sous-régulé était SPINK4 (serine peptidase inhibitor kazal type 4 ; Fold Change (FC) = -1,92), suivi de DCHS1 (dachsous cadherin-related 1 ; FC = -1,37), ARRB1 (arrestin beta 1 ; FC = -1,21), PRELP (proline arginine-rich end leucine-rich repeat, FC = -0,96), NCAPG2 (non-SMC condensin II complex, subunit G2 ; FC = -0,87) et SMYD3 (SET and MYND domain containing ; FC = -0,78). Aucune DE n'a été détectée à J29 lorsque FRF était comparé à C ou à C+AB. Il n'y a également eu aucune DE relevée à J45 entre les trois groupes.

Pour la suite des analyses, une comparaison intra-groupe a été effectuée entre J29 et J45 (J45 vs. J29 pour chaque groupe). Ainsi, ce sont 1657, 438 et 0 gènes DE qui ont été détectés respectivement pour C, RFF et C+AB (tableau 15). Pour le groupe C, l'expression différentielle a été principalement caractérisée par une sur-régulation puisque nous avons enregistré un total de 1146 gènes sur-régulés contre seulement 511 gènes sous-régulés, avec des valeurs d'expression différentielle (FC) comprises entre -2,12 et 2,51.

Tableau 15 : Top-dix des gènes DE pour FRF, c et C+AB entre 29 et 45 jours

| | FRF | | | C | | | C+AB | | |
|--------------------|----------|-------|-----------|----------|-------|-----------|------------------------------------|-------|-----------|
| | Nom | logFC | adj.P.Val | Nom | logFC | adj.P.Val | Nom | logFC | adj.P.Val |
| SANG | CCL5 | 2,26 | 3,62E-02 | IRF7 | 2,15 | 1,68E-03 | Pas d'expression différentielle | | |
| | GZMB | 1,88 | 2,99E-02 | CCL5 | 2,09 | 1,15E-02 | | | |
| | IRF7 | 1,79 | 3,73E-02 | PRF1 | 1,87 | 2,84E-03 | | | |
| | SRGN | 1,76 | 1,56E-02 | RLA-A2 | 1,74 | 7,04E-04 | | | |
| | RLA-A2 | 1,62 | 2,01E-02 | RLA-A1 | 1,74 | 2,34E-04 | | | |
| | PGLYRP1 | 1,61 | 3,06E-02 | PSMB9 | 1,69 | 1,13E-04 | | | |
| | PRF1 | 1,59 | 4,20E-02 | GPR15 | 1,63 | 3,11E-04 | | | |
| | NCF2 | 1,58 | 5,31E-03 | DOCK8 | 1,58 | 1,05E-04 | | | |
| | S100A11 | 1,56 | 2,49E-02 | GZMB | 1,56 | 1,18E-02 | | | |
| | GLIPR1 | 1,55 | 2,13E-02 | FKBP11 | 1,54 | 3,66E-04 | | | |
| | IFT57 | -0,93 | 4,48E-02 | UROD | -1,39 | 3,83E-03 | | | |
| | LRCH1 | -0,93 | 4,03E-02 | CENPA | -1,51 | 4,91E-04 | | | |
| | MICU3 | -0,97 | 2,49E-02 | PTN | -1,53 | 2,54E-03 | | | |
| | E2F1 | -1,00 | 2,79E-02 | ZNF646 | -1,57 | 5,21E-03 | | | |
| | RDH8 | -1,01 | 3,06E-02 | PTCHD3 | -1,65 | 4,42E-03 | | | |
| | NRN1L | -1,02 | 4,23E-02 | ARRB1 | -1,71 | 1,96E-05 | | | |
| | NCAPG | -1,03 | 3,06E-02 | METTL7A | -1,72 | 2,89E-02 | | | |
| | CENPA | -1,07 | 4,00E-02 | MEIOB | -1,84 | 1,92E-03 | | | |
| | PPIL6 | -1,09 | 3,19E-02 | DCHS1 | -2,05 | 2,69E-06 | | | |
| | NKIRAS2 | -1,16 | 4,93E-02 | PKNOX2 | -2,12 | 2,34E-04 | | | |
| TISSU ILEAL | AY175623 | 2,68 | 3,20E-02 | AY171654 | 2,89 | 1,48E-02 | GZMB | 3,63 | 3,98E-02 |
| | OASL | 2,67 | 3,28E-02 | AY175621 | 2,88 | 1,47E-02 | PRF1 | 3,29 | 3,98E-02 |
| | MX1 | 2,48 | 3,21E-02 | AY171647 | 2,83 | 1,47E-02 | CCL5 | 2,72 | 2,76E-02 |
| | AY171690 | 2,43 | 2,19E-02 | AY175477 | 2,81 | 1,47E-02 | TRGV10 | 2,55 | 3,98E-02 |
| | AY175621 | 2,42 | 3,26E-02 | AY171704 | 2,71 | 1,47E-02 | D38134 | 2,23 | 3,98E-02 |
| | AY171704 | 2,42 | 1,59E-02 | AY175607 | 2,62 | 1,47E-02 | SH2D1A | 2,2 | 3,98E-02 |
| | AY175607 | 2,33 | 1,59E-02 | AY171690 | 2,61 | 1,80E-02 | CXCR6 | 2,14 | 3,98E-02 |
| | AY171842 | 2,33 | 1,59E-02 | AY171758 | 2,59 | 1,47E-02 | GPR171 | 1,94 | 3,98E-02 |
| | FAM3B | 2,3 | 1,59E-02 | AY171842 | 2,58 | 1,47E-02 | TRIM69 | 1,89 | 3,98E-02 |
| | AF264569 | 2,29 | 1,59E-02 | M77058 | 2,56 | 1,47E-02 | CD96 | 1,89 | 3,98E-02 |
| | TMEM150A | -1,66 | 1,96E-02 | NPM3 | -0,72 | 2,28E-02 | INA | -0,72 | 4,06E-02 |
| | SLAMF9 | -1,8 | 3,59E-02 | NID2 | -0,87 | 4,94E-02 | THRA | -0,75 | 4,37E-02 |
| | PLA2G1B | -1,87 | 1,59E-02 | NF-M | -1,08 | 2,93E-02 | FAM189A2 | -1,04 | 4,21E-02 |
| | NGEF | -2,31 | 2,45E-02 | OAT | -1,1 | 1,47E-02 | FOLR1 | -1,16 | 4,06E-02 |
| | KYNU | -2,33 | 5,93E-03 | FOLR1 | -1,11 | 2,93E-02 | AKR1D1 | -4,3 | 3,98E-02 |
| | CNDP1 | -2,58 | 3,39E-02 | LRP2 | -1,13 | 1,48E-02 | GZMB | 3,63 | 3,98E-02 |
| | HGD | -2,83 | 7,50E-03 | VIP | -1,39 | 3,59E-02 | | | |
| | DIO1 | -3,29 | 8,03E-03 | KYNU | -1,66 | 2,28E-02 | | | |
| | HMGCS2 | -4,4 | 1,39E-02 | DIO1 | -2,45 | 2,93E-02 | | | |
| | AKR1D1 | -4,65 | 1,59E-02 | AKR1D1 | -4,06 | 2,93E-02 | | | |

Une observation similaire a été faite pour le groupe FRF puisque l'expression différentielle, bien que plus faible que le groupe précédent, était également caractérisée par une activation des gènes, avec donc 337 gènes sur-régulés, contre 101 sous-régulés. Pour FRF, les FC oscillaient entre -1,25 et 2,26. Aucune DE n'a été mesurée pour le groupe C+AB entre 29 et 45 jours.

Pour les groupes FRF et C, nous avons enregistré une expression commune de 315 gènes, ce qui représente 72% du total de gènes DE pour FRF contre 23% pour C (figure 28). Parmi ce groupe de gènes, il y a eu une sur-régulation significative des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et avec des valeurs d'expression semblables entre ces deux groupes. On pouvait ainsi relever les chemokines CCL5 (FC = 2,26 et 2,09, respectivement) et CCL4 (FC = 1,35 et 2,14), le facteur 7 de régulation de l'interféron (IRF7, FC = 1,79 et 2,14), le récepteur à l'interleukine 1 (IL1R, FC = 1,31 et 1,19), les récepteurs TLR4 (FC = 1,36 et 1,10) et TLR2 (FC = 1,24 et 0,99). De plus, les gènes RLA-A1 (FC = 1,49 et 1,74) et RLA-A2 (FC = 1,62 et 1,73), codant des molécules du CMH de classe 1, ont également fait partie des gènes les plus DE. Avec le régime C, nous avons mesuré une sous-régulation de PKNOX2 (PBX/Knotted 1 Homeobox 2 ; FC = 2,12), suivi de DCSH1 (FC = -2,05) et de MEIOB (meiosis specific with OB domains ; FC = -1,84), tous impliqués dans la prolifération cellulaire. Les principaux gènes inhibés par le régime enrichi en FRF entre J29 et J45 étaient NKIRAS2 (NFKB inhibitor interacting ras-like 2 ; FC = -1,16), suivi de PPIL6 (peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 6 ; FC = -1,09) et CENPA (centromere protein A ; FC = 1,07).

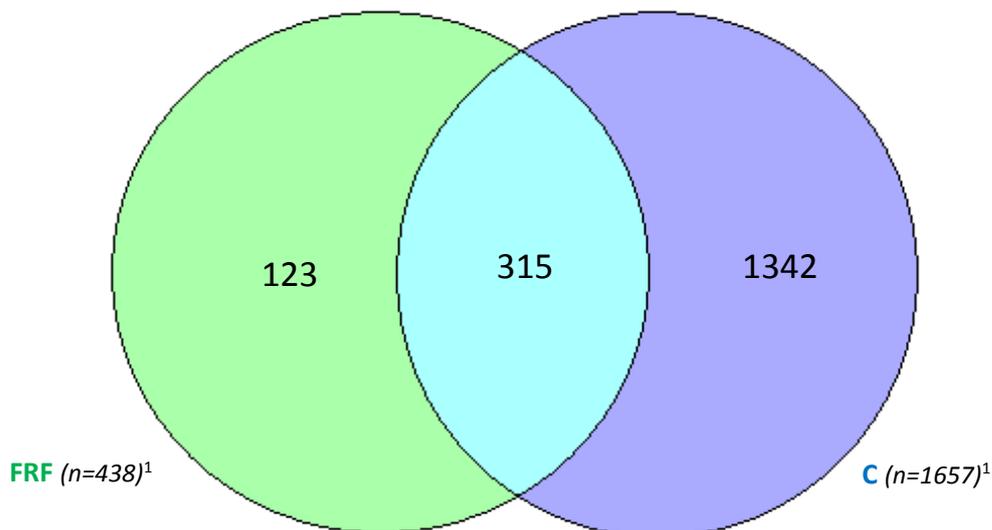


Figure 28 : Diagramme de Venn des gènes DE pour FRF et C, entre 29 et 45 jours.

¹Le nombre entre parenthèses correspond au nombre total de gènes DE.

2. Expression des gènes dans le tissu iléal

Tout d'abord, il n'y a eu aucun effet du régime alimentaire sur l'expression des gènes (comparaison C+AB vs. C, FRF vs. C ou FRF vs. C+AB), que ce soit à J29 ou à J45. Lorsque l'on s'intéresse à la DE pour chaque groupe pris indépendamment et en fonction de l'âge (J45 vs. J29 pour chaque groupe), l'expression des gènes a été plus forte pour FRF avec 128 gènes DE, suivi par C avec 73 gènes DE, puis par C+AB avec 36 gènes DE. Pour le groupe FRF, le nombre de gènes sous-exprimés (n=64) était exactement similaire à celui des gènes sur-exprimés (n=64), avec des FC compris entre -4,65 et 2,68. Pour les groupes C+AB et C, la sous-régulation a été à l'inverse plus faible, avec respectivement 11 et 5 gènes sous-exprimés. En revanche, le nombre de gènes activés a été aussi nombreux que pour le groupe FRF (62 pour C+AB et 61 pour C). Les FC ont été plus élevés pour le groupe C+AB (jusqu'à + 4,23) par rapport à C (+ 2,93), mais similaires entre ces deux groupes pour les gènes inhibés (- 4,30 vs. - 4,03).

Les deux gènes les plus activés avec FRF ont été OASL (2'-5'-oligoadenylate synthetase-like ; FC = 2,67) et MX1 (myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein P78 (mouse) ; FC = 2,48), tous deux possédant des activités antivirales. A l'inverse, les gènes AKR1D1 (aldo-keto reductase family 1, member D1) et HMGCS2 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)) ont été les principaux gènes inhibés par FRF (FC = -4,65 et -4,40, respectivement) et sont impliqués dans le métabolisme hépatique. Le gène AKR1D1 était également fortement régulé à la baisse avec le régime C+AB (FC = -4,30), suivi dans une moindre mesure par FOLR1 (folate receptor 1 ; FC = 1,16) et THRA (thyroid hormone receptor alpha ; FC = -0,75). A l'inverse, les gènes activés par le régime médicamenteux C+AB entre J29 et J45 ont été GZMB (granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1) ; FC = 3,63), suivi de PRF1 (perforin 1 ; FC = 3,29) et CCL5 (chemokine (C-C Motif) ligand 5 ; FC = 2,72). D'autres gènes, impliqués dans la réponse immunitaire, ont été régulés à la hausse, comme CXCR6 (FC = 2,14), CD96 (FC = 1,89), CD48 (FC = 1,55), CD8A (FC = 0,98) et IL15 (FC = 1,31). Comme pour les groupes FRF et C+AB, le gène AKR1D1 a été le gène le plus réprimé entre J29 et J45 (FC = -4,06), suivi par DIO1 (deiodinase, iodothyronine, type I ; FC = -2,45) et KYNU (kynureninase ; FC = -1,66).

Les gènes FOLR1 et SLAMF7 ont été sur-exprimés dans les trois groupes, avec des valeurs FC du même ordre de grandeur (entre 0,8 et 1,18 pour FOLR1 ; entre 1,26 et 1,42 pour SLAMF7 ; figure 29). A l'inverse, les gènes FAM46C et AKR1D1 ont été sous-exprimés, pour FRF, C+AB et C, avec également des valeurs FC similaires (entre -1,11 et -1,52 pour FAM46C ; entre -4,06 et -4,65 pour AKR1D1).

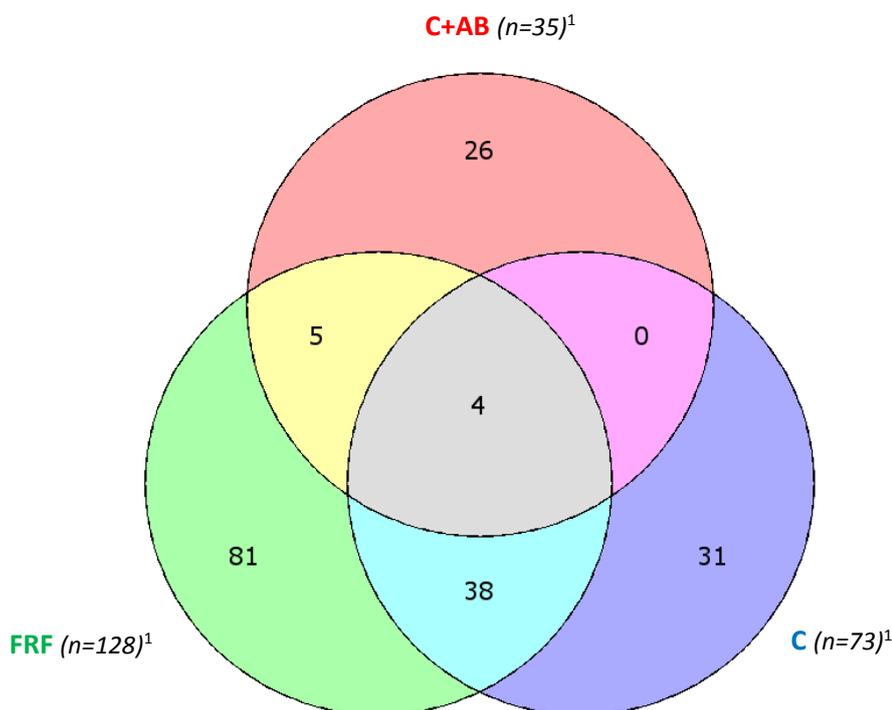


Figure 29 : Diagramme de Venn des gènes DE pour chaque groupe, entre 29 et 45 jours.

¹Le nombre entre parenthèses correspond au nombre total de gènes DE.

En plus de ces 4 gènes, il y a eu 5 autres gènes exprimés à la fois dans les groupes C+AB et FRF, dont un était sous-exprimé (FAM189A2, FC moyen = -1), et 4 sur-exprimés : TRAV19 (FC moyen = 1,30), SH2D1A (FC moyen = 2), PLA2G16 (FC moyen = 0,90) et GPR15 (FC moyen = 1,70). Enfin, il y a eu plus de gènes communément exprimés entre C et FRF, avec un total de 42 gènes DE.

3. Les principales fonctions biologiques exprimées dans le sang et le tissu iléal pour chaque groupe entre 29 et 45 jours

L'ensemble des gènes DE ont été soumis à Ingenuity Pathway Analysis (IPA) afin d'obtenir les principales fonctions biologiques dans lesquels sont impliqués ces gènes (tableau 16). La plupart des gènes dépendent de plusieurs fonctions biologiques plus ou moins proches. Dans le sang, les fonctions liées à la survie, à la croissance ou à la prolifération cellulaire, font partie des fonctions biologiques principalement activées, à la fois pour les groupes FRF et C.

Tableau 16 : Principales fonctions biologiques des gènes DE. ¹Nombre de gènes DE affectés à la fonction biologique. ²% du nombre total de gènes DE.

| | SANG | | | ILEON | | |
|--|---|-----------------------|--|---|-----------------------|---------------|
| | Fonctions | Nb gènes ¹ | % du Nb total | Fonctions | Nb gènes ¹ | % du Nb total |
| PRF | Cancer | 233 | 53,20% | Cancer | 66 | 51,60% |
| | Cell Death and Survival | 123 | 28,10% | Cellular Growth and Proliferation | 37 | 28,90% |
| | Cellular Growth and Proliferation | 115 | 26,30% | Cell Death and Survival | 30 | 23,40% |
| | Cellular Development | 104 | 23,70% | Immunological Disease | 29 | 22,70% |
| | Cellular Function and Maintenance | 102 | 23,30% | Organismal Injury and Abnormalities | 26 | 20,30% |
| | Hematological System Development and Function | 86 | 19,60% | Organismal Survival | 23 | 18,00% |
| | Tissue Development | 82 | 18,70% | Hematological Disease | 18 | 14,10% |
| | Immunological Disease | 77 | 17,60% | Hematological System Development and Function | 14 | 10,90% |
| | Cellular Movement | 77 | 17,60% | Tissue Morphology | 14 | 10,90% |
| | Inflammatory Response | 76 | 17,40% | Cell Morphology | 13 | 10,20% |
| | Tissue Morphology | 66 | 15,10% | Cellular Assembly and Organization | 12 | 9,40% |
| | Immune Cell Trafficking | 58 | 13,20% | Amino Acid Metabolism | 9 | 7,00% |
| | Connective Tissue Disorders | 49 | 11,20% | Immune Cell Trafficking | 8 | 6,30% |
| | Embryonic Development | 36 | 8,20% | Hypersensitivity Response | 6 | 4,70% |
| Respiratory Disease | 27 | 6,20% | Humoral Immune Response | 5 | 3,90% | |
| C | Cancer | 850 | 51,30% | Cardiovascular Disease | 24 | 32,90% |
| | Gastrointestinal Disease | 511 | 30,80% | Developmental Disorder | 7 | 9,60% |
| | Cellular Growth and Proliferation | 408 | 24,60% | Hematological Disease | 7 | 9,60% |
| | Cell Death and Survival | 393 | 23,70% | Cellular Development | 7 | 9,60% |
| | Cellular Development | 363 | 21,90% | Cellular Growth and Proliferation | 6 | 8,20% |
| | Cell Morphology | 277 | 16,70% | Embryonic Development | 6 | 8,20% |
| | Organismal Survival | 270 | 16,30% | Gastrointestinal Disease | 5 | 6,80% |
| | Gene Expression | 266 | 16,10% | Amino Acid Metabolism | 5 | 6,80% |
| | Hematological System Development and Function | 252 | 15,20% | Hematological System Development and Function | 5 | 6,80% |
| | Immunological Disease | 241 | 14,50% | Cell Death and Survival | 4 | 5,50% |
| | Tissue Morphology | 228 | 13,80% | Hepatic System Disease | 3 | 4,10% |
| | Infectious Disease | 218 | 13,20% | Humoral Immune Response | 3 | 4,10% |
| | Hematological Disease | 202 | 12,20% | Auditory and Vestibular System Development and Function | 2 | 2,70% |
| | Hematopoiesis | 154 | 9,30% | Cardiovascular System Development and Function | 2 | 2,70% |
| Connective Tissue Development and Function | 114 | 6,90% | DNA Replication, Recombination, and Repair | 1 | 1,40% | |
| C+AB | | | | Immunological Disease | 15 | 41,70% |
| | | | | Cell-To-Cell Signaling and Interaction | 14 | 38,90% |
| | | | | Cell Death and Survival | 13 | 36,10% |
| | | | | Hematological System Development and Function | 13 | 36,10% |
| | | | | Tissue Morphology | 12 | 33,30% |
| | | | | Inflammatory Response | 11 | 30,60% |
| | | | | Cellular Compromise | 11 | 30,60% |
| | | | | Cellular Movement | 11 | 30,60% |
| | | | | Cellular Development | 11 | 30,60% |
| | | | | Gastrointestinal Disease | 10 | 27,80% |
| | | | | Metabolic Disease | 10 | 27,80% |
| | | | | Endocrine System Disorders | 9 | 25,00% |
| | | | | Immune Cell Trafficking | 8 | 22,20% |
| | | | | Organ Development | 4 | 11,10% |
| | | | Endocrine System Development and Function | 3 | 8,30% | |

Pour le groupe C, un nombre important de gènes est impliqué dans les maladies gastro-intestinales (511 gènes, soit plus de 30% du nombre total de gènes DE). Alors que le pourcentage de gènes impliqués dans les maladies immunologiques était comparable entre FRF et C (17,6% vs. 14,5%, respectivement), le groupe FRF a enregistré 17,4% de gènes DE impliqués dans la réponse inflammatoire et 13,2% pour la circulation des cellules immunitaires. Pour le groupe C, il y a eu environ 13% de gènes DE impliqués dans les maladies infectieuses et hématologiques.

Au niveau de l'iléon, plus de 40% des gènes DE entre 29 et 45 jours sont annotés comme impliqués dans des maladies immunitaires pour le groupe C+AB, mais ne présente que 15 gènes, compte-tenu du faible nombre trouvé DE pour ce groupe. Pour le groupe FRF, cette fonction regroupe 29 gènes, soit 22,7% des gènes DE. Cela place la fonction associée aux maladies immunitaires en 4^{ème} position pour le groupe FRF, derrière les fonctions liées à la croissance ou au développement cellulaire. Étonnamment pour le groupe C, la principale fonction activée concerne les maladies cardiovasculaires, avec 24 gènes impliqués dans cette fonction (soit 32,9%). Les troubles du développement ont rassemblés environ 10% des gènes DE, suivi des maladies hématologiques, puis de la croissance et du développement cellulaire. Le groupe C n'a enregistré que 5 gènes DE impliqués dans les maladies gastro-intestinales, contre 511 gènes DE dans le sang.

III. Résultats de l'étude méta-monogénique

1. Mise au point de la chaîne de traitement des données de séquençage MiSeq

a. Le contigage

Il est réalisé à partir du logiciel FLASH (Magoč et Salzberg, 2011) et permet d'aligner les deux produits de séquençage, R1 et R2, d'une longueur de 250 bases (bases notées b dans la suite du manuscrit) chacune. La superposition (overlap) de R1 et R2 doit être comprise entre 20b et 35b, pour ainsi former une séquence d'environ 450b.

b. Le nettoyage des séquences

La première étape de ce travail consiste à éliminer les séquences contenant des erreurs de séquençage (présence de N au sein de la séquence correspondant à des acides nucléiques non définis). Les séquences trop petites ou trop grandes, qui ne correspondraient donc pas à la taille des amplicons V3-V4 attendus, sont également supprimées. Seules les séquences de tailles comprises entre 250b et 500b sont conservées. Les amorces F343 et R784 (Liu et al., 2008) ayant permis d'amplifier les régions V3-V4 de l'ADN génomique sont également retirées à l'aide du programme Cutadapt (Martin, 2011).

c. La déréplication

Dans l'objectif de réduire la quantité de données, toutes les séquences identiques d'un même échantillon sont regroupées sous un seul nom. L'abondance de ces séquences redondantes est associée à ce nom (figure 30) afin de ne pas perdre l'information et de pouvoir la retrouver facilement dans les tables d'abondance.

| Nom de l'échantillon | Identifiant de séquence | Abondance |
|----------------------|-------------------------|-----------|
| >Y4_ | HDGTTE678SHFG65_ | 12 |

Figure 30 : Identifiant d'une séquence après déréplication

d. L'élimination des chimères

La création accidentelle de chimères peut éventuellement avoir lieu pendant la PCR. Le package Mothur (Schloss et al., 2009) permet d'identifier ces chimères en utilisant l'algorithme UCHIME, puis de les supprimer.

e. La clusterisation

Le principe est de regrouper les séquences en unité opérationnelle taxonomique (OTU pour l'acronyme en anglais habituellement utilisé), avec l'idée qu'un OTU correspondrait à une espèce bactérienne. Ce regroupement en OTU se fait grâce à SWARM (Mahé et al., 2014). Les amplicons presque identiques sont regroupés de manière itérative en utilisant un seuil local (d choisi ici d=13). Puis en utilisant la structure interne des clusters et les abondances des amplicons, ces résultats sont affinés.

f. L'affiliation phylogénétique

Elle se réalise selon deux méthodes complémentaires. La première repose sur une approche Bayésienne avec le RDP Classifier (Wang et al., 2007) via le package Mothur, qui utilise la banque de données LTP 111 (<http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>), choisie pour ses qualités d'annotations. Malgré le faible nombre de séquences que comporte cette banque de données (environ 14 000 séquences), elle présente l'avantage d'être très propre, non redondante et toutes les affiliations taxonomiques sont données du règne à l'espèce. RDP attribue également un bootstrap pour chaque rang taxonomique, qui permet d'apprécier la robustesse de l'annotation affiliée et ainsi d'apprécier la proximité relative entre séquences. La seconde méthode est l'affiliation grâce à l'alignement entre OTUs et la banque de données Silva v.115 (Pruesse et al.,

2007) riche d'environ 150 000 séquences. Ces alignements se font par l'outil BLAT (Kent, 2002). Les critères retenus pour valider l'affiliation pour chaque alignement BLAT sont les pourcentages d'identité (95%) et de couverture (80%).

g. Analyses statistiques sur la table d'abondance

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R 3.0.2 (R Development Core Team, 2013). Afin de vérifier l'impact des antibiotiques maternels sur le microbiote des lapereaux, un test non-paramétrique de Wilcoxon a tout d'abord été effectué à J15 (peu de valeurs et ne suivant pas une loi normale) avec l'aliment des mères (Cm ou ABm) comme facteur principal. A J29 et J45, les données ont été traitées avec un modèle linéaire mixte (package nlme), en tenant compte de l'âge et de l'aliment des lapereaux comme effets fixes, et de la portée comme effet aléatoire. La variabilité des distances (Bray-Curtis) entre les profils taxonomiques à partir des OTUs a été effectuée par nMDS (non-metric distance scaling). Les analyses de corrélation canonique régularisées (rCCA) ont été réalisées à partir du package mixOmics (Liquet et al., 2012).

Le tableau 17 ci-dessous présente un bilan du nombre de séquences après chaque étape du pipeline.

Tableau 17 : Bilan du nombre de séquences conservées ou éliminées après application de la chaîne de traitement MiSeq

| | |
|--|----------------|
| Nb initial de séquences : | 9155367 |
| Nb de séquences impropres rejetées (trop petites, trop grandes et avec des N) : | 471624 |
| Nb de séquences avec amorces impropres : | 162750 |
| Nb de séquences dérépliquées : | 4371649 |
| Nb de séquences chimériques : | 622787 |
| Nb de séquences non chimériques : | 3748862 |
| Nb d'OTUs : | 83608 |
| Nb de séquences conservées : | 7618584 |

The diagram features a blue oval containing the text '- 17 %'. Two blue arrows originate from this oval: one points to the 'Nb initial de séquences' (9155367) and the other points to the 'Nb de séquences conservées' (7618584), indicating a 17% decrease in the total number of sequences.

2. Représentation nMDS des échantillons sur la totalité des OTUs

L'analyse par nMDS a été réalisée sur les 83608 OTUs détectés. Elle montre clairement un clivage entre les profils microbiens des lapereaux âgés de 15 jours avec ceux de 29 et 45 jours (figure 31). A l'exception d'un animal qui montre un profil taxonomique très différent des autres individus, il n'y a pas eu de différence au niveau de la composition du microbiote caecal entre les lapereaux issus de mères ayant ingéré un aliment avec ou sans antibiotique.

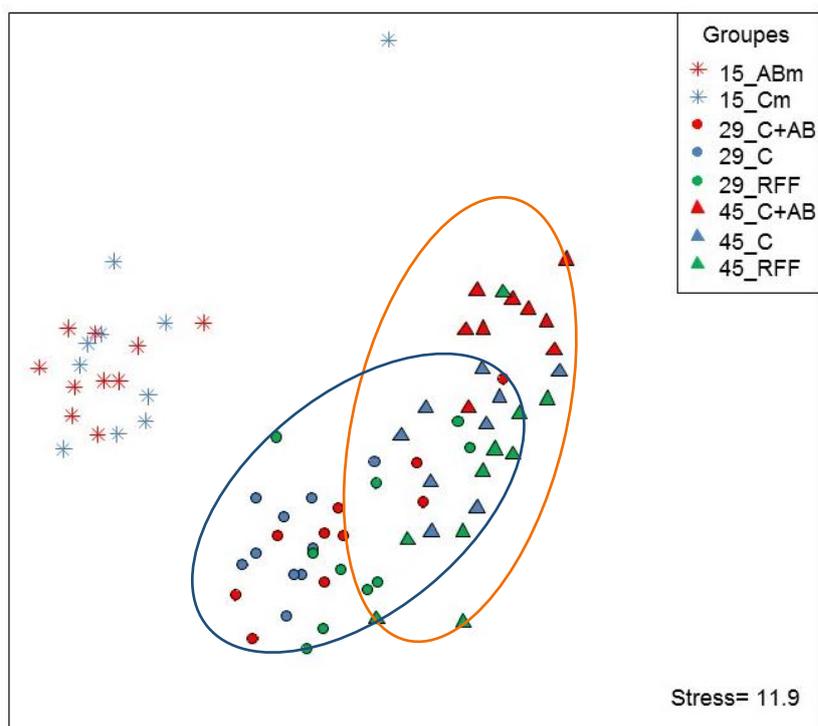


Figure 31 : Représentation nMDS des distances entre les profils taxonomiques des communautés bactériennes caecales des lapereaux à J15 (impact de la mère), J29 et J45

Lorsque l'on s'intéresse aux microbiotes à J29 (ellipse bleue) et J45 (ellipse orange), on remarque une proximité entre les profils microbiens avec néanmoins une distinction entre ceux de J29 et ceux de J45. Il n'y a, de plus, aucune différence entre les groupes à J29. Le constat est moins évident à J45, où le groupe C+AB semble détaché des deux autres groupes.

3. Effet de l'aliment des mères sur la composition du microbiote caecal des lapereaux (J15)

Le nombre d'espèces observées à J15 était équivalent entre les groupes (1263 ± 362 en moyenne). Au total, la caractérisation des microbiotes a été effectuée sur 10 lapereaux issus des mères témoins (Cm) et également 10 lapereaux issus des mères avec antibiotiques (ABm), soit un total de 20 échantillons. Il y a eu 11 phyla identifiés à J15, mais seulement 4 d'entre eux possédaient au moins 0,05% du montant total des séquences (tableau 18).

Aucune différence n'a été observée entre les groupes pour chaque phylum à J15. Le phylum des Bacteroidetes était dominant, suivi par celui des Firmicutes, des Protéobactéries et des Actinobactéries. Il n'y a également pas eu de différence entre les groupes pour les familles et les genres à J15.

Tableau 18: Abondance relative (%) des principaux phyla dans le caecum des lapereaux à J15.

| Phyla | Groupes ¹ | | SEM | P-value | |
|-----------------|----------------------|-------|------|---------|--|
| | C+AB | C | | Groupe | |
| Firmicutes | 27,85 | 28,63 | 1,95 | 0,48 | |
| Bacteroidetes | 63,54 | 54,22 | 2,98 | 0,14 | |
| Protéobactéries | 6,63 | 14,70 | 4,03 | 1 | |
| Actinobactéries | 0,004 | 0,43 | 0,21 | 0,09 | |

¹n=10 pour C+AB et n=10 pour C

4. Evolution de l'écosystème caecal en fonction de l'âge et de l'aliment

a. Au niveau des phyla

Globalement, le nombre d'OTUs rencontrés était plus faible pour FRF (1061 ± 455) par rapport aux groupes C+AB et C (1337 ± 516 en moyenne), mais aucune différence n'a été relevée pour ce paramètre entre J29 et J45 (1240 ± 480 en moyenne pour chaque âge). Pour les 59 échantillons caractérisés à J29 et J45, il y a eu 20 phyla identifiés dans le contenu caecal, mais seulement 3 possédaient plus de 0,05% du montant total des séquences (tableau 19). Le phylum des Firmicutes était majoritaire à J29 avec une abondance relative de 73,5%, qui a augmenté jusqu'à 85,5% à J45. A l'inverse, les Bacteroidetes avec une abondance de 23,8% à J29, abaissée à 10,1% à J45.

L'abondance relative des Proteobactéries a été multipliée par 3 pour le groupe AB (figure 32), de 0,67% à 2,84%, alors qu'elle est restée stable à la fois pour C et FRF.

Table 19: Influence de l'âge sur l'abondance relative des principaux phyla bactériens dans le caecum des lapins à J29 et J45.

| Phyla | Age ¹ , j | | SEM | P-values | | |
|-----------------|----------------------|-------|------|----------|---------|--------------|
| | 29 | 45 | | Groupe | Age | Groupe x Age |
| Firmicutes | 73,49 | 85,50 | 1,58 | 0,66 | < 0,001 | 0,058 |
| Bacteroidetes | 23,86 | 10,14 | 1,62 | 0,42 | < 0,001 | 0,059 |
| Proteobactéries | 0,58 | 1,42 | 0,17 | 0,001 | 0,001 | 0,003 |

¹ n=30 à J29 et n=28 à J45

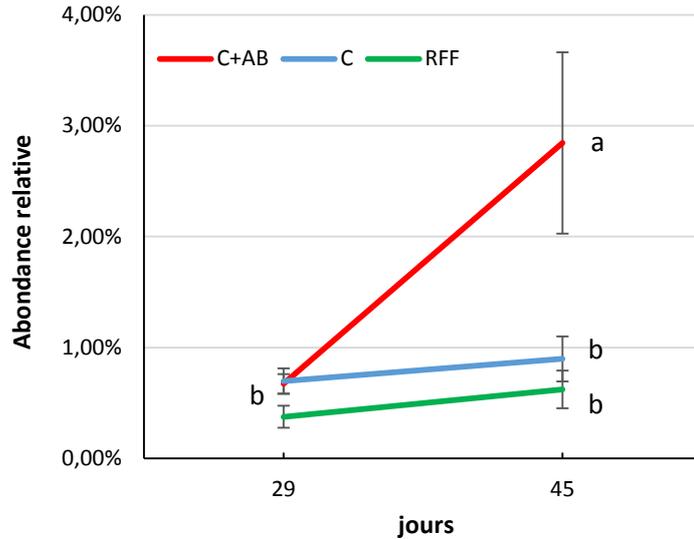


Figure 32 : Abondance relative des Protéobactéries en fonction de l'âge et du groupe.

b. Au niveau des familles

Sur l'ensemble des échantillons, 113 familles et 306 genres ont été détectés. Les familles bactériennes prédominantes appartenaient à la classe des Clostridies (*Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*), parmi lesquelles nous avons observé une augmentation de leurs abondances relatives avec l'âge (tableau 20), de 73,4% pour J29 jusqu'à 85% pour J45. A l'inverse, l'abondance des *Bacteroidaceae* a fortement diminué (23,7% vs. 9,7%, $P < 0.001$), alors que celle des *Campylobacteraceae* a légèrement augmenté. De plus, le groupe FRF présente une abondance relative plus faible en *Campylobacteraceae* (0,04%, $P < 0,001$) par rapport aux groupes C+AB et C (0,17% et 0,26%, respectivement). Pour les *Ruminococcaceae*, seul le groupe C a enregistré une augmentation significative de l'abondance (figure 33), en passant de 0,13% (J29) à 0,46% (J45). L'abondance en *Ruminococcaceae* des animaux C+AB semble également suivre (numériquement) cette tendance.

Table 20: Influence de l'âge sur l'abondance relative des principales familles bactériennes dans le caecum des lapins à J29 et J45.

| Familles | Age ¹ , j | | SEM | P-values | | |
|---------------------|----------------------|-------|------|----------|---------|--------------|
| | 29 | 45 | | Groupe | Age | Groupe x Age |
| Lachnospiraceae | 73,18 | 84,70 | 1,58 | 0,70 | < 0,001 | 0,07 |
| Bacteroidaceae | 23,66 | 9,69 | 1,63 | 0,38 | < 0,001 | 0,074 |
| Desulfovibrionaceae | 0,36 | 0,31 | 0,04 | 0,085 | 0,36 | 0,26 |
| Ruminococcaceae | 0,19 | 0,32 | 0,03 | 0,04 | 0,002 | 0,007 |
| Campylobacteraceae | 0,13 | 0,18 | 0,02 | < 0,001 | 0,014 | 0,25 |
| Porphyromonadaceae | 0,08 | 0,09 | 0,01 | 0,30 | 0,76 | 0,4 |

¹n=30 à J29 et n=28 à J45

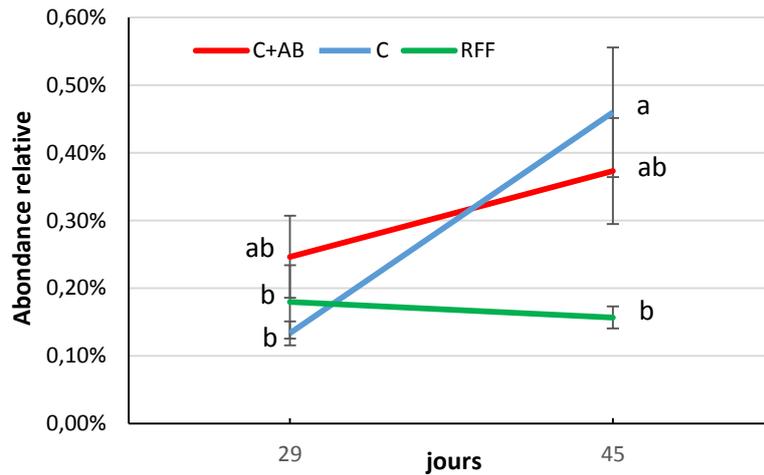


Figure 33 : Abondance relative des Ruminococcaceae en fonction de l'âge et du groupe.

c. Au niveau des genres

Comme pour la famille, le genre *Bacteroides* (tableau 21), qui était le genre dominant à J15, a diminué significativement avec l'âge, avec une abondance relative de 23,7% à J29 contre 9,7% à J45 ($P < 0,001$). De plus, nous avons également détecté un effet groupe pour le genre *Campylobacter* (comme pour les familles), avec une abondance relative plus faible pour FRF (0,03%) par rapport aux deux autres groupes (0,14% et 0,25% pour C+AB et C, respectivement ; $P < 0,001$).

Table 21: Influence de l'âge sur l'abondance relative des principales familles bactériennes dans le caecum des lapins à J29 et J45.

| Genres | Age ¹ , d | | SEM | P-values | | |
|----------------------|----------------------|------|------|----------|---------|--------------|
| | 29 | 45 | | Groupe | Age | Groupe x Age |
| <i>Bacteroides</i> | 23,66 | 9,69 | 1,63 | 0,38 | < 0,001 | 0,074 |
| <i>Desulfovibrio</i> | 0,34 | 0,30 | 0,03 | 0,060 | 0,33 | 0,19 |
| <i>Campylobacter</i> | 0,13 | 0,15 | 0,02 | < 0,001 | 0,45 | 0,11 |
| <i>Oxalobacter</i> | 0,03 | 0,05 | 0,01 | 0,15 | 0,061 | 0,35 |
| <i>Thalassospira</i> | 0,03 | 0,09 | 0,02 | 0,066 | 0,043 | 0,94 |

¹n=30 à J29 et n=28 à J45

5. Corrélations entre les OTUs majoritaires et des paramètres fermentaires et morphologiques

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux 638 OTUs majoritaires qui ont été sélectionnés à partir de leur variance (tous les OTUs présentant plus 90% d'abondance nulle parmi les 78 échantillons ont été retirés). La matrice de corrélation présentée ci-dessous (figure 34) montre qu'il n'y a globalement que très peu de corrélations entre ces OTUs, ce qui laisse suggérer une forte indépendance des OTUs.

Nous avons fait de même pour les 13 paramètres présentés dans l'article I, à savoir : MS, pH, NH₃, concentration en AGV totaux, en C2, C3, C4 et C5, et ratio C2/C4. Nous avons également inclus d'autres paramètres morphologiques relevés à l'abattage comme : le poids de caecum plein / vide, le poids de la rate et de l'appendice vermiforme (tous sont rapportés au poids vif). La matrice de corrélation (figure 35) montre d'importantes corrélations entre ces 13 paramètres.

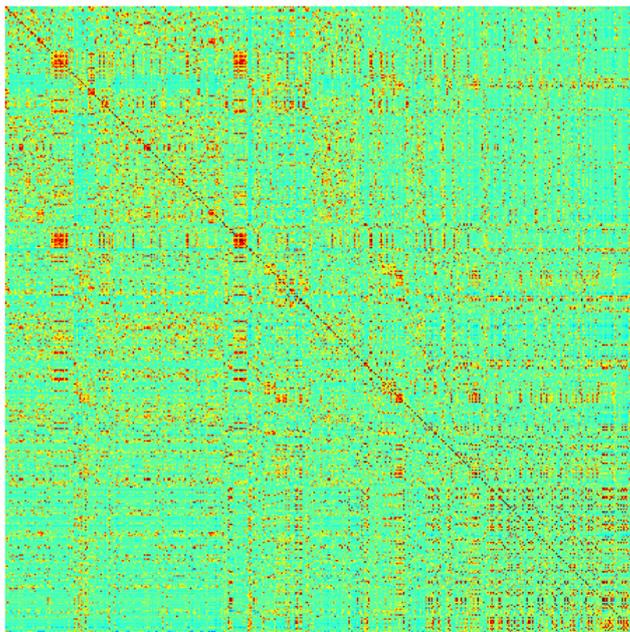


Figure 34 : Matrice de corrélation (Pearson) entre les 638 OTUs majoritaires

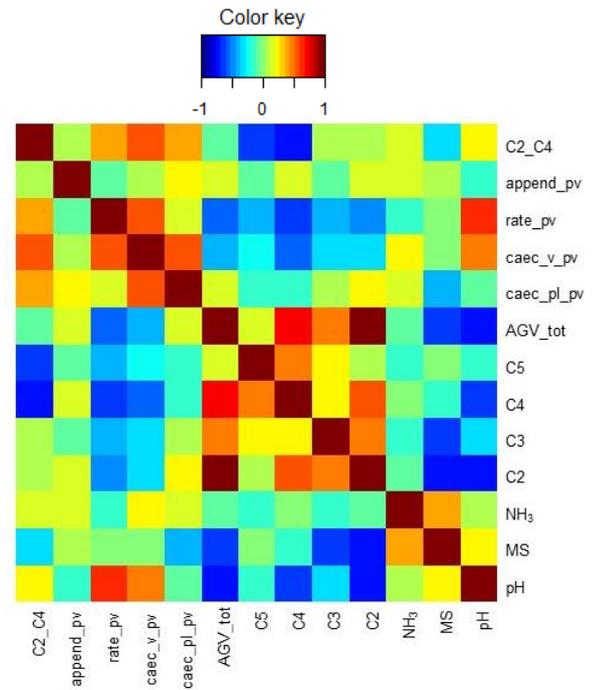


Figure 35 : Matrice de corrélation (Pearson) entre les 13 paramètres

Une corrélation canonique régularisée (Rcc, figure 36) a ensuite été réalisée entre les OTUs et les paramètres fermentaires et morphologiques. La relation entre ces deux jeux de données était bonne puisque une corrélation de 0.7 a été obtenue pour la première dimension.

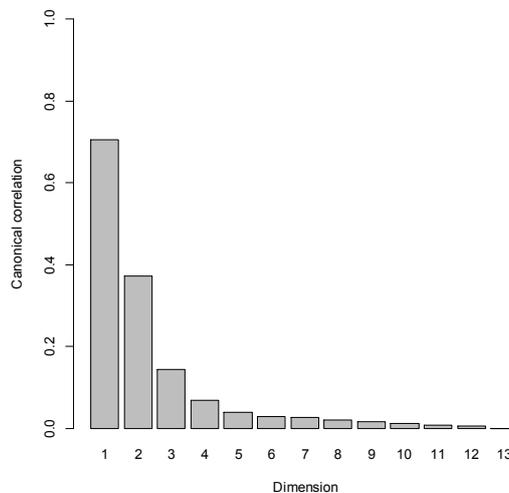


Figure 36 : Corrélation canonique régularisée

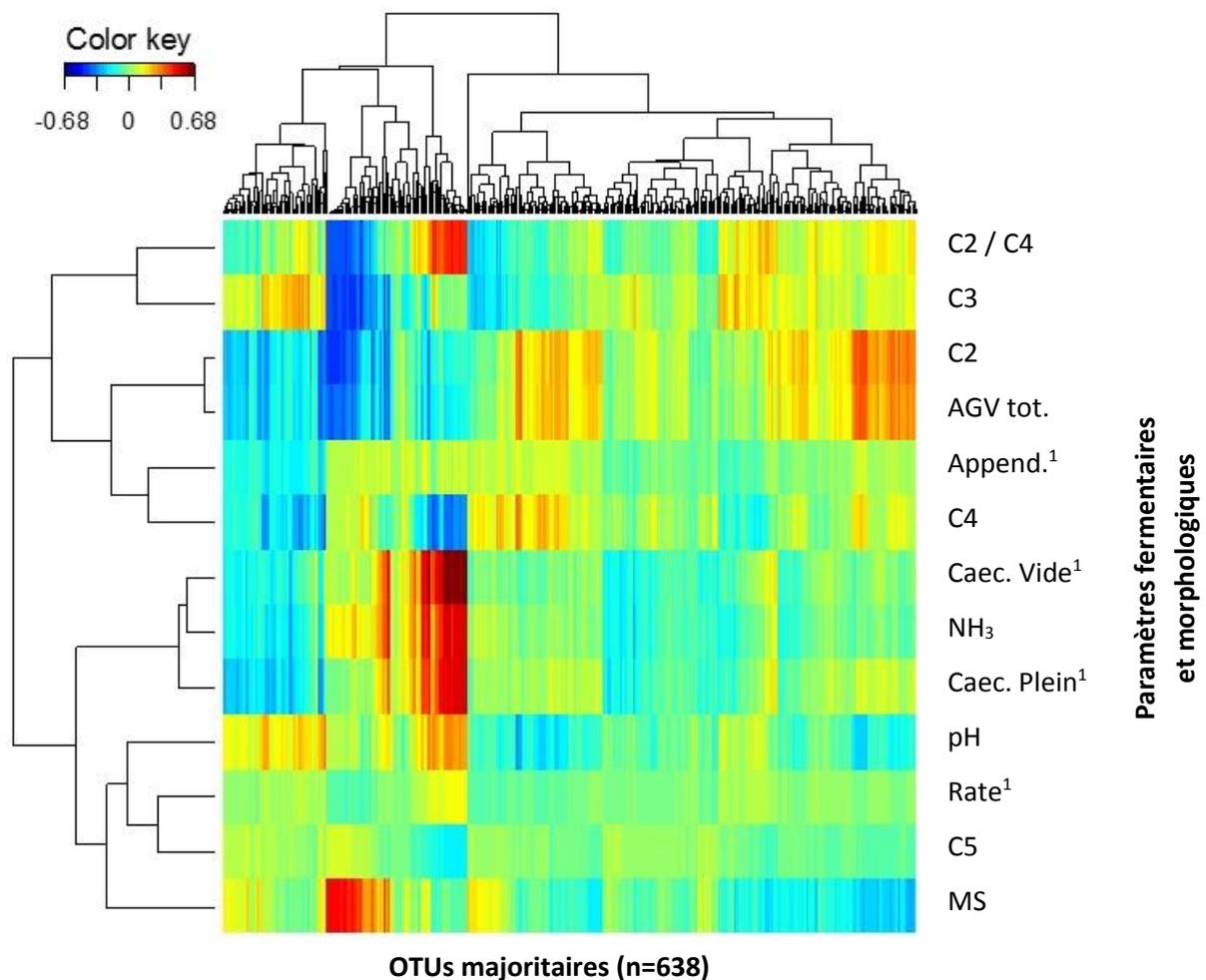


Figure 37 : Matrice de similarité entre OTUs et paramètres fermentaires et morphologiques après une analyse des corrélations canoniques régularisée (rCCA).

¹ exprimés en pourcentage du poids vif.

La matrice de similarité présentée dans la figure 37 permet de visualiser les corrélations entre les paramètres morphologiques, et l'abondance relative des OTUs. Ainsi, nous avons remarqué que certains OTUs étaient positivement corrélés avec le taux de MS, et négativement avec les concentrations en AGV totaux, acide acétique (C2), propionique (C3) et ratio C2/C4. A l'inverse, certains OTUs présentaient une forte corrélation avec le ratio C2/C4, les poids de caecum plein et vide et la concentration en ammoniacque, mais étaient opposés aux concentrations en acide butyrique (C4). Parmi les 638 OTUs majoritaire, la figure 38 détaille ceux ayant une abondance supérieure à 0,04 %, et une valeur de similarité supérieure à 0,5. Ainsi, l'OTU n°2 était le plus abondant (82%), et sa séquence représentative était assignée à *Lachnospiraceae* avec 100% d'identité et 100% de couverture. Cet OTU présentait de bonnes corrélations positives proches de 0,6 avec les concentrations en AGV totaux, en C2, et en C4, alors qu'il enregistrait dans le même temps une corrélation négative avec le pH (-0,51).

| | pH | MS | NH ₃ | C2 | C3 | C4 | C5 | AGV Tot. | Caec. Plein ¹ | Caec. vide ¹ | Rate ¹ | Append. ¹ | c2/c4 | Abond. % | Ident. % | Affiliation taxonomique |
|--------|-------|-------|-----------------|-------|-------|-------|-------|----------|--------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|-------|----------|----------|--|
| OTU_1 | 0,43 | 0,01 | -0,17 | -0,41 | 0,41 | -0,54 | 0,01 | -0,42 | -0,22 | -0,05 | 0,14 | -0,29 | 0,25 | 13,2 | 100 | Bacteroidetes, <i>Bacteroides_rodentium</i> . |
| OTU_2 | -0,51 | -0,17 | 0 | 0,59 | -0,25 | 0,57 | -0,01 | 0,59 | 0,12 | -0,11 | -0,13 | 0,26 | -0,19 | 82,2 | 100 | Firmicutes, <i>Lachnospiraceae</i> . |
| OTU_6 | 0,38 | -0,02 | 0,38 | -0,27 | 0,11 | -0,45 | -0,14 | -0,30 | 0,35 | 0,51 | 0,15 | -0,03 | 0,42 | 0,28 | 96 | Proteobacteria, <i>Desulfovibrio_sp._LNB2</i> . |
| OTU_11 | 0,30 | -0,02 | 0,56 | -0,17 | -0,03 | -0,34 | -0,19 | -0,21 | 0,54 | 0,67 | 0,14 | 0,09 | 0,43 | 0,12 | 93.1 | Actinobacteria, <i>Atopobium</i> . |
| OTU_17 | 0,31 | -0,05 | 0,54 | -0,15 | 0 | -0,36 | -0,19 | -0,20 | 0,54 | 0,67 | 0,14 | 0,08 | 0,46 | 0,12 | 94.7 | Actinobacteria, <i>Enterorhabdus</i> . |
| OTU_32 | 0,34 | 0,06 | 0,54 | -0,27 | -0,06 | -0,36 | -0,16 | -0,30 | 0,49 | 0,64 | 0,13 | 0,06 | 0,36 | 0,15 | 92.1 | Firmicutes, <i>Lachnospiraceae</i> . |
| OTU_37 | 0,34 | -0,01 | 0,52 | -0,21 | 0 | -0,38 | -0,18 | -0,25 | 0,50 | 0,64 | 0,14 | 0,06 | 0,43 | 0,04 | 100 | Proteobacteria, <i>Oxalobacter</i> . |

¹ ramené en pourcentage du poids vif

Figure 38 : Matrice de corrélations entre les OTUS majoritaires et les paramètres fermentaires

L'OTU n°1 est le deuxième OTU le plus abondant, avec une abondance relative de 13,2%. Sa séquence a été assignée à 100% à *Bacteroides_rodentium*. Cet OTU n°1 présentait des corrélations relativement opposées à celles de l'OTU n°2 puisqu'il est négativement corrélé aux concentrations en AGV totaux, C2 et C4, mais les corrélations sont positives avec le pH et la concentration en C3. Le profil des corrélations des 5 OTUs restants était globalement similaire, dans la mesure où l'on a observé des corrélations positives marquées pour les poids de caecum plein et vide, la concentration en NH₃, et dans une moindre mesure le ratio C2/C4 et le pH.

6. Corrélations entre expressions des gènes et OTUs majoritaires

Une corrélation de Pearson a été effectuée entre les données d'expression du transcriptome iléal de lapereaux âgés de 29 et 45 jours, et la caractérisation du microbiote de ces mêmes animaux. Pour simplifier la lecture de ces résultats et ainsi permettre une meilleure interprétation, nous avons délibérément restreint cette analyse aux 185 gènes les plus sous- ou sur-exprimés, ainsi qu'aux 99 OTUs majoritaires (figure 39). Nous retrouvons ainsi les matrices de corrélation spécifiques aux OTUs (à l'intérieur des rectangles rouges). En ce qui concerne la matrice spécifique aux 185 gènes principalement sous- ou sur-exprimés, nous avons observé des corrélations fortes entre les gènes, qu'elles soient positives ou négatives. Lorsque l'on s'intéresse aux interactions abondance des OTUs x niveau de transcription des gènes de l'hôte dans le sang, on remarque qu'il n'y a que peu de corrélations, malgré une variabilité plus importante que celles observées au sein de la matrice de corrélation des OTUs.

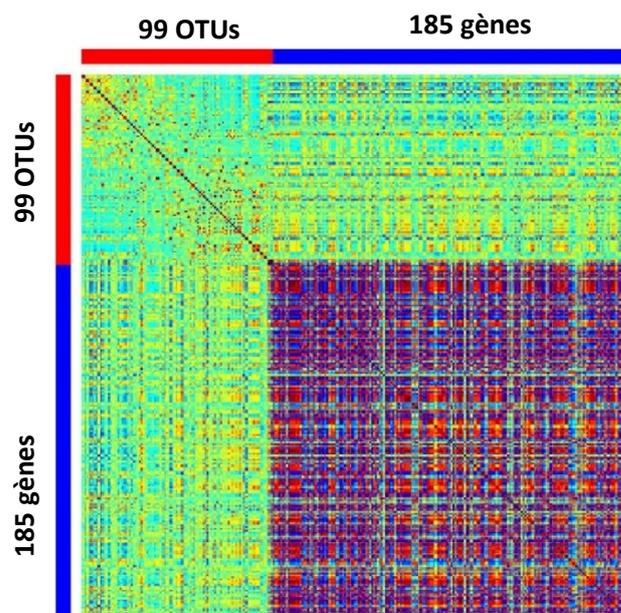


Figure 39 : Matrice de corrélation (Pearson) faisant intervenir les 185 gènes les plus sous- ou sur-exprimés et les 99 OTUs les plus abondants.

A la suite de cette corrélation, nous avons effectué une rCCA (figure 40) afin de croiser plus finement ces deux jeux de données. Il convient néanmoins d'être vigilant sur cette analyse puisque nous avons obtenu une faible corrélation canonique (0,12). La similarité entre les deux jeux de données est donc très faible. Les OTUs n°1 et 2 (qui sont les OTUs les plus abondants) sont inversement corrélés pour l'ensemble des gènes. D'autres OTUs suivent la même tendance, bien que leurs abondances soient beaucoup plus faibles. La répartition des gènes dans cette matrice s'est principalement faite en fonction de l'activation ou de l'inhibition de ces gènes.

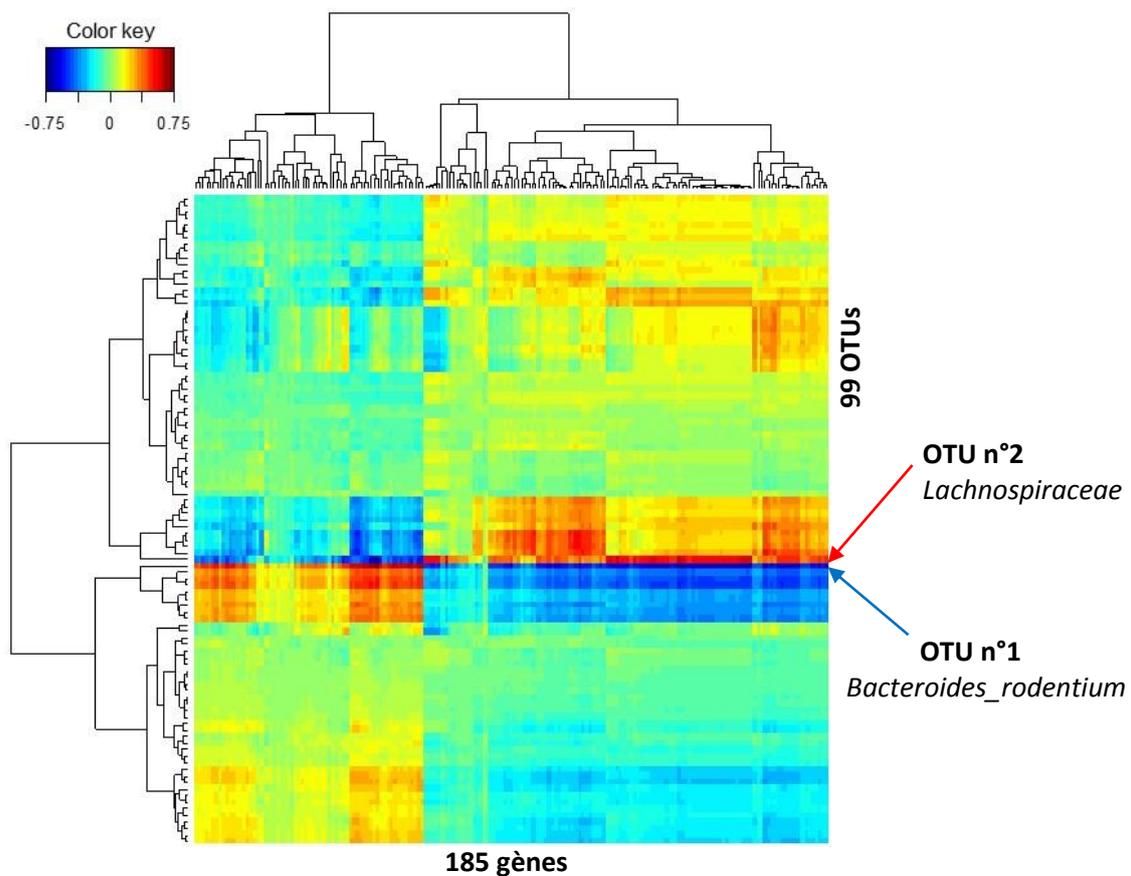


Figure 40 : Matrice de similarité entre les 185 gènes les plus sous- ou sur-exprimés et les 99 OTUs les plus abondants, après une analyse des corrélations canoniques régularisée (rCCA).

DISCUSSION GENERALE

L'originalité et la force de notre travail résident dans le couplage de deux approches génomiques ciblant d'une part l'hôte (transcriptome) et d'autre part son microbiote digestif (métagénome), associées aux mesures de paramètres zootechniques (croissance, ingestion et santé) et fermentaires (pH, NH₃, concentration en AGV, profils fermentaires, etc...). Cette approche tridimensionnelle nous a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur les relations entre immunité et microbiote digestif chez le jeune mammifère d'élevage, mais aussi d'analyser le rôle nutritionnel des fibres rapidement fermentescibles chez le lapin. L'enjeu finalisé est de répondre à une attente sociétale forte : diminuer l'utilisation d'antibiotiques d'une manière générale, et plus particulièrement dans les élevages cynicoles.

Nous avons ainsi apporté des réponses à des questions biologiques, avec des résultats prometteurs dans le cadre de la modulation de l'activité microbienne caecale de lapereaux via l'ingestion précoce (dès 15 jours d'âge) de fibres rapidement fermentescibles (FRF). Les FRF permettent d'améliorer l'efficacité alimentaire en post-sevrage ainsi que les paramètres fermentaires du caecum, tout en gardant un bon niveau sanitaire. Les trois études transcriptomiques que nous avons réalisées ont permis d'obtenir différents niveaux d'informations sur la réponse immunitaire du lapin : une réponse spécifique des cellules de l'immunité dans des conditions de stress, avec la stimulation *in vitro* de PBMC ; une réponse globale, à partir du sang total provenant de lapins ayant reçu différents régimes alimentaires ; et une réponse locale, à partir de tissus iléaux, pour se focaliser sur l'impact de ces régimes alimentaires au niveau de l'immunité intestinale. L'étude méta-monogénique nous a permis d'atteindre une connaissance détaillée de la composition des microbiotes caeaux selon la nutrition des jeunes lapins (FRF, C+AB et C), tout en analysant l'impact d'une antibiothérapie préventive chez leurs mères. L'objectif est maintenant de réaliser une analyse combinée de l'ensemble de ces données. A notre connaissance, le jeu de données disponibles est unique actuellement pour l'espèce lapin. Ce travail a de plus permis de mettre au point des outils performant de phénotypage moléculaire pour le lapin, que ce soit avec l'enrichissement et l'annotation d'un microarray, ou le développement d'une chaîne de traitement des données de séquençage à très haut débit.

Dans la partie suivante, nous ferons une analyse critique des méthodologies utilisées. Après un bref rappel de leurs principaux avantages et améliorations, nous discuterons quelques problèmes techniques rencontrés. Dans un deuxième temps, nous établirons des connexions croisées entre les résultats des études zootechniques, transcriptomiques, et méta-monogénique. Enfin, nous ferons un point sur le devenir des outils de génomique pour le lapin.

CHAPITRE I - ANALYSE CRITIQUE DE LA METHODOLOGIE

I. Puce à ADN pour l'analyse de la réponse immunitaire

1. Amélioration de l'outil existant

Les puces à ADN permettent de mesurer l'expression simultanée de milliers gènes dans un laps de temps relativement court, pour un coût raisonnable, et ne nécessitant pas des compétences poussées en bio-informatique. A partir d'une biopuce commerciale, nous avons ajouté 453 gènes bien annotés pour la réponse immunitaire du lapin, ce qui nous permet désormais d'approfondir les analyses immunologiques effectuées chez le lapin. Notre travail de ré-annotation a permis d'attribuer des fonctions biologiques à des gènes pour lesquels nous n'avons aucune information (pour environ 15% des sondes). De plus, nous avons également corrigé certaines annotations, des noms de gènes ayant été jusqu'à présent attribués à tort à certaines sondes. Etant donné que le génome du lapin n'est pas encore complètement annoté, il reste encore de nombreuses sondes pour lesquelles aucune fonction n'est encore associée (< 20% des sondes, soit moins de 12000 sondes sur un total d'environ 63000 sondes).

2. Biais inhérents à cette technique rencontrés dans la thèse

a. Effet « laboratoire »

Il existe plusieurs études qui ont mis en avant la variabilité des résultats transcriptomiques obtenus dans des laboratoires différents (Wang et al., 2005 ; Irizzari et al., 2005). Des méthodes d'ajustement sont cependant utilisées comme la normalisation des données (log2, quantile, etc...) et les méthodes bayésienne empirique (Johnson et al., 2007) afin de réduire la variabilité entre les données due aux bruits ou artéfacts.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons mesuré l'expression de gènes provenant de deux matériels biologiques différents : le sang et le tissu iléal. Pour des raisons pratiques, les extractions d'ARN n'ont pas été effectuées avec le même protocole d'extraction, tout comme les hybridations qui n'ont pas été faites sur la même plateforme (pour le sang : CRB Gadie (INRA Jouy-en-Josas) ; pour l'iléon : Get-TriX (INRA Saint-Martin du Touch)). Dans le cadre de notre étude, Il était préférable de ne pas combiner les données issues de ces deux études transcriptomiques au sein d'une seule et même analyse. C'est pour cette raison que nous avons fait le choix de présenter séparément les valeurs d'expression des gènes du sang total et celles des tissus iléaux.

b. Anormalité du bruit de fond pour l'étude transcriptomique sur les ARN de sang total

Dans le cadre de cet essai, nous avons été confrontés à des valeurs de bruit de fond supérieures aux valeurs standards indiquées par Agilent (50 uf au lieu de 20-40 uf). Ce bruit de fond peut provenir soit d'un lavage incomplet (composé de détergents et de solutions salines), soit de la présence de contaminants non spécifiques qui produisent une fluorescence non désirée (de la poussière, des résidus présents sur la biopuce à la suite d'un défaut de fabrication, ...). Dans ces conditions, il est possible d'effectuer un lavage supplémentaire à l'acétonitrile, un solvant organique qui permet d'abaisser le bruit de fond, et dans notre cas, correspondre aux standards attendus par le fabricant. Il est important de souligner que ce solvant réduit la fluorescence non spécifique et ne modifie pas de façon significative les signaux d'intérêt. Le lavage à l'acétonitrile permet donc d'améliorer la qualité des données en termes de ratio signal / bruit de fond.

II. Le séquençage Miseq pour l'analyse phylogénétique du microbiote

La technologie MiSeq est utilisée à l'INRA depuis peu et remplace progressivement le pyroséquençage Roche 454, compte-tenu du nombre très important de séquences produites et du gain en termes de coût par échantillon. Cette technique de séquençage, récente, est ainsi bien adaptée pour caractériser les écosystèmes microbiens par une approche méta-monogénique, et permet de mettre en évidence des espèces bactériennes présentes en faibles abondances. Dans le cadre de l'adaptation de la technique de séquençage 16S au séquenceur Miseq au sein de l'UMR GenPhySE (pour le lapin) et de l'UMR GABI (pour le porc), d'importants efforts de développement de la chaîne de traitement des données ont été réalisés. Les résultats présentés dans l'étude expérimentale contribuent à valider que le séquençage par MiSeq est une bonne approche pour la caractérisation des microbiotes.

1. Biais inhérents à cette technique rencontrés dans la thèse

a. Qualité de l'ADN

Lors du premier séquençage, nous avons été confrontés à un problème d'amplification d'ADN, détecté dès les premières étapes de contrôle qualité opérés par la plateforme GENOTOUL. Malgré ce problème, toutes les étapes suivantes du séquençage ont été réalisées les unes après les autres sans interruption puisqu'il s'agissait d'un séquençage « test ». Les ADN n'ayant pas pu être amplifiés correctement ont donc produit des séquences de mauvaise qualité et en faible nombre. Cela a donc généré une importante variabilité entre les échantillons, qui ne rendait pas possible le traitement de l'ensemble de ces échantillons en une seule fois, sans écarter ceux présentant de trop faible quantités de séquences.

Il a été difficile de déterminer la cause de ces problèmes d'amplification, étant donné que les ADN ont été extraits de manière aléatoire « dirigée », en veillant à ce qu'il y ait autant d'individus pour chaque âge et chaque lot par session d'extraction, et en suivant le même protocole détaillé dans l'article 3. Néanmoins, nous avons remarqué que ces amplifications défectueuses provenaient essentiellement d'ADN de lapins âgés de 45 jours, qui correspondent aux animaux les plus vieux ayant été séquencés pour cette expérimentation.

La cause qui nous a donc paru la plus probable était la présence d'inhibiteur de PCR dans ces ADN, confortée par la légère couleur brunâtre de ces échantillons. Les hypothèses que nous émettons sur la présence d'inhibiteurs sont :

- Une quantité de matière caecale initialement prélevée trop importante. Nous avons néanmoins respecté la quantité conseillée de 200mg (max). De plus, les rendements et la qualité des ADN (ratios 260/280 et 260/230) étaient bons. Avec une quantité plus faible de matière caecale, les différentes étapes de lavages au TENP (composée de Tris-HCL, EDTA, NaCl et polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)) prévues dans le protocole auraient peut-être été plus efficaces en retirant davantage de substances inhibitrices d'amplification (acides humiques, etc...).

- Une erreur dans la préparation de la solution de lavage TENP. En effet, la solution a été préparée avant le début de l'ensemble des extractions, et maintenue à 4°C par la suite. Bien qu'il n'y ait pas eu de problème d'amplification sur les ADN des animaux de J15 et la plupart de ceux de J29, on peut supposer qu'il y avait une quantité de matière caecale initiale trop élevée.

- Une dilution des ADN non-optimale. Afin de corriger la présence d'inhibiteurs, il aurait été possible de diluer d'avantage les ADN (et donc les inhibiteurs présents dans ces ADN), tout en respectant une quantité d'ADN suffisante pour l'amplification.

Nous avons donc fait le choix de purifier ces ADN à l'aide d'un tamis moléculaire réalisé sur colonne Zymo-Spin™ contenant du PVPP. Ce polymère de haut poids moléculaire, crée un complexe avec les composés phénoliques et les alcaloïdes, les inhibiteurs de PCR. Cela peut donc être à la base d'un biais dans l'interprétation de nos données, dans la mesure où le passage sur colonne de PVPP a pu altérer la qualité des ADN, et donc le produit final de séquençage. En effet, différentes méthodes d'extraction peuvent aboutir à des différences significatives relevées au niveau des familles et des OTU (Kennedy et al., 2014).

b. Affiliation

Etant donné qu'il s'agit d'une technique très récente, la chaîne de traitement des données est en constante évolution. Ainsi, lorsque nous avons analysé les données présentées dans cette thèse avec la méthode de clustering SWARM, nous avons opté pour une différence arbitraire de 13 bases (distance $d = 13$) entre séquences et intra-OTU. Cela représente donc une différence d'environ 3% entre séquences (une erreur de 13 bases sur une longueur moyenne d'environ 450 bases). Or, après des échanges très récents avec Frédéric Mahé, le concepteur de SWARM (Mahé et al., 2014), il semblerait plus opportun de privilégier une distance $d=1$, c'est-à-dire une différence d'une seule base entre séquences, afin de mieux dissocier les OTU. En effet lorsqu'une séquence présente 2 ou 3 bases différentes d'une autre séquence, elle ne sera alors plus rattachée à cette séquence et dépendra alors d'un OTU différent.

Parmi les 83608 OTU rencontrés dans le cadre de nos résultats, l'OTU le plus abondant était l'OTU n°2 et correspondait au genre des Firmicutes. Il regroupait à lui seul 4992202 séquences, soit environ 65 % du nombre total de séquences. Avec une distance $d=1$, cet OTU majoritaire serait probablement éclaté en plusieurs sous-OTU et pourrait quelque peu modifier les résultats d'affiliation phylogénétique du microbiote. Nous n'avons à l'heure actuelle pas assez de recul sur l'utilisation de cet outil et d'autres travaux complémentaires sont nécessaires pour affiner cette analyse.

CHAPITRE II - IMPACT DES FIBRES RAPIDEMENT FERMENTESCIBLES DISTRIBUEES PRECOCEMENT CHEZ LE LAPEREAU : APPROCHE MULTIDISCIPLINAIRE

La modulation précoce de l'activité microbienne caecale est une des stratégies possibles d'amélioration de la santé digestive chez le lapin (Combes et al., 2013). Elle permettrait d'accroître les effets protecteurs de la flore commensale contre des bactéries pathogènes. Alors que l'importance des fibres dans la ration des herbivores n'est plus à démontrer, des équipes de recherche commencent à s'intéresser à une certaine fraction de ces fibres : les fibres rapidement fermentescibles (Trocino et al., 2013 ; Gidenne, 2014). Elles correspondent aux pectines insolubles dans l'eau et aux fibres solubles (pectines, bêta-glucanes, ...). Elles peuvent être apportées dans l'aliment du lapin sous forme de pulpe de betterave, marc de pomme ou de raisin.

Dans ce chapitre, nous synthétiserons les principaux résultats d'après la figure suivante (figure 41) :

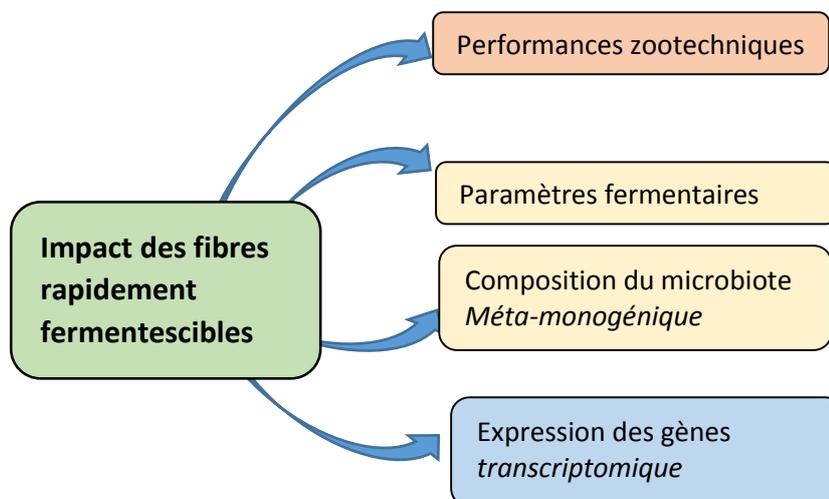


Figure 41 : Structuration des principaux résultats

I. Quels sont les impacts des fibres rapidement fermentescibles sur les performances zootechniques des lapereaux ?

Les conséquences des FRF ne sont pas encore claires sur la croissance et la santé, sachant que certains résultats (Garcia et al., 1993 ; Trocino et al., 2010 ; Gidenne, 2014) sont contradictoires du fait des difficultés d'analyse de ces composés. **Nous avons obtenu des résultats prometteurs**

après le sevrage en optimisant l'apport de FRF dans l'aliment et en le distribuant précocement dès le début de l'ingestion solide du lapereau. Tout d'abord, la santé des animaux avec FRF est équivalente à celle des animaux témoins (morbidité, mortalité et IRS). De plus, l'enrichissement en FRF de l'aliment a permis une meilleure efficacité alimentaire sans impacter le poids vif des lapins à 42 jours d'âge. Au-delà de cet âge, les conséquences des FRF sont globalement similaires à un aliment standard. A partir de ce constat, il serait donc judicieux, d'un point de vue économique pour l'éleveur, de **préconiser les FRF pour des lapins pendant la période « péri-sevrage », soit de 2 à 6 semaines d'âge**. Malgré le fait que notre étude ait été effectuée avec un nombre non négligeable d'animaux, cet effectif reste cependant insuffisant pour valider nos observations et les extrapoler pour des élevages commerciaux, qui enregistrent près de 600 femelles en production par atelier en 2012 (Coutelet, 2012).

Nous avons également comparé cette incorporation de FRF à un aliment médicamenteux, utilisé dans le cadre de la réduction de l'EEL. L'objectif était d'évaluer la possibilité de substituer les antibiotiques par d'autres composés (en l'occurrence des FRF), et ainsi participer à la diminution de l'utilisation d'antibiotiques en élevage. Les résultats sont contrastés, car si les FRF permettent de diminuer l'indice de consommation en post-sevrage, le poids vif à l'abattage des animaux reste inférieur à celui des animaux médicamenteux. De plus, le poids du tube digestif de lapins nourris avec des FRF est supérieur à des animaux témoins, ce qui diminue d'avantage le rendement à l'abattage (Knudsen, communication personnelle). Bien que le taux de morbidité soit supérieur à ceux des animaux médicamenteux, **les FRF ne dégradent pas le taux de mortalité**. Nous avons de plus observé une tendance à l'amélioration de ce taux en post-sevrage, ce qui est un **gros point positif pour les FRF dans le contexte actuel**, où l'on favorise les pratiques d'élevages avec un usage minimum de médicaments. Les résultats obtenus avec les FRF au niveau des performances zootechniques vont dans ce sens, et des travaux de recherche complémentaires sont nécessaires pour les conforter et ainsi poursuivre cet effort en cuniculture.

II. Quels sont les impacts des fibres rapidement fermentescibles sur les paramètres fermentaires et la composition du microbiote des lapereaux ?

Les FRF présentent des avantages au niveau des paramètres fermentaires puisqu'elle impactent positivement les concentrations caecales en AGV totaux (Garcia et al., 2002 ; Trocino et al., 2013). Nos résultats sont allés dans ce sens puisque **les FRF ont augmenté la concentration caecale en AGV et en C2** (au détriment du C4) et la **diminution du pH**. Ces paramètres s'avèrent être des indicateurs d'une bonne santé digestive puisqu'ils diminuent les risques liés à l'EEL et protègent contre les infections entériques à *E. Coli* (Prohászka, 1980 ; Gruesco et al., 2013).

Au niveau de la caractérisation des écosystèmes microbiens, **la médication effectuée chez les mères n'a pas sensiblement modifié le microbiote caecal des lapereaux à 15 jours d'âge**. Cela est en contradiction avec les travaux d'Abecia et al. (2007b) qui montrent un effet des antibiotiques maternels (tiamuline) sur l'écosystème microbien des lapereaux. Nos résultats sont surprenants dans le sens où les oxytétracyclines, utilisées dans cette étude, peuvent être éliminées par l'hôte via le lait, donc transmis aux lapereaux. De plus, Levy et al. (1976) avaient déjà mis en évidence qu'une incorporation de tétracyclines dans un aliment destiné à des volailles modifiait même la flore digestive des éleveurs en contact avec cet aliment. Bien que nous n'ayons pas vérifié la présence d'OTC dans le lait, nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la quantité d'OTC ingérée via le lait par les lapereaux n'était pas suffisante pour induire une modification significative de la composition des microbiotes des lapereaux.

Globalement, l'approche méta-monogénique n'a pas permis de mettre en évidence des différences de composition du microbiote inter-groupes, que ce soit avant sevrage (29 jours) ou après sevrage (45 jours). Au niveau des familles, la seule différence notable a été observée pour le groupe avec antibiotiques, où l'abondance relative des Protéobactéries a augmenté significativement entre 29 et 45 jours, pour devenir trois fois supérieure à celle des deux autres groupes à 45 jours. Étonnamment, Stecher et Hardt (2008) ont observé une réponse similaire chez des humains atteints de maladies intestinales inflammatoires, précisant que l'augmentation des populations de Protéobactéries semble être un indicateur de l'inflammation. Cette observation n'est donc pas favorable d'un point de vue santé digestive pour le régime avec antibiotiques, mais est en faveur du régime avec FRF.

Il n'y a pas eu de différence au niveau des deux familles majoritaires entre les trois régimes alimentaires. Cependant, une différence non négligeable a été observée pour les *Ruminococcaceae* et les *Campylobacteraceae*, dont l'abondance relative pour les animaux ayant reçu des FRF diminue avec l'âge et devient plus faible que celle des autres groupes au 45^{ème} jour. Cela conforte les observations faites au niveau des phyla. De plus, Hansen et al. (2013) présentent également une corrélation entre l'augmentation de l'abondance en *Campylobacteraceae* et l'état inflammatoire de l'intestin chez l'homme. Encore une fois, ces résultats confèrent aux **FRF un effet positif, contribuant à la diminution de l'état inflammatoire du tube digestif**. Les résultats transcriptomiques vont également dans ce sens et seront discutés ci-après.

Un **effet âge important** a été obtenu **entre 15 et 45 jours**, confirmant ainsi les résultats obtenus par Combes et al. (2014). Les populations de Bactéroidetes, largement dominantes avec une alimentation lactée (J15), laissent progressivement la place aux Firmicutes à 29, puis 45 jours.

D'autres variations mineures ont été observées pour certains genres mais n'ont pas retenu notre attention pour cette analyse. Donc globalement, et à l'exception des Protéobactéries, le régime alimentaire n'a donc pas modifié de façon notable la composition du microbiote des animaux.

L'analyse indépendante de l'affiliation via l'étude des OTUs montre des liens étroits entre les OTUs majoritaires et les paramètres fermentaires. L'OTU n°2, assigné au *Lachnospiraceae*, est bien corrélé aux paramètres fermentaires impactés positivement par les FRF (augmentation des concentrations en AGV totaux, acide acétique et diminution du pH). L'OTU n°1, assigné plus précisément aux *Bacteroides_rodentium*, est, en revanche, inversement corrélé à ces mêmes paramètres fermentaires. D'autres paramètres tels que le poids du caecum plein et vide ou la concentration en NH₃ sont également bien corrélés à des OTUs majoritaires, mais ces paramètres ne permettent pas de les discriminer, contrairement aux 2 OTUS majoritaires.

Bien que les corrélations entre les OTUs et les paramètres fermentaires ne soient pas excellentes (0,6 max), il est néanmoins possible de dire que les **FRF agissent préférentiellement sur les *Lachnospiraceae*, et participent alors à la bonne santé digestive des lapereaux**. De plus, étant donné que les abondances relatives pour les *Lachnospiraceae* ne diffèrent pas entre les groupes, nous pouvons alors suggérer l'hypothèse que seule **l'activité métabolique des bactéries est optimisée**. Les bactéries évoluant dans un environnement clos et limité (le caecum), elles n'ont pas la propension à se multiplier indéfiniment, sauf en cas d'anomalie anatomique ou fonctionnelle pouvant engendrer des cas de pullulations bactériennes (Leung Ki et al., 2010). Avec les FRF, les bactéries disposent d'une quantité supérieure de substrat fermentaire, ce qui stimule leur activité métabolique.

III. Quels sont les impacts des fibres rapidement fermentescibles sur l'expression des gènes des lapereaux ?

Lorsque l'on se positionne âge par âge, l'expression différentielle entre les groupes a été pratiquement nulle, aussi bien pour les gènes de l'immunité que pour des gènes impliqués dans d'autres fonctions. Au niveau de la réponse immunitaire, cela ne paraît pas incohérent dans le sens où les animaux n'ont pas reçu de challenge infectieux, et d'autant plus que les conditions sanitaires des animaux étaient bonnes. Les FRF n'apportent pas un avantage notable d'un point de vue expression génique et à un instant *t*.

En s'intéressant à l'évolution de l'expression des gènes en fonction de l'âge, le constat est différent. Au niveau sanguin, le niveau d'expression différentiel du génome mesuré chez des animaux ayant ingéré des FRF se positionne entre celui des animaux témoins (niveau d'expression

supérieur) et celui des animaux avec antibiotiques (niveau d'expression nul). Il est difficile d'expliquer ces différences importantes d'expression, si tant est qu'il y ait réellement une signification biologique. Nous pouvons néanmoins suggérer que les **FRF permettent de mettre en place plus rapidement certaines fonctions biologiques (immunité ou autre) avant le sevrage**. Ainsi, le différentiel observé entre les animaux FRF et témoins proviendrait de la stimulation des gènes associés à ces fonctions entre 29 et 45 jours pour les animaux témoins. Les fonctions biologiques activées entre 29 et 45 jours sont globalement similaires. Cependant, les gènes impliqués dans les maladies gastro-intestinales sont plus stimulés chez les animaux témoins, ce qui conférerait un **rôle protecteur des FRF pour la santé digestive**. Cela corrobore ainsi les résultats obtenus dans le cadre de l'étude méta-monogénique avec la stabilisation des *Campylobacteraceae*, discutés précédemment.

L'absence de différence d'expression pour le groupe avec antibiotiques suggère en revanche un **nivelage de l'expression génique par les antibiotiques**, et laisse supposer un retard dans le développement de l'immunité des lapereaux. Il serait alors intéressant d'évaluer les conséquences phénotypiques, transcriptomiques et métagénomiques, de l'arrêt de la distribution d'un aliment médicamenteux au profit d'un aliment standard, autour du sevrage.

Au niveau iléal, il y a eu 20 fois moins de gènes différentiellement exprimés pour le groupe témoin par rapport au niveau sanguin, et seulement 3 fois moins pour les lapins avec FRF. Les principales fonctions associées à ces gènes différentiellement exprimés sont globalement similaires. En revanche pour le régime médicamenteux, les gènes activés sont principalement rassemblés dans des fonctions liées aux maladies gastro-intestinales et immunologiques, et aux réponses inflammatoires. Cette dernière observation va dans le sens de celles précédemment énoncées, avec dans ce cas présent, un **impact négatif des antibiotiques sur la santé digestive, qui n'est pas observé avec les FRF**. Il convient cependant de rester prudent sur l'interprétation de ces résultats puisque peu de gènes activés sont répertoriés dans les fonctions biologiques citées.

La figure 42 permet de récapituler l'ensemble de ces résultats et d'avoir une vision globale des faits marquants obtenus dans le cadre d'une incorporation de fibres rapidement fermentescibles dans un aliment avant sevrage, avec des approches phénotypiques, transcriptomiques et méta-monogéniques.

Approche méta-monogénique
séquençage ARNr 16S - MiSeq

Fibres rapidement
Fermentescibles
(FRF)

Antibiotiques
(contre l'EEL)

Approche transcriptomique
microarray

Activité des
Lachnospiraceae (mais pas
leur abondance)

MICROBIOTE

Stabilisation des
abondances de
Campylobacteraceae

Activation précoce des
fonctions biologiques

TRANSCRIPTOME

Nivelage de l'expression
des gènes

AGV
C2 et C4
pH } 29 et 45
jours

Limite l'inflammation
digestive

= Poids
IC
= Mortalité } 29-42
jours

Activation plus rapide de
l'immunité

AMELIORATION DE LA
SANTÉ DIGESTIVE

AMELIORATION DU
REVENU DE L'ÉLEVEUR

Figure 42 : Schéma récapitulatif des principaux résultats avec l'incorporation de fibres rapidement fermentescibles

CHAPITRE III : L'AVENIR DE LA GENOMIQUE CHEZ LE LAPIN

I. Nouvelles connaissances sur l'activation in vitro de PBMC

L'étude transcriptomique effectuée sur les PBMC a été effectuée grâce au microarray enrichi en gènes de la réponse immunitaire et récemment annoté. Cette étude a permis d'obtenir de nouvelles connaissances sur l'immunité du lapin, telles que le panel de cytokines inhibées ou activées avec une stimulation par du LPS ou un mélange de PMA et de ionomycine. Nos résultats vont également dans le sens d'une étude similaire effectuée chez le porc (Gao et al., 2010), où un cocktail de PMA et ionomycine active 15 à 20 fois plus de gènes qu'avec du LPS. La PMA et ionomycine vise donc un plus large panel de cellules cibles, contrairement au LPS qui n'active que les monocytes et les macrophages exprimant CD14 (Piriou-Guzylack et Salmon, 2008). Nous avons également mis en avant le rôle immunodépresseur et pro-coagulant du LPS sur des PBMC de lapin, ainsi qu'une augmentation marquée de la réponse inflammatoire, caractérisée par l'expression de cytokines et chemokines entre 4 et 24 heures. Tout un panel d'autres gènes tels que SAA1, S100A12 ou F3 ont également été activés par le LPS, comme observé pour d'autres espèces animales (Gross et al., 2014) et pour l'homme (River et al., 1975). Avec la PMA et ionomycine, nous avons enregistré une activation rapide (dès 4 heures) des réponses Th2, iTreg et Th17, suivie d'une augmentation plus tardive de la réponse Th1 à 24 heures. Les gènes impliqués dans des fonctions liées à la multiplication et à la croissance cellulaire ont également été fortement activés par le mélange de PMA et de ionomycine.

Le lapin présente donc des **réponses immunologiques similaires à d'autres espèces d'élevage**. Certaines d'entre-elles sont **très proches de celles observées chez l'homme, ce qui confirme donc l'importance du lapin comme animal modèle en recherche biomédicale**. Notre étude a donc permis de produire une quantité importante d'informations, qui pourra être reprise ultérieurement pour d'autres projets de recherche effectués chez le lapin.

II. La transcriptomique et la métagénomique au service du phénotypage moléculaire

Longtemps considéré comme un animal modèle en immunologie et physiologie expérimentales, le lapin a été délaissé jusqu'au début des années 2000, faute d'outils performants de génétique moléculaire. Le *Mammalian Genome Project* (Lindblad-Tho et al., 2011) a permis de rattraper ce retard en réalisant une couverture 7X du génome du lapin. De récents travaux ont également permis d'identifier de multiples polymorphismes nucléotidiques, qui seront prochainement rassemblés sur une puce SNP, dans le cadre d'une collaboration européenne (action COST RGB-Net). De plus, d'important travaux d'annotation ont été effectués à partir de données RNA-seq,

renforçant ainsi les connaissances sur le génome du lapin. Le microarray sur lequel nous avons travaillé a également bénéficié de cette nouvelle annotation et permet avec précision d'étudier l'expression du génome. **Le lapin dispose donc d'une panoplie d'outils moléculaires performants et récents**, qui se rapprochent dorénavant des outils disponibles pour d'autres espèces comme le porc et la vache par exemple, voire la souris. Ces outils offrent de nouvelles perspectives pour utiliser efficacement le lapin lorsqu'il se révèle un animal modèle plus pertinent que la souris. Au niveau des études métagénomiques, les techniques de séquençage à haut débit vont permettre d'obtenir encore plus de séquences d'une qualité supérieure. Les biais inhérents à ces techniques seront connus et maîtrisés. En parallèle, les banques de gènes bactériens vont s'étoffer, ce qui permettra d'avoir une connaissance encore plus précise des métagénomiques et de leurs interactions avec des réponses phénotypiques ou transcriptomiques.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Les objectifs de ma thèse étaient de contribuer à l'amélioration *i)* des outils génomiques actuels disponibles pour le lapin, *ii)* des connaissances sur la modulation de l'activité microbienne caecale et *iii)* de contribuer à proposer de nouvelles stratégies nutritionnelles pré-sevrage pouvant améliorer la santé digestive du lapin en croissance. Ces objectifs s'inscrivent dans les attentes de la profession cunicole notamment par rapport à la réduction de l'utilisation d'antibiotiques et par rapport à l'identification de nouvelles stratégies d'alimentation avant le sevrage. De plus, il y avait des attentes au niveau des outils de phénotypage, puisque le lapin souffrait d'un retard par rapport à d'autres espèces d'élevage, retard qui a néanmoins été réduit au cours de ces dernières années sous l'impulsion d'une communauté scientifique dynamique.

D'un point de vue méthodologique, nous avons amélioré une puce à ADN de lapin pour des études transcriptomiques. Ainsi, nous avons tout d'abord enrichi une version commerciale existante d'une puce ADN avec 453 gènes spécifiques de la réponse immunitaire du lapin. Nous avons ensuite amélioré notablement l'annotation de cette puce, en collaboration avec l'Institut Broad (Cambridge, MA, USA). Cette collaboration nous a permis d'utiliser une large banque de données RNAseq à laquelle nous avons contribué avec la production d'ARN de PBMC et de rate. Ce travail permet donc de proposer à la communauté scientifique un outil actualisé et performant pour l'étude de l'expression des gènes chez le lapin, que ce soit au niveau immunitaire, ou pour d'autres domaines. Ce travail a également contribué au développement de la chaîne de traitement des données MiSeq pour la caractérisation des écosystèmes microbiens. Cette technologie est utilisée depuis peu au sein de l'équipe NED (UMR GenPhySE) et vise à remplacer le pyroséquençage Roche 454 utilisé jusqu'à présent pour ce type d'étude. La chaîne de traitement des données MiSeq est encore en développement et nécessitera des ajustements par rapport aux méthodes d'affiliation avec SWARM, ainsi qu'au niveau des indices de richesse et de diversité.

D'un point de vue cognitif, ce travail a permis d'obtenir des connaissances au niveau du phénotype, du transcriptome et du métagénome. Dans le cadre d'une modulation précoce (dès 15 jours d'âge) de l'activité microbienne caecale de lapereaux via l'ingestion de fibres rapidement fermentescibles (FRF), nous avons ainsi montré que les FRF permettent une augmentation de l'activité fermentaire caecale avec une plus forte concentration en AGV. De plus, nous avons mesuré une meilleure efficacité alimentaire en post-sevrage par rapport aux témoins ou aux animaux sous condition d'inhibition (avec antibiotiques). Concernant la santé digestive, l'ingestion précoce de FRF aurait un effet favorable sur la mortalité dans les deux semaines qui suivent le sevrage. Cet effet favorable n'a cependant pas été confirmé sur l'ensemble de la période de croissance. Ces résultats très encourageants sur la santé digestive doivent tout de même être

confirmés à l'aide d'un schéma expérimental faisant appel à des effectifs d'animaux plus conséquents, et plusieurs sites d'élevage dans la mesure du possible.

Au niveau du transcriptome, il en ressort que le lapin présente des réponses biologiques similaires à d'autres espèces d'élevage et à l'homme, dans le cadre d'une stimulation *in vitro* de PBMC. Cela confirme son importance en tant qu'animal modèle en recherche biomédicale. L'analyse de l'expression des gènes au niveau sanguin et iléal laisse suggérer que les FRF permettent une mise en place plus précoce de fonctions biologiques et contribuent à la protection de la santé digestive.

Au niveau du métagénome, nous avons tout d'abord confirmé des résultats obtenus précédemment (Combes et al., 2014) puis montré que l'antibiothérapie maternelle (OTC et colistine) n'impacte pas le microbiote des lapereaux à 15 jours. Les FRF, dans le cadre d'une distribution précoce, ne modifient pas significativement l'abondance des bactéries caecales des lapereaux. Elles semblent favoriser l'activité métabolique des bactéries grâce à une disponibilité supérieure en substrat fermentaire. De plus, la stabilisation de l'abondance de *Campylobacteraceae* permettrait de réduire l'inflammation digestive grâce aux FRF.

Nos résultats ont donc été intéressants par rapport à l'augmentation de l'activité du microbiote, permise par les FRF. En revanche, l'implantation du microbiote semble difficilement modulable par les FRF, compte-tenu de l'absence de différence entre les compositions des microbiotes. Les relations entre l'activité du microbiote et l'immunité existent et sont mesurables de manière globale, avec l'expression des gènes regroupés par fonctions biologiques. En revanche, des corrélations plus précises entre les OTUs majoritaires et les principaux gènes sur- ou sous-exprimés n'ont pas pu être établies et nécessitent d'être approfondies dans le futur.

D'un point de vue plus finalisé, les FRF utilisées dans le cadre de la thèse (pulpe de betterave et marc de pomme) peuvent être conseillées dans un aliment péri-sevrage, avec une distribution dès l'âge de 2 semaines, et jusqu'à 6 semaines environ. De cette façon, il est ainsi possible de couvrir l'ensemble de la période critique pour la santé digestive du lapereau, sans impacter la croissance, et avec un bénéfice au niveau de l'efficacité alimentaire.

En perspective de ce travail, il pourrait être intéressant de se pencher sur d'autres sources de FRF bien établies, en substitution ou en complément de celles utilisées dans la thèse. De plus, la prospection en nouvelles sources de FRF permettrait de compléter cette approche. La capacité de mieux mesurer la teneur en FRF des aliments serait enfin souhaitable car cela permettrait non seulement des résultats plus fiables, mais aussi des comparaisons plus fines entre études scientifiques, que ce soit pour le lapin ou pour d'autres animaux d'élevage.

Afin de maximiser l'effet des FRF, il serait également judicieux d'un point de vue expérimental, de faire varier l'âge au sevrage (21, 28 ou 35 jours) comme effectué dans le cadre de l'étude de Kovács et al. (2012), mais en gardant une distribution précoce de FRF. Plus globalement, et afin de montrer l'intérêt financier pour l'éleveur, il serait pertinent de réaliser une analyse économique, à plus grande échelle, de l'incorporation de FRF dans un aliment post-sevrage.

Nos résultats soulèvent enfin la question de l'intérêt des outils de transcriptomique et de métagénomique pour le phénotypage moléculaire des animaux. Il serait alors possible de mettre en évidence des biomarqueurs, permettant de sélectionner des animaux sur des critères tels que la réduction de l'inflammation digestive ou la sensibilité aux troubles digestifs. Mais est-ce que la profession cunicole serait prête à utiliser ces outils de phénotypage moléculaire, relativement coûteux par rapport à la valeur économique d'un lapin ?

REFERENCES

- Abecia L., McEwan N.R., Newbold C.J. and Fondevila M. (2004). Molecular profiling of the major bacterial species in the rabbit caecum as affected by therapeutical doses of antibiotics. In Proceedings of the Eighth World Rabbit Congress, eds Becerril, C.M. and Pro, A. Puebla (Mexico), 7-10 September, 63.
- Abecia L., Fondevila M., Balcells J., Lobley G.E. and McEwan N.R. (2007a). The effect of medicated diets and level of feeding on caecal microbiota of lactating rabbit does. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 787-793.
- Abecia L., Fondevila M., Balcells J. and McEwan N.R. (2007b). The effect of lactating rabbit does on the development of the caecal microbial community in the pups they nurture. *J. Appl. Microbiol.*, 103, 557-564.
- ANSES (2013). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2012.
- Banchereau J., Pascual V. and O'Garra A. (2012). From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.*, 13, 925-931.
- Bellavia M., Damiano G., Gioviale M. C., Palumbo V. D., Cacciabaudo F., Buscemi G., and Monte A. I. L. (2011). Abnormal expansion of segmented filamentous bacteria in the gut: a role in pathogenesis of chronic inflammatory intestinal diseases? *Med. Microb.*, 22, 45-47.
- Benson A.K., Kelly S.A., Legge R., Ma F., Low S.J., Kim J., Zhang M., Oh P.L., Nehrenberg D., Hua K. et al. (2010). Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 18933-18938.
- Bent S.J., Pierson J.D., Forney L.J., Danovaro R., Luna G.M., Dell'anno A. and Pietrangeli B. (2007). Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2399-2401.
- Bónai A., Szendrő Z., Matics Z., Fébel H., Kametler L., Tornnyos G., Horn P., Kovács F., Kovács M. (2010). Effect of inulin supplementation and age on growth performance and digestive physiological parameters in weaned rabbits. *World Rabbit Sci.*, 18, 121-129.
- Booijink C.C., Zoetendal E.G., Kleerebezem M. and De Vos W.M. (2007). Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol.*, 2, 285-295.
- Bouvet J.P. and Fischetti V.A. (1999). Diversity of antibody-mediated immunity at the mucosal barrier. *Infect. Immun.*, 67, 2687-2691.
- Brambell F.W. (1966). The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet.*, 2, 1087-1093.

- Caccavo D., Pellegrino N.M., Altamura M., Rigon A., Amati L., Amoroso A. and Jirillo E. (2002). Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J. Endotoxin Res.*, 8, 403-417.
- Candau M., Delpon G. and Fioramonti J. (1978). Influence de la nature des glucides membranaires sur le développement anatomofonctionnel du tractus digestif du lapin. In: Proc. of the 2èmes Journées de la Recherche Cunicole, 4-5 avril, Toulouse, INRA ITAVI publ. Paris, pp. 1.1-1.4.
- Carneiro M., Rubin C.J., Di Palma F., Albert F.W., Alföldi J., Barrio A.M., Pielberg G., Rafati N., Sayyab S., Turner-Maier J., et al. (2014). Rabbit genome analysis reveals a polygenic basis for phenotypic change during domestication. *Science*, 345, 1074-1079.
- Carré B. and Brillouet J.M. (1989). Determination of water-insoluble cell-walls in feeds: interlaboratory study. *J. Assoc. Anal. Chem.*, 72, 463-467.
- Chamorro S., Gómez-Conde M.S., Perez de Rozas A.M., Carabaño R. and De Blas J.C. (2007). Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal*, 1, 651-659.
- Chaslus-Dancla E. and Lafont J.P. (1985). Resistance to gentamicin and apramycin in *Escherichia coli* from calves in France. *Vet. Rec.*, 117, 90-91.
- Cherrier M. and Eberl G. (2012). The development of LTi cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 24, 178-183.
- Claesson M.J., Wang Q., O'Sullivan O., Greene-Diniz R., Cole J.R., Ross R.P. and O'Toole P.W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.*, 38, e200.
- Combes S., Michelland R.J., Monteils V., Cauquil L., Soulié V., Tran N.U., Gidenne T. and Fortun-Lamothe L. (2011). Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 77, 680-689.
- Combes S., Fortun-Lamothe L., Cauquil L. and Gidenne T. (2013). Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. *Animal*, 7, 1429-1439.
- Combes S., Gidenne T., Cauquil L., Bouchez O. and Fortun-Lamothe L. (2014). Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status. *J. Anim. Sci.*, 92, 652-665.
- Conway P.L. (1995). Microbial ecology of the human large intestine. In: Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology. Gibson, G.R. and Macfarlane, G.T. Eds., 1-24.

- Cong Y., Feng T., Fujihashi K., Schoeb T.R. and Elson C.O. (2009). A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 19256–19261.
- Corthesy B. and Kraehenbuhl J.P. (1999). Antibody-mediated protection of mucosal surfaces. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 236, 93-111.
- Coutelet G. (2012). Gestion technico-économique des éleveurs de lapin de chair - RENACEB (Réseau National Cunicole d'Élevage en Bandes) et RENALAP (Réseau National Lapin) - résultats 2012. ITAVI (Institut Technique de l'Aviculture).
- Cunliffe R.N. (2003). α -Defensins in the gastrointestinal tract. *Mol. Immunol.*, 40, 463-467.
- Dominguez-Bello M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N. and Knight R. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 11971-11975.
- Domon B. and Aebersold R. (2010). Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy. *Nat. Biotechnol.*, 28, 710-721.
- Erkeller-Yuksel F.M., Deneys V., Yuksel B., Hannel I., Hulstaert F., Hamilton C., Mackinnon H., Stokes L.T., Munhyeshuli V., Vanlangendonck F., et al. (1992). Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J. Pediatr.*, 120, 216-222.
- Externest D., Meckelein B., Schmidt M.A. and Frey A. (2000). Correlations between antibody immune responses at different mucosal effector sites are controlled by antigen type and dosage. *Infect. Immun.*, 68, 3830-3839.
- Fagarasan S., Kinoshita K., Muramatsu M., Ikuta K. and Honjo T. (2001). In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. *Nature*, 413, 639-643.
- Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R.N., Willmitzer L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.*, 18, 1157-1161.
- Fortun-Lamothe L. and Boullier S. (2007). A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. *Livest. Sci.*, 107, 1-18.
- Foster J.A. and McVey Neufeld K.A. (2013). Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.*, 36, 305-312.
- Freter R. (1974). Interactions between mechanisms controlling the intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.*, 27, 1409-1416.
- Gaboriau-Routhiau V., Rakotobe S., Lécuyer E., Mulder I., Lan A., Bridonneau C., Rochet V., Pisi A., De Paepe M., Brandi G., Eberl G., Snel J., Kelly D. and Cerf-Bensussan N. (2009). The key role

- of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses. *Immunity*, 31, 677-689.
- Gao Y., Flori L., Lecardonnell J., Esquerré D., Hu Z.L., Teillaud A., Lemonnier G., Lefèvre F., Oswald I.P. and Rogel-Gaillard C. (2010). Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA-ionomycin using an expression array targeting the pig immune response. *BMC Genomic*, 11, 292.
- García G., Galvez J.F. and De Blas J.C. (1993). Effect of substitution of sugar beet pulp for barley in diets for finishing rabbits on growth performance and on energy and nitrogen efficiency. *J. Anim. Sci.*, 71, 1823-1830.
- García J., Carabaño R., Perez-Alba L. and De Blas J.C. (2000). Effect of fiber source on cecal fermentation and nitrogen recycled through cecotrophy in rabbits. *J. Animal Sci.*, 78, 638-646.
- García J., Gidenne T., Falcao-E-Cunha L. and De Blas, C. (2002). Identification of the main factors that influence caecal fermentation traits in growing rabbits. *Animal Research*, 51, 165-173.
- Gidenne T., Kerdiles V., Jehl N., Arveux P., Briens C., Eckenfelder B., Fortun L., Montessuy S. and Muraz G. (2001). Effet d'une hausse du ratio fibres digestibles/protéines sur les performances zootechniques et l'état sanitaire du lapin en croissance : résultats préliminaires d'une étude multi-site. In Proc.: 9èmes Journées de la Recherche Cunicole. 28-29 November. Paris, France, 65-68.
- Gidenne T. (2003). Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livest. Prod. Sci.*, 81, 105-117.
- Gidenne T., Jehl, N., Lapanouse A. and 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. *Brit. J. Nutr.*, 92,95-104.
- Gidenne T., Carabaño R., Badiola I., Garcia J. and Licois D. (2007). L'écosystème caecal chez le lapin domestique: Impact de la nutrition et de quelques facteurs alimentaires. Conséquences sur la santé digestive des lapereaux. In: Proc. 12^{èmes} Journ. Rech. Cunicole, 2007 November, Le Mans, France, 59-72.
- Gidenne T., Combes S. and Fortun-Lamothe L. (2012). Restreindre l'ingestion du jeune lapin : de nouvelles stratégies pour renforcer sa santé digestive et améliorer son efficacité alimentaire. *INRA Prod. Anim.*, 25, 323-336.
- Gidenne T. (2014). Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve the digestive health. *Animal*, in press.

- Gloor G.B., Hummelen R., Macklaim J.M., Dickson R.J., Fernandes A.D., MacPhee R. and Reid G. (2010). Microbiome profiling by illumina sequencing of combinatorial sequence-tagged PCR products. *PLoS One*, 5, e15406.
- Gómez-Conde M.S., Chamorro S., Nicodemus N., Garcia J., Carabaño R. and De Blas C. (2004). Effect of the level of soluble fibre on ileal apparent digestibility at different ages. In: Proc. of the 8th World Rabbit Congress, C. Becerril and A. Pro (Eds.), Puebla, Mexico, 7-10 september, Colegio de Postgraduados for WRSA publ., pp. 130.
- Gómez-Conde M.S., Chamorro S., Rebollar P.G., Eiras P., Garcia J. and Carabaño R. (2005). Efecto del tipo de fibra sobre el tejido linfoide asociado a intestino en animales de 35d de edad. *ITEA Prod. Anim.*, 26, 415-419.
- Gómez-Conde M.S., Pérez De Rozas A., Badiola I., Chamorro S., Mateos G.G., De Blas J.C., Garcia J. and Carabaño R. (2006). Level of soluble fiber and medication influence the presence of intestinal pathogen microbiota in young rabbits. In: Proc. of the ADSA- ASAS Joint Annual meeting, 9-13 july, Minneapolis, USA, abstr. W 137 (<http://adsa.asas.org/meetings/2006/abstracts/342.pdf>).
- Gómez-Conde M.S., Pérez de Rozas A., Badiola I., Pérez-Alba L., De Blas J.C., Carabaño R., García J. 2009. Effect of neutral detergent soluble fibre on digestion, intestinal microbiota and performance in twenty five day old weaned rabbits. *Livest. Sci.*, 125: 192-198.
- Gouet P. and Fonty G. (1979). Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Ann. Biol. Anim. Bioch.*, 19, 553-566.
- Gournier-Château N., Larpent J.P., Castellanos M.I. and Larpent J.L. (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine, Lavoisier ed.
- Gross S.R., Sin C.G., Barraclough R. and Rudland P.S. (2014). Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71, 1551-1579.
- Gruesco I., De Blas J.C., Cachaldora P., Mendez J., Losada B. and García-Rebollar P. (2013). Combined effects of supplementation of diets with hops and of a substitution of starch with soluble fiber on feed efficiency and prevention of digestive disorders in rabbits. *Animal Feed Sci. Technol.*, 180, 92-100.
- Guarner F. and Malagelada J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet.*, 361, 512-519.
- Hall M.B., Lewis B.A., Van Soest P.J and Chase L.E. (1997). A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fibre. *J. Sci. Food Agric.*, 74, 441-449.
- Hall M.B., Hoover W.H., Jennings J.P. and Miller Webster T.K. (1999). A method for partitioning neutral detergent-soluble carbohydrates. *J. Sci. Food Agr.*, 79, 2079-2086.
- Hall M.B. (2003). Challenges with non fiber carbohydrate methods. *J. Anim. Sci.*, 81, 3226-3232.

- Handelsman J., Rondon M.R., Brady S.F., Clardy J. and Goodman R.M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.*, 5, R245-249.
- Hansen R., Berry S.H., Mukhopadhyaya I., Thomson J.M., Saunders K.A., Nicholl C.E., Bisset W.M., Loganathan S., Mahdi G., Kastner-Cole D. et al. (2013). The microaerophilic microbiota of de-novo pediatric inflammatory bowel disease: the BISCUIT study. *PLoS One*, 8, e58825.
- Hasman H., Saputra D., Sicheritz-Ponten T., Lund O., Svendsen C.A., Frimodt-Møller N. and Aarestrup F.M. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 52, 139-146.
- Hemarajata P. and Versalovic J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap. Adv. Gastroenterol.*, 6, 39-51.
- Huurre A., Kalliomaki M., Rautava S., Rinne M., Salminen S. and Isolauri E. (2008). Mode of delivery - effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology*, 93, 236-240.
- Huybens N., Houeix J., Licois D., Mainil J. and Marlier D. (2009). Inoculation and bacterial analyses of fractions obtained from the reference inoculum TEC4 which experimentally reproduces epizootic rabbit enteropathy. *World Rabbit Sci.*, 17, 185-193.
- Irizarry R.A., Warren D., Spencer F., Kim I.F., Biswal S., Frank B.C., Gabrielson E., Garcia J.G., Geoghegan J., Germino G., et al. (2005). Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nat. Methods*, 2, 345-350.
- Ivanov I.I., Atarashi K., Manel N., Brodie E.L., Shima T., Karaoz U., Wei D., Goldfarb K.C., Santee C.A., Lynch S.V., Tanoue T., Imaoka A., Itoh K., Takeda K., Umesaki Y., Honda K. and Littman D.R. (2009). Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.*, 139, 485-498.
- Jang M.H., Kweon M.N., Iwatani K., Yamamoto M., Terahara K., Sasakawa C., Suzuki T., Nochi T., Yokota Y., Rennert P.D., Hiroi T., Tamagawa H., Iijima H., Kunisawa J., Yuki Y., Kiyono H. (2004). Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 6110-6115.
- Jego G., Pascual V., Palucka A.K. and Banchereau J. (2005). Dendritic cells control B cell growth and differentiation. *Curr. Dir. Autoimmun.*, 8, 124-139.
- Johnson A.C., Heinzl F.P., Diaconu E., Sun Y., Hise A.G., Golenbock D., Lass J.H. and Pearlman E. (2005). Activation of toll-like receptor (TLR)2, TLR4, and TLR9 in the mammalian cornea induces MyD88-dependent corneal inflammation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46, 589-595.
- Johnson W.E., Li C. and Rabinovic A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics*, 8, 118-127.

- Kaplan C.W., Astaire J.C., Sanders M.E., Reddy B.S. and Kitts C.L. (2001). 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed lactobacillus acidophilus NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 1935- 1939
- Kennedy N.A., Walker A.W., Berry S.H., Duncan S.H., Farquarson F.M., Louis P., Thomson J.M.; UK IBD Genetics Consortium, Satsangi J., Flint H.J., Parkhill J., Lees C.W. and Hold G.L. (2014). The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One*, 9, e88982.
- Khachatryan Z.A., Ktsoyan Z.A., Manukyan G.P., Kelly D., Ghazaryan K.A. and Aminov R.I. (2008). Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One*, 3, e3064.
- Kawai T. and Akira S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*, 11, 373-384.
- Kent W.J. (2002). BLAT - the BLAST-like alignment tool. *Genome Res.*, 12, 656-64.
- Knight K.L. and Winstead C.R. (1997). B lymphocyte development in the rabbit. *Int. Rev. Immunol.*, 15, 129-163.
- Kocherginskaya S.A., Aminov R.I. and White B.A. (2001). Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*, 7, 119-134.
- Kolb A.F. (2001). The prospects of modifying the antimicrobial properties of milk. *Biotechnol. Adv.*, 19, 299-316.
- Konstantinov S.R., Awati A.A., Williams B.A., Miller B.G., Jones P., Stokes C.R., Akkermans A.D., Smidt H. and De Vos W.M. (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.*, 8, 1191-1199.
- Kovács M., Bónai A., Szendrő Z., Milisits G., Lukács H., Szabó-Fodor J., Tornyos G., Matics Z., Kovács F. and Horn P. (2012). Effect of different weaning ages (21, 28 or 35 days) on production, growth and certain parameters of the digestive tract in rabbits. *Animal*, 6, 894-901.
- Lanning D., Sethupathi P., Rhee K.J., Zhai S.K. and Knight K.L. (2000a). Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J. Immunol.*, 165, 2012-2019.
- Lanning D., Zhu X., Zhai S.K. and Knight K.L. (2000b). Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes, and selection. *Immunol. Rev.*, 175, 214-228.
- Lavoie P.M., Huang Q., Jolette E., Whalen M., Nuyt A.M., Audibert F., Speert D.P., Lacaze-Masmonteil T., Soudeyns H. and Kollmann T.R. (2010). Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-

- 23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *J. Infect. Dis.*, 202, 1754-1763.
- Lazarevic V., Whiteson K., Huse S., Hernandez D., Farinelli L., Osterås M., Schrenzel J. and François P. (2009). Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J. Microbiol. Methods*, 79, 266-271.
- Lebas F., Coudert P., De Rochambeau H. and Thébault R.G. (1996). Nutrition et alimentation. In : Le lapin : Elevage et pathologie. FAO Eds, Rome, Italie, 21-50.
- Lehner M., Bailo M., Stachel D., Roesler W., Parolini O. and Holter W. (2007). Caspase-8 dependent apoptosis induction in malignant myeloid cells by TLR stimulation in the presence of IFN-alpha. *Leuk. Res.*, 31, 1729-1735.
- Lembet A., Gaddipati S., Holzman I.R., Berkowitz R.L., Bottone E.J. (2003). Meconium enhances the growth of perinatal bacterial pathogens. *Mt Sinai J Med.*, 70, 126-129.
- Lepage P., Hasler R., Spehlmann M.E., Rehman A., Zvirbliene A., Begun A., Ott S., Kupcinskas L., Doré J., Raedler A. and Schreiber S. (2011). Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 141, 227-236.
- Leung Ki E.L., Roduit J., Delarive J., Guyot J., Michetti P. and Dorta G. (2010). Pullulation bactérienne de l'intestin grêle. *Rev. Med. Suisse*, 6, 186-191.
- Levy S.B., FitzGerald G.B. and Macone A.B. (1976). Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N. Engl. J. Med.*, 295, 583-588.
- Levy O., Coughlin M., Cronstein B.N., Roy R.M., Desai A. and Wessels M.R. (2006). The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF-alpha production in the human newborn. *J. Immunol*, 177, 1956-1966.
- Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., Schlegel M.L., Tucker T.A., Schrenzel M.D., Knight R. and Gordon J.I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, 1647-1651.
- Li J., Jia H., Cai X., Zhong H., Feng Q., Sunagawa S., Arumugam M., Kultima J.R., Prifti E., Nielsen T. et al. (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.*, 32, 834-841.
- Licois D., Wyers M. and Coudert P. (2005). Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Vet. Res.*, 36, 601-613.
- Lin C.S., Chang C.J., Lu C.C., Martel J., Ojcius D.M., Ko Y.F., Young J.D. and Lai H.C. (2014). Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed J.* 2014, doi: 10.4103/2319-4170.138314.

- Lindblad-Toh K., Garber M., Zuk O., Lin M.F., Parker B.J., Washietl S., Kheradpour P., Ernst J., Jordan G., Mauceli E., Ward L.D., et al. (2011). A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals. *Nature*, 478, 476-482.
- Liquet B., Lê Cao K.A., Hocini H. and Thiébaud R. (2012). A novel approach for biomarker selection and the integration of repeated measures experiments from two assays. *BMC Bioinformatics*, 13, e325.
- Liu Z., DeSantis T.Z., Andersen G.L. and Knight R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Res.*, 36, e120.
- Loman N.J., Misra R.V., Dallman T.J., Constantinidou C., Gharbia S.E., Wain J. and Pallen M.J. (2012). Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.*, 30, 434-439.
- Ma J., Prince A. and Aagaard K.M. (2014). Use of whole genome shotgun metagenomics: a practical guide for the microbiome-minded physician scientist. *Semin. Reprod. Med.*, 32, 5-13.
- Mackie R.I., Sghir A. and Gaskins H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J Clin. Nutr.*, 69, 1035S-1045S.
- Mage R. (1998). Immunology of Lagomorphs. In: Handbook of Vertebrate Immunology. P. Griebel, P.P. Pastoret, H. Bazin et A. Govaerts Eds, Academic Press, Londres, Royaume-Uni : 223-260.
- Magoč T. and Salzberg S.L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27, 2957-2963.
- Mahé F., Rognes T., Quince C., De Vargas C. and Dunthorn M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, 2, e593.
- Malone J.H. and Oliver B. (2011). Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.*, 31, 9:34.
- Mantione K.J., Kream R.M., Kuzelova H., Ptacek R., Raboch J., Samuel J.M. and Stefano G.B. (2014). Comparing Bioinformatic Gene Expression Profiling Methods: Microarray and RNA-Seq. *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, 23, 138-142.
- Martignon M.H., Combes S. and Gidenne T. (2010). Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. *Comp. Bioch. Physiol., Part A*, 156, 156-162.
- Martin W.J. (1989). New technologies for large-genome sequencing. *Genome*, 31, 1073-1080.
- Martin M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high- throughput sequencing reads. *EMBnet. J.*, 17, 10-12.

- Martinsen T.C., Bergh K. and Waldum H.L. (2005). Gastric juice: a barrier against infectious diseases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 96, 94-102.
- Martínez-Vallespín B., Navarrete C., Martínez Paredes E., Ródenas L., Cervera C. and Blas E. (2011). Determination of neutral detergent soluble fibre: modifications of the original method. *ITEA Prod. Anim.*, 24, 291-293.
- Massip K., Combes S., Cauquil L., Zemb O. and Gidenne T. (2012). High throughput 16S-DNA sequencing for phylogenetic affiliation of the caecal bacterial community in the rabbit - Impact of the hygiene of housing and of the intake level, In Proc.: VIIIth INRA-RRI Symposium on Gut Microbiology. Gut microbiota: friend or foe? INRA Rowett Institute of Nutrition and Health. (Ed.) publ., Clermont-Ferrand, France, 17-20 june, p57.
- Maynard C.L., Elson C.O., Hatton R.D. and Weaver C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489:231-241.
- McCleary B.V., De Vries J.W., Rader J.I., Cohen G., Prosky L., Mugford D.C., Champ M. and Okuma K. (2010). Determination of total dietary fiber (codex definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC*, 93, 221-233.
- Michelland R.J. (2009). Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores : approche compare vache / lapin. Université de Toulouse, France.
- Michelland R.J., Monteils V., Combes S., Cauquil L., Gidenne T. and Fortun-Lamothe L. (2010). Comparison of the archaeal community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit. *Anaerobe*, 16, 396-401.
- Montagne L., Piel C. and Lallès J.P. (2004). Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutr. Rev.*, 62, 105-14.
- Mowat A. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.*, 3, 331-341.
- Moynagh P.N. (2005). TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol.*, 26, 469-476.
- Nagashima K., Hisada T., Sato M. and Mochizuki J. (2003). Application of new primer-enzyme combinations to terminal restriction fragment length polymorphism profiling of bacterial populations in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1251-1262.
- Nielsen R., Paul J.S., Albrechtsen A. and Song Y.S. (2011). Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nat. Rev. Genet.*, 12, 443-451.
- Nyren P.B., Pettersson B., and Uhlen M. (1993). Solid phase minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal. Biochem.*, 208, 171-175

- Perez J.M., Gidenne T., Bouvarel I., Arveaux P., Bourdillon A., Briens C., La Naour J., Messenger B. and Mirabito L. (2000). Replacement of digestible fibre by starch in the diet of growing rabbits. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. *Ann. Zootech.*, 49, 369-377.
- Piriou-Guzylack L. and Salmon H. (2008). Membrane markers of the immune cells in swine: an update. *Vet. Res.*, 39-54.
- Prohászka L. (1980). Antibacterial effect of volatile fatty acids in enteric E. coli-infections of rabbits. *Zentralbl. Vet. B.*, 27, 631-639.
- Prosky L., Asp N.G., Schweizer T.F., Devries J.W. and Furda I. (1992). Determination of insoluble and soluble dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *The Journal of AOAC International*, 75, 360-367.
- Pruesse E., Quast C., Knittel K., Fuchs B.M., Ludwig W., Peplies J. and Glöckner F.O. (2007). SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.*, 35, 7188-7196.
- Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P. and Gu Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 13, 341.
- Reid G., Younes J.A., Van der Mei H.C., Gloor G.B., Knight R. and Busscher H.J. (2011). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nature Rev. Microbiol.*, 9, 27-38.
- Reyes A., Haynes M., Hanson N., Angly F.E., Heath A.C., Rohwer F. and Gordon J.I. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466, 334-338.
- Richaud-Patin Y., Soto-Vega E., Llorente L. (2005). The gut: beyond immunology. *Reumatol. Clin.*, 1, 121-128.
- Rivers R.P., Hathaway W.E., Weston W.L. (1975). The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br. J. Haematol.*, 30, 311-316.
- Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., Nyren P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.*, 242, 84-89.
- Sayah R.S., Kaneene J.R., Johnson Y. and Miller R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in Escherichia coli isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1394-1404.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J. et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 7537-7541.

- Scupham A.J. (2007). Succession in the intestinal microbiota of preadolescent turkeys. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60, 136-147.
- Sekirov I., Russell S.L., Antunes L.C. and Finlay B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.*, 90, 859-904.
- Seruga B., Zhang H., Bernstein L.J. and Tannock I.F. (2008). Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 8, 887-899.
- Simecka J.W. (1998). Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 34, 235-259.
- Simpson J.M., McCracken V.J., White B.A., Gaskins H.R. and Mackie R.I. (1999). Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microb. Met.*, 36, 167-179.
- Slack E., Hapfelmeier S., Stecher B., Velykoredko Y., Stoel M., Lawson M.A., Geuking M.B., Beutler B., Tedder T.F., Hardt W.D. et al. (2009). Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. *Science*, 325, 617-620.
- Soler M.D., Blas E., Cano J.L., Pascual J.J., Cervera C. and Fernández- Carmona J. (2004). Effect of digestible fibre/starch ratio and animal fat level in diets around weaning on mortality rate of rabbits. In Proc.: *8th World Rabbit Congress*, 7-10 September, 2004. Puebla, Mexico. 996-1001.
- Spor A., Koren O. and Ley R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Rev. Microbiol.*, 9, 279-290.
- Stecher B. and Hardt W.D. (2008). The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol.*, 16, 107-114.
- Stewart P.S. (1997). Theoretical aspects of antibiotic diffusion into biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40, 2517-2522.
- Strachan D.P. (1989). Hay fever, hygiene and household size. *Br. Med. J.*, 299, 1259–1260.
- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon J.J., Gibson G.R., Collins M.D. and Dore J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4799–4807.
- Sundset M.A., Edwards J.E., Cheng YF., Senosiain R.S., Fraile M.N., Northwood K.S., Praesteng K.E., Glad T., Mathiesen S.D. and Wright A.D. (2009). Molecular diversity of the rumen microbiome of Norwegian reindeer on natural summer pasture. *Microb. Ecol.*, 57, 335-348.
- Tatsuoka N., Mohammed N., Mitsumori M., Tajima K., Hara K., Kurihara M. and Itabashi H. (2007). Analysis of methanogens in the bovine rumen by polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. *Anim. Sci. J.*, 78, 512-518.

- Toward R., Montandon S. and Walton G. (2012). Gibson GR. Effect of prebiotics on the human gut microbiota of elderly persons. *Gut Microbes*, 3, 57-60.
- Trocino A., Fragkiadakis M., Radaelli G. and Xiccato G. (2010). Effect of dietary soluble fibre level and protein source on growth, digestion, caecal activity and health of fattening rabbits. *World Rabbit Sci.*, 18, 199-210.
- Trocino A., Garcia J., Carabaño R. and Xiccato G. (2013). A meta-analysis of the role of soluble fibre in diets for growing rabbits. *World Rabbit Sci.*, 21, 1-15.
- Vaishampayan P.A., Kuehl J.V., Froula J.L., Morgan J.L., Ochman H. and Francino M.P. (2010). Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol. Evol.*, 2, 53-66.
- Van Soest P.J., Robertson J.B. and Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74, 3583–3597.
- Wang H., He X., Band M., Wilson C. and Liu L. (2005). A study of inter-lab and inter-platform agreement of DNA microarray data. *BMC Genomics*, 6, e71.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M. and Cole J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5261-5267.
- Wang Z., Gerstein M. and Snyder M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.*, 10, 57-63.
- Wang J.Q., Jeelall Y.S., Ferguson L.L. and Horikawa K. (2014). Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front. Immunol.*, 5, e367.
- Wray C., Hedges R.W., Shannon K.P. and Bradley D.E. (1986). Apramycin and gentamicin resistance in *Escherichia coli* and salmonellas isolated from farm animals. *J. Hyg.*, 97, 445-456.
- Xiccato G., Trocino A., Carraro L. and Fragkiadakis M. (2006). Digestible fibre to ADF ratio and protein concentration in diets for early weaned rabbits. In Proc.: 3rd Rabbit Congress of America, 21-23 August, Maringá, Brazil, Comm. 35, 1-6.
- Yatsunencko T., Rey F.E., Manary M.J., Trehan I., Dominguez-Bello M.G., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Baldassano R.N., Anokhin A.P., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222-227.
- Yin Y., Lei F., Zhu L., Li S., Wu Z., Zhang R., Gao G.F., Zhu B. and Wang X. (2010). Exposure of different bacterial inocula to newborn chicken affects gut microbiota development and ileum gene expression. *ISME J.*, 4, 367-376.
- Zhang J.M. and An J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.*, 45, 27-37.

ABSTRACT

Digestive health of rabbits is difficult to manage in breeding systems, especially around weaning where digestive problems are very common and can result in significant losses. The use of antibiotics decreases in order to avoid the emergence of problems with antibiotic resistance, but alternatives must be found. The objectives of this work were: i) to study effects of the incorporation of rapidly fermentable fiber (FRF) in diets fed to rabbits from 15 days of age, and compared to a feed with antibiotics (tiamulin and apramycin), used to fight against epizootic rabbit enteropathy; ii) to deploy genomics methodologies targeting the rabbit species (improvement and re-annotation of a microarray) and the digestive microbiota (pipeline analysis of 16S rRNA gene), for molecular phenotyping. An innovative approach was used in this work through the combination of three complementary approaches: phenotypic, transcriptomic, and metagenomic. At the phenotypic level, the stimulation of the fermentation activity by FRF is verified with higher cecal VFA concentrations (+ 20%) and higher cecal acidity. Moreover, the FRF tend to reduce mortality post-weaning and improve feed efficiency. At the transcriptomic level, we obtained new data on the immunity of the adult rabbit with *in vitro* stimulation of peripheral blood mononuclear cells with LPS and PMA-Ionomycin. This study confirms the importance of the rabbit as an animal model for biomedical research. In young rabbits, the new version of the microarray allowed us to show that biological functions are more quickly implemented with FRF than a standard diet, and that antibiotics level out the gene expression. In addition, FRF help to limit intestinal inflammation. At the metagenomic level, the targeting of the 16S rRNA, we showed that an increase in cecal microbiota activity is not associated with major changes of microbiota composition, with the exception of the stabilization of the relative abundance of *Campylobacteraceae*, which limits gastrointestinal inflammation. Our preliminary results did not identify significant correlations between gene expression in blood and/or ileum, and principal taxonomic profiles of the digestive microbiota. Our results suggest that FRF can be proposed as a new nutrition strategy peri-weaning, with improved feed efficiency and increased protection of digestive health, and secondly that genomic approaches are promising to describe more precisely phenotypes of interest in rabbits.

Keywords: metagenomics, microarray, microbiota, immunity, rabbit, rapidly fermentable fibers, antibiotics.

RESUME

La santé digestive du lapin est difficile à maîtriser en élevage, notamment en période de sevrage où des troubles digestifs sont fréquents et peuvent entraîner des pertes importantes. Bien que l'utilisation d'antibiotiques diminue, afin d'éviter l'apparition de problèmes de résistance, des solutions alternatives doivent être trouvées. Nos principaux objectifs étaient : *i*) d'étudier l'influence de l'incorporation de fibres rapidement fermentescibles (FRF) dans un aliment distribué précocement dès 15 jours d'âge, en comparaison d'un aliment avec antibiotiques (tiamuline et apramycine) utilisés pour lutter contre l'entéropathie épizootique du lapin ; *ii*) de déployer des méthodologies en génomique ciblant l'espèce lapin (amélioration et réannotation d'un microarray) et son microbiote digestif (pipeline d'analyse du gène de l'ARNr 16S), pour du phénotypage moléculaire. L'originalité de notre travail réside ainsi dans l'acquisition de données par trois approches complémentaires : phénotypique, transcriptomique, et métagénomique. **Au niveau phénotypique**, la stimulation de l'activité fermentaire par les FRF est vérifiée avec une hausse de la concentration caecale en AGV (+20%) et une plus forte acidité du biotope caecal. De plus, les FRF tendent à réduire la mortalité en post-sevrage et améliorent l'efficacité alimentaire. **Au niveau transcriptomique**, nous avons tout d'abord apporté de nouvelles connaissances sur l'immunité du lapin adulte avec la stimulation in vitro de cellules mononuclées du sang périphérique par du LPS et de la PMA-ionomycine. Cette étude confirme l'importance du lapin comme animal modèle pour la recherche biomédicale. Chez le jeune lapin, la nouvelle version du microarray nous a permis de montrer que les fonctions biologiques sont plus rapidement mises en place avec les FRF qu'avec un aliment standard, et que les antibiotiques nivellent l'expression génique. De plus, les FRF contribueraient à limiter l'inflammation intestinale. **Au niveau métagénomique** et en ciblant l'ARNr 16S, nous montrons qu'une augmentation de l'activité microbienne caecale n'est pas associée à une modification majeure de la composition du microbiote, à l'exception de la stabilisation de l'abondance des *Campylobacteraceae*, qui limiterait l'inflammation digestive. Nos travaux, encore préliminaires, n'ont pas permis d'identifier des corrélations significatives entre l'expression génique dans le sang et/ou l'iléon, et les profils taxonomiques (OTUs) majoritaires du microbiote digestif. L'ensemble de nos résultats suggère d'une part que les FRF peuvent être proposées comme une nouvelle stratégie nutritionnelle péri-sevrage, avec une amélioration de l'efficacité alimentaire et une protection accrue de la santé digestive, et d'autre part que des approches génomiques sont prometteuses pour qualifier finement les phénotypes d'intérêt chez le lapin.

Mots clés : métagénomique, microarray, microbiote, immunité, lapin, fibres rapidement fermentescibles, antibiotiques.