THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme CHARLOTTE PAËS

le jeudi 2 juillet 2020

Titre :

Stimulation de l'ingestion d'aliment solide chez le lapereau allaité et conséquences sur l'implantation du microbiote intestinal et la santé digestive.

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Génétique, Physiologie et Systèmes d'Elevage (GENPHYSE)

Directeur(s) de Thèse :

MME SYLVIE COMBES

M. THIERRY GIDENNE

Rapporteurs :

Mme EVELYNE FORANO, INRA CLERMONT FERRAND

Mme ISABELLE LE HUEROU-LURON, INRA RENNES

Membre(s) du jury :

M. FRANCIS ENJALBERT, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Président

M. BENOIST SCHAAL, CTRE NAT RECH SCIENTIFIQUE, Membre

Mme KARINE BEBIN, GROUPE CCPA, Invité

Mme SYLVIE COMBES, INRA TOULOUSE, Membre

M. THIERRY GIDENNE, INRA TOULOUSE, Membre

L'utopie est la vérité de demain

Victor Hugo

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Evelyne Forano de l'unité MEDIS de l'INRAE Auvergne-Rhône-Alpes et Isabelle Le Huërou-Luron de l'unité NuMeCan de l'INRAE de Saint Gilles pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de cette thèse, ainsi que Benoist Schaal de l'unité du Centre des sciences du Goût et de l'Alimentation du CNRS de Dijon pour avoir accepté d'en être l'examinateur. J'adresse mes remerciements à Francis Enjalbert, professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse au cours de cette situation si particulière que fut la crise du COVID-19. Je remercie également Gérard Coureaud de l'unité du Centre des sciences du Goût et de l'Alimentation du CNRS de Dijon ainsi que Lucile Montagne de l'unité PEGASE de l'INRAE Agrocampus Ouest pour leurs conseils pertinents lors de mes comités de suivi de thèse.

Je remercie Xavier Fernandez et Juliette Riquet pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de l'unité GenPhySE dans d'excellentes conditions. Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse Sylvie Combes pour m'avoir fait confiance pendant ces trois années, pour son engagement dans notre travail et sa disponibilité en toutes circonstances (même le week-end pour remplir les coupelles des lapereaux !). Merci Sylvie pour ton enthousiasme scientifique contagieux et pour tous les savoirs que tu m'as transmis au travers d'échanges toujours francs et constructifs. Je suis également reconnaissante à mon co-directeur de thèse Thierry Gidenne pour ses précieux conseils et pour m'avoir donné les clés pour appréhender la nutrition du lapin, toujours avec bonne humeur et passion. Je remercie également Laurence Fortun-Lamothe pour tout le travail conduit en amont de cette thèse, notamment pour la mise au point des processus de granulations, et pour ses remarques toujours enrichissantes.

Je souhaite remercier les différents partenaires du Groupe d'Expérimentation Cunicole qui m'ont donné l'opportunité de réaliser cette thèse CIFRE : CCPA, Evialis, MixScience, Techna et Wisium. Je remercie tout particulièrement mes interlocuteurs privilégiés : Karine Bébin, Chantal Davoust, Emeline Guené-Grand, Charly Gohier, François-Xavier Menini et Gwénaël Rebours, pour avoir suivi l'avancement de cette thèse avec attention, pour leur appui technique à la formulation et leurs retours terrains essentiels. Merci pour cette collaboration durant laquelle vous m'avez accordé confiance et liberté.

J’adresse des remerciements tout particuliers à Martin Beaumont et Davi Savietto pour m’avoir laissée prendre part à leurs projets de recherche. Merci Martin pour ton accompagnement sicentifique et pour avoir élargi la vision de ce projet de thèse par des approches moléculaires que je n’aurais jamais pensé réalisables ! Merci Davi pour avoir toujours été ouvert à l’échange ainsi que pour tes encouragements tout au long de cette thèse.

Je tenais à remercier chaleureusement l’équipe de Pectoul, qui s’est mobilisée pendant plus d’un an sur nos essais zootechniques, pour m’avoir fait partager son quotidien à l’élevage, toujours avec indulgence et gentillesse. Mes pensées vont tout d’abord vers Michel, de qui je garderai l’image d’une personne pleine de vigueur avec un grand cœur, parti bien trop tôt. Merci à Patrick, toujours présent pour trouver une solution à nos problèmes techniques avec bonne humeur. Je remercie Annette pour avoir patiemment bataillé avec Sidex, avec l’aide de François Laperruque. Merci à Jean-Marie pour ses délicieux gâteaux à la pause café et ses conseils à destination de l’apprentie jardinière que je suis ! Je remercie également l’équipe de Langlade venue en renfort sur nos essais et tout particulièrement Florence.

Je remercie également les nombreuses personnes qui ont travaillé sur mes échantillons et m’ont permis de progresser en biochimie et biologie moélculaire en me transmettant leurs connaissances. Je suis extrêmement reconnaissante à Carole Bannelier pour toutes les analyses chimiques réalisées avec un timing parfait, malgré des quantités d’échantillons très importantes. Merci pour ce travail colossal réalisé ainsi que pour ton oreille attentive. Merci à Mumu et Béa pour leur bienveillance et leur aide essentielle dans la préparation des dosages. Je remercie également Céline et Ingrid pour m’avoir grandement aidée dans la préparation des échantillons destinés au séquençage d’ARN16S et pour leur soutien technique sans faille. Merci pour ces moments de travail en équipe toujours dans la bonne humeur. Merci à Marie-Luce, Yves et Eric pour leurs dosages d’amidon, d’acides gras volatils et d’ammoniac et pour leur réactivité impressionnante face à nos questions. Finalement seul l’amidon résistant nous aura résisté ! Je remercie également Savannah ainsi que Kévin, qui m’ont épaulée au laboratoire, pour m’avoir ainsi fait confiance dans l’encadrement de leurs stages.

Grâce à l’ensemble des personnes des équipes SYSED et NED, ces trois années sont passées incroyablement vite, avec l’impression de faire partie d’une petite famille sur laquelle j’ai toujours pu compter même lors de chantiers de prélèvements à 8h du matin dans le froid ! Grâce à vous j’ai en quelque sorte découvert la *convivencia* toulousaine, c’est-à-dire le bien vivre ensemble. Merci Laurent et Géraldine pour vos explications toujours claires et vos coups

de pouce pour les analyses de données de séquençage et statistiques. Au sein de mon équipe NED, je remercie également Annabelle, Francis, Asma, Djamila, Olivier et Caroline pour leurs retours enrichissants concernant mon travail. Je remercie mes compagnons thésards pour leur bonne humeur quotidienne et l'entraide précieuse en toutes circonstances : Yayu, Héloïse, Cécile et je l'espère future thésarde Eloïse ! Malo, merci pour ton partage de news rigolotes et les pauses « thés » qui ont égayé nos journées. Merci également à Manon, Christelle, ma voleuse de madeleines préférées, et Marie-Léa, pour avoir ensoleillé nos pauses café et déjeuner ! Mes camarades de chorale, et Florence tout particulièrement, ont également été au rendez-vous de cette bonne humeur : merci pour votre accueil ! Enfin, je remercie tout ceux que j'ai croisés plus rapidement et qui ont contribué à rendre la poursuite de cette thèse si agréable.

Je tiens à remercier mes amis, qui bien qu'éloignés, ont toujours été présents pour moi, et en particulier aux membres de mon « trio » Thomas et Sidonie ainsi que mon ancienne coloc' de choc Justine. Merci à ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans mes projets. Si le mot merci n'est pas assez fort pour exprimer ma pensée, je remercie tout de même ma maman pour m'avoir supportée avec joie depuis bientôt près de 27 ans. Ces trois années ont également été réussies grâce à mon mari Yi. Merci d'avoir accepté de venir vivre en France pour me soutenir comme tu l'as fait.

Je dédie ce travail de thèse à mon papa, de qui je tiens le goût du savoir et l'envie de tout connaître. Je sais que, depuis tout là-haut, tu es fier de savoir que la famille Paës accueillera prochainement un nouveau docteur !

Publications et communications issues de la thèse

PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE DE RANG A

Paës C, Fortun-Lamothe L, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Bannelier C, Debrusse AM, Gidenne T and Combes S 2019. Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. *Animal Feed Science and Technology* 255, 114223. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114223

Paës C, Fortun-Lamothe L, Coureaud G, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Bannelier C, Debrusse A-M, Gidenne T, Combes S 2020. Insights into suckling rabbit feeding behaviour: acceptability of different creep feed presentations and attractiveness for sensory feed additives. *animal*, 14(8), 1629-1637. https://doi.org/10.1017/S1751731120000038

Paës C, Aymard P, Debrusse A-M, Laperruque F, Bannelier C, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Gidenne T, Fortun-Lamothe L, Combes S 2020. Data set on early feed intake and growth performances of rabbits fed during the suckling period with pellets differing in diameter or compression rate using a double-choice testing design. *Data in Brief* 29, 10519. https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105196

Paës C, Gidenne T, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Bouchez O, Barilly C., Aymard P, Combes S 2020. Early introduction of solid foods: ingestion level matters more than prebiotics supplementation for shaping the gut microbiota. *Frontiers in Veterinary Science,* 7:261. 10.3389/fvets.2020.00261

Beaumont M, **Paës C**, Mussard E, Cauquil L, Aymard P, Barilly C, Gabinaud B, Fourre S, Gautier R, Canlet C, Combes S 2020. Gut microbiota derived metabolites contribute to the gut barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. *Gut Microbes*, 11:5, 1268-1286. https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1747335

Savietto D, **Paës C,** Cauquil L, Fortun-Lamothe L, Combes S 2020. Evolution of microbial community along the reproductive life in rabbit females and link to offspring survival. *animal*, 1-9. https://doi.org/10.1017/S1751731120001305

COMMUNICATIONS DANS DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Paës C, Fortun-Lamothe L, Gidenne T, Bebin K, Grand E, Dupperray J, Gohier C, Rebours P, Aymard P and Combes S 2018. Investigation of early feed intake: does suckling rabbit have pellet preferences ? In 69. Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP), Dubrovnik, HRV (2018-08-27 - 2018-08-31), Abstract, Session 27, Theatre 8, p.315. Présentation Orale.

Paës C, Fortun-Lamothe L, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Debrusse A.M, Gidenne T, Combes S 2019. Quantification de l'ingestion d'aliment solide de lapereaux allaités et effets du diamètre et de la dureté des granulés sur leurs préférences alimentaires, in 18. Journées de la Recherche Cunicole, Nantes, France, 27-28 Mai 2019, Cuniculture (142-147). Présentation orale.

Paës C, Gidenne T, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Bouchez O, Aymard P, Combes S.2019 Early introduction of solid foods: ingestion level matters more than prebiotics

supplementation for shaping the gut microbiota. 7th World Congress on Targeting Microbiota - Towards Clinical Revolution, Cracovie, Pologne. Présentation orale.

Paës C, Gidenne T, Barilly C , Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Beaumont M, Combes S. Stimulation of early solid feed ingestion in the nest accelerates the maturation of the rabbits caecal microbiota. World Rabbit Congress 1-3 July Nantes, France. Communication de 4 pages soumise en décembre 2019.

Paës C, Gidenne T, Bannelier C, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Combes S. Suckling rabbit digestibility: effect of the age at introduction of a starter feed World Rabbit Congress 1-3 July Nantes, France. Communication de 4 pages soumise en décembre 2019.

Beaumont M., **Paës C**., Cauquil L., Aymard P., Barilly C., Bouchez O., Canlet C., Combes S. 2019. L'ingestion d'aliments solides au début de la vie induit la co-maturation du microbiote et de la barrière intestinale. Club d'étude des cellules épihtéliales digestives (CECED), 26 – 27 mars 2019, Toulouse, France. Présentation Orale.

Beaumont M., **Paës C.,** Cauquil L., Aymard P., Barilly C., Bouchez O., Canlet C., Combes S. 2019. Early life solid food ingestion remodels the gut microbiota composition and increases the production of protective bacterial metabolites. Digestive Diseases Week (DDW), may 18-21, 2019, San Diego, USA. Poster.

Savietto D, **Paës C ,** Despeyroux M, Barilly C, Cauquil L, Combes S. 2019. Gut microbiota of rabbit females according to the annual reproductive success and age]. 44. Symposium de Cunicultura de ASESCU (2019-06-05-2019-06-06) Aranda del Duero (ESP). (World Rabbit Science, 27), 2019. 108. Présentation orale

Table des matières

Remerciements 1
Publications et communications issues de la thèse 4
Table des matières 6
Liste des tableaux 9
Liste des photos 9
Liste des figures 10
Liste des abréviations 12
Introduction générale 13
Chapitre I - Capacité d'ingestion et de digestion du lapereau allaité 15
I/ Evolution de la capacité d'ingestion **15**
A) Développement sensoriel et moteur 15
B) Accès au lait : efficacité et compétition au sein de la portée 17
C) Accès à un substrat nutritionnel solide avant le sevrage : déroulement chronologique et déterminants 18
II/ Remaniement des capacités digestives du lapereau avant le sevrage **22**
A) Morphologie de l'appareil digestif du lapin et développement de la naissance au sevrage 23
B) Digestion enzymatique 28
C) Digestion microbienne et dégradation des composés fibreux 31
Chapitre II – Le sevrage : une période critique pour la santé du lapin 36
I/ Modalités du sevrage chez le lapin en conditions naturelles et en élevage **36**
II/ Causes de mortalités en élevage cunicole dans la période entourant le sevrage **37**
III/ Facteurs extrinsèques et intrinsèques favorisant l'occurrence des troubles digestifs **38**
A) Un ingéré d'aliment solide inadapté tant en quantité qu'en qualité 39
B) Une réponse immunitaire partielle au moment du sevrage 40
C) Implication du microbiote dans l'émergence de troubles digestifs 43
Chapitre III – L'intestin, un organe clé de la préservation de la santé en association symbiotique avec le microbiote digestif 45
I/ L'intestin, une structure organisée pour contenir la charge microbienne **45**
A) La muqueuse digestive constitue une barrière aux micro-organismes 45
B) Immunité digestive : mécanismes de résistance à la pénétration et à la prolifération microbienne. 47
II/ Rôle du microbiote intestinal dans la préservation de la santé **51**
A) Tolérance des bactéries commensales par le système immunitaire associé à la muqueuse 51
B) Effet barrière 52
C) Stimulation de l'immunité de l'hôte 52

Chapitre IV – Modalités de contrôle du microbiote intestinal pour préserver la santé 55

I/ Pertinence d'apports alimentaires précoces pour moduler le microbiote 55

A) Intérêt d'une manipulation du microbiote au début de la vie 55

B) L'ingestion d'aliment solide orchestre l'installation du microbiote 57

C) Quelles stratégies pour moduler les dynamiques d'implantation du microbiote ? 57

II/ Optimiser l'ingestion d'aliment solide en début de vie 59

A) Stimulation de l'ingestion solide au début de la vie pour façonner le microbiote en développement 60

B) Adapter les apports nutritionnels au lapereau et à son microbiote 65

Problématique et objectif de recherche 69

Stratégies de recherche 70

Chapitre 1 - **Etude du comportement alimentaire du lapereau pour le développement d'un support nutritionnel attractif** 77

Article 1 : Démarrage de l'ingestion solide du lapereau allaité et mise en évidence de préférences alimentaires en termes de caractéristiques physiques des granulés 80

Article 2 : Jeu de données sur l'ingestion précoce d'aliment solide et les performances de croissance de lapins allaités recevant des granulés différant par leur diamètre ou taux de compression dans le cadre d'un test de préférences en double-choix 97

Article 3 : Exploration du comportement alimentaire du lapereau allaité : étude de l'acceptation de différentes présentations de l'aliment démarrage et attractivité d'additifs sensoriels 109

Chapitre 2 - **Définition de la valeur nutritionnelle d'aliments pré-sevrage** 135

Article 4 : Capacités digestives du lapereau allaité : effets de la date d'introduction et de la composition de l'aliment démarrage **..... 139**

Chapitre 3 - **Orientation précoce du microbiote et conséquences sur la santé** 151

Article 5 : La quantité et la qualité d'aliment solide consommé en début de vie orientent la composition et l'activité du microbiote caecal et modulent l'expression de gènes dans le tissu intestinal 155

Article 6 : Introduction précoce d'aliments solides : les niveaux d'ingestion importent plus que la supplémentation en prébiotiques pour moduler le microbiote digestif 195

Discussion générale 249

I/ Intérêts et limites de nos stratégies expérimentales et méthodologiques 250

A) Stratégies expérimentales suivant une démarche analytique et incrémentale 250

B) Evaluation de l'ingestion précoce : dispositif et préférences alimentaires 252

C) Mesures de digestibilité fécale apparente sous la mère (chapitre 2) 256

D) Méthodes d'analyse physiologique 257

II/ Déterminants de l'ingestion précoce 261

A) Caractéristiques de l'aliment susceptibles d'influencer l'ingestion avant sevrage 261

B) Facteurs intrinsèques à l'animal et à la portée pouvant moduler l'ingestion au nid 266

III/ Besoins nutritionnels du lapereau 271

A) Efficience de la digestion d'aliment solide du lapereau allaité 271

B) Stratégies nutritionnelles avant sevrage et conséquences sur les performances zootechniques 273

IV/ Tryptique alimentation solide – hôte – microbiote : effets de stratégies d'alimentation du jeune lapereau sur le microbiote et la santé 275

A) Modulation du microbiote caecal et de son activité fermentaire 275

B) Conséquences physiologiques de la conduite alimentaire du lapin avant le sevrage 282

Conclusion 289

Perspectives 291

Références 295

Annexe 1 : Protocole de fabrication de gels alimentaires à destination de lapereaux allaités 332

Annexe 2 : Composition en ingrédients et valeur nutritionnelle des régimes FF (riche en fibres digestibles), STA (riche en amidon) et CONTROL 333

Annexe 3 : Article 4 du chapitre 2 complété du lot CONTROL 335

Annexe 4 : Article 5 du chapitre 3 complété du lot CONTROL 337

Annexe 5 : Photos de lames histologiques 340

Liste des tableaux

Tableau 1 : Valeurs de digestibilités (en %) obtenues chez le jeune lapereau. 30
Tableau 2 : Recommandation d'apports fibreux dans l'aliment destiné aux lapereaux en période péri-sevrage pour réduire les troubles digestifs. 39
Tableau 3 : Diversité des stratégies possibles pour stimuler la prise alimentaire précoce. 64
Tableau 4 : Récapitulatif des expérimentations réalisées lors de ce travail de thèse. 74
Tableau 5 : Effectifs pour l'étude du microbiote et des paramètres de santé. 75
Tableau 6 : Analyse PERMANOVA sur les distances de Wunifrac calculées à partir des communautés bactériennes caecales des animaux des lots expérimentaux non sevrés. 280
Tableau 7 : Synthèse des effets des stratégies alimentaires testées dans l'essai 6 (article 5) sur les différentes variables mesurées. 287

Liste des photos

Photo 1 : Développement morphologique du lapin allaité. 15
Photo 2 : Logement des animaux. 73
Photo 3 : Grille de collecte des fèces placée sous l'espace des lapereaux afin de mesurer la digestibilité fécale d'une portée. 137
Photo 4 : Image thermique d'un nid vu depuis le dessus. 270

Liste des figures

Figure 1 : Analyse longitudinale des mouvements de mâchoire du jeune lapin au fil du temps (mouvements d'écartement et de déviation maximums). 16
Figure 2 : Courbe d'ingestion de lait observée selon l'état physiologique de femelles multipares allaitantes. 18
Figure 3 : Dynamique d'ingestion du lapereau allaité caractérisée par une part croissante d'aliment solide. 19
Figure 4 : Evolution du comportement alimentaire du lapereau allaité dans des conditions commerciales en lien avec le développement sensoriel et l'évolution physique. 21
Figure 5 : Compositions nutritionnelles moyennes du lait de lapine et d'un aliment destiné aux femelles, représentatif du type d'aliment qui peut être accessible aux lapereaux allaités à partir de 15 jours d'âge. 22
Figure 6 : Ingestion de nutriments par un lapereau (en g/j par animal et en % de l'ingéré sec total) entre le démarrage de l'ingestion solide et le sevrage à 35 jours. 23
Figure 7 : Anatomie du tractus digestif du lapin adulte. 24
Figure 8 : Croissance des segments (tissu + contenu) du tractus digestif de lapereaux autour du sevrage. 28
Figure 9 : Effets de l'âge et de l'arrêt des apports lactés sur l'activité lactase de la muqueuse du jéjunum. 30
Figure 10 : Evolution temporelle de la composition bactérienne taxonomique du microbiote caecal de lapin. 32
Figure 11 : Evolution de l'activité caecale fermentaire avant sevrage. 34
Figure 12 : Evolution des capacités digestives du lapereau allaité en lien avec la transition alimentaire qui survient avant le sevrage. 35
Figure 13 : Nombre d'éleveurs ayant déclaré un pic de mortalité notable en engraissement de 2005 à 2016 et taux de survie annuel en engraissement de 1985 à 2015. 37
Figure 14 : Construction d'un répertoire d'anticorps varié par recombinaison somatique. 41
Figure 15 : Le sevrage du porcelet est caractérisé par des niveaux bas d'immunoglobulines A dans la lumière intestinale. 42
Figure 16 : L'épithélium digestif constitue une barrières physico-chimique maintenant les micro-organismes dans le lumen, hors de la muqueuse. 46
Figure 17 : Organisation du tissu lymphoïde associé aux muqueuses digestives du lapin. 47
Figure 18 : Induction de la réponse inflammatoire au niveau d'un follicule du GALT. 49
Figure 19 : L'immunoglobuline sécrétoire sIgA est composée de deux molécules d'IgA monomériques, associées par liaison covalente via une chaîne J, ainsi que d'une composante sécrétoire. 49
Figure 20 : Avec l'âge, les communautés microbiennes sont plus homogènes. 56
Figure 21 : Stratégies de manipulation précoce du microbiote. 58
Figure 22 : L'ingestion d'aliment solide du lapin est stimulée par l'arrêt des apports lactés. 60
Figure 23 : Exemple de dispositifs facilitant l'ingestion d'aliment par le lapereau. 61
Figure 24 : Exemple de plans d'alimentation couramment employés avant le sevrage en conditions commerciales ou avec des dispositifs expérimentaux proposant deux types d'aliments via deux mangeoires différentes. 65
Figure 25 : Stratégie de recherche du travail de thèse. 70
Figure 26 : Synthèse de la conduite d'élevage avant sevrage et des mesures phénotypiques communes aux essais. 72
Figure 27 : Schéma expérimental de l'essai 5. 137
Figure 28 : Schémas expérimentaux des essais 6 et 7. 153
Figure 29 : Construction successive des protocoles expérimentaux suivant une démarche d'amélioration continue 250

Figure 30 : Représentation des plans d'alimentation utilisés dans les essais des chapitres 2 et 3. 252
Figure 31 : Aménagements du dispositif d'alimentation mère-jeunes séparée de Fortun-Lamothe et al. (2000). 253
Figure 32 : Cinétique d'ingestion précoce d'aliment (granulés ou gels), corrigée pour les éventuelles pertes en eau. 254
Figure 33 : Analyse de la santé par l'étude du dialogue microbiote hôte au niveau du tissu caecal. 260
Figure 34 : Etude de la relation linéaire entre poids vifs après égalisation (J3 ou J4) mesurée à l'échelle des portées et ingestion totale au nid (de J7 à J17) de chaque portée pour une bande donnée. 266
Figure 35 : Corrélation globale entre ingestion précoce d'aliment solide et poids de portée au démarrage des essais 3 à 7. 267
Figure 36 : Déterminants de l'ingestion d'aliment solide chez le lapereau allaité. 271
Figure 37: Lots expérimentaux permettant l'analyse des effets induits par l'apport précoce d'aliment solide. 275
Figure 38 : Synthèse des effets principaux de la stimulation précoce d'aliment solide sur la colonisation bactérienne du caecum et son activité métabolique. 278
Figure 39 : Evolution des teneurs plasmatiques en IgG au cours de la croissance. 284
Figure 40 : Conséquences biologiques d'une modulation du ratio fibres digestibles/amidon de l'aliment distribué avant sevrage (synthèse article 5). 286

Liste des abréviations

ADF : Acid Detergent Fibre
ADL : Acid Detergent Lignin
AGV (VFA) : Acides Gras Volatils (Volatil Fatty Acids)
BAFF : Facteur d'activation des cellules B (B-cell activating factor)
CUD (FDC) : Coefficient d'Utilisation Digestive (Faecal Digestibility Coefficient)
CV : Coefficient de Variation
DF : Digestible Fibres
EEL (ERE) : Entéropathie Epizootique du Lapin (Epizootic Rabbit Enteropathy)
ED (DE) : Energie digestible (Digestible energy)
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
MS (DM) : Matière Sèche (Dry Matter)
GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue
GEC : Groupe d'Expérimentation Cunicole
GMQ (ADG) : Gain Moyen Quotidien (Average Daily Gain)
GOS : Galacto-oligossacharides
Gpx2 : Glutathione Peroxidase 2
Ig : Immunoglobuline
sIgA : Immunoglobulines A sécrétoires
IL : Interleukine
MAT (CP) : Matières Azotées Totales (Crude Protein)
NDF : Neutral Detergent Fibre
NK : Natural Killer
OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle (Operational Taxonomic Unit)
pigR : Polymeric Immunoglobulin Receptor
PRR : Pattern Recognition Receptor
qPCR : PCR quantitative
RMN (NMR) : Résonance Magnétique Nucléaire (Nuclear Magnetic Resonance)
TNF : Facteur de Nécrose Tumorale (Tumor Necrosis Factor)
Tnfsf13b : Tumor Necrosis Factor ligand Superfamily Member 13b

<u>Abréviations des noms de régimes ou additifs utilisés</u>

MOS : Mannan-oligosaccharides
FOS : Fructo-oligosaccharides
STA : Starch (régime enrichi en amidon)
FF : Fermentable Fibres (régime enrichi en fibres digestibles)

Introduction générale

Malgré des progrès conséquents dans la formulation des aliments et des pratiques d'élevage des lapins depuis les années 1980, une forte incidence de troubles digestifs au moment du sevrage est encore observée. Une enquête menée en 2017 en France dans les ateliers cunicoles a ainsi révélé que la mortalité entre la naissance et la vente atteignait 25%, avec 9% des pertes observées peu de temps après le sevrage (Lebas, 2018), majoritairement associées à des troubles d'ordre digestif (Licois et Marlier, 2008). Dans ce contexte, l'utilisation d'intrants médicamenteux reste fréquente en cuniculture et le lapin demeure l'animal d'élevage le plus exposé aux antibiotiques devant le porc et la volaille (les ventes d'antibiotiques à destination de la filière cunicole en 2016 ont permis de traiter 198% du total du poids vif des lapins, Méheust et al., 2017). Le risque de propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques associé aux coûts des antimicrobiens incitent les éleveurs à s'orienter vers des alternatives. L'engagement de l'interprofession cunicole (CLIPP) dans une démarche collective de réduction raisonnée de l'usage des antibiotiques démarrée en 2011 se poursuit avec pour objectif une réduction de 50% d'usage d'antibiotiques d'ici 2022, renforcant la recherche de solutions innovantes pour contrôler la santé du jeune lapin.

Bien que l'étiologie de ces mortalités par troubles digestifs ne soit pas toujours identifiée, le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle essentiel dans le cadre d'une approche préventive. En effet, la perturbation de l'homéostasie du microbiote intestinal semble prédisposer les jeunes mammifères aux infections entériques (Bäuerl et al., 2014 ; Argüello et al., 2018 ; Jin et al., 2018). Au contraire, lorsque l'équilibre entre l'hôte et le microbiote intestinal est établi, le microbiote contribue à la défense de l'hôte sous différents aspects (Sekirov et Finlay, 2009). En particulier, le microbiote intestinal empêche l'établissement de bactéries pathogènes opportunistes par la compétition pour les nutriments (Kamada et al., 2013). Outre cette fonction " barrière ", de nombreuses études ont souligné l'action du microbiote intestinal sur le système immunitaire (Hooper et al., 2012). L'exposition précoce au microbiote intestinal est en particulier déterminante pour l'établissement d'une fonction immunitaire normale à l'âge adulte (Al Nabhani et al., 2019).

De nombreuses études ont démontré que l'ingestion d'aliment solide affecte fortement le microbiote des segments digestifs distaux à savoir le caecum et le côlon puisque les nutriments alimentaires fournissent des substrats pour la croissance microbienne (Padilha et al., 1999 ;

Koenig et al., 2011 ; Bian et al., 2016). Contrairement aux autres espèces nidicoles, les lapins sont capables d'ingérer des substrats solides peu de temps après la naissance en conditions naturelles (Hudson et Distel 1982). En condition d'élevage, il a été démontré que les lapereaux présentent un comportement coprophage à partir de la fin de la première semaine de vie qui peut se poursuivre une semaine plus tard (Kovács et al. 2006 ; Combes et al. 2014). Dès l'âge de 8 jours, les lapereaux peuvent aussi consommer des petites quantités d'aliment solide, s'il est fourni dans le nid (Kacsala et al 2018). La capacité du lapereau allaité à consommer de l'aliment solide à un stade précoce pourrait donc être exploitée en une stratégie biomimétique permettant de favoriser la colonisation du compartiment caeco-colique par des communautés bactériennes qui interagissent positivement avec la santé de l'hôte.

Lors de mon travail de thèse, j'ai posé l'hypothèse que la modulation du microbiote induite par des apports d'aliments solides à un stade précoce favoriserait son dialogue avec l'hôte, garantissant ainsi un développement et un apprentissage optimal du système immunitaire du lapereau. **Notre objectif de recherche était de comprendre les déterminants de l'ingestion précoce du lapereau allaité de manière à la stimuler et à promouvoir l'installation d'un microbiote digestif favorable à la santé de l'hôte**. La finalité de ce travail de thèse est de proposer des nouvelles stratégies d'alimentation en cuniculture favorisant une meilleure maîtrise de la santé digestive du lapin allaité.

Le manuscrit présentera tout d'abord une étude bibliographique, permettant de décrire l'état actuel des connaissances concernant 1/ les capacités d'ingestion et de digestion du lapereau, 2/ les modalités du sevrage et ses conséquences pour la santé du lapin, 3/ le rôle clé de l'intestin et du microbiote hébergé dans la préservation de la santé et 4/ certaines modalités de contrôle du microbiote intestinal. Après avoir explicité la problématique de ce travail et nos stratégies de recherche, les résultats seront présentés sous la forme de 6 articles scientifiques. Enfin, une discussion générale permettra d'examiner de façon critique l'ensemble des résultats au regard de la bibliographie, et je proposerai des perspectives à ce travail de thèse.

Chapitre I - Capacité d'ingestion et de digestion du lapereau allaité

Le péri-sevrage représente une période de bouleversements pour le jeune lapin (*Oryctolagus cuniculus*) avec d'une part une inversion du rapport ingéré de lait sur ingéré d'aliment solide dès la troisième semaine d'âge, et d'autre part un arrêt des apports lactés au moment du sevrage. Cette part croissante de substrat solide dans le régime alimentaire du lapereau allaité, combinée à une réduction de disponibilité en lait, est possible grâce à l'évolution rapide de la capacité motrice du lapereau et de ses capacités masticatrices. Ces évolutions anatomiques ainsi que cette dynamique d'ingestion seront présentées dans une première partie. En parallèle de ces évolutions, les fonctions digestives du lapereau sont modulées autour du sevrage avec une hausse des fermentations microbiennes induite par l'arrivée de substrats solides dans le caecum. La seconde partie de notre exposé présentera ces changements d'ordre digestif au niveau de l'hôte ainsi qu'à l'échelle des communautés bactériennes qu'il héberge.

I/ Evolution de la capacité d'ingestion

A) Développement sensoriel et moteur

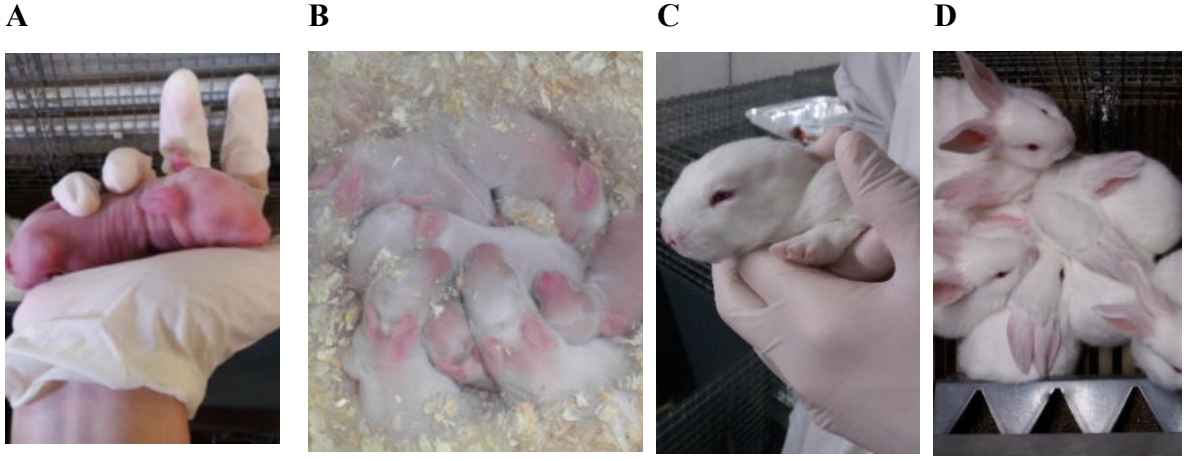


Photo 1 : Développement morphologique du lapin allaité. Lapereau âgé d'un jour, nu et aveugle (A) ; apparition du sous-poil autour de 4 jours d'âge (B) ; ouverture des yeux observée chez un lapereau de 11 jours (C) et démarrage de la consommation de granulés autour de 17 jours d'âge lorsque les lapereaux sont capables de se mouvoir jusqu'aux mangeoires (D). Source : photos personnelles.

Après une courte période de gestation (31 jours en moyenne), les lapereaux naissent en partie immatures en termes de développement physiologique, sensoriel et moteur (Combes et al., 2018). Leurs yeux sont clos à la naissance et ne s'ouvrent qu'à partir de 10 jours d'âge

(Hudson et Distel, 1982 ; Photo 1). De plus, les lapereaux ne répondent aux stimuli auditifs qu'à partir de 7 jours (Gottlieb, 1971). Nus et ectothermiques (ne produisant pas de chaleur interne), les nouveau-nés dépendent exclusivement de l'isolation thermique offerte par le nid et restent enfouis et groupés sous les éléments du nid entre deux tétées (Hull, 1965). Le système chimio sensoriel du lapereau est en revanche complètement développé à la naissance : le lapereau répond fortement aux odeurs maternelles (Coureaud et al., 2001; Schaal et al., 2003) et s'oriente préférentiellement vers des sources de chaleur (Serra et Nowak, 2008). Espèce nidicole, le lapereau demeure essentiellement dans le nid jusqu'à environ 13-15 jours d'âge, date à partir de laquelle il commence à se mouvoir hors du nid (Broekhuizen et al., 1986). De façon concomitante, des mouvements de mastication sont observés à 10-13 jours d'âge et coexistent alors avec des mouvements de succion. Toutefois la mastication ne devient similaire à celle de l'adulte qu'à partir de 23 jours (Langenbach et al., 2001; Figure 1). La dentition du lapin évolue rapidement au cours du premier mois de vie : uniquement pourvu à la naissance des grandes incisives supérieures et inférieures, toutes les dents de lait sont mises en place au neuvième jour et l'installation de toutes les dents définitives est constatée à 27 jours (Yardin, 2009). De la naissance à 35 jours d'âge, le poids du lapereau est multiplié par 14 (portées de 8 lapereaux, Meo et al., 2004), ce qui témoigne de la croissance rapide de cette espèce avant le sevrage en lien avec le développement des capacités sensorielles.

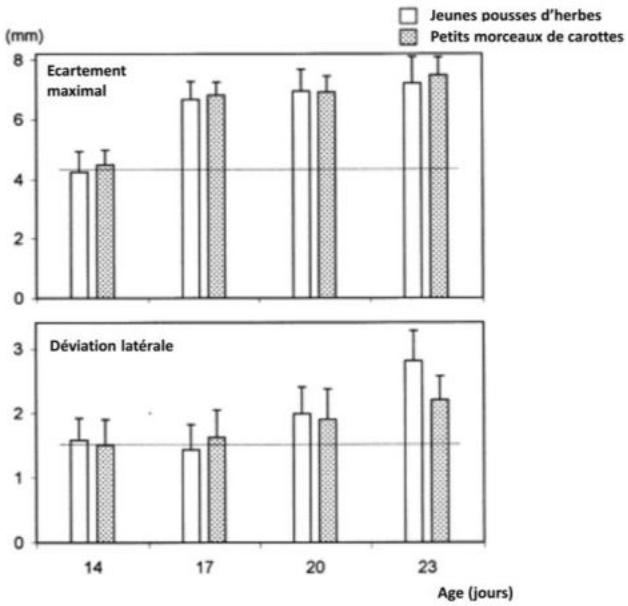


Figure 1 : Analyse longitudinale des mouvements de mâchoire du jeune lapin au fil du temps (mouvements d'écartement et de déviation maximums). D'après Langenbach et al. (2001).

B) Accès au lait : efficacité et compétition au sein de la portée

L'allaitement suit un rythme circadien et se caractérise par une anticipation des lapereaux (selon une horloge interne) qui sortent de leur torpeur et s'agitent peu de temps avant que la femelle n'entre dans le nid. Au moment de l'allaitement, les petits se dressent spontanément vers la femelle et déplacent rapidement leur tête dans un mouvement de va-et-vient pour changer fréquemment de mamelles au cours de la tétée. Au bout de quelques minutes, l'allaitement prend fin avec le départ de la femelle qui bondit brusquement hors du nid (Hudson et Distel, 1982). Le comportement d'allaitement de la lapine domestiquée est similaire à celui de la femelle à l'état sauvage avec un allaitement bref (moins de 5 minutes). Cet allaitement n'a lieu qu'une fois par jour dans la majorité des cas (Davies et al., 1964; Hudson et Distel, 1982) et il est suivi de la fermeture du terrier ce qui correspond sans doute à une stratégie adaptive pour éviter la prédation des petits (Zarrow et al., 1965).

L'ingestion de lait par les lapereaux est donc particulièrement efficiente, et elle peut atteindre en début de vie 25% du poids des lapereaux en une seule tétée (Coureaud et al., 2008a). L'orientation efficace du lapereau vers les mamelles est facilitée par la perception des odeurs qu'elle émane, possiblement apprises dans l'environnement pré-natal (Coureaud et al., 2002; Schaal, 2005). Le lait contient également des molécules attractives dont au moins une phéromone identifiée parmi les 150 composés volatils qu'il comprend, le 2-methylbut-2-énal, capable d'induire le comportement orocéphalique typique de recherche des mamelles (Schaal et al., 2003). La prise de lait fait l'objet d'une compétition au sein de la portée avec des quantités ingérées fortement hétérogènes, corrélées avec le poids des lapereaux (Coureaud et al., 2000; Drummond et al., 2000). En moyenne, les portées de lapines commerciales sont composées de 10 à 12 lapereaux qui sont ainsi en concurrence pour l'accès aux tétines (de 8 à 11 tétines par femelle ; Lebas, 2003). De plus, il a été estimé que 14% des lapereaux n'accédaient pas à la première tétée et que près de la moitié des lapereaux manquaient une tétée au moins une fois lors des 14 premiers jours de vie (Coureaud et al., 2000; Drummond et al., 2000).

Outre la réactivité du lapereau au sein de la portée, les quantités de lait disponibles dépendent de nombreux facteurs intrinsèques à la femelle tels que le statut physiologique, la parité, le nombre de mamelles, le génotype ou la taille de portées (Maertens et al., 2006). La quantité de lait disponible évolue également dans le temps. De manière générale, on estime que l'ingéré individuel de lait est en moyenne de 5 à 10 g/jour après la mise-bas puis atteint un maximum de 30 g/jour au pic de lactation autour de 20-25 jours d'âge (Orengo et Gidenne,

2007; Coureaud et al., 2008a). Cette consommation de lait diminue par la suite avec une cinétique de décroissance qui dépend du statut physiologique des femelles allaitantes (gestantes ou non ; Figure 2). Au moment du sevrage (35 jours d'âge), l'ingestion de lait ne représente plus qu'en moyenne 7 grammes par lapereau (Orengo et Gidenne, 2007).

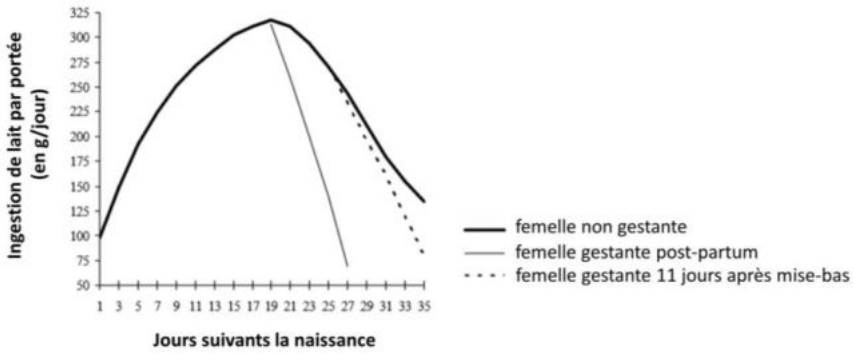


Figure 2 : Courbe d'ingestion de lait observée selon l'état physiologique de femelles multipares allaitantes. Données théoriques issues de la synthèse de Maertens et al. (2006).

C) Accès à un substrat nutritionnel solide avant le sevrage : déroulement chronologique et déterminants

Chez les lapereaux sauvages, le grignotage des éléments fibreux du nid (composé d'herbes sèches, mousse, feuilles…) est observé dès 8 jours d'âge avec une forte progression de cette ingestion vers 11-12 jours caractérisée par un amenuisement des éléments du nid (Hudson et Distel, 1982). En plus des éléments constituant le nid, Kovács et collaborateurs (2006) ont observé des fèces de lapines, déposées au moment de l'allaitement, dans la majorité des nids de lapereaux de 3 jours d'âge. Ces fèces sont consommées par les jeunes lapereaux (comportement de coprophagie) dès leur première semaine d'âge (Hudson et Distel, 1982), avec une forte variabilité de la disponibilité et de l'ingestion de pelotes fécales maternelles entre portées (Combes et al., 2014). En élevage, les copeaux de bois constitutifs du nid représentent un substrat nutritionnel pauvre et l'ingestion précoce de fèces maternelles demeure faible comparativement à la consommation de lait (un total de 10 pelotes fécales ingérées par portée, Combes et al., 2014). Lorsque des granulés expérimentaux (à base de pousses de soja ou d'aliment porc) sont apportés aux lapereaux entre 3 et 15 jours, leur consommation est observée, mais la quantité ingérée n'a pas été mesurée (Kacsala et al., 2018).

Ainsi la part d'aliment solide dans le régime alimentaire du lapin n'est considérée comme significative qu'à partir de 18-21 jours, période qui correspond à la capacité du lapereau à quitter le nid pour consommer les granulés dans la mangeoire de sa mère et à s'abreuver. Dès lors, l'ingestion de granulés augmente rapidement : inférieure à 2 grammes par lapereau à 20

jours d'âge, elle est multipliée par 5 à 25 jours, et atteint plus de 40 grammes à 32 jours (Scapinello et al., 1999) ou encore près de 60 grammes pour un sevrage à 35 jours (Gallois et al., 2005b) (Figure 3). D'importants écarts d'ingestion sont observés entre portées au démarrage de la consommation d'aliment granulé avec un coefficient de variation (CV) atteignant 51% à 22 jours (Orengo et Gidenne, 2007), variabilité possiblement en lien avec des disponibilités en lait hétérogènes (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2000). La croissance quasi-exponentielle de l'ingéré solide concordant avec une décroissance plus lente de la production laitière, on arrive à des niveaux équivalents d'ingérés frais de lait et de granulés vers 27 jours d'âge (Scapinello et al., 1999 ; Orengo et Gidenne, 2007 ; Gidenne et al., 2010). Toutefois, en considérant les ingérés en matière sèche, les consommations de lait et de granulés deviennent équivalentes dès 22 jours (Orengo et Gidenne, 2007). L'introduction d'aliment solide dans le régime du lapin s'accompagne d'un changement de comportement alimentaire : d'une prise de lait importante sur un court laps de temps, le lapereau passe à plusieurs repas de granulés répartis irrégulièrement dans la journée (Laplace, 1978). Il a été montré qu'à partir de 22 jours d'âge, l'ingestion de granulés était plus élevée pendant les heures précédant l'allaitement avec une majorité d'aliment consommée la nuit (73-76% de l'ingéré solide ; Orengo et Gidenne, 2007), comportement d'ingestion et d'abreuvement nocturne classiquement observé chez des animaux plus âgés (Laplace, 1978).

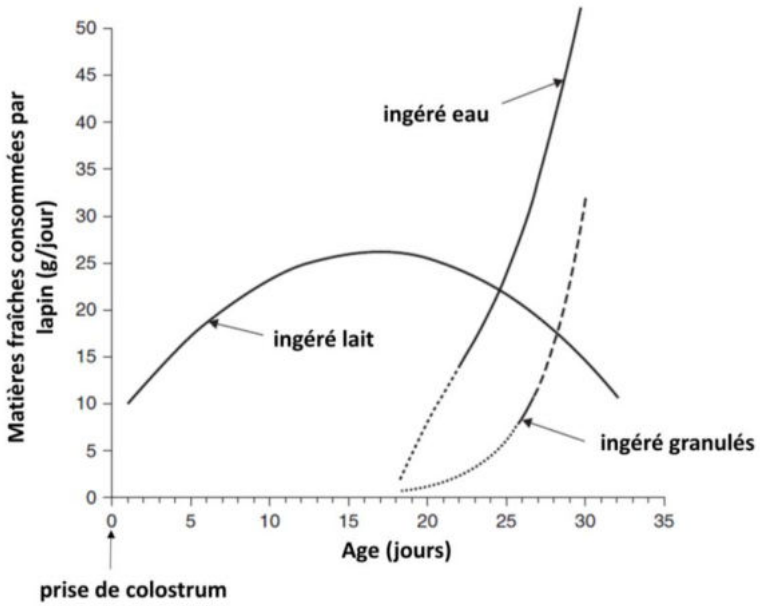


Figure 3 : Dynamique d'ingestion du lapereau allaité caractérisée par une part croissante d'aliment solide. D'après la synthèse de Gidenne et al. (2010) réalisée à partir de données disponibles sur des portées composées de 7 à 9 lapereaux allaités par des femelles inséminées 11 jours post-partum puis sevrés à 30 jours.

Le lapin produit deux types d'excréments : d'une part les crottes dures, éliminées dans

l'environnement, et d'autre part les crottes molles ou cæcotrophes consommées en totalité par le lapin avec un prélèvement directement à l'anus (Hörnicke et Batsch, 1977). La consommation des cæcotrophes est observable avant sevrage et permet l'ingestion des produits finaux de la digestion en complément des aliments exogènes. A la différence des crottes dures, les cæcotrophes se présentent en grappes de petits agrégats, bruns foncés, mous et enveloppés de mucus. L'ingestion de fèces molles a été quantifiée dès 28 jours d'âge et représenterait de 15 à 35% de l'ingéré total sec (Gidenne et al., 2015). De plus, l'observation visuelle d'estomacs de lapins âgés de 2 et 3 semaines a confirmé que le comportement de cæcotrophie ne débute pas avant 4 semaines (Orengo et Gidenne, 2007). Les quantités de cæcotrophes ingérées augmentent ensuite avec l'âge jusqu'à 9 semaines, en lien avec la croissance des lapins (Gidenne et Lebas, 1987). Les valeurs d'ingestion de cæcotrophes doivent toutefois être considérées avec précaution puisque la cæcotrophie est complexe à mesurer. Les techniques utilisées induisent en effet un stress chez les animaux et les résultats varient en fonction de la méthode (Carabaño et al., 2000).

En plus de l'exploration de l'environnement par le lapereau de 2 ou 3 semaines et du développement de sa mastication, l'apprentissage social pourrait favoriser le démarrage de l'ingestion d'aliment solide. En effet, il a été montré que les lapereaux mangeaient préférentiellement dans la mangeoire destinée à la lapine (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2003) et consommaient plus de granulés quand ils étaient identique à ceux des femelles (Read et al., 2019). Ceci suggère que les lapereaux reproduisent le comportement de leur mère. En outre l'exposition *in utero* des portées aux aliments maternels favorise leur attractivité (Coureaud et al., 2002). L'orientation du lapereau vers un substrat solide pourrait également s'expliquer par un changement de réactivité face à la phéromone mammaire. Alors que les nouveau-nés réagissent de façon automatique à la phéromone, les lapereaux de 5 et 10 jours d'âge présentent une réactivité moindre sous l'influence d'autres facteurs physiologiques associés à la satiété (Montigny et al., 2006). Des mécanismes spécifiques agissant sur le système nerveux central pourraient également être à l'origine de cette transition naturelle d'un aliment lacté vers un aliment solide chez le lapereau. Ainsi, des antagonistes à la sérotonine sont capables de réenclencher la prise lactée chez le rat tandis que des modifications de métabolisme de la dopamine ont été observées au cours du sevrage chez le porc (German et al., 2006).

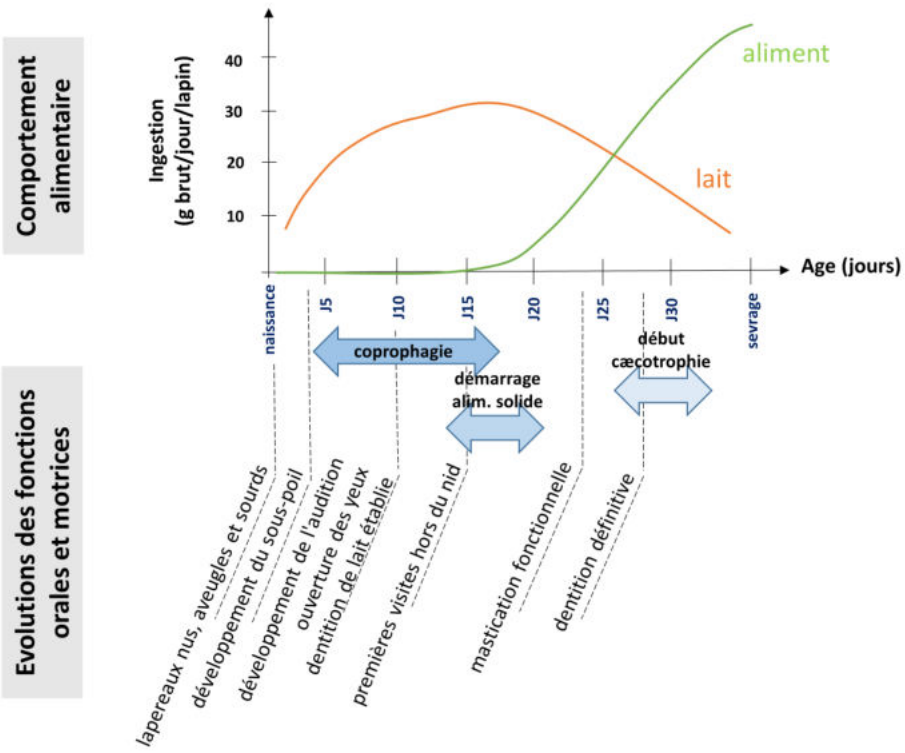


Figure 4 : Evolution du comportement alimentaire du lapereau allaité dans des conditions commerciales en lien avec le développement sensoriel et l'évolution physique.

La capacité de l'animal à s'orienter vers l'aliment, qu'il soit solide ou liquide, conditionne son ingestion. De par le développement de ses capacités orales (mastication, dentition) et d'exploration (ouverture des yeux, sortie du nid), une alimentation mixte lait/aliment est possible chez le lapereau dès la fin de la première semaine de vie (Figure 4). Toutefois avant l'âge de 15 jours cette ingestion d'aliment solide n'a jamais été quantifiée, ni sa cinétique décrite. Bien qu'observée dans des conditions naturelles et expérimentales, cette alimentation mixte n'est pas accessible en période post-partum chez des lapereaux en conditions d'élevage. Au début de la vie, l'ingestion solide se limite donc à celle de fèces maternelles.

II/ Remaniement des capacités digestives du lapereau avant le sevrage

Avant le sevrage, d'importantes modifications du régime alimentaire ont lieu : le lapereau passe d'un régime exclusivement lacté à un régime mixte et ceci en une dizaine de jours seulement. En termes de nutriments, cela se traduit par une part grandissante de glucides et de fibres dans le régime avec à l'opposé une réduction de la part des lipides et protéines (Figures 5 et 6). La réduction puis l'arrêt de l'alimentation lactée marque également la fin des apports en oligosaccharides et autres composés immodulateurs que le lait maternel contient (détails dans le chapitre II). Le changement rapide de sources alimentaires est associé à des modifications profondes des fonctions digestives. D'une digestion qui repose majoritairement sur l'action hydrolytique d'enzymes endogènes, on observe un passage à une digestion plus marquée par les fermentations bactériennes de polysaccharides végétaux quelques jours avant le sevrage.

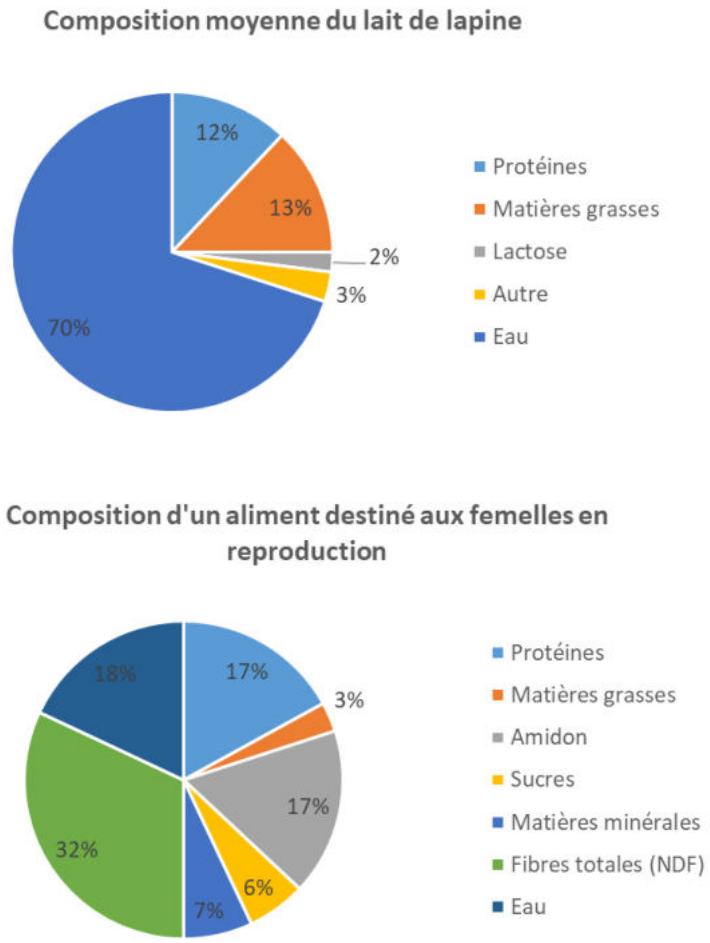


Figure 5 : Compositions nutritionnelles moyennes du lait de lapine (d'après les données de Maertens et al., 2006) et d'un aliment destiné aux femelles, représentatif du type d'aliment qui peut être accessible aux lapereaux allaités à partir de 15 jours d'âge (Read et al., 2019).

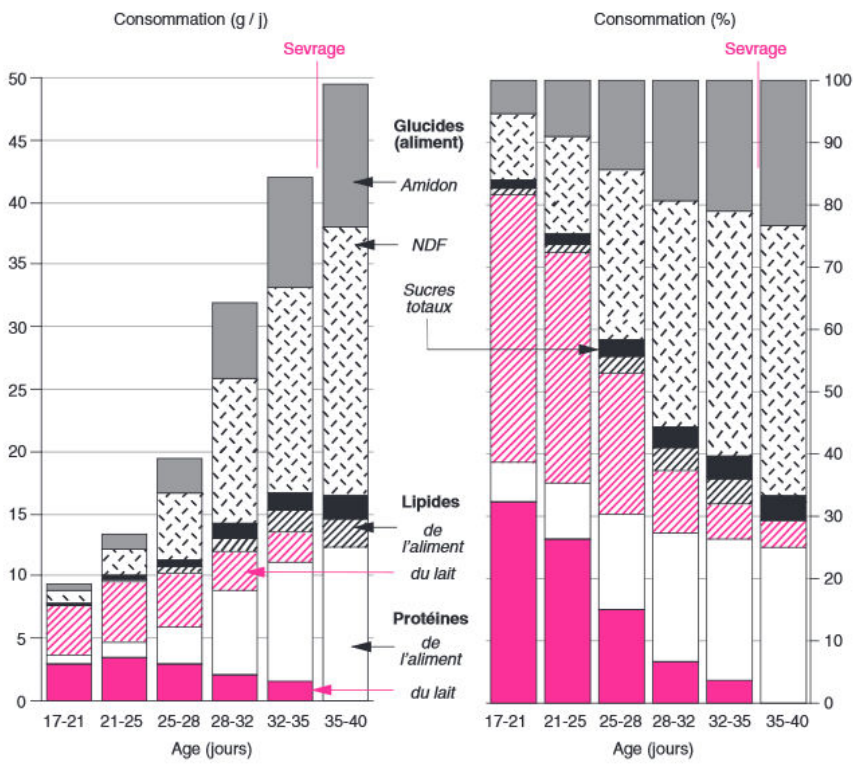


Figure 6 : Ingestion de nutriments par un lapereau (en g/j par animal et en % de l'ingéré sec total) entre le démarrage de l'ingestion solide et le sevrage à 35 jours d'après Fortun-Lamothe et Gidenne, 2003.

A) Morphologie de l'appareil digestif du lapin et développement de la naissance au sevrage

Le tractus digestif du lapin est composé d'une succession de compartiments dans lesquels transite le bol alimentaire, à savoir la cavité buccale, l'œsophage, l'intestin grêle composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, le caecum, le côlon (proximal, *fusus coli* et distal) puis le rectum (Figure 7).

1) Cavité buccale

La dentition du lapin est caractéristique de l'ordre des Lagomorphes auquel il appartient avec deux paires d'incisives au niveau de la mâchoire supérieure, positionnées l'une derrière l'autre, et une paire d'incisives au niveau de la mâchoire inférieure. Les dents du lapin sont dites hypsodontes c'est-à-dire à croissance continue. Les incisives permettent de couper les aliments ingérés tandis que les prémolaires (5 paires) et les molaires (6 paires) servent à les broyer. La salive du lapin contient également de l'amylase produite au niveau de la glande parotide (Gjörstrup, 1980). Suite à ce premier traitement mécanique et chimique, le bol alimentaire mélangé à la salive est avalé et transite vers l'estomac, sans reflux possible.

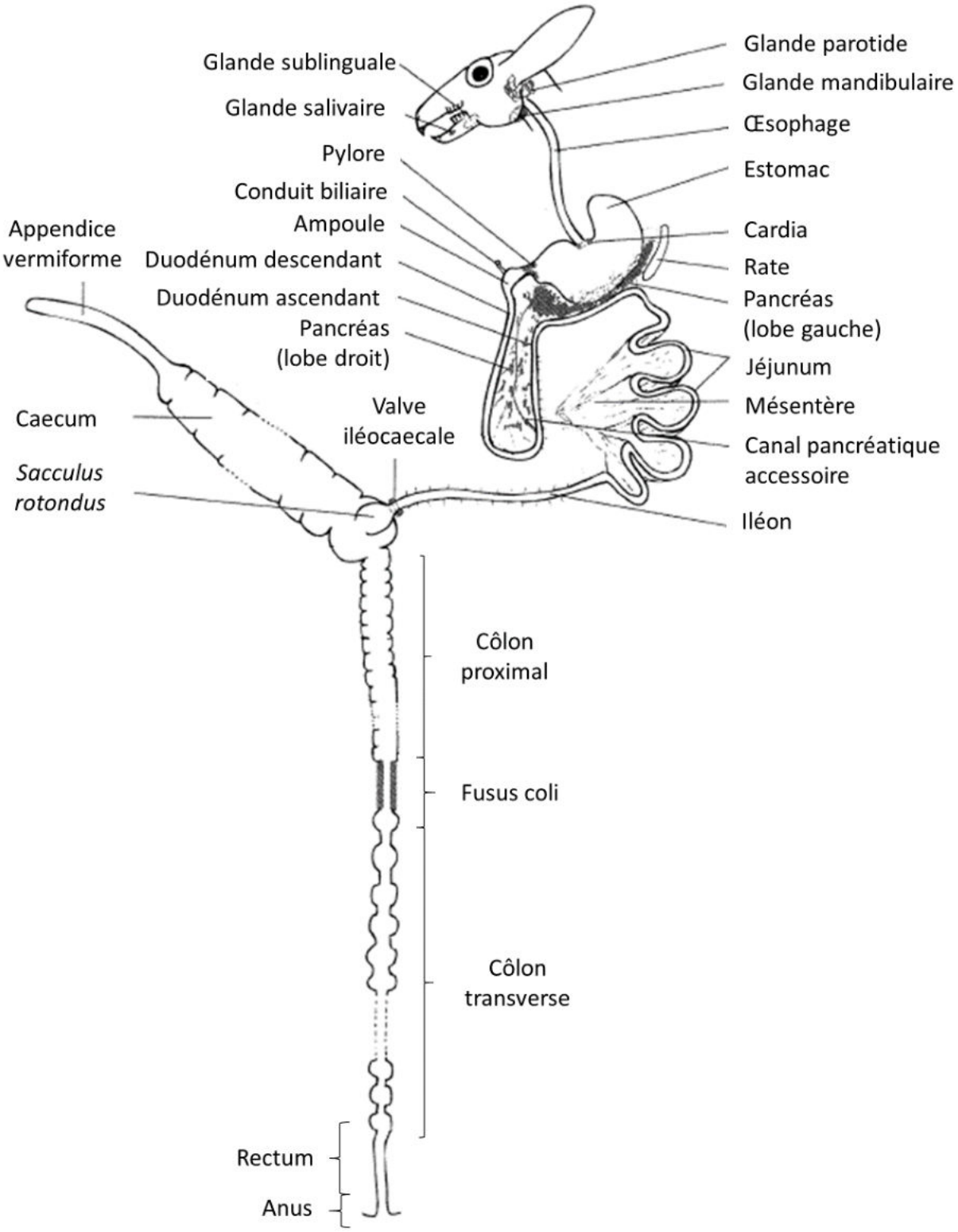


Figure 7 : Anatomie du tractus digestif du lapin adulte. D'après Harcourt-Brown, 2008.

2) Estomac

L'estomac du lapin se divise en deux parties : l'antrum et le fundus où peuvent être stockées les cæcotrophes. La muqueuse stomacale est tapisée de glandes gastriques responsables de la production de sucs qui vont soumettrent le bol alimentaire à un milieu particulièrement acide (pH de 1 à 5 selon les prélèvements ; Carabaño et al., 2010). Ce suc contient de l'acide chlorhydrique, de la pepsine, lipase et rénine. L'estomac du jeune lapin est animé de mouvements de vidange lents mais réguliers, permettant l'apport continu de nutriments au duodénum entre deux tétées (Escobar et al., 2000). Il a été montré que les glandes de la muqueuse stomacale sécrètent du suc gastrique en continu (Carabaño et al., 2010). En sortie d'estomac, à proximité du pylore, le canal cholédoque permet l'introduction des sels biliaires secrétés par le foie.

Le poids frais de l'estomac du jeune lapereau de 3 semaines représente 1/5ème du poids du tractus digestif total, en lien avec la forte prise de lait à cet âge (Lebas et Laplace, 1972). Bien que le poids du tissu stomacal soit multiplié par trois entre la deuxième et la cinquième semaine d'âge, cet organe digestif connaît la plus lente croissance avant sevrage avec une importance pondérale en diminution dès 22 jours d'âge (Lebas et Laplace, 1972; Orengo et Gidenne, 2007).

3) Pancréas

Le pancréas du lapin se caractérise par une structure diffuse maintenue par un tissu mésenchymateux. Il est divisé en deux parties avec une fonction endocrine assurée par les îlots de Langherans et une fonction exocrine qui se déroule dans la partie glandulaire acineuse (Lebas et al., 1971). Le contenu enzymatique des vésicules de sécrétion est constitué de précurseurs enzymatiques favorisant la dégradation des protéines (trypsinogène et chymotrypsinogène notamment), d'amylase et de lipase (avec son cofacteur) pour la digestion des carbohydrates et des lipides respectivement.

De la naissance à 21 jours d'âge, le développement pondéral du pancréas est limité puis connaît une phase de croissance plus importante entre les 3ème et 4ème semaines, de façon concomitante à l'augmentation d'ingéré solide (Lebas et al., 1971).

4) Intestin grêle

La paroi de l'intestin grêle est constituée de quatre couches :

1. La muqueuse en contact direct avec le bol alimentaire ou chyme, elle-même constituée de l'épithélium, un ensemble de cellules jointives organisées en structure de type cryptes/villosités, d'une couche de tissu conjonctif (*lamina propria*) et d'une couche musculaire

(musculaire muqueuse). Les cellules éptihéliales sont issues des cellules souches intestinales localisées à la base des cryptes. L'épithélium est constitué de types cellulaires variés : les cellules absorbantes (entérocytes), les cellules sécrétrices (cellules caliciformes ou en gobelet sécrétrices de mucus, cellules entéroendocrines, cellules de Paneth) ainsi que les cellules immunologiques « M » présentes uniquement au niveau de follicules et qui assurent la détection d'antigènes.

2. La sous-muqueuse qui entoure la muqueuse dans un tissu conjonctif
3. La musculeuse, constituée de muscles lisses assurant les mouvements péristaltiques
4. La séreuse qui constitue la couche externe de l'intestin

La digestion des aliments au niveau de l'intestin grêle est principalement réalisée par l'action des enzymes pancréatiques déversées au niveau du duodénum. Les protéases produites par les acini pancréatiques sont activées par clivage protéolytique dans l'intestin grêle. Ces endopeptidases et exopeptidases réalisent une hydrolyse des protéines alimentaires dans l'espace intra-luminal libérant ainsi des peptides et acides aminés. L'amylase permet de libérer au niveau du lumen des sucres simples. Enfin la lipase pancréatique permet d'hydrolyser une majorité des lipides circulant dans la lumière de l'intestin-grêle. Une dernière digestion peut encore se dérouler au niveau du pôle apical des entérocytes grâces aux enzymes des bordures en brosses (microvillosités) telles que les enzymes peptidase, maltase, sucrase et lactase (Debray et al., 2003). Les nutriments libérés sont ensuite absorbés par les entérocytes par diffusion passive ou transport actif. Cette absorption de nutriments est facilitée par l'importante surface d'échange de la muqueuse intestinale crée par la présence de villosités.

L'intestin grêle croît avant sevrage avec une augmentation de longueur (de 145 cm à 3 semaines à 209 cm à 5 semaines) et de poids (poids de tissu frais multiplié par trois entre 3 et 5 semaines ; Lebas et Laplace, 1972). Une ébauche de muqueuse intestinale se dessine à partir d'une semaine d'âge avec l'apparition de ses premiers constituants (glandes de Brunner notamment). A partir de 20 jours la muqueuse est structurellement proche de celle du lapin adulte (Carabaño et al., 2000). Toutefois, il a été montré que l'arrivée de substrats solides en quantité importante au moment du sevrage modulait la morphologie de la muqueuse. Les villosités ont une apparence fine à deux semaines d'âge puis s'allongent et s'aplatissent en fin de lactation (Yu et Chiou, 1996). Une réduction des tailles de villosités au moment du sevrage a été observée dans certains cas, en lien direct avec l'arrêt de l'alimentation lactée et une hausse de l'alimentation solide (Gutiérrez et al., 2002). Toutefois cette abrasion des villosités en lien avec l'ingestion solide n'est pas toujours observée (Gallois et al., 2005b) .

5) Caecum

La majorité des digestas circulent de l'iléon vers la base du caecum en passant par le *sacculus rotondus* tandis qu'une minorité (10%) se dirige directement vers l'*ampulla coli* du côlon proximal. Le caecum, siège du développement bactérien et des fermentations, est constitué de nombreuses spires (entre 22 et 25) et s'achève dans l'appendice vermiforme, un organe lymphoïde lisse de diamètre plus faible (1 cm contre 4-5 cm pour le caecum). A la différence de l'intestin grêle, la muqueuse caecale ne présente pas de villosités mais contient en revanche des cryptes (Snipes, 1978). Le rôle nutritionnel du caecum (absorption des acides gras volatils, production de vitamines via le microbiote) sera détaillé plus loin lors de la présentation de la digestion microbienne qui s'y déroule.

Le développement du caecum est limité jusqu'à 21 jours d'âge avant d'observer une cinétique de croissance beaucoup plus rapide, quand l'ingestion d'aliment solide devient significative (Padilha et al., 1996; Combes et al., 2011). Le poids de l'ensemble caecum et appendice augmente de 3,3 à 15,2 g de tissu entre la 3ème et 5ème semaines (Lebas et Laplace, 1972), et de 0,5% de poids vif à 2 semaines à environ 6% du poids vif à 6 semaines (Gidenne, 2015a). Cette croissance aboutira après sevrage à un déplacement de l'importance relative de l'intestin grêle et du gros intestin (défini comme l'ensemble caecum + côlon) en faveur de ce dernier, témoignant de son importance croissante dans les processus digestifs (Figure 8).

6) Côlon

Le côlon est connecté au caecum en une zone élargie rattachée à la valvule iléo-caecale appelée l'*ampulla coli*. Le côlon présente un fonctionnement différencié selon un rythme circadien (Bezille et al., 1973). Lors de la production des cæcotrophes en matinée, le contenu caecal se déverse dans le côlon proximal qui "pousse" son contenu vers le côlon distal par des mouvements péristaltiques. Les cæcotrophes ont ainsi une composition proche du digesta caecal, et comparées aux crottes dures, sont riches en protéines (+15-17%), minéraux (+1-3%), vitamines B et K et sont pauvres en cellulose (-12%) (Michelland et al. 2012). En revanche, lors de la production de fèces dures, le côlon proximal présente un double motricité, alternative, avec d'une part des contractions anti-péristaltiques et de pression, permettant de sélectionner et de refouler vers le caecum les particules fines et solubles; et d'autre part des contractions péristaltiques pour "pousser" vers le côlon distal les particules grossières (>300 µm) qui constitueront les fèces dures (Laplace, 1978). De plus, le côlon distal a une activité circadienne avec des sécrétions de lysozymes associées à la production de cæcotrophes. Ces lyzozymes

ensuite réassimilées par le lapin pourraient alors faciliter la lyse des bactéries ingérées via les cæcotrophes (Camara et Prieur, 1984). Tout comme le caecum, le côlon connaît une croissance linéaire entre 3 et 5 semaines d'âge (Lebas et Laplace, 1972).

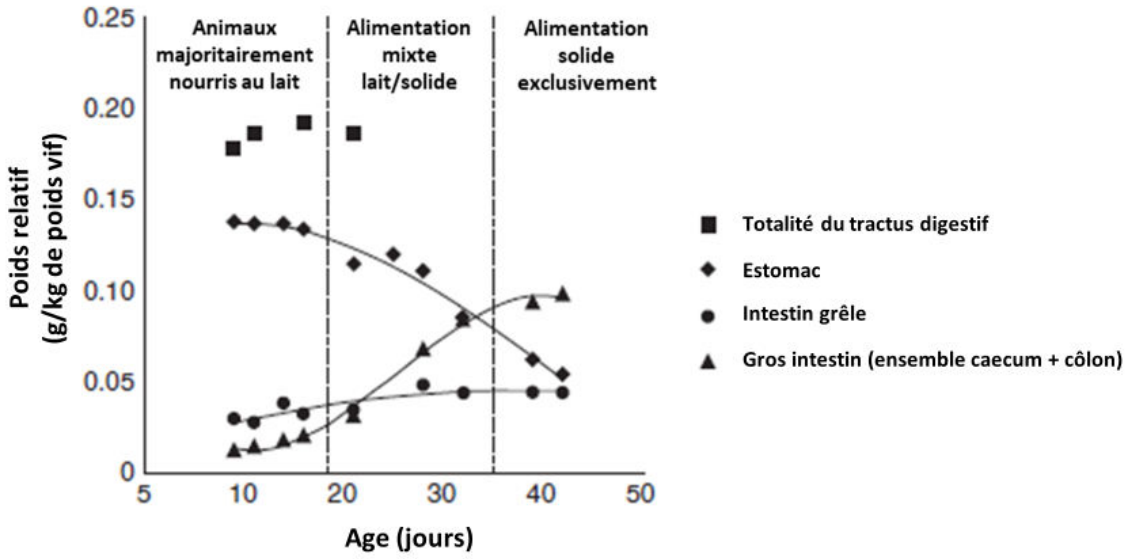


Figure 8 : Croissance des segments (tissu + contenu) du tractus digestif de lapereaux autour du sevrage. Les poids sont rapportés en kg de poids vif. D'après Carabaño et al., 2000.

B) Digestion enzymatique

La digestion enzymatique du bol alimentaire se déroule dans la partie antérieure du tube digestif. Elle débute dans la cavité buccale sous l'action d'enzymes salivaires, se poursuit dans l'estomac et se termine dans l'intestin grêle. Cette activité se met en place progressivement, principalement sous la dépendance de facteurs ontogéniques.

1) Evolution des capacités digestives enzymatiques avant le sevrage

L'activité lipase du suc gastrique a été identifiée dès 6 jours d'âge et augmente par la suite jusqu'à 30 jours avant de décroître et de disparaître chez les lapins adultes (Carabaño et al., 2000). Les lipases gastriques permettent de digérer les matières grasses du lait et sont produites par les glandes cardiales (partie terminale de l'œsophage) à différents emplacements selon l'âge des lapereaux (Bernadac et al., 1991). La pepsine représente l'activité protéolytique principale de l'estomac. Elle est localisée dans les deux tiers du fundus mais son activité ne devient importante qu'à partir de deux semaines d'âge (Moreau et al., 1990). La protéase rénine, responsable de la coagulation du lait dans l'estomac, est toutefois présente dès la naissance et permet la digestion des caséines du lait sur les deux premières semaines de vie avant que l'activité pepsine ne devienne majoritaire (Henschel, 1973).

L'activité enzymatique du pancréas est décelable dès le stade embryonnaire (Courtot et al., 1970) mais les activités de la trypsine, chymotrypsine, lipase et amylase restent limitées pendant les trois premières semaines de vie (Lebas et al., 1971). Parallèlement au développement pondéral de la glande pancréatique, les activités enzymatiques de la lipase, l'amylase et la chymotrypsine du pancréas augmentent fortement à partir de 20-25 jours d'âge (Lebas et al., 1971; Debray et al., 2003). Seule l'activité trypsique chute avant sevrage, entre 21 et 28 jours d'âge (Gallois et al., 2008b). Toutefois, il convient de noter que les activités amylase et disaccharidases demeurent à des niveaux faibles avant sevrage (Gutiérrez et al., 2002) même lorsque les activités enzymatiques sont rapportées au poids vif (Debray et al., 2003). L'activité des dissacharidases de la bordure en brosse augmente également au cours du temps pendant la lactation. A 28 jours les activités des sucrases et maltases des duodénum et jéjunum deviennent similaires à ceux de lapins de 35 et 42 jours (Gallois et al., 2008b). L'activité lactase chute quant à elle de 25 à 35 jours en lien avec la disparition progressive de son substrat (Gutiérrez et al., 2002; Figure 9). Les activités lipases et protéases dans la lumière intestinale demeurent constantes à partir de 28 jours (Marounek et al., 1995).

Afin de déterminer si ces modulations d'activités sont induites par l'ingéré solide ou sont de nature ontogéniques, Corring et al. (1972) et (Gallois et al., 2008b) ont suivi l'évolution de l'équipement enzymatique de lapins sevrés précocement à 21 jours. Ces auteurs ont montré que l'âge des lapereaux était un plus fort déterminant de l'activité enzymatique du pancréas que l'alimentation, malgré une légère adaptation du pancréas à l'ingéré solide. En revanche, l'étude de Gutiérrez et al., (2002) a mis en évidence une activité alpha-amylase dans la muqueuse jéjunale plus élevée à 35 jours chez des lapins sevrés dès 25 jours d'âge.

2) *Efficacité de la digestion du lait*

Après la phase colostrale, le lapereau ingère un lait particulièrement riche en protéines (12% en moyenne) et matières grasses (13%) mais pauvre en lactose (< 2 %), avec des légères fluctuations selon le stade de lactation (Lebas et al., 1971; Maertens et al., 2006). Dans les premières phases de la lactation, la lipolyse des matières grasses du lait est principalement assurée par les lipases gastriques puis est poursuivie par les enzymes pancréatiques devenues pleinement fonctionnelles. Suivant le même schéma, la rénine assure la dégradation des protéines du lait chez les nouveau-nés avant que la pepsine gastrique et les protéases du pancréas n'agissent en fin de lactation. Ces différents étapes d'hydrolyse rendent ainsi le lait très digeste pour le lapereau avec une digestibilité totale de la matière sèche de 94% (dont 94

et 97% de digestibilité pour l'azote et l'énergie respectivement) récemment estimée par Gidenne et al. (2018) entre 21 et 25 jours d'âge.

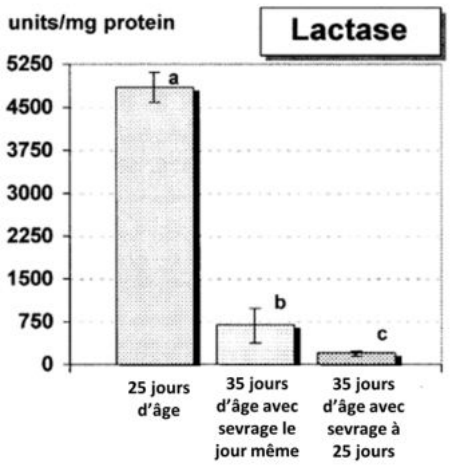


Figure 9 : Effets de l'âge et de l'arrêt des apports lactés sur l'activité lactase de la muqueuse du jéjunum. D'après Gutiérrez et al., 2002.

3) Méconnaissance de la digestibilité de l'aliment pré-sevrage

Tableau 1 : Valeurs de digestibilité (en %) obtenues chez le jeune lapereau.

	Digestibilité iléale de lapereaux allaités à 28J (1)	Digestibilité fécale de lapereaux allaités de 24 à 28J (1)	Digestibilité fécale de lapereaux allaités de 25 à 27J (2)	Digestibilité fécale de lapereaux allaités de 28 à 31J (2)
Matières sèches			nr	nr
Matières organiques	62	68	88	73
Amidon	95	98	nr	nr
Protéines totales	73	79	86	83
Matières grasses		85	87	87
Fibres totales		35	54	43

nr : non renseigné

(1) D'après (Gallois et al., 2008a), par dosage de l'ytterbium
(2) D'après Debray et al., 2003

Peu de mesures de digestibilité iléale ou totale ont été réalisées chez des lapereaux allaités (Tableau 1). Afin de proposer des valeurs de digestibilité reproductibles, la méthode de référence pour lapin sevré (Perez et al., 1995) impose une adaptation préalable des animaux à l'aliment ainsi qu'un logement en cage individuelle à métabolisme, impossible à installer avant sevrage. Les faibles niveaux d'ingestion des lapereaux demandent également des mesures précises prenant en compte le gaspillage (Read, 2016). Enfin l'interaction lait/aliment solide complexifie l'interprétation des données. Ainsi par exemple chez la souris allaitée, en dépit de

l'absence d'enzymes amylolytiques dans la salive et le tractus digestif, l'amidon est bien digéré grâce à l'activité glucosidase du lait maternel (Nichols et al., 2016).

Pour mieux comprendre la physiologie digestive du lapereau allaité, connaître l'efficacité de digestion des lapereaux sevrés apparaît essentiel. Chez des lapins âgés de 11 semaines, l'amidon est presque entièrement dégradé à la sortie de l'iléon (94-97%) ainsi qu'une majorité des protéines totales (Gidenne, 1992). Une étude plus récente a permis de confirmer ces valeurs chez des lapereaux de 35 jours sevrés depuis 10 jours (Gomez-Conde et al., 2007). Chez des lapins adultes, les composants insolubles des parois végétales (fraction NDF) demeurent intacts en sortie d'iléon tandis que des sucres neutres et acides composant les substances pectiques sont en partie hydrolysés au niveau de l'iléon (digestibilité iléale entre 20 et 40%), suggérant que l'hydrolyse intestinale des fractions solubles pectiques est possible chez les lapereaux sevrés (Gidenne, 1992).

C) Digestion microbienne et dégradation des composés fibreux

Comme tous les herbivores monogastriques, le lapin présente un large fermenteur caecal en position distale, avec une stratégie digestive "mutualiste" combinant compétition pour les nutriments et coopération (Mackie, 2002). Cela consiste en une première digestion des fractions digestibles de l'aliment par l'hôte dans l'intestin grêle suivie d'une fermentation des éléments non digérés dans la partie distale du tractus gastro-intestinal permise par vaste communauté microbienne (Michelland et al., 2012)

1) Développement du microbiote intestinal

Les hydrolyses enzymatiques bactériennes se déroulent principalement dans le caecum du lapin et sont suivies de fermentations. Le caecum abrite un microbiote particulièrement riche, c'est-à-dire une communauté de micro-organismes commensaux, symbiotiques et opportunistes potentiellement pathogènes, cohabitant avec leur hôte, et contribuant à la santé ou la maladie (Lederberg, 2001). Les populations résidant dans le caecum sont principalement d'origine bactérienne avec également des archées (majoritairement issues du genre *Methanobrevibacter*), présentes en moindre proportion (Bennegadi et al., 2003; Combes et al., 2011; Mi et al., 2018). La présence d'espèces eucaryotes (champignons ou protozoaires) au sein de l'écosystème caecal de lapins adultes sains a récemment été démontrée (Mi et al., 2018).

Le tube digestif du lapereau est considéré comme stérile *in utero* et sa colonisation débute à la naissance par contact avec la mère et l'environnement proche (Combes et al., 2018). Ainsi

les Bacteroidetes, phylum dominant le microbiote du nouveau-né, sont retrouvées au niveau de la vulve et du vagin de lapines et dans une moindre proportion au niveau de leurs mamelles, suggérant une transmission verticale de microbiote, c'est-à-dire de la mère vers sa descendance (Kovács et al., 2006). Le microbiote du nouveau-né se caractérise par une densité bactérienne faible (10^8 copies de gènes d'ARNr 16S par gramme de contenu caecal) et un microbiote peu diversifié dominé par quelques types bactériens parmi lesquels les Gram - Bacteroides et les Gram + Firmicutes (Combes et al., 2011) ainsi que des Coliformes identifiés par culture chez des lapereaux d'une semaine d'âge par Kovács et al. (2006). Le nombre de colonies bactériennes évolue ensuite fortement et passe à 10^{11} copies de gènes d'ARNr 16S par gramme de contenu caecal à 21 jours d'âge (Combes et al., 2011). La colonisation du caecum par les archées est plus tardive, avec des premières espèces identifiées à partir de 5 jours d'âge. Une hausse significative du nombre d'archées est observée entre 28 et 35 jours en évoluant de 10^6 à 10^7 copies (Combes et al., 2011).

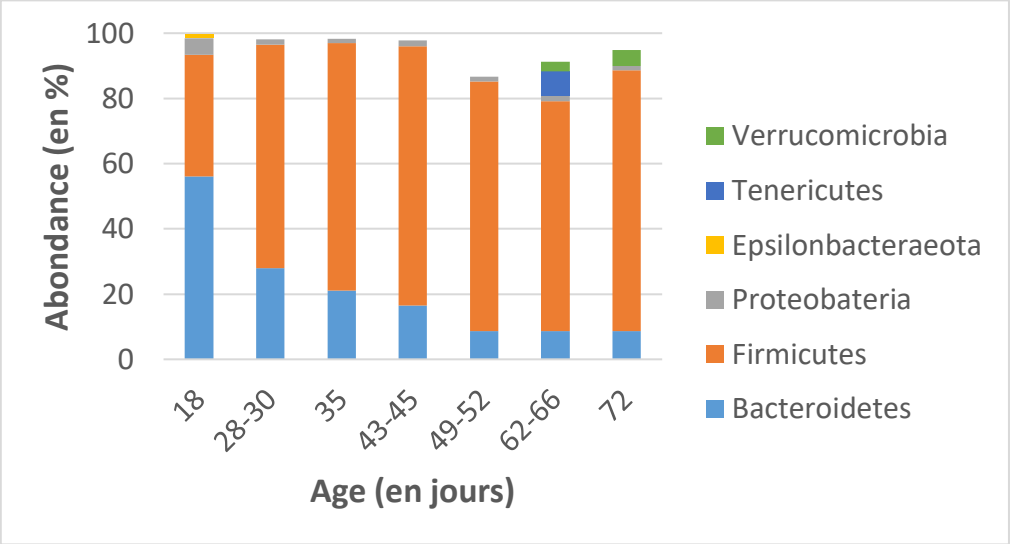


Figure 10 : Evolution temporelle de la composition bactérienne taxonomique du microbiote caecal de lapin (à l'échelle des phyla sachant que les phyla dont l'abondance était inférieure à 1% ne sont pas représentés). Résultat issu de la synthèse de données de séquençage du gène codant l'ARNr 16S (Monteils et al., 2008; Combes et al., 2011; Zhu et al., 2015; Velasco-Galilea et al., 2018; Read et al., 2019; Mattioli et al., 2019). Les animaux étaient généralement sevrés à 35 jours.

Cette colonisation bactérienne est en partie modulée par le comportement de coprophagie du lapereau au nid qui stimule l'implantation de la famille de bactéries fibrolytiques Ruminococcaceae et s'accompagne d'une réduction de Bacteroidaceae (Combes et al., 2014), bactéries spécialisées dans la consommation d'oligosaccharides du lait maternel (Charbonneau et al., 2016). Le passage d'un régime presque exclusivement lacté (18 jours d'âge) à un régime mixte aliment-solide (28 jours d'âge) modifie profondément la structure et la composition des

écosystèmes bactériens caecaux (bien plus que l'arrêt de l'alimentation lactée au moment du sevrage) avec un enrichissement du microbiote (hausse des indices d'alpha-diversité) et une augmentation notable du ratio Firmicutes/Bacteroidetes (Read et al., 2019, Figure 10).

2) *Démarrage des activités fermentaires*

Une fois l'alimentation solide démarrée, des composés de nature majoritairement fibreuse parviennent au caecum (Gidenne, 1992). Ces substrats favorisent le développement de bactéries fibrolytiques, parmi lesquelles une flore cellulolytique dénombrée à partir de 16 jours d'âge et en expansion jusqu'à 25 jours (Boulahrouf et al., 1991). Au contraire, l'absence de substrat solide restreint les potentiels d'activités pectinolytiques et xylanasiques bactériennes (Combes et al., 2008). Les diverses activités enzymatiques bactériennes (protéolyse, uréolyse, amylolyse et fibrolyse) permettent la dégradation des composés les moins digestibles, rendus accessible à l'hôte sous la forme d'acides gras volatils (AGV), d'ammonium (dégradation des acides aminés) et de protéines bactériennes notamment. L'activité fermentaire caecale augmente à partir de la deuxième semaine d'âge parallèlement à l'introduction d'aliment solide (Figure 11). Ces fermentations sont caractérisées par une légère diminution de la concentration en ammoniac du contenu caecal et une augmentation des teneurs en AGV, ce qui entraîne une diminution du pH caecal (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2003). Cette diminution de la teneur en ammoniac du contenu caecal traduit un changement d'activité du microbiote digestif, d'abord tourné vers la dégradation d'acides aminés, qui s'oriente ensuite vers la fermentation des fibres apportées dans les substrats alimentaires solides. Le profil des AGV du lapin est caractérisé par une prédominance d'acétate et une diminution du ratio proprionate/butyrate avec l'accroissement de la part de l'aliment solide (Combes et al., 2011). De façon concomitante, l'expression du gène *Mct1* codant pour un transporteur du butyrate est augmentée dans la muqueuse caecale lors du démarrage de l'ingestion d'aliment solide (Beaumont et al., Submitted). Chez le lapin adulte, l'absorption d'AGV dans la muqueuse intestinale permet de couvrir de 30 à 50% de ses besoins énergétiques (Gidenne, 2015a). La caecotrophie permet enfin un recyclage des nutriments non dégradés à l'issue des processus digestifs (bactéries et autres produits de fermentation). Ces apports en protéines microbiennes via la caecotrophie sont essentiels pour le lapin et représentent entre 14 et 29% de l'ingéré azoté total (Hörnicke et Björnhag, 1979; Belenguer et al., 2005).

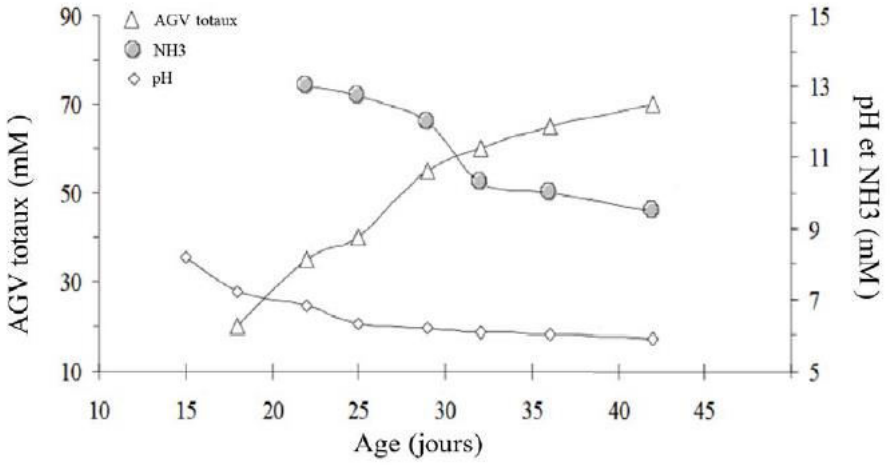


Figure 11 : Evolution de l'activité caecale fermentaire avant sevrage. D'après Gidenne et al., 2008.

Résultat des hydrolyses réalisées en amont du caecum et des fermentations qui s'en sont suivies, la digestibilité totale des lapereaux en milieu et fin de lactation (25-27 jours et 28-31 jours) serait élevée, avec une digestibilité de la matière organique comprise entre 70 et 80%, des digestibilités de protéines et de matières grasses supérieures à 80% et entre 40 et 60% des parois cellulaires digérées (Debray et al., 2001). Seules les lignines et cutines demeurent quasiment intactes en fin de digestion (Gidenne, 2015b). Chez des lapereaux de 42 jours, sevrés depuis 10 jours, il a été constaté que la digestion totale de composés glucidiques simples était quasiment complète, indépendamment des quantités d'aliments reçus avant sevrage (Scapinello et al., 1999).

Une synthèse de l'ensemble des remaniements d'ordre digestif (croissance des organes, évolutions des activités enzymatiques) survenant lors de la transition alimentaire est représentée en figure 12. La capacité du lapereau à digérer le lait est très élevée avec une digestibilité de l'ordre de 94% à trois semaines d'âge, en lien avec une capacité digestive enzymatique adaptée. A l'inverse, la digestibilité iléale et apparente de l'aliment solide par des lapereaux allaités est moins bien connue. Connaître la capacité du lapereau allaité à dégrader les nutriments permettrait de formuler un aliment solide qui lui soit adapté. Il conviendrait donc de déterminer les valeurs de digestibilité de l'aliment à différents stades de lactation pour diverses compositions nutritionnelles.

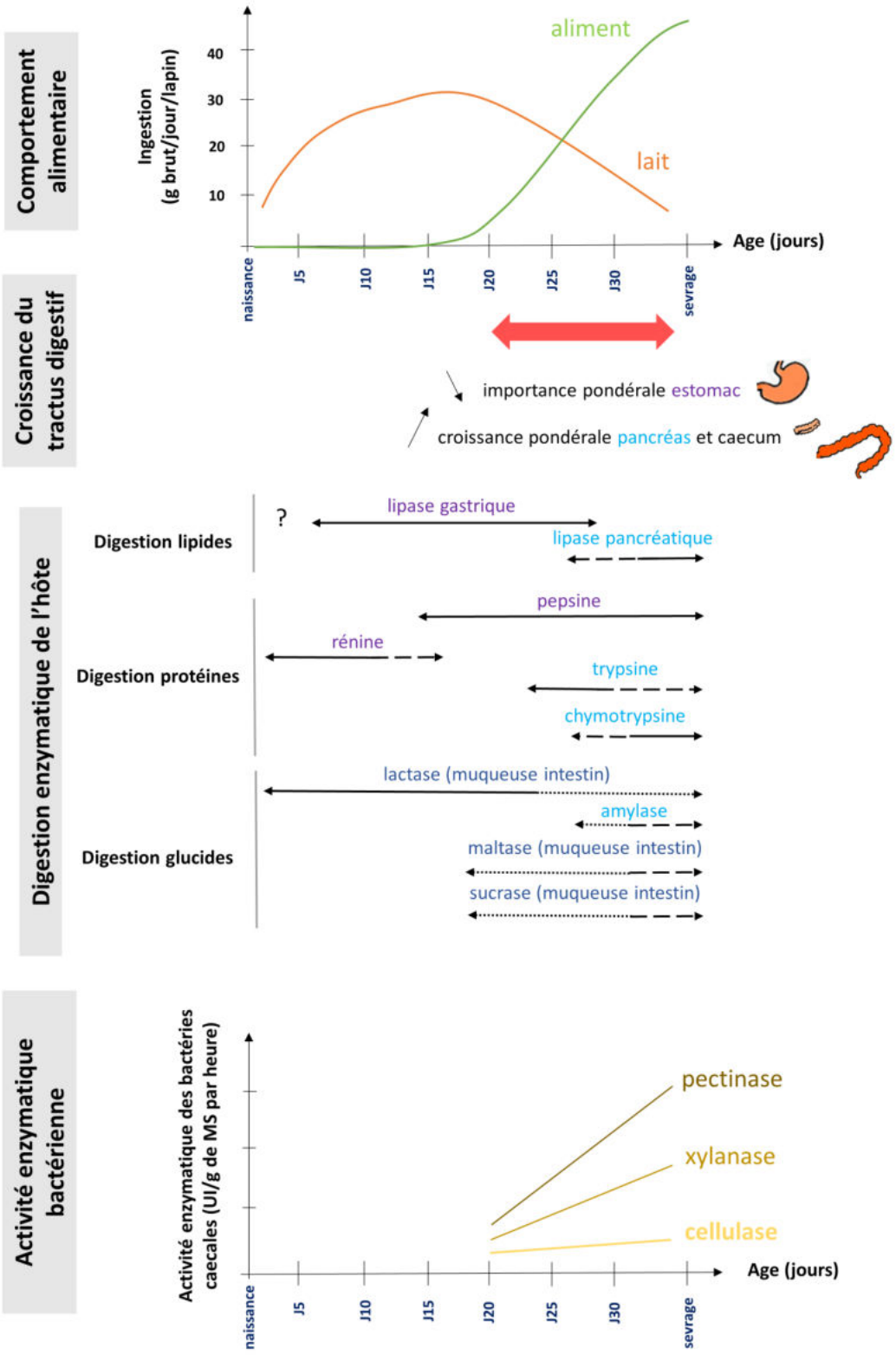


Figure 12 : Evolution des capacités digestives du lapereau allaité en lien avec la transition alimentaire qui survient avant le sevrage. Les flèches en pointillés ou avec des tirets correspondent respectivement à des activités enzymatiques très faibles ou avec des niveaux intermédiaires. Les flèches en trait plein correspondent à des activités enzymatiques élevées.

Chapitre II – Le sevrage : une période critique pour la santé du lapin

Au sein de ce chapitre seront présentés successivement le déroulement du sevrage en élevage cunicole puis les conséquences en termes de santé de cet événement particulier, source de stress nutritionnel et social pour de jeunes animaux. Certains facteurs favorisant l'occurrence de troubles digestifs en début d'engraissement seront présentés, parmi lesquels les facteurs nutritionnels et la physiologie intrinsèque du lapereau, qui présente un statut immunitaire et un microbiote digestif encore immatures au moment du sevrage.

I/ Modalités du sevrage chez le lapin en conditions naturelles et en élevage

En conditions naturelles, le sevrage correspond à l'arrêt de l'alimentation lactée. Le moment du sevrage dépend de l'état physiologique de la lapine : si elle n'est pas de nouveau gestante (maintien de la lactation), le sevrage des lapereaux peut avoir lieu jusqu'à 4-6 semaines d'âge alors que dans le cas contraire, le sevrage intervient autour de 3 semaines d'âge ce qui est fréquent au printemps (démarrage d'une nouvelle gestation) (Gidenne et al., 2010b). En élevage, le sevrage des lapereaux a lieu entre 28 et 35 jours d'âge. La moitié des élevages conventionnels français fonctionne selon un système d'élevage qualifié de « tout vide - tout plein » (ITAVI, 2017) où seules les lapines sont déplacées dans un nouveau bâtiment (ou salle d'élevage) au moment du sevrage. Cette pratique minimiserait le stress d'un changement d'environnement pour les lapereaux, mais surtout permet de réaliser un vide sanitaire de quelques jours entre chaque bande. De même l'aliment proposé avant sevrage peut être maintenu quelques jours en engraissement (aliment péri-sevrage) pour éviter de changer trop brusquement les apports nutritionnels. Malgré cela, la période du sevrage correspond à de nombreux bouleversements tant sur le plan alimentaire (arrêt de l'alimentation lactée) que social (séparation de la mère, nouveaux congénères…). Ces changements alimentaires sont toutefois plus progressifs que lors du sevrage d'autres espèces (veau laitier, porc…) : en effet, lors du sevrage (environ 30 jours), le lapin présente une ingestion d'aliment solide bien établie avec une proportion d'ingéré solide supérieure à celle du lait (86% de l'ingéré brut total à 35 jours, Orengo et Gidenne, 2007). Il n'en demeure pas moins que la période de post-sevrage en élevage cunicole reste marquée par une fréquence assez élevée de troubles digestifs, comme observée chez d'autres jeunes mammifères.

II/ Causes de mortalités en élevage cunicole dans la période entourant le sevrage

Une enquête menée par l'ITAVI en 2017 auprès de 697 ateliers cunicoles a mis en évidence un taux de mortalité global (naissance à vente) de 25% (Lebas, 2018), un chiffre en accord avec les résultats relevés lors de cette dernière décennie (Figure 13). Une part importante de la mortalité est imputée à la période naissance-sevrage (16% de la mortalité totale) avec une majorité des pertes durant la première semaine post-natale (Rashwan et Marai, 2010) en lien avec des qualités maternelles insuffisantes (rejet de la portée par la femelle, cannibalisme, écrasement, quantité de lait insuffisante…) ou un nid n'offrant pas un confort thermique adéquat. Le taux de mortalité en engraissement (entre le sevrage et la vente) a été fortement réduit entre 1985 et 2010, mais une nouvelle hausse de mortalité a été constatée ces dernières années parallèlement à l'émergence du virus variant de la maladie hémorragique virale (VHD2, voir Figure 13) et potentiellement en lien avec le plan de démédication lancé en 2011 par la filière cunicole. En 2017, la mortalité en engraissement s'élevait ainsi à 9%. Ces pertes sont concentrées sur le début d'engraissement (4-6 semaines d'âge ; Peeters, 1987) et sont essentiellement associées à des troubles digestifs (Marlier et al., 2003a), avec des diarrhées dans 95% des cas (Licois et Marlier, 2008). De plus, les pathologies digestives sont responsables de morbidité, caractérisée par une faible croissance et une moindre efficacité alimentaire (Gidenne, 2015b).

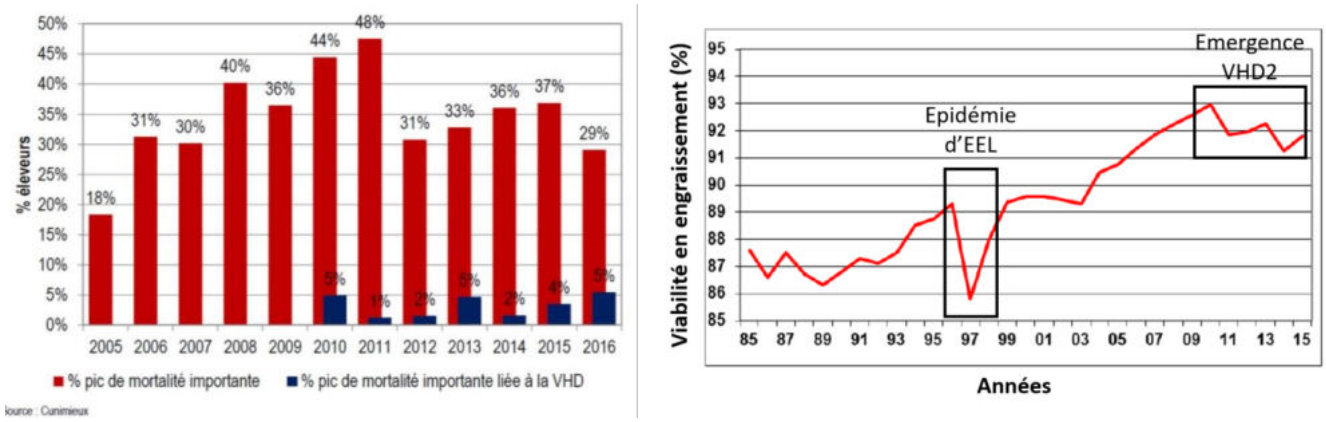


Figure 13 : Nombre d'éleveurs ayant déclaré un pic de mortalité notable en engraissement de 2005 à 2016 à gauche (données : ITAVI, réseau d'élevage Cunimieux) avec l'émergence de cas de VHD depuis 2010. Taux de **survie** annuel en engraissement de 1985 à 2015 à droite (données : ITAVI, GTE RENACEB).
Source : Cadudal, 2018 à gauche et Hurand, 2016 pour la figure de droite.

L'étiologie des maladies digestives est complexe car les signes cliniques observés (diarrhée, distension abdominale, …) sont peu spécifiques d'un agent pathogène précis.

Plusieurs agents opportunistes peuvent contribuer à une entéropathie, dont la cause peut être un déséquilibre digestif, ou encore être d'origine non biologique (stress, alimentation…) (Marlier et al., 2003a). Parmi ces agents pathogènes spécifiques, les coccidies sont des parasites reconnus comme étant à l'origine de la majorité des troubles intestinaux d'origine parasitaire (Licois et Marlier, 2008). Certaines espèces bactériennes telles que les *Escherichia coli* entéropathogènes, *Salmonella Typhimurium ou Enteritidis,* certaines *Clostridium* ou encore *Klebsiella pneumoniae* constituent des causes spécifiques d'entéropathies (Licois et Marlier, 2008; Combes et al., 2018). Des virus peuvent également être responsables de pathologies, parmi les rotavirus, adenovirus, coronavirus et parvovirus (Marlier et al., 2003b). Toutefois, pour un certain nombre de pathologies, aucun agent étiologique n'a été identifié. Parmi ces entérites non spécifiques, on distingue notamment l'entéropathie épizootique du lapin (EEL), une maladie dont les symptômes sont bien décrits mais à l'étiologie inconnue. Alors que la proportion de ces troubles digestifs non spécifiques était faible au début des années 2000, elle atteignait 35% des élevages en 2016-2017 (Cadudal, 2018). En plus des troubles cliniques visibles, l'activité de l'épithélium digestif serait compromise au moment du sevrage, comme ont pu le montrer Gutiérrez et al. (2002) qui ont révélé une diminution du ratio longueur des villosités/profondeur des cryptes digestives ainsi qu'une chute d'activité des enzymes de la bordure en brosse (maltase, sucrase), indicateurs d'une altération des capacités fonctionnelles de la muqueuse (Hampson et Kidder, 1986). La combinaison de plusieurs facteurs non biologiques (extrinsèques) et intrinsèques à l'animal induirait ou favoriserait ces pathologies digestives non infectieuses.

III/ Facteurs extrinsèques et intrinsèques favorisant l'occurrence des troubles digestifs

Les facteurs favorisant l'apparition de troubles digestifs peuvent être qualifiés d'extrinsèques, c'est-à-dire non inhérents à l'animal, et d'intrinsèques en lien avec le développement physiologique de l'animal. Parmi les facteurs extrinsèques qui regroupent les conditions d'élevage et d'hygiène, la qualité et la quantité d'aliment solide apporté au lapereau au moment du sevrage sont des variables explicatives de l'occurrence des troubles digestifs non infectieux. De plus en élevage, le sevrage se déroule alors même que le système immunitaire et le microbiote digestif se construisent. Ces deux derniers paramètres expliquent également la sensibilité du jeune lapin aux troubles digestifs.

A) Un ingéré d'aliment solide inadapté tant en quantité qu'en qualité

Tableau 2 : Recommandation d'apports fibreux dans l'aliment destiné aux lapereaux en période péri-sevrage pour réduire les troubles digestifs. D'après Gidenne (2015).

Composition optimale (en g/kg d'aliment)	
Lignocellulose (ADF)	> 190
Lignines (ADL)	> 55
Cellulose (ADF-ADL)	> 130
Lignines/cellulose	>0,40
Hémicelluloses	> 120
Fibres digestibles/lignocellulose	< 1,30

Les fibres digestibles sont ici considérées comme égales à hémicellulose +eau-pectines insolubles

La quantité d'aliments apportée en post-sevrage module l'état sanitaire des jeunes lapins. C'est ainsi que depuis une quinzaine d'années, la réduction de l'ingéré lors des quatre premières semaines d'engraissement est devenue une méthode classique d'élevage pour réduire les syndromes d'entéropathies non spécifiques dans un contexte de démédication (Gidenne et al., 2012). De façon surprenante, les effets bénéfiques de la restriction alimentaire étaient associés à une réduction de la réponse humorale digestive (sécrétion d'IgA fécaux) et à une inhibition de l'immunité systémique (teneurs en IgG et IgA plasmatiques). Toutefois la réponse inflammatoire (évaluée par mesure de la fièvre et des niveaux plasmatiques de TNF α) ne serait pas modulée (Knudsen, 2014).

La composition de l'aliment apporté au jeune lapereau joue également un rôle clé dans la prévention des maladies digestives, en particulier les fibres alimentaires, premiers constituants des aliments destinés aux lapins en engraissement (Gidenne, 2015). Au-delà de leur rôle nutritif, les fibres sont susceptibles de moduler l'ingestion, la digestibilité, la motricité digestive et l'activité fermentaire (Gidenne, 1996). Ces fibres ne peuvent être considérés dans leur ensemble puisqu'elle sont composées de constituants variés, que l'on peut classer selon la méthode de fractionnement biochimique de Van Soest (1991) en : fibres totales ou NDF (fibre au détergent neutre), lignocellulose ou ADF (fibre au détergent acide) et lignine ou ADL. En laboratoire de recherche, les pectines sont analysées par un dosage d'acides uroniques. Des études multi-centres (réalisées dans plusieurs élevages expérimentaux) ont permis de démontrer le rôle majeur des apports fibreux dans l'incidence des troubles digestifs du lapin en croissance tandis que la concentration en amidon dans l'aliment a un rôle mineur (Gidenne et al., 2004, 2005b). Les apports de lignocellulose, qui diminue le temps de séjour des aliments, sont déterminants dans la prévention de l'occurrence d'entéropathies (Gidenne, 2015b). De plus, des méta-

analyses ont également montré l'importance du ratio fibres digestibles/lignocellulose sur la santé en post-sevrage, ce ratio devant demeurer inférieur à 1.3 pour réduire les risques sanitaire (Gidenne, 2015b). Une réduction des cas d'EEL et de parésie serait par ailleurs observée lorsque ce ratio augmente entre 0,73 et 1,03 (Rebours et al., 2019). Des recommandations alimentaires ont donc été publiées pour minimiser le risque sanitaire (Tableau 2). Par ailleurs, la qualité et quantité d'abreuvement peuvent contribuer à la santé digestive du lapin: en particulier, les eaux à pH trop basiques favorisent les pathologies digestives (Marlier et al., 2003a).

B) Une réponse immunitaire partielle au moment du sevrage

La réponse immunitaire se déroule en plusieurs temps : lors d'une infection, le système immunitaire inné agit en première ligne de défense par le biais des macrophages et neutrophiles. Lorsque ces derniers ne parviennent pas à éliminer ou reconnaître des organismes pathogènes, l'immunité spécifique (ou adaptative) intervient grâce aux lymphocytes, des globules blancs capables de se différencier en fonction des antigènes reconnus (Janeway et al., 2001). De façon surprenante, les jeunes lapins (âgés de moins de 4 semaines) sont très peu affectés par certains virus tels que celui de la VHD1, pourtant mortel chez des lapins plus âgés (Abrantes et al., 2012). L'utilisation d'immunosuppresseurs a démontré que cette absence de susceptibilité s'expliquait par une réponse immunitaire particulièrement efficace (Marques et al., 2014). Ainsi les défenses immunitaires innées du lapereau allaité ou juste sevré sont développées par rapport à des individus adultes, avec notamment une surexpression des gènes MHC de classe II, associés à la prolifération de macrophages et cellules NK (Natural Killer) (Neave et al., 2018). Cette réponse efficace de l'immunité innée n'a toutefois été montrée que dans le cas de pathologies virales et cet axe de recherche reste à explorer.

L'immunité adaptative propre aux lapereaux est en revanche limitée avant sevrage. Cette immunité est essentielle car elle permet d'amplifier la réponse immunitaire avec d'une part une action spécifique de l'antigène rencontré, et d'autre part l'effet mémoire qui permet une élimination plus efficace d'un agent pathogène auquel l'hôte serait confronté de nouveau.

Les immunoglobulines, ou anticorps, sont constitués de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères reliées entre elles par des ponts disulfures. Une partie variable se situe à l'extrémité de chacune de ces chaînes. Dans les lymphocytes B en développement (plasmocytes), un réarrangement des gènes codant pour ces parties variables des immunoglobulines a lieu. Au niveau des chaînes lourdes, les sections situées entre les segments

de gènes D et J, puis entre les segments V et D-J sont éliminées (Figure 14). Il existe de multiples copies de ces segments VDJ, susceptibles des former jusqu'à 100 différents exons VDJ complets (Lanning et al., 2000).

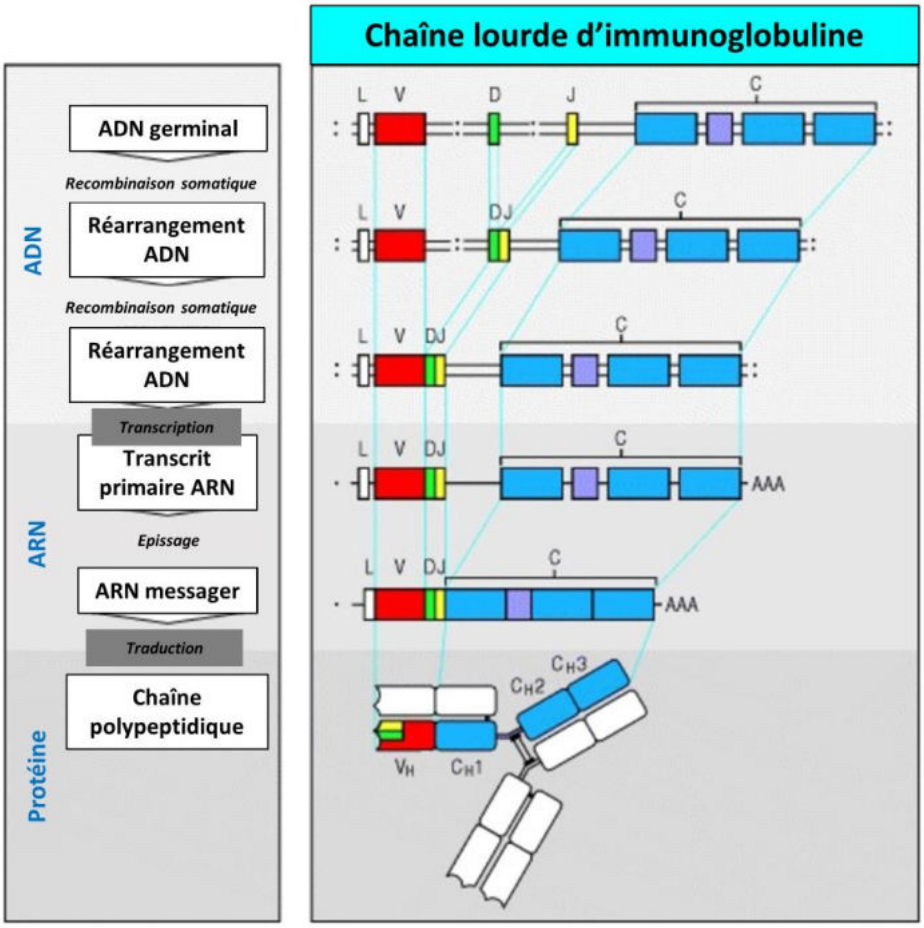


Figure 14 : Construction d'un répertoire d'anticorps varié par recombinaison somatique. La région variable des chaînes lourdes (V_H, H pour heavy chain) est constituée de trois segments de gènes formant la séquence VDJ après réarrangement. La région constante (C_H) est reliée à V_H lors de la transcription. Les chaînes polypeptidiques formant l'immunoglobuline sont reliées après la traduction grâce à des ponts disulfures.
D'après Janeway et al., 2001b.

L'association entre les domaines variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère constitue un site de reconnaissance (ou paratope) des antigènes. Ainsi, cette recombinaison VDJ, source de variabilité des anticorps produits, est essentielle pour la reconnaissance des multiples antigènes que l'organisme du jeune lapereau pourrait rencontrer (Janeway et al., 2001b). Le répertoire d'anticorps des lapins est généré en trois étapes avec dans un premier temps la génération de lymphocytes (lymphopoïèse) dans le foie et la moelle osseuse pendant la vie fœtale. La prolifération des lymphocytes et les processus de recombinaisons géniques s'effectuent par la suite dans les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse digestive entre 4 et

8 semaines d'âge, sous l'influence du microbiote intestinal (Mage et al., 2006). Cette construction d'un répertoire d'anticorps primaire apparaît tardive chez le lapereau puisqu'elle a généralement lieu en phase prénatale chez la plupart des autres mammifères (Rhee et al., 2004). Ce répertoire primaire est particulièrement important pour le lapereau puisque la lymphopoïèse est limitée chez le lapin adulte. Ainsi ce répertoire primaire fournit un pool de cellules B et d'anticorps pour le reste de la vie de l'animal, avec dans un dernier temps des modifications possibles par mutation somatique (changement d'une ou plusieurs bases nucléiques de l'ADN) au fur et à mesure des contacts avec des antigènes (construction du répertoire d'anticorps secondaire) (Kennedy et al., 2016). Outre un répertoire d'anticorps limité avant 4 semaines d'âge chez le lapin, l'immunité des nouveau-nés se caractérise généralement par un nombre réduit de cellules précurseurs de lymphocytes B et T ainsi que des structures lymphoïdes immatures (Willems et al., 2009).

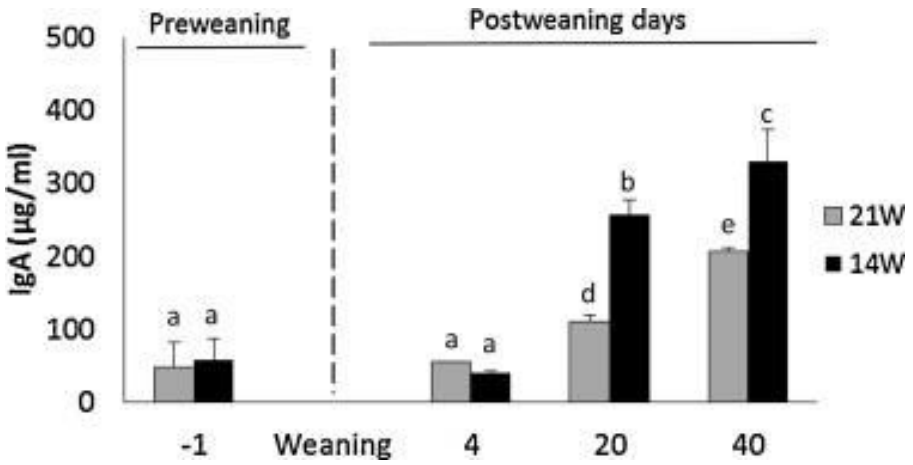


Figure 15 : Le sevrage du porcelet est caractérisé par des niveaux bas d'immunoglobulines A dans la lumière intestinale. 21W : sevrage à 21 jours tandis que 14W : sevrage à 14 jours. D'après García et al., 2016.

Ainsi la santé du lapereau nouveau-né dépend fortement de la protection offerte par immunité passive. Chez les mammifères, le colostrum et le lait sont particulièrement riches en immunoglobulines A sécrétoires (sIgA) (Woof and Kerr, 2006). Chez le lapereau, ces sIgA issues du lait se retrouvent dans le tractus digestif sous forme active avec une demi-vie de 3 jours (Maertens et al., 2006). Ces IgA maternelles sont essentielles pour la préservation des bactéries pionnières (Schofield et Palm, 2018) ainsi que pour l'homéostasie digestive (Breedveld et van Egmond, 2019) et elles représentent une première ligne de défense de la muqueuse via une réponse non-inflammatoire (Pérez-Berezo et al., 2011). L'immunité passive est d'autant plus essentielle que la production endogène d'IgA par les animaux allaités est très réduite (Rogier et al., 2014). Les fonctions clés des sIgA qui agissent en interaction avec le

microbiote commensal ainsi que les mécanismes de production endogènes seront présentés dans le chapitre III. Cette limitation ontogénique, ainsi que la réduction potentielle de production d'IgA liée au stress (Campos-Rodríguez et al., 2013) aboutiraient à une réponse humorale digestive au plus bas au moment du sevrage, comme démontré chez les porcelets qui présentent les taux d'IgA intestinaux les plus faibles le jour précédant le sevrage ainsi que 4 jours après le sevrage (Figure 15). De façon plus générale, l'arrêt d'une alimentation lactée correspond à un arrêt des apports maternels en composants immunorégulateurs et immunoprotecteurs tels que les lactoferrines, les oligosaccharides ou encore les lipides et glycomacropeptides (van den Elsen et al., 2019), expliquant en partie la sensibilité des animaux au sevrage. Chez le lapin, il a été démontré que le lait présentait une activité bactériostatique *in vitro* avec une protection offerte contre les infections aux colibacilles *in vivo* (Gallois et al., 2007). Les acides gras à chaînes moyennes du lait de lapine feraient partie de ces facteurs antimicrobiens (Skrivanova et al., 2009) tout comme les caséines qu'il contient, dont l'activité antibactérienne peut être déclenchée lors de la digestion du lait par les endopeptidases du lapereau (Baranyi et al., 2003). Chez l'homme, la présence de communautés bactériennes et de cellules immunitaires dans le lait, susceptibles de moduler la santé du nouveau-né, est bien connue (Cabrera-Rubio et al., 2012; Bode et al., 2014) mais n'a pas encore été caractérisée chez les lagomorphes.

C) Implication du microbiote dans l'émergence de troubles digestifs

Le rôle clé du microbiote digestif sur la préservation de la santé et l'incidence de maladies a fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Chez les mammifères, le microbiote empêche la colonisation de l'écosystème digestif par des pathogènes via un effet barrière (McKenney et Kendall, 2016) tout en contribuant au développement de l'immunité de l'hôte (Sekirov et Finlay, 2009; Cheng et al., 2019 ; voir mécanismes dans le chapitre III). Chez le lapin, les études de Sekirov et Finlay (2009), Bäuerl et al. (2014) et plus récemment de Jin et al. (2018) ont montré l'association entre maladies digestives d'étiologie inconnue et altérations du microbiote, sans toutefois pouvoir démontrer des liens de causalité. Ces modifications qualitatives et fonctionnelles du microbiote digestif sont appelées dysbiose. Dans le cas de l'EEL, la diversité du microbiote est fortement réduite, et associée à une réduction du phylum Firmicutes au profit des Protéobactéries avec de plus fortes proportions de certains genres issus des familles Bacteroides et Clostridium (Bäuerl et al., 2014; Jin et al., 2018). La prolifération de bactéries opportunistes ou pathogènes se fait alors au détriment des bactéries fibrolytiques productrices de butyrate *Eubacterium* et *Faecalibacterium* (Jin et al., 2018). Point de départ de

la maladie ou conséquences de cette dernière, des perturbations au niveau du microbiote rendent l'hôte immunocompromis et donc plus susceptibles aux infections d'espèces potentiellement pathogènes (Sekirov et Finlay, 2009). Une fois l'infection initialisée, l'espèce pathogène agirait sur la niche occupée par les bactéries commensales, modulant ainsi la composition microbienne et créant un environnement maximisant sa pathogénicité. En parallèle, le stress nutritionnel et social induit par le sevrage peut altérer la barrière digestive comme montré via des modèles de stress expérimentaux chez les rongeurs (Söderholm et al., 2002; Silva et al., 2014). L'un des mécanismes par lequel le stress agirait sur la santé digestive du lapin consiste en l'induction de décharges répétées d'adrénaline qui ralentiraient le transit intestinal des animaux (Peeters, 1987), aboutissant à une augmentation du temps de séjour des aliments comme observé lors d'une déficience en fibres alimentaires (Gidenne, 1996). La multiplication non maîtrisée de bactéries pathogènes associée à une barrière intestinale compromise permet le passage de ces pathogènes à travers la muqueuse intestinale (Wiest and Rath, 2003). Ce phénomène de translocation bactérienne est fréquent dans certaines pathologies digestives et contribuerait à une morbidité accrue (Wiest and Rath, 2003).

Les deux premières semaines de post-sevrage constituent une période critique en élevage cunicole avec une forte sensibilité des animaux aux entéropathies. Un ingéré inadéquat du lapin sevré, tant en termes de quantité et de qualité, explique une partie des mortalités observées. Malgré l'amélioration des formules péri-sevrage et la mise en place quasi-systématique des stratégies de restriction alimentaire, ces troubles demeurent fréquents. L'immunité adaptative partielle du jeune lapin, mise à l'épreuve lors du challenge du sevrage, pourrait expliquer cette sensibilité. Plusieurs éléments indiquent qu'une altération du microbiote jouerait un rôle clé dans l'occurrence de troubles digestifs. Par conséquent une meilleure gestion des facteurs favorisant le développement du système immunitaire et la maturation du microbiote pourraient constituer des leviers d'action efficaces de préservation de la santé digestive du jeune lapin.

Chapitre III – L'intestin, un organe clé de la préservation de la santé en association symbiotique avec le microbiote digestif

La muqueuse intestinale présente une structure hautement spécialisée, siège de la symbiose hôte-microbiote, qui assure l'absorption des nutriments tout en empêchant le passage de bactéries. Elle représente le premier organe de défense immunitaire, fonction remplie en collaboration avec un écosystème microbien complexe composé d'environ 1000 espèces différentes (Combes et al., 2011). Le rôle joué par l'intestin dans l'immunité de l'organisme sera présenté dans un premier temps. Nous montrerons ensuite en quoi le microbiote constitue un allié indispensable de cette immunité.

I/ L'intestin, une structure organisée pour contenir la charge microbienne

A) La muqueuse digestive constitue une barrière aux micro-organismes

Les différents segments digestifs présentent des barrières physico-chimiques adaptées à leur fonction première de digestion. Ainsi les sucs gastriques permettent à la fois la digestion du bol alimentaire et renforcent l'acidité du milieu stomacal, limitant ainsi le développement bactérien (Davies et Davies, 2003).

Au niveau de l'intestin grêle et du gros intestin, le mucus qui recouvre les entérocytes forme une première barrière physico-chimique entre le microbiote résident et la muqueuse digestive (Figure 16). Ce mucus se présente sous une forme visqueuse d'environ 150 µm d'épaisseur chez l'homme (Hooper et al., 2012) et d'une vingtaine de micromètres chez la souris (Elderman et al., 2017) et constitue une barrière importante pour des bactéries qui mesurent entre 0,2 et 2,0 µm. Les mucines qui constituent ce gel protecteur sont produites par les cellules caliciformes et permettent de limiter la translocation de micro-organismes et l'activation excessive des récepteurs de l'immunité innée au pôle apical des cellules épithéliales (Sekirov et Finlay, 2009). Les cellules caliciformes additionnelles peuvent également sécréter des protéines en trèfles comme le TFF3 (trefoil factor 3) qui assurent l'intégrité du mucus par réticulation notamment (Peterson et Artis, 2014). Tandis que le gros intestin (caecum + côlon) est recouvert de deux couches de mucus, une seule couche protège l'intestin grêle ce qui assure notamment le passage des nutriments (Peterson and Artis, 2014). Ainsi dans un tractus digestif

sain, le microbiote n'est pas en contact avec les cellules épithéliales et n'est échantillonné que de façon contrôlée par des cellules spécialisées dans le plaques de Peyer (cellules M ; Hooper et al., 2012). Les cellules épithéliales contribuent également à l'immunité innée de la muqueuse en exprimant des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, extracellulaires (récepteurs de type Toll dit TLR, également exprimés par les cellules immunitaires) ou intracellulaires (récepteurs de type NOD). Ces récepteurs sont capables de reconnaître les motifs moléculaires associés à des pathogènes ou dégâts cellulaires lors d'infections et contribuent ainsi à l'induction de la réponse inflammatoire (Sekirov et Finlay, 2009). On observe ainsi dans le lumen la présence de molécules antimicrobiennes (lactoferrine, lysozyme,…) sécrétées par les cellules de Paneth dans l'intestin grêle ou d'autres types de cellules dans le gros intestin (Muniz et al., 2012). RegIIIγ est par exemple une lectine antibactérienne produite par les cellules épithéliales sous le contrôle des récepteurs TLR, qui empêche la pénétration des bactéries dans le mucus, limitant ainsi le nombre de bactéries en contact avec l'épithélium (Hooper et al., 2012)

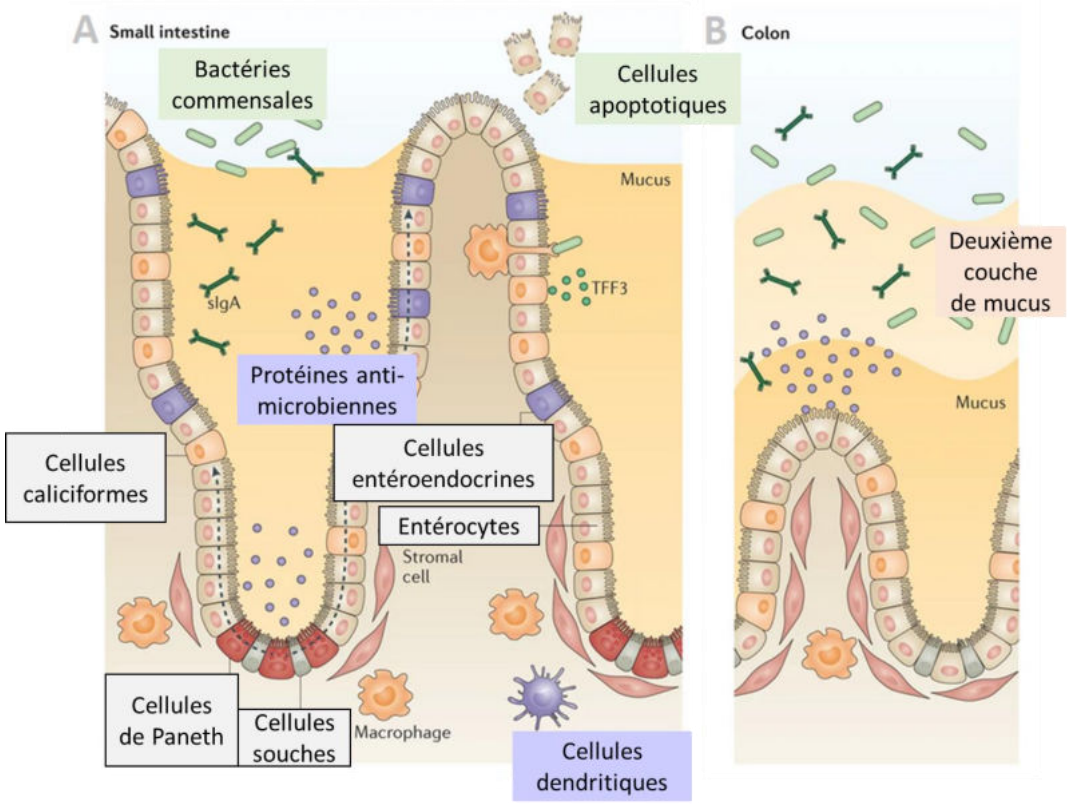


Figure 16 : L'épithélium digestif constitue une barrière physico-chimique maintenant les micro-organismes dans le lumen, hors de la muqueuse. Les flèches du schéma (A) représentent le mouvement des cellules qui se différencient lors de leur migration vers la lumière intestinale. A la différence de l'intestin grêle, le côlon (B) ne présente pas de villosités et est protégé par deux couches de mucus. sIgA : Immunoglobulines A sécrétoires. D'après Peterson et Artis (2014).

L'épithélium constitue une seconde barrière physique jointive grâce à des éléments assurant la cohésion du tissu tels que les jonctions serrées intercellulaires présentes au pôle apicale des cellules épithéliales (Bryant et Mostov, 2008). La division régulière de cellules souches pluripotentes localisées au niveau des cryptes de l'épithélium assure un nombre constant de cellules en dépit des exfoliations régulières au niveau du sommet des villosités. Les diverses fonctions exprimées par les cellules de l'épithélium permettent collectivement la mise en place d'une barrière dynamique et le maintien d'une perméabilité intestinale sélective, nécessaire aux fonctions d'absorption de nutriments. Enfin, le péristaltisme intestinal permet de réduire le temps de contact des possibles pathogènes avec la muqueuse intestinale (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007).

B) Immunité digestive : mécanismes de résistance à la pénétration et à la prolifération microbienne.

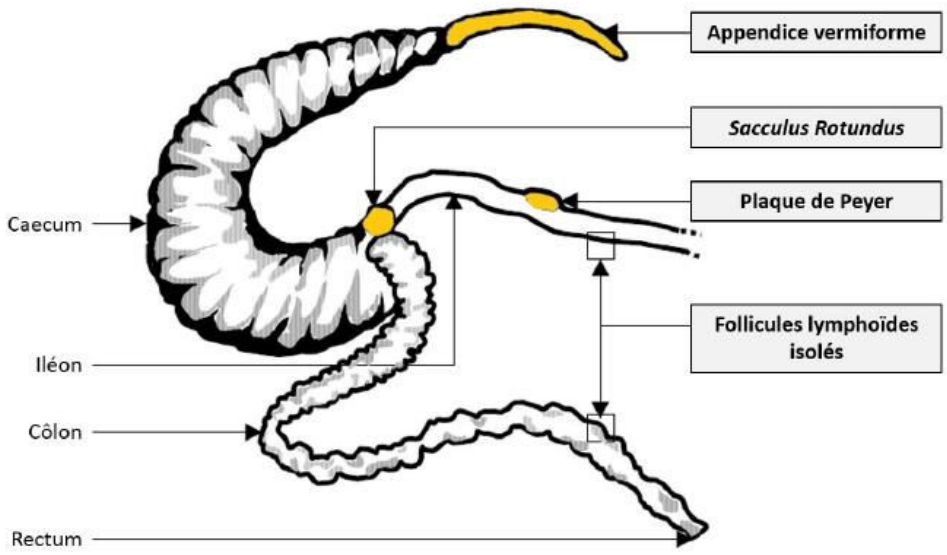


Figure 17 : Organisation du tissu lymphoïde associé aux muqueuses digestives du lapin
De Knudsen (2014) d'après Fortun-Lamothe et Boullier (2007)

Afin de contenir les communautés microbiennes abritées par le tractus digestif, celui-ci contient un grand nombre de cellules immunitaires. Ces cellules sont situées dans le tissu lymphoïde du tube digestif (en anglais gut-associated lymphoid tissue, GALT) et limitent l'invasion de bactéries pathogènes ou opportunistes tout en tolérant les micro-organismes commensaux (Sekirov et Finlay, 2009).

Le GALT est particulièrement développé chez le lapin (Haley, 2003) et se répartit dans plusieurs segments spécifiques (Figure 17). Les cellules immunitaires peuvent se regrouper au sein de follicules dans l'intestin ou le côlon, contenant essentiellement des lymphocytes B

assemblés dans une matrice de tissu conjonctif lâche et de cellules dendritiques (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007; Figure 17). Les plaques de Peyer sont une forme spécifique d'agrégats de follicules surmontés par des dômes de cellules épithéliales le long de l'intestin grêle. Les cellules M qui couvrent ces dômes sont spécialisées dans l'absorption des antigènes et micro-organismes présents dans le lumen, qu'elles délivrent ensuite aux cellules présentatrices d'antigènes des follicules lymphocytaires sous-jacents, permettant ainsi l'induction d'une réponse immunitaire spécifique par les lymphocytes T. Ces cellules M sont particulièrement abondantes chez le lapin (50% des cellules recouvrant le dôme) par rapport au rat ou à l'homme (entre 5 et 10% ; Haley, 2003), ce qui démontre leur rôle clé dans l'initiation de la réponse immunitaire. De nombreuses cellules de l'immunité (granulocytes, macrophages, lymphocytes…) se répartissent également de façon diffuse au sein de l'épithélium ou de la *lamina propria* (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007). Le lapin possède deux organes lymphoïdes digestifs hautement différenciés : le *sacculus rotondus,* spécifique des lagomorphes, situé à la jonction iléo-caecale et considéré comme une plaque de Peyer hypertrophiée (Haley, 2003), et l'appendice vermiforme à l'extrémité du caecum qui servirait de réservoirs de bactéries bénéfiques pouvant permettre un réensemencement du caecum suite à des troubles digestifs (Smith et al., 2013). Ainsi le microbiote des tissus lymphoïdes est plus robuste à des perturbations de court terme que le caecum (Arrazuria et al., 2018). Cet appendice favoriserait également la sécrétion d'ions bicarbonate dans le lumen caecal, ce qui assurerait un rôle de tampon pour les AGV produits au moment des fermentations (Davies and Davies, 2003). Le *sacculus rotondus*, l'appendice vermiforme et les plaques de Peyer sont également essentiels pour le développement d'un répertoire immunitaire primaire d'anticorps car ils constituent les sièges majeurs de prolifération et différenciation des lymphocytes B par recombinaison somatique des gènes VDJ (Mage et al., 2006).

Les cellules dendritiques et macrophages représentent des cellules sentinelles (elles résident en permanence dans les tissus) capables d'ingérer les agents infectieux par phagocytose tout en activant des processus immunitaires par l'émission de signaux. Les macrophages agissent majoritairement comme des effecteurs de la réponse immunitaire innée dans la *lamina propria* où ils phagocytent et éliminent les bactéries qui auraient pu franchir la barrière intestinale et sécrètent en retour des cytokines pro ou anti-inflammatoires (Cerovic et al., 2014; Duque and Descoteaux, 2014). Les cellules dendritiques sont capables d'initier une réponse immunitaire adaptative au niveau de la *lamina propria*, d'un follicule (Figure 18) ou d'un ganglion mésentérique après migration. Elles initient la réponse immunitaire adaptative en activant des lymphocytes T naïfs CD4+ spécifiques de l'antigène présenté (Cerovic et al., 2014)

qui vont à leur tour activer d'autres cellules immunitaires avec une réponse (T helper de type 1 ou 2) dépendant de l'environnement inflammatoire (Segura et Amigorena, 2014).

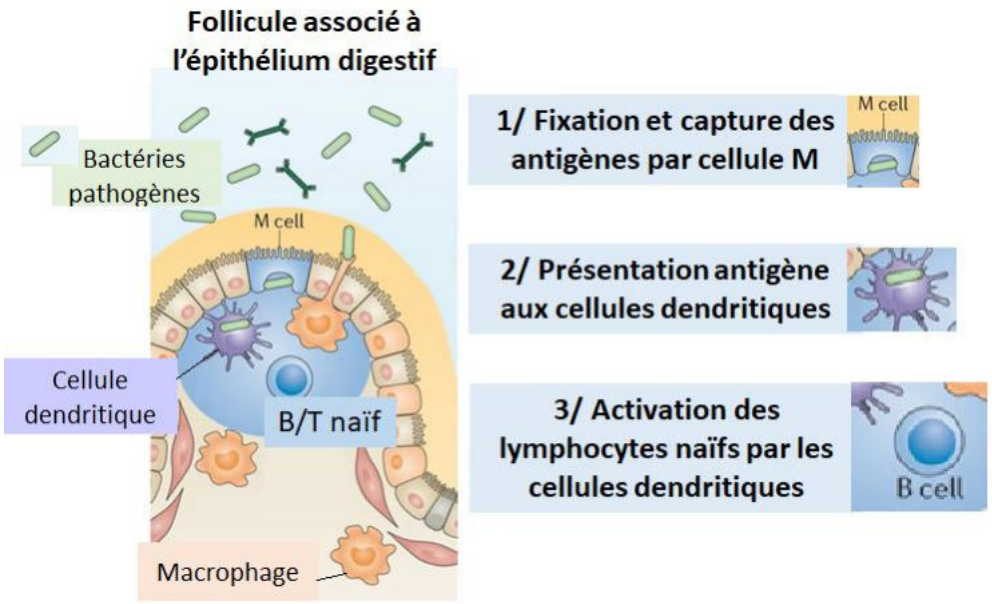


Figure 18 : Induction de la réponse inflammatoire au niveau d'un follicule du GALT. D'après Peterson et Artis (2014).

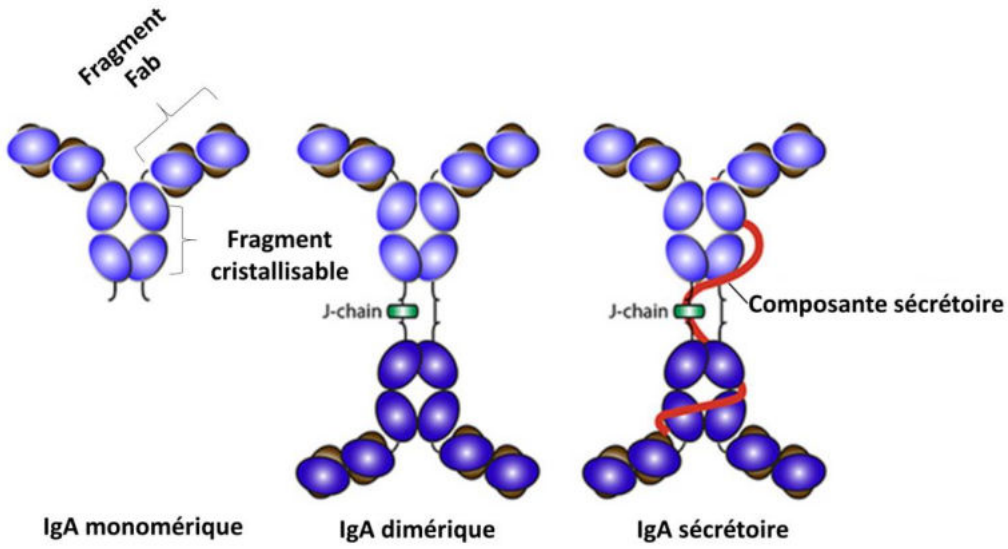


Figure 19 : L'immunoglobuline sécrétoire sIgA est composée de deux molécules d'IgA monomériques, associées par liaison covalente via une chaîne J, ainsi que d'une composante sécrétoire. Le fragment cristallisable permet au sIgA d'être reconnu par des effecteurs de l'immunité et d'activer le système du complément. Le fragment Fab (antigen binding fragment) assure la détection puis la fixation de l'antigène. D'après Breedveld et van Egmond, 2019.

Les lymphocytes B reconnaissent les motifs des antigènes prélevés par les cellules M, induisant une production d'immunoglobulines ciblées (Nakamura et al., 2018). Grâce aux

vaisseaux lymphatiques afférents, les lymphocytes activés se dirigent vers les ganglions mésentériques pour se différencier avant de rejoindre la circulation sanguine et finalement la muqueuse où ils poursuivent leur différenciation (Mowat, 2003). Les cellules B deviennent alors productrices d'IgA. Ces IgA sont d'abord produits sous forme dimérique dans la *lamina propria* puis se lient au récepteur d'immunoglobuline polymérique situé sur la surface basolatérale des cellules épithéliales (Figure 19). Le complexe formé est alors transporté par endocytose puis transcytose au travers jusqu'au lumen où il se présente sous forme d'IgA sécrétoire (sIgA) (Breedveld et van Egmond, 2019). Cette pièce sécrétoire confère aux IgA une protection essentielle contre les enzymes protéolytiques ce qui leur permet de rester ancré au sein du mucus tapissant la surface épithéliale (Phalipon et al., 2002). Les IgA de la muqueuse jouent un rôle central dans la protection de l'hôte, en amont dans le mucus, ou dans la *lamina propria* lorsque des antigènes parviennent à la pénétrer. En plus d'empêcher la pénétration de bactéries pathogènes, elles contribuant également à la diversification du microbiote, à la neutralisation des toxines et virus et elles augmentent la détection et le prélèvement d'antigènes (Breedveld et van Egmond, 2019). A la différence des IgM et IgG, les IgA activent peu le système du complément, qui favorise l'inflammation, l'opsonisation (recouvrement d'une molécule avant phagocytose), la lyse, la phagocytose et le recrutement des lymphocytes B (Woof and Kerr, 2006). Les IgA sont considérées comme des anticorps neutralisants non activateurs. Ainsi en fixant les pathogènes ou leurs sous-produits, les IgA empêchent leur fixation sur des sites de l'épithélium par exclusion immune (Breedveld et van Egmond, 2019). Enfin, après fixation de bactéries spécifiques, les IgA réduiraient l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Mantis et al., 2011). Ces spécificités confèrent aux IgA un rôle protecteur, qui permet d'éviter de soumettre la muqueuse à des traumatismes inflammatoires excessifs (Corthésy, 2007).

Le système immunitaire digestif doit faire face à une charge microbienne importante tout en évitant le déclenchement de signaux qui conduiraient à des réponses immunitaires excessives mettant en péril l'intégrité de l'intestin. Ceci est possible grâce à un contact direct limité entre bactéries intestinales et cellules épithéliales. Cette stratification est possible grâce au mucus (barrière physique), aux produits antibactériens produits par les cellules épithéliales et délivrés dans le lumen ainsi que par la présence d'IgA se fixant aux bactéries du lumen (barrière chimique). De plus, les cellules présentatrices d'antigènes engendrent des mécanismes immunitaires adaptés (activation de cellules T, maturation des lymphocytes, production de cytokines…) nécessaires au maintien de l'homéostasie intestinale.

II/ Rôle du microbiote intestinal dans la préservation de la santé

Les mammifères sont désormais considérés comme des holobiontes, qui sont le résultat de l'expression des gènes de leur propre génome et du génome collectif des bactéries (microbiome) qu'ils hébergent (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2018). En effet, le microbiote joue un rôle dans diverses fonctions physiologiques telles les fonctions neurologiques, digestives et immunitaires. La part des variations phénotypiques (qualité de la viande, efficience alimentaire…) attribuée au microbiote digestif fait désormais l'objet de nombreuses études (Delgado et al., 2019; Verschuren et al., 2020). L'importance du microbiote digestif dans la construction et la préservation de la santé de son hôte sera présentée dans cette partie. Nous présenterons comment le microbiote contribue aux défenses de l'hôte à la fois par son effet barrière contre les bactéries pathogènes et par la promotion de la maturation du système immunitaire intestinal.

A) Tolérance des bactéries commensales par le système immunitaire associé à la muqueuse

Le maintien des microbes commensaux n'est possible que grâce au phénomène de tolérance orale, c'est-à-dire de réactivité réduite de l'immunité en présence d'une communauté microbienne commensale, qui suppose que le système digestif soit capable de différencier nutriments, antigènes, micro-organismes propres ou exogènes potentiellement pathogènes (Tordesillas et Berin, 2018). Une allergie alimentaire correspond à une tolérance orale déficiente en présence d'antigènes d'origine alimentaire spécifiques (Stephen-Victor et Chatila, 2019) tandis que dans le cas d'inflammation chronique, la réponse immunitaire est dirigée contre le microbiote commensal (Simecka, 1998). Les mécanismes assurant la tolérance orale du microbiote commensal n'ont pas tous été élucidés, mais il semblerait que certains lymphocytes T CD4+ jouent un rôle essentiel (Bouladoux et al., 2013). Ces cellules T sont spécifiques pour les antigènes commensaux, et demeurent dans un état naïf lorsqu'elles sont exposées à ces derniers. Les sIgA et leur composante sécrétoire libre participent également à cette tolérance orale en ancrant les bactéries pathogènes dans le mucus et en favorisant au contraire la formation de biofilms par les bactéries commensales (Mantis et al., 2011). Enfin la réduction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires lorsque le tractus du nouveau-né est

colonisé par une le microbiote commensal constituerait un mécanisme permettant d'éviter un recrutement excessif des cellules immunitaires en développement (Fink et al., 2012).

B) Effet barrière

Une fonction majeure du microbiote est la protection contre la colonisation d'agents pathogènes et contre la surcroissance des pathobiontes indigènes (Kamada et al., 2013a; McKenney and Kendall, 2016). Le phénomène de compétition exclusive est un des mécanismes identifiés de cet effet barrière. Les bactéries commensales, particulièrement adaptées à leurs niches écologiques suite à des pressions de sélection (Abt et Pamer, 2014), limitent l'accès aux nutriments et aux sites d'attachement des bactéries opportunistes ou pathogènes. Ces bactéries commensales ont également développé des stratégies agissant directement sur la survie des pathogènes. Ainsi certains produits du métabolisme bactérien ont des propriétés antimicrobiennes tels que certains peroxydes, AGV ou peptides (Abt et Pamer, 2014) et peuvent contribuer à l'abaissement du pH réduisant ainsi la croissance des pathobiontes. Ces peptides d'origine bactérienne appartiennent à différentes familles, comme par exemple les défensines et cathélicidines, qui vont principalement déstabiliser les structures bactériennes des micro-organismes pathogènes présents dans le lumen (Sekirov et Finlay, 2009). Certaines bactéries commensales telles que *E. faecalis* contiendraient des bactériophages, virus attaquant les bactéries, ou produiraient des biosurfactants (Sekirov et Finlay, 2009) leur conférant ainsi un avantage compétitif. Le microbiote commensal peut également contrôler l'expression de facteurs de virulence des bactéries pathogènes en consommant l'oxygène résiduel du lumen (Kamada et al., 2013a). Enfin, certaines bactéries facilitent la fonction de barrière de l'hôte en stimulant la production de mucus (Kamada et al., 2013a).

C) Stimulation de l'immunité de l'hôte

1) Mise en évidence d'une immuno-modulation par le microbiote

L'importance du microbiote intestinal pour le développement du GALT a été montrée pour la première fois en empêchant la colonisation microbienne de l'appendice vermiforme du lapin nouveau-né (Perey et Good, 1968). La croissance de l'appendice était empêchée en absence de microbiote intestinal mais son développement pouvait être restauré en permettant une nouvelle colonisation microbienne. De même, les lapins axéniques présentent un GALT sous-développé ainsi qu'un répertoire d'anticorps réduit (Stěpánková et al., 1980; Lanning et al., 2000). Il

semblerait plus particulièrement que l'association des bactéries commensales *Bacteroides fragilis* et *Bacillus subtilis* participe à la maturation du GALT et à la diversification des gènes VDJ (Rhee et al., 2004). L'utilisation d'animaux de laboratoire axéniques a également révélé l'importance du microbiote intestinal pour la production de cytokines (molécules impliquées dans le dialogue inter-cellulaire lors d'une réponse immunitaire) et d'immunoglobulines (Sekirov et Finlay, 2009).

2) Régulation de l'immunité innée de l'hôte par le microbiote

La reconnaissance des motifs bactériens par des cellules épithéliales ou des cellules spécialisées (cellules M ou cellules dendritiques) permet l'activation de voies de signalisation cellulaires (Sekirov et Finlay, 2009) via l'activation des récepteurs (pattern recognition receptor, PRR). Par exemple, les récepteurs NOD2, fortement exprimés chez les cellules de Paneth, sont activés par les peptidoglycanes bactériens et peuvent induire la sécrétion de cytokines, l'autophagie, la formation de vésicules intra-cellulaires, des mécanismes de réparation de l'épithélium et induire la production de peptides antimicrobiens ou de mucus par les cellules en gobelet (Thaiss et al., 2016). Parmi les peptides antimicrobiens induits par le microbiote commensal, les alpha-défensines et RegIIIγ sécrétées par les cellules épithéliales jouent un rôle clé de l'immunité innée en contrôlant la croissance des pathogènes dans l'intestin (Kamada et al., 2013a; Cheng et al., 2019). Les métabolites bactériens, intermédiaires du dialogue muqueuse/microbiote, sont impliqués dans cette orchestration de l'immunité innée (Thaiss et al., 2016). En particulier, le butyrate semblerait intéressant pour le maintien de la barrière épithéliale, avec des mécanismes démontrés *in vivo* (Peng et al., 2007; Zheng et al., 2017). Parmi les mécanismes moléculaires impliqués dans le dialogue hôte-microbiote, de récentes études ont démontré une action épigénétique (mécanismes modifiant de manière réversible, transmissible et adaptative l'expression des gènes sans en changer la séquence nucléotidique) des métabolites bactériens au niveau de l'ADN, l'ARN ou au niveau des histones des tissus digestifs (Miro-Blanch et Yanes, 2019).

L'activation des PRR est également importante pour l'élimination des cellules infectées (Thaiss et al., 2016). Ainsi la détection de motifs microbiens ou de signaux de danger par certains PRR active l'inflammasome NLRC4, un complexe de l'immunité innée exprimée à l'intérieur des cellules épithéliales (Jamilloux and Henry, 2013). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines IL-1β et l'IL-18, nécessaires au recrutement de neutrophiles ainsi qu'au déclenchement d'une mort cellulaire programmée, permet l'expulsion

des cellules infectées et donc des pathogènes entériques (Kamada et al., 2013a; Jamilloux and Henry, 2013). Enfin, le microbiote agit indirectement sur la réponse immunitaire des cellules épithéliales en modulant leur métabolisme. Les AGV produits constituent le principal substrat énergétique des cellules épithéliales dans le gros intestin et vont affecter leur consommation de dioxygène et stabiliser l'expression des facteurs induits par hypoxie renforçant ainsi la barrière épithéliale (Kelly et al., 2015).

3) Régulation de l'immunité adaptative de l'hôte par le microbiote

Certaines bactéries telles que des Bacteroidetes ou des espèces de *Lactobacillus* permettent l'activation des cellules dendritiques du GALT, induisant la production de cytokines parmi une large gamme, modulant ainsi l'expansion des lymphocytes T-helper (Sekirov et Finlay, 2009). De manière générale, la colonisation du tractus digestif par le microbiote affecte la composition du GALT en augmentant le nombre de lymphocytes intra-épithéliaux et de cellules productrices d'immunoglobulines dans les follicules et la *lamina propria* (Stěpánková et al., 1980). Le microbiote agirait également sur la production d'immunoglobulines via un dialogue réciproque. Les IgA participent à la tolérance des bactéries commensales, qui en retour stimuleraient la production d'IgA sécrétoires (sIgA) en augmentant les quantités de récepteurs d'immunoglobuline polymériques des cellules épithéliales (Mantis et al., 2011; Breedveld et van Egmond, 2019). Cette interaction entre sIgA et microbiote commensal est positive pour l'hôte car elle permet non seulement de préserver le microbiote commensal mais elle contribuerait aussi à un renforcement direct de la barrière épithéliale avec notamment un renforcement des jonctions serrées (Mantis et al., 2011). Enfin, le microbiote participe activement à la diversification somatique du répertoire d'anticorps du lapin avec 90% des gènes Ig VDJ qui dépendent du microbiote intestinal pour leur diversification (Vajdy et al., 1998; Lanning et al., 2000).

L'action du microbiote intestinal n'est pas seulement limité à son effet « barrière » du fait de l'existence d'un dialogue entre microbiote et immunité susceptible de profondément moduler la santé du lapin. Le microbiote digestif joue ainsi un rôle clé dans le développement, la stimulation et l'éducation du système immunitaire. Une meilleure compréhension des facteurs susceptibles de moduler le microbiote digestif apparaît ainsi essentielle pour optimiser cette symbiose entre microbiote et hôte.

Chapitre IV – Modalités de contrôle du microbiote intestinal pour préserver la santé

Nous avons précédemment montré en quoi le microbiote digestif était un partenaire symbiotique essentiel à l'homéostasie intestinale. Nous montrerons dans ce chapitre que la période post-natale constitue une fenêtre d'action prometteuse pour contrôler l'implantation du microbiote et que la colonisation du microbiote digestif est fortement dépendante de l'ingestion d'aliment solide. Les dernières connaissances en date pouvant contribuer à moduler quantitativement et qualitativement l'ingestion d'aliment solide en début de vie du lapereau allaité seront enfin présentées.

I/ Pertinence d'apports alimentaires précoces pour moduler le microbiote

A) Intérêt d'une manipulation du microbiote au début de la vie

Comme précédemment démontré, le microbiote stimule le développement du système immunitaire, et participe en particulier à la construction du répertoire d'anticorps primaire chez le jeune lapin. Un meilleur contrôle de la colonisation microbienne précoce irait ainsi de pair avec une optimisation de l'immunité autour du sevrage. Chez l'homme, des effets à long terme du microbiote de l'enfant ont été démontrés dans le cas de pathologies survenant plus tard dans la vie, telles que les allergies ou l'obésité, suggérant que le microbiote en développement contribuerait à une programmation de la santé (Laitinen et al., 2017; Torow and Hornef, 2017). Plusieurs études montrent enfin que cette implantation microbienne ne saurait être décalée dans le temps. Ainsi la tolérance du microbiote commensal par le système immunitaire digestif peut être induite chez des souris axéniques par transplantation d'un microbiote « conventionnel » peu de temps après la naissance, tandis que cette procédure échoue lorsque le microbiote est inoculé chez des souris plus âgées (Sudo et al., 1997; Olszak et al., 2012). De même, l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF-α et IFNγ, classiquement observée au moment du sevrage et essentielle dans la régulation de l'immunité, ne peut être induite chez des souris élevées dans un milieu stérile que si un microbiote est transféré avant sevrage (Al Nabhani et al., 2019). Ces auteurs démontrent ainsi l'importance de la période précédant le sevrage durant laquelle le microbiote est capable d'induire des modifications physiologiques essentielles pour le développement de l'immunité de l'hôte.

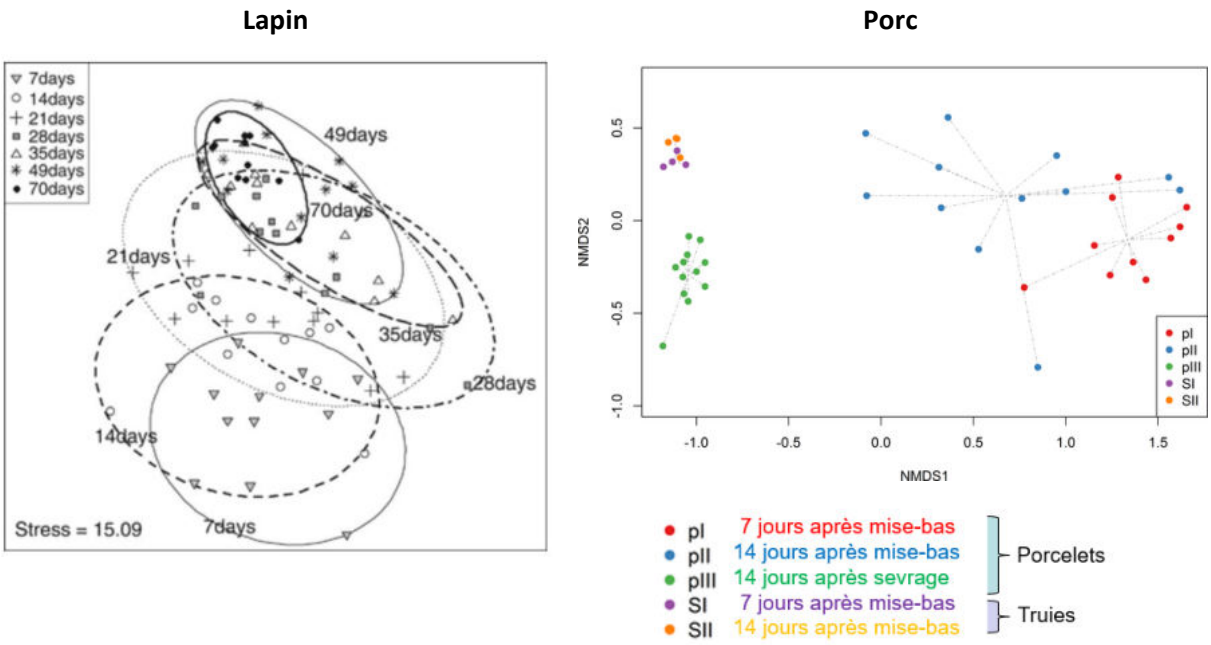


Figure 20 : Avec l'âge, les communautés microbiennes sont plus homogènes. A gauche : représentation nMDS des profils des communautés bactériennes caecale de lapins âgés de 7 à 70 jours (Combes et al., 2011). A droite : représentation nMDS des communautés bactériennes fécales de porcelets âgés de 7 à 42 jours et de truies au cours des 7 et 14 jours suivant la mise-bas (Motta et al., 2019). Chaque point représente un individu et deux points proches dans l'espace correspondent à des profils microbiens similaires.

Des interventions précoces visant à moduler le microbiote permettent non seulement d'optimiser les bénéfices santé mais s'avèrent également plus efficaces que ces mêmes interventions réalisées plus tardivement. En effet, le microbiote est plus variable chez des individus jeunes que chez des adultes, constante observée chez de nombreux mammifères (Combes et al., 2011; Yatsunenko et al., 2012; Motta et al., 2019; Figure 20). Ceci s'explique par une certaine permissivité du microbiote du nouveau-né, colonisé de façon aléatoire par les méta-communautés qui l'entourent dès la naissance (Curtis et Sloan, 2004). Le microbiote des individus s'uniformise avec l'âge de l'hôte, pour atteindre un état stable, dit de « climax » (Mackie et al., 1999). Toutefois des changements de communautés bactériennes surviennent à nouveau chez des individus très âgés (Nagpal et al., 2018). Il est donc considéré que le microbiote des adultes est plus résilient face à des perturbations que le microbiote du jeune (Laitinen et al., 2017). Ainsi la période post-natale constitue une fenêtre d'opportunité (Torow and Hornef, 2017) pour le pilotage du microbiote. Durant cette période, l'introduction de nouvelles espèces bactériennes bénéfiques, et/ou la stimulation de leur croissance, seraient facilitées. Chez le lapin, la période comprise entre la naissance et 49 jours d'âge apparaît opportune pour intervenir sur le microbiote puisqu'après cette période les communautés bactériennes apparaissent plus stables et donc plus difficilement modulables (Figure 20).

B) L'ingestion d'aliment solide orchestre l'installation du microbiote

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer le processus de colonisation microbienne. L'environnement maternel est particulièrement déterminant dans la construction de ce dernier, avec un effet plus marqué de la mère nourricière que de la mère génétique (Abecia et al., 2007b) notamment grâce aux fèces déposées dans le nid (Combes et al., 2014; Achard et al., 2019) ou à la composition de son lait (Fonty et al., 1979). L'apport d'antibiotiques modifie bien sûr le microbiote caecal, en réduisant sa diversité (Abecia et al., 2007a). De même, les conditions d'hygiène des élevages jouent sur la composition caecale bactérienne (Combes et al., 2017b) tout comme la composante génétique (Garreau et al., 2019) ou alimentaire (Zhu et al., 2013). Des analyses longitudinales réalisées sur différentes espèces ont permis de déterminer les événements majeurs affectant la colonisation bactérienne. Outre l'effet âge qui structure fortement le microbiote, le moment de l'introduction d'aliment solide dans le régime alimentaire est un déterminant majeur de la succession écologique des espèces bactériennes chez les mammifères (Koenig et al., 2011; Yáñez-Ruiz et al., 2015; Bian et al., 2016), puisque l'aliment solide (d'origine végétale) apporte des substrats au microbiote différents de ceux du lait. Chez le lapereau, de faibles quantités d'aliment solide ingérées seraient de ce fait capables d'induire une modulation microbienne majeure comme observé au démarrage de l'ingestion de solide entre 18 et 28 jours d'âge (Read et al., 2019). Durant cette période, bien que la part du lait demeure majoritaire (98% d'ingéré total frais à 18 jours et 72% à 27 jours), les apports d'aliments solides modifieraient profondément la composition microbienne avec de façon intéressante une réduction d'abondance des familles Campylobacteraceae, Desulfovibrionaceae et Enterobacteriaceae, pathobiontes éventuels, et des changements d'activité métabolique dont une hausse spectaculaire du butyrate (Beaumont et al., 2019). Ainsi les interactions entre aliment solide – hôte – microbiote représentent un triptyque marqué.

C) Quelles stratégies pour moduler les dynamiques d'implantation du microbiote ?

Plusieurs stratégies pour moduler la dynamique d'implantation du microbiote peuvent être envisagées. La composition initiale du microbiote (espèces pionnières) peut être modifiée en agissant sur l'environnement du nid et les facteurs maternels (1). Le processus de colonisation bactérienne pourrait être modifié avec un plan d'alimentation permettant d'atteindre différents profils bactériens au cours de la vie qui maximisent la symbiose hôte-microbiote (2). Une

accélération de la succession écologique des espèces bactériennes pour atteindre un état de « climax » plus rapidement pourrait être désirable puisque les lapins plus âgés sont moins susceptibles aux troubles digestifs (3) (Combes et al., 2013) (Figure 21). De manière générale, l'efficacité des interventions nutritionnelles précoces dépendra à la fois des composés utilisés pour favoriser la colonisation de micro-organismes spécifiques (variation de composition nutritionnelle, utilisation d'aliments fonctionnels ciblant certaines espèces…) et de la fenêtre d'action temporelle (Yáñez-Ruiz et al., 2015).

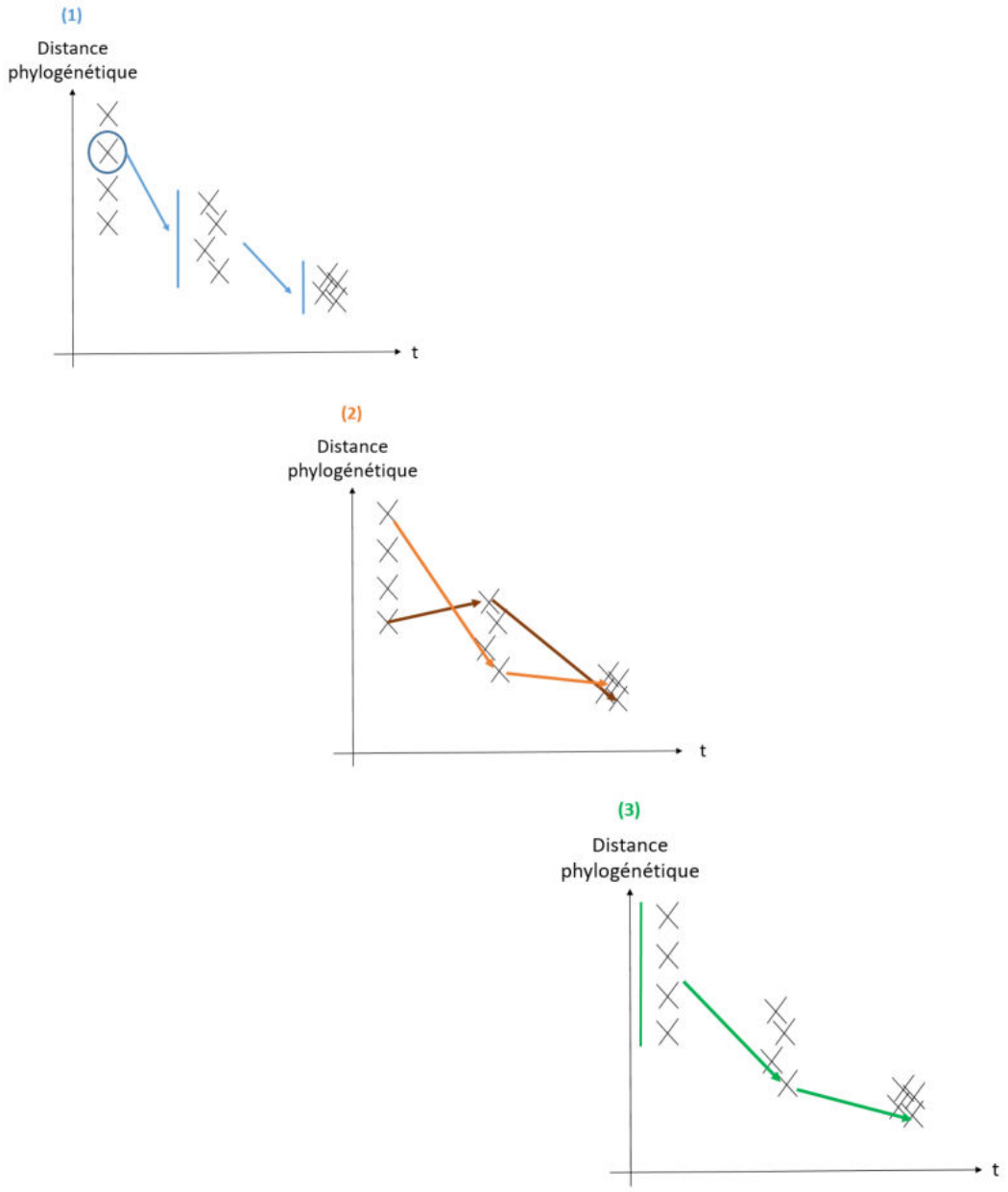


Figure 21 : Stratégies de manipulation précoce du microbiote. Chaque croix représente une communauté microbienne à un instant t. La première stratégie (1) consiste en une modulation de l'état initial du microbiote. Avec la stratégie (2), le chemin parcouru pour atteindre un microbiote final stable évolue de façon à optimiser l'interaction hôte/microbiote. Enfin la 3ème stratégie consiste à rejoindre plus rapidement un état mature.

Les précédents essais testant différents aliments péri-sevrage du lapereau et leurs conséquences sur l'implantation microbienne ont montré des premiers résultats encourageants. La supplémentation de luzerne déshydratée de 15 à 45 jours en complément d'un aliment standard permet d'augmenter le ratio Ruminococcaceae/Lachnospiraceae (Mattioli et al., 2019), un indicateur de santé intestinale (Combes et al., 2014). Différentes stratégies d'alimentation de 18 à 49 jours d'âge (variation des apports énergétiques ou protéiques) ont pour leur part permis d'agir sur la maturation microbienne (Read et al., 2019). En revanche, aucun de ces schémas expérimentaux n'ont testé la stimulation précoce d'aliment solide (pendant les deux premières semaines d'âge) mimant ainsi le comportement d'ingestion observé en condition naturelle (Hudson et Distel, 1982). Connaissant la forte permissivité du microbiote en début de vie (Figure 20), les effets d'une ingestion précoce de fèces au nid sur l'implantation microbienne (Combes et al., 2014) et la capacité naturelle du nouveau-né à consommer un substrat solide (voir Chapitre I), une intervention alimentaire précoce représente une stratégie d'ingénierie du microbiote prometteuse pouvant répondre aux trois stratégies présentées en Figure 21.

La période post-natale représente une période pertinente pour la manipulation du microbiote digestif du jeune. Chez le lapereau, cette fenêtre d'action serait comprise entre la naissance et 49 jours d'âge avec des effets marqués de l'introduction d'aliment solide sur le remodelage du microbiote digestif. Cette manipulation précoce du microbiote en développement peut être réalisée par la stimulation de l'ingéré solide en début de vie, avec un contrôle des nutriments apportées.

II/ Optimiser l'ingestion d'aliment solide en début de vie

Immunité, microbiote et aliment sont étroitement associés. Moduler les apports alimentaires solides, en particulier au début de la vie, permettrait ainsi d'agir directement sur cet ensemble et *in fine* d'améliorer la santé du jeune lapin. Compte tenu des difficultés rencontrées autour du sevrage du lapin, diverses actions nutritionnelles ont été envisagées par le passé afin d'améliorer la transition alimentaire lait – aliment solide. Tout d'abord, les différents leviers d'action permettant de stimuler l'ingestion d'aliment solide du lapereau sous la mère seront présentés (Tableau 3). L'avancée des connaissances relatives aux besoins nutritionnels du lapereau sera ensuite détaillée pour proposer un aliment adapté au lapereau allaité.

A) Stimulation de l'ingestion solide au début de la vie pour façonner le microbiote en développement

1) Modifier l'ingestion de liquide pour stimuler l'ingestion d'aliment

Un lien étroit existe entre quantités d'ingéré lacté et d'ingéré solide (granulés). Ainsi, une réduction de la disponibilité en lait induite soit par une réduction de la taille de portée (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2000; Di Meo et al., 2003) soit par un sevrage précoce à partir de 21 jours d'âge (Xiccato et al., 2003; Kovács et al., 2012) augmente de façon significative l'ingestion de granulés par les lapereaux (Figure 22). Cette stimulation de la prise de granulés promeut l'activité du microbiote caecal (évaluée par la quantification de paramètres fermentaires) et accélère le développement pondéral du tractus digestif (Xiccato et al., 2003; Kovács et al., 2012). Au contraire le maintien d'une alimentation lactée inhibe le développement du microbiote et notamment de la flore cellulolytique (Padilha et al., 1996, 1999). Toutefois le poids au sevrage de lapereaux ayant ingéré moins de lait était réduit (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2000 ; Feugier et al., 2005; Kovács et al., 2012). Or, un faible poids au sevrage est souvent associé à un risque accru de mortalité en engraissement (Feugier et al., 2005; Assan, 2018). De plus, un sevrage anticipé augmente la sensibilité du lapereau aux infections colibacillaires (Gallois et al., 2005a) en lien avec l'arrêt des apports en composés immunoprotecteurs du le lait de lapine (Gallois et al., 2007 ; Skrivanova et al., 2009). Par conséquent, un arrêt précoce de l'ingestion de lait pour stimuler l'ingestion d'aliment solide est un bon modèle expérimental mais semble peu pertinent pour une application en élevage compte tenu des risques sanitaires observés lors de sevrages précoces.

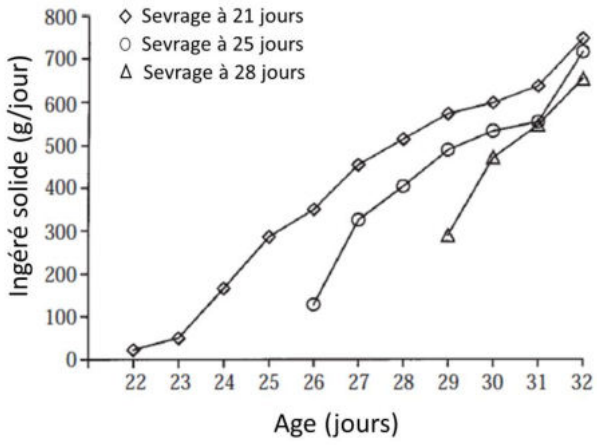


Figure 22 : L'ingestion d'aliment solide du lapin est stimulée par l'arrêt des apports lactés. D'après Xiccato et al., 2003.

Chez des lapins adultes, la consommation d'eau et d'aliment solide sont corrélées positivement (Prebble et Meredith, 2014) et cette relation est linéaire (Cizek, 1961). L'aliment distribué aux lapereaux d'élevage étant déshydraté (environ 90% de matière sèche), l'accès à l'eau représente un facteur essentiel de contrôle de l'ingestion solide. Hors du nid, il a toutefois été montré que la consommation d'eau des lapereaux était identique, que l'accès à l'eau soit facilité (par le biais d'abreuvoirs abaissés ou posés sur le sol) ou non (Maertens et Groote, 1990; Gidenne et al., 2002).

2) Améliorer l'accessibilité de l'aliment solide

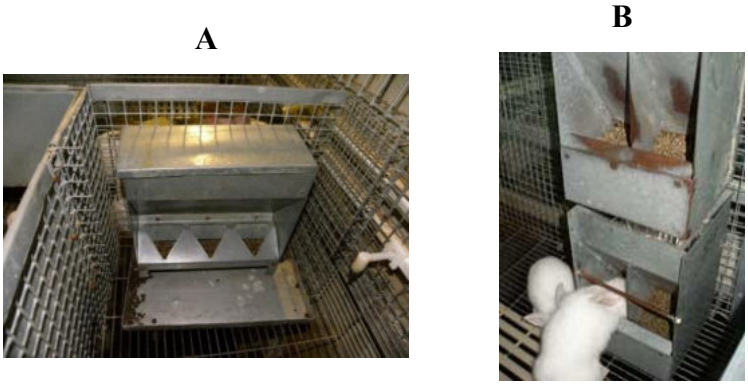


Figure 23 : Exemple de dispositifs facilitant l'ingestion d'aliment par le lapereau. Ces mangeoires spécifiques permettent également d'évaluer de façon distincte l'ingestion des femelles et de leurs lapereaux.
A : Dispositif de Fortun-Lamothe et al. (2000). Les mangeoires des lapereaux sont situées dans un espace inaccessible aux femelles et se caractérisent par des ouvertures en triangle pour limiter le gaspillage. Le plateau situé sous la mangeoire permet d'évaluer les gaspillages éventuels.
B : Dispositif de Travel et al. (2009). Les lapereaux accèdent facilement aux mangeoires placées au niveau du sol tandis que l'accès aux femelles est empêché grâce à une barre horizontale. Les femelles consomment ainsi leur aliment dans des mangeoires surélevées.

Plusieurs solutions permettent d'améliorer la disponibilité de l'aliment solide tout en maintenant l'allaitement. La mise en place de mangeoires adaptées aux lapereaux et d'un logement empêchant la femelle d'y accéder ont été testés en conditions expérimentales (Figure 23). Ces dispositifs ont permis de préciser le comportement alimentaire du jeune lapereau dès qu'il est apte à quitter le nid (Debray et al., 2002; Gidenne et al., 2007a; Read et al., 2016). Ces dispositifs ont également montré que la stratégie nutritionnelle avant sevrage (teneur en énergie digestible et protéines digestible) conditionnait le poids des lapereaux au sevrage et à la vente (Read et al., 2015) ainsi que l'ingestion de lait (remplacement de l'amidon par les fibres ; Debray et al., 2002). Malgré la mise à disposition de mangeoires adaptées aux lapereaux, il semblerait cependant que ces derniers préfèrent consommer dans les mangeoires des femelles (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2003).

La mise à disposition d'un aliment directement dans la boîte à nid a également été testée en conditions expérimentales soit via l'apport de granulés reconstitués de 3 à 15 jours d'âge (Kacsala et al., 2018) ou de granulés classiques à partir de 8 jours d'âge (Combes et al., 2017a) soit un peu plus tardivement avec des dispositifs combinant granulés et chicorée fraîche (Castellini et al., 2007) ou granulés et herbe fraîche/luzerne déshydratée à partir de 15 jours (Mattioli et al., 2019). Ces aliments étaient consommés par les lapereaux avec une bonne appétence pour la chicorée (16 g d'ingérés quotidiens par lapereau entre 15 et 28 jours). Une hausse de l'ingéré de granulés pré-sevrage était également observée lorsque de l'herbe ou de la luzerne étaient apportés. L'apport de chicorée dès 15 jours d'âge, un aliment riche en fructo-oligosacccharides et inuline, permettait de moduler l'activité fermentaire caecale (réduction du pH et NH_3 et hausse du contenu en AGV) associée à une augmentation de la taille de l'appendice vermiforme et de la taille des plaques de Peyer (Castellini et al., 2007). La stimulation d'ingestion solide avant le sevrage via l'apport de composés fibreux en complément des granulés était associée à une hausse de l'abondance du phylum Firmicutes ainsi que du ratio Ruminococcaceae/Lachnospiraceae, deux indicateurs de maturité (Mattioli et al., 2019). Ces premiers éléments suggèrent l'intérêt d'une stimulation précoce de l'ingestion solide pour piloter le microbiote.

3) Autres stratégies de stimulation de la prise alimentaire précoce

Le gavage des lapins par intubation gastrique a été utilisé dans le passé sur des lapins âgés de 13 à 24 jours (Presch, 1984). L'apport journalier de 66 grammes de matière sèche par cette méthode permettait certes une hausse des poids vifs à 25 et 28 jours mais était associée à des taux de survie plus faibles avec une hausse des cas de diarrhée notamment. Cette méthode représente une technique expérimentale uniquement, et d'autres méthodes plus respectueuses du bien-être animal permettant d'augmenter l'ingestion solide volontaire doivent donc être envisagées.

Le lapin présente un comportement alimentaire sélectif. Une telle sélectivité a été démontrée en conditions sauvages où les lapins sélectionnaient les plantes disponibles pour leur consommation (Bhadresa, 1977) avec un pâturage sélectif même parmi différentes variétés d'orges de printemps (Bell et Watson, 1993), comportement nécessaire à la survie de cette espèce herbivore pour éviter l'ingestion de plantes toxiques (Altbäcker et al., 1995). Un comportement identique est observé chez les lapins de compagnie (Prebble et Meredith, 2014)

tout comme chez le lapin d'élevage élevé en cage (Maertens, 2010; Mattioli et al., 2019) ou au pâturage à l'extérieur (Legendre et al., 2019).

L'appétence de l'aliment apparaît essentielle pour initier la prise alimentaire, et cette appétence dépendra de plusieurs composantes telles que la valeur nutritionnelle de l'aliment, sa perception sensorielle, ou encore des expériences passées de l'individu. Concernant la perception sensorielle des aliments, il est connu que les caractéristiques physiques des granulés influencent l'ingestion des lapins en croissance (Maertens, 1994). Des efforts ont été menés pour identifier les préférences alimentaires du lapereau allaité en termes de granulés mais ces études se heurtent à une confusion d'effets entre composition nutritionnelle de l'aliment, taille et dureté des granulés (Gidenne et al., 2007a; Travel et al., 2009). Enfin, l'ingestion volontaire est affectée par les expériences déjà vécues par l'individu avec notamment un apprentissage qui débuterait avant la naissance. Ainsi les lapereaux démontrent des préférences pour les aliments préalablement reçus par leur mère pendant la gestation et la lactation (Bilkó et al., 1994; Altbäcker et al., 1995; Coureaud et al., 2002, 2008b). Le lapin sevré est capable de réguler son ingestion dans une certaine gamme de concentration énergétique par le biais de modifications des teneurs en AGV sanguins et de la glycémie (Gidenne et al., 2010b). Chez le lapereau allaité, les mécanismes de régulation de l'ingestion solide selon la valeur nutritionnelle de l'aliment sont moins clairs, notamment en raison d'interactions entre compositions nutritionnelles et caractéristiques physico-chimiques de l'aliment (Gidenne et al., 2007a). Il semblerait toutefois que les jeunes lapereaux ne régulent pas leur ingestion en fonction de la densité énergétique de l'aliment mais préfèreraient au contraire un aliment riche en énergie (Read et al., 2016) ou enrichi en amidon (Debray et al., 2002). Ainsi, à condition de mieux connaître les déterminants de l'ingestion solide du lapereau, la composition nutritionnelle de l'aliment pourrait être un levier permettant de la favoriser.

L'ingestion d'aliment solide du lapereau non sevré est liée aux disponibilités en lait et en eau. L'utilisation de dispositifs expérimentaux d'alimentation mère-jeunes séparée a enrichi nos connaissances sur le comportement alimentaire du jeune lapin mais les déterminants de l'ingestion précoce (avant 15 jours d'âge) demeurent méconnus. Introduire un aliment appétant représente une piste pertinente pour stimuler la prise alimentaire précoce. L'acquisition de connaissances supplémentaires relatives aux préférences du lapereau apparaît ainsi essentielle.

Tableau 3 : Diversité des stratégies possibles pour stimuler la prise alimentaire précoce

Stratégie	Avantages	Limites	Références
Réaliser des incubations gastriques	Apports conséquents d'aliments solides et contrôle de l'ingestion	Ethique et bien-être animal Non applicable en élevage	Presch, 1984
Sevrer précocement	Stimule l'ingestion volontaire d'aliment et réduit la sollicitation des lapines	Problèmes de croissance et dégradation potentielle du statut sanitaire	Pascual, 2001; Xiccato et al., 2003; Gallois et al., 2007
Améliorer l'accès à l'eau	Pourrait favoriser la consommation d'aliment	Besoin d'aménagements de cages et d'études supplémentaires pour valider leur pertinence	Maertens et Groote, 1990; Gidenne et al., 2002
Mettre à disposition un aliment dans la boîte à nid	Démarrage de l'ingestion stimulée et premiers éléments montrant des effets sur le fermenteur caecal	Niveaux d'ingestion solide non quantifiés et études supplémentaires nécessaires	Castellini et al., 2007; Kacsala et al., 2018; Mattioli et al., 2019
Améliorer l'appétence des aliments pré-sevrage	Pourrait favoriser l'ingestion volontaire d'aliment en s'adaptant aux spécificités du lapereau	Besoin d'études permettant de discriminer les éléments modulant l'attractivité de l'aliment	Gidenne et al., 2007; Travel et al., 2009
Exploiter le continuum chimique entre environnements pré et post-natal	Orientation sélective des lapereaux pour des arômes présents dans l'aliment maternel démontrée	Nécessité de voir si les préférences développées favorisent l'ingestion en l'absence de choix	Bilkó et al., 1994; Altbäcker et al., 1995; Coureaud et al., 2002, 2008b

B) Adapter les apports nutritionnels au lapereau et à son microbiote

Les besoins nutritionnels du lapereau allaité ont fait l'objet de peu d'études. En effet en conditions d'élevage classiques, une seule mangeoire par cage est présente et les lapereaux reçoivent généralement le même aliment que leur mère alors que leurs besoins sont considérés antagonistes (Gidenne and Fortun-Lamothe, 2002). Dans de tels systèmes, un aliment riche en énergie est généralement apporté pendant les quatre premières semaines de lactation pour répondre aux besoins de la femelle puis un aliment plus riche en fibres est apporté à l'ensemble des animaux de la cage pour préparer les lapereaux à la transition alimentaire du sevrage (Figure 24). Ce plan d'alimentation fondé sur des compromis nutritionnels ne permet pas de formuler un aliment spécifiquement dédié au lapereau. De plus il est essentiel de proposer un aliment adapté aux femelles pour ne pas altérer leur production laitière (Xiccato, 1996). De ce fait, l'utilisation de deux mangeoires comme dans les dispositifs d'alimentation mère-jeunes séparée présentés ci-dessus est essentiel pour collecter des informations relatives aux besoins nutritionnels du lapereau sous la mère. Enfin de tels essais nécessitent un suivi de l'ingestion précis puisqu'au démarrage de l'ingestion solide les consommations observées sont de faibles ampleurs.

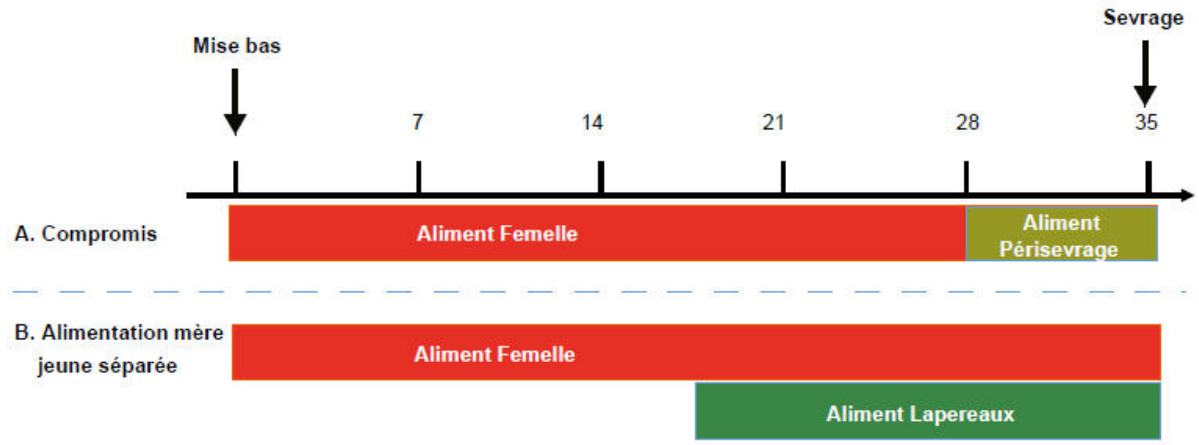


Figure 24 : Exemple de plans d'alimentation couramment employés avant le sevrage en conditions commerciales (A) ou avec des dispositifs expérimentaux proposant deux types d'aliments via deux mangeoires différentes (B). La première stratégie (A) se veut un compromis entre besoins énergétiques des lapines et préparation des lapereaux au sevrage. La seconde stratégie permet d'optimiser les apports alimentaires sans pénaliser les femelles avec un aliment riche en énergie (généralement ≥2500 kcal/kg) apporté de façon constante. L'aliment lapereau permet quant à lui de répondre aux besoins en fibres de la portée. D'après Combes et al., 2018.

Comme montré dans le chapitre II, les différents types de fibres sont impliqués dans le statut sanitaire des lapins (Gidenne, 2015b) du fait de leur action sur l'activité du microbiote

caecal ou sur le transit digestif, et un apport équilibré en fibres est déterminant pour la santé digestive (Rebours et al., 2019). L'apport d'amidon permet d'augmenter la concentration énergétique de l'aliment et ainsi d'accroître les performances de croissance et d'efficacité alimentaire. L'utilisation de dispositifs d'alimentation mère-jeunes séparée a permis de montrer que des apports peu énergétiques mais élevés en lignocellulose (ADF à 20 ou 21%) dans l'aliment du lapereau, combinés à un aliment énergétique (énergie digestible à 2964 kcal/kg de MS, teneur en amidon à 17%) pour la lapine, apparaissaient optimaux pour la croissance des portées et leur viabilité en engraissement (Debray, 2002; Piccolo et al., 2005). La distribution d'un aliment riche en lignines (ADL à 6,4% vs ADL à 4,5%) permettait en outre de réduire la mortalité en post-sevrage (2,6% vs 6,1%) (Morisse, 1988). A des échelles plus fines, il a été montré que l'intégrité et les fonctions immunitaires de la muqueuse intestinales de l'hôte peuvent être modulées par les apports en fibres. Ainsi, l'augmentation du ratio fibres totales/amidon permet d'augmenter le nombre de cellules M de l'appendice vermiforme chez des lapins de 52 et 62 jours (Zhu et al., 2013). Une hausse des apports en fibres solubles chez des lapereaux de 35 jours, sevrés depuis 10 jours, permet d'augmenter la longueur des villosités ainsi que l'activité sucrase des enzymes de la bordure en brosse du jéjunum avec une digestibilité iléale de l'amidon améliorée (Gomez-Conde et al., 2007).

Les substrats parvenant dans le caecum sont susceptibles de moduler les paramètres physico-chimiques des biotopes microbiens, agissant en retour sur l'activité et le taux de multiplication des micro-organismes présents. Ainsi, la recherche d'un aliment de composition optimale, qui favoriserait l'installation et la maturation du microbiote intestinal, peut être combinée avec une stratégie de stimulation de l'ingéré solide. D'un point de vue microbien, l'ajout de pectines favorise la production d'AGV dans le caecum, tandis que l'activité fermentaire est réduite lorsque le degré de lignification des fibres augmente (Gidenne, 2015b). On distingue ainsi les fibres rapidement fermentescibles (pectines insolubles, hémicellulose, fibres solubles) fortement dégradées dans le segment caeco-colique, des fractions lentement fermentescibles (lignocellulose) et donc faiblement dégradées par le microbiote en raison d'un temps de rétention trop court dans le caecum. L'origine botanique des fibres influence également la digestibilité de l'aliment et les fermentations caecales (Gidenne, 1996). Concernant les apports d'amidon, la proportion d'amidon fermentée dans le caecum par rapport à celle digérée dans l'intestin grêle est mal connue à ce jour (Gidenne, 1996), mais les données disponibles chez le lapin adulte ou le lapereau allaité (Gallois et al., 2008a) indiquent qu'une très faible part d'amidon parvient au caecum (entre 1 et 6%). Il est démontré que l'amidon

module très peu l'activité du microbiote caecal du lapin. C'est pourquoi une stratégie de formulation consiste à partiellement remplacer l'amidon par des fibres rapidement fermentescibles, qui permettraient d'optimiser l'activité microbienne caecale (Gidenne, 1996).

L'utilisation d'additifs tels que les probiotiques, prébiotiques, ou leur combinaison les synbiotiques, est répandue dans l'alimentation humaine comme animale et vise à une action ciblée sur le microbiote. Par définition, l'administration de probiotiques dans l'aliment permet l'ingestion de micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels (FAO/OMS, 2002). Lorsque l'aliment maternel était supplémenté en spores du genre *Bacillus* (Maertens et al., 2010) peu d'effets sur les performances zootechniques des lapereaux avant sevrage étaient observés. L'administration de bactéries *Bacillus* en engraissement n'affectait pas les paramètres fermentaires (Maertens et al., 2010) avec des effets sur la mortalité post-sevrage limités (mélange de bactéries des genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bacillus*, Hollister et al., 1990). Plus récemment, l'utilisation de souches de *Lactobacillus acidophilus* combinées avec *Bacillus subtilis* dans l'aliment apporté en engraissemenet était associée à une amélioration des performances zootechniques et une modulation des populations bactériennes présentes dans le caecum (coliformes et bacillis) (Phuoc et Jamikorn, 2017). Les prébiotiques sont quant à eux définis comme des substrats qui sont utilisés de façon sélective par les micro-organismes de l'hôte, conférant ainsi un avantage en termes de santé (définition de l'association scientifique internationale pour les probiotiques et prébiotiques, Gibson et al., 2017). L'évolution de cette définition ces dernières années a permis d'élargir la liste des composés à effet prébiotique (Bindels et al., 2015). Ainsi outre les oligosaccharides (inuline, fructo-oligossacharides FOS, galacto-oligossacharides GOS, mannan-oligossacharides MOS…) qui sont reconnus comme ayant une action prébiotique, l'amidon résistant, les fibres rapidement fermentescibles (pectines ou hémicelluloses fermentescibles appellées arabinoxylanes), les acides linoléiques ou encore certains composés phénoliques représentent de nouveaux candidats prébiotiques (Slavin, 2013; Bindels et al., 2015; Zaman et Sarbini, 2016).

Chez le lapin, l'enrichissement de l'aliment en MOS à hauteur de 0,1-0,3% à partir de 18 ou 25 jours d'âge favorisait la production d'acides gras volatils (Volek et al., 2007; Oso et al., 2013). L'inuline incorporée à 4% dans l'aliment pré sevrage (Volek et al., 2007) ou à 2% en fin d'engraissement (Maertens et al., 2004) favorisait également l'activité caecale. Finalement, nos connaissances concernant les molécules à effets prébiotiques et probiotiques ainsi que la

disponibilité des produits disponibles évoluent rapidement. Leur intérêt pour la construction du microbiote du lapereau demande à être documenté.

Les connaissances relatives aux besoins nutritionnels du lapin avant sevrage sont encore aujourd'hui limitées en lien avec la nécessité d'imaginer de nouvelles méthodes d'études. Comme pour le lapereau en engraissement, un antagonisme existe entre les effets des apports d'amidon et fibres, le premier étant nécessaire à la croissance des animaux voire à l'appétence de l'aliment, tandis que les fibres permettent de maintenir un bon statut sanitaire (en particulier les fractions ADF et ADL). Les fibres rapidement fermentescibles (hémicelluloses et pectines notamment) constituent des prébiotiques potentiels qui pourraient permettre de stimuler l'activité du microbiote. L'acquisition de nouvelles connaissances sur les besoins en nutriments de l'hôte et de son microbiote doit être poursuivie pour pouvoir formuler un aliment adéquat à l'intention de très jeunes lapereaux.

Problématique et objectif de recherche

Le sevrage, qui marque notamment la fin des apports lactés chez le lapin, constitue une période à risque sanitaire élevé. Des modifications profondes de la physiologie du lapereau surviennent autour du sevrage, lapereau dont le système immunitaire est encore en construction et le microbiote digestif en évolution. Le microbiote digestif joue un rôle clé dans le développement, la stimulation et l'éducation du système immunitaire. Piloter l'implantation du microbiote dès le plus jeune âge représente ainsi un levier d'action potentiel de préservation de la santé du lapin. L'aliment constitue une des variables de contrôle du microbiote digestif, en particulier au début de la vie. Bien que le lapereau soit capable de consommer un substrat solide de façon précoce comme observé en conditions naturelles, il ne dispose d'aliment que tardivement dans les conditions d'élevage actuelles. De plus, l'aliment mis à disposition avant sevrage n'est pas formulé pour répondre spécifiquement aux besoins du jeune hôte et de son microbiote. L'amélioration de la transition alimentaire préalable au sevrage via la stimulation de l'ingéré précoce représente par conséquent une stratégie biomimétique (mise à disposition d'un aliment solide comme observé dans les terriers en conditions naturelles) pertinente pour piloter le microbiote digestif et ainsi favoriser le développement du système immunitaire.

Dans ce cadre, **notre objectif de recherche était de comprendre les déterminants de l'ingestion précoce du lapereau allaité de manière à la stimuler et ainsi de promouvoir l'installation d'un microbiote digestif favorable à la santé de l'hôte**. Nous avons posé l'hypothèse que l'évolution du microbiote induite par des apports d'aliments solides à un stade précoce favoriserait son dialogue avec l'hôte, garantissant ainsi un développement et un apprentissage optimal du système immunitaire du lapereau. La finalité de ce travail de thèse est de proposer des nouvelles pratiques alimentaires en élevage cunicole favorisant un meilleur pilotage de la santé.

Stratégies de recherche

Démarche expérimentale

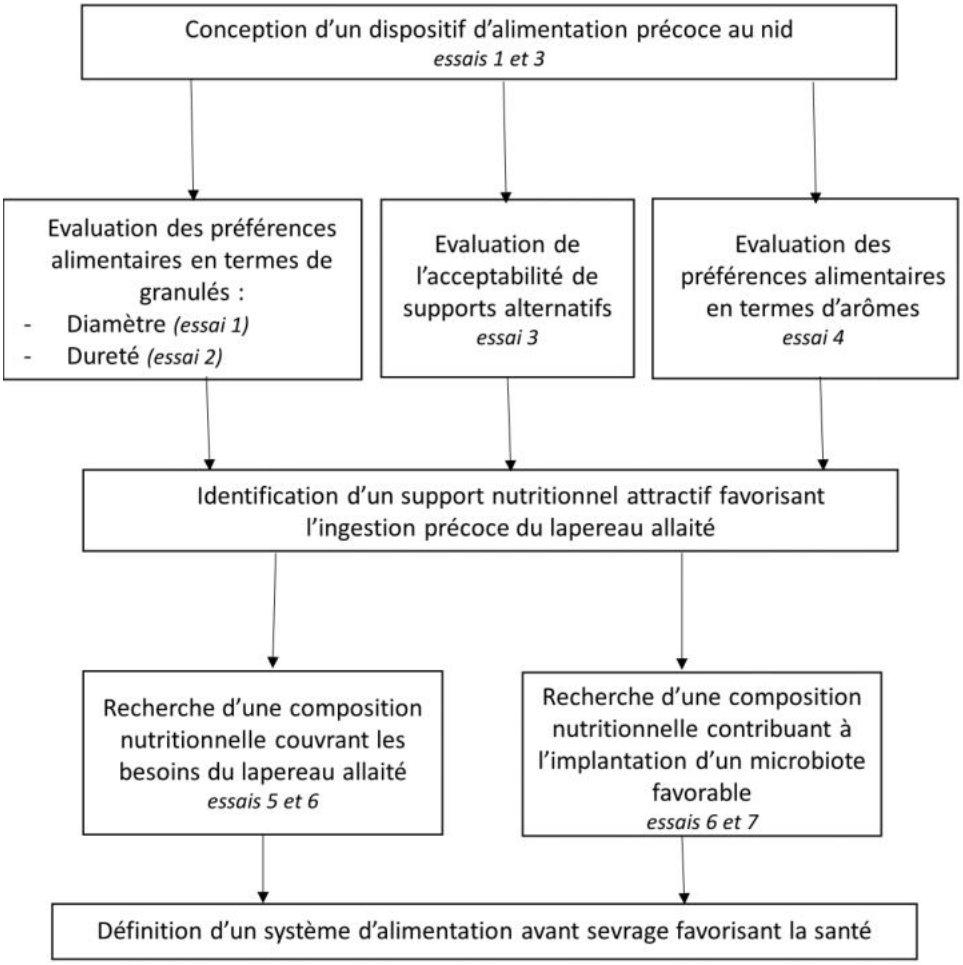


Figure 25 : Stratégie de recherche du travail de thèse. Dans un premier temps, l'étude du comportement alimentaire du lapereau allaité a permis de concevoir un dispositif de mise à disposition d'aliment solide et d'identifier un support nutritionnel attractif. Fort de ces prérequis, les effets d'une alimentation précoce sur la capacité digestive, les performances de croissance, le microbiote et des paramètres de santé ont été évalués en faisant varier le type d'apports (macronutriments, additifs).

Pour atteindre cet objectif, nous avons **conçu un dispositif de mise à disposition d'un support nutritionnel** dans le nid permettant de favoriser l'ingestion et de la quantifier (essais 1,2 et 3). Au début de ce projet de thèse, nous avons décidé d'écarter l'idée de proposer un aliment substitut de lait afin de favoriser la transition alimentaire du lapereau vers un régime solide. En élevage, la granulation est répandue car elle permet une large modularité de la composition nutritionnelle. C'est pourquoi nous avons dans un premier temps privilégier ce support et **étudier les préférences alimentaires en termes de caractéristiques physiques du**

granulé du lapereau non sevré (essais 1 et 2, publications au journal « Animal Feed Science and Technology » et data paper dans le journal « Data In Brief », chapitre 1). Un troisième essai a permis de tester pour la première fois l'**acceptabilité de supports innovants alternatifs aux granulés** pour mieux prendre en compte les spécificités alimentaires du jeune lapin **(**essai 3, article 2 publié dans le journal « animal »). Connaissant les capacités olfactives développées du lapereau, notre quatrième essai s'est intéressé **à l'intérêt de l'ajout d'arômes dans l'aliment apporté au nid et aux conséquences sur les préférences alimentaires (**essai 4, publication au journal « animal »). Ces 4 essais préalables ont permis de comprendre les déterminants de l'ingestion précoce d'aliment et de construire des outils indispensables pour la suite de notre démarche.

Afin d'apporter des connaissances sur les **besoins nutritionnels du lapereau allaité**, nous avons étudié avant sevrage la digestibilité de deux aliments ne différant que par leur ratio fibres digestibles/amidon (essais 5 et 6) et leur impact sur les performances de croissance jusqu'à la vente des animaux (publication 4 en préparation).

Les effets d'une stimulation précoce de l'ingéré solide sur **l'implantation du microbiote et son activité** ont enfin été évalués dans nos sixième et septième essais. Différents types de substrats destinés aux fermentations bactériennes ont été testés : des aliments complets variant par leur ratio fibres digestibles/amidon (essai 6) ou des aliments enrichis en prébiotiques (essai 7). Les conséquences sous-jacentes d'un dispositif d'alimentation précoce sur la santé ont été investiguées plus spécifiquement (statut immunitaire, expression de gènes…) (publication 5 en préparation et publication 6 soumise dans Frontiers in Microbiology).

Contrôle des conditions d'élevage

La méthode de conduite d'élevage s'est voulue commune aux 7 essais, tous réalisés au sein de la station expérimentale cunicole de GenPhySE entre décembre 2016 et mai 2018. Afin de maîtriser la génétique du cheptel, le troupeau de femelles initialement présent a été maintenu tout le long de la thèse avec l'introduction de nouvelles femelles issues du même élevage reproducteurs à deux reprises. Dans toutes les expérimentations, les portées ont été égalisées à 10 lapereaux à 2 jours d'âge (J2) sans remplacement en cas de mort. Les lapereaux ne sont identifiés individuellement qu'à partir du sevrage à J35. Ainsi. le suivi zootechnique avant sevrage (ingestion de lait et d'aliment, poids de portées, statut sanitaire, voir Figure 25) a été réalisé à l'échelle de la portée tandis que des pesées individuelles ont été réalisées après sevrage.

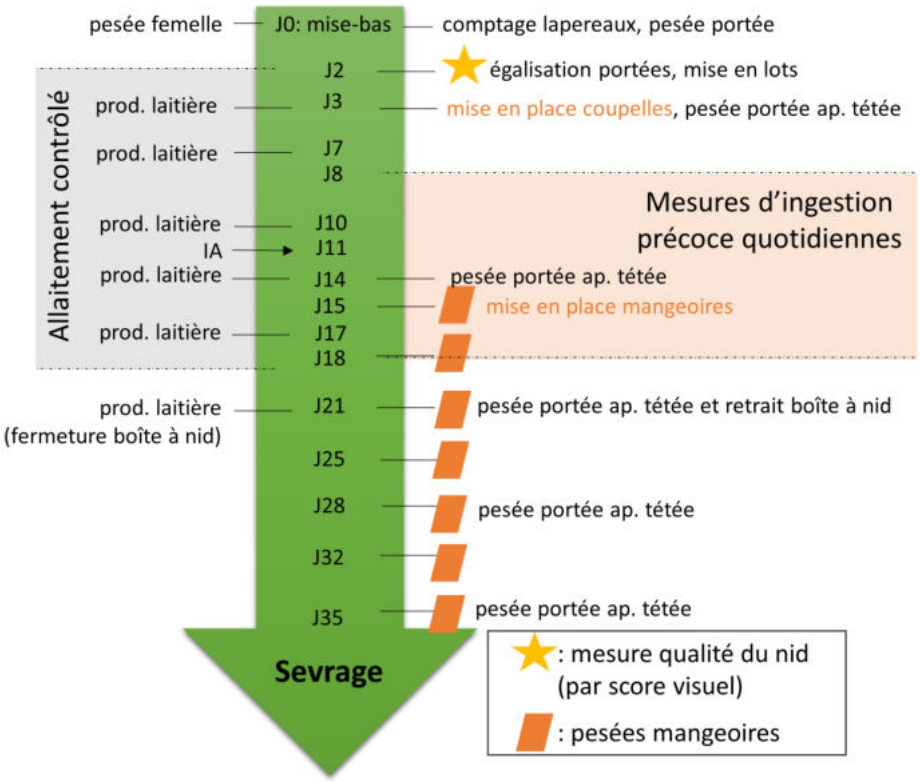


Figure 26 : Synthèse de la conduite d'élevage avant sevrage et des mesures phénotypiques communes aux essais. « Prod. Laitière » réfère aux mesures de production de lait des lapines, qui équivaut à la consommation de lait des lapereaux, réalisées par pesée des femelles avant puis après tétée. « Pesée portée ap. tétée » réfère à la pesée des lapereaux après tétée et « IA » à insémination artificielle.

Les cages employées en maternité correspondent à des dispositifs expérimentaux permettant de mesurer séparément l'ingéré solide des lapereaux (Figure 26). Ainsi les femelles disposaient d'une mangeoire surélevée impossible d'accès pour les lapereaux tandis que ces derniers évoluaient dans un espace auquel la femelle n'avait pas accès (espace sur sol grillagé avec mangeoires) ou seulement de façon temporaire (nid) grâce à l'allaitement contrôlé (Photo 2). L'allaitement contrôlé est une méthode qui consiste à fermer les boîtes à nid et à ne les ouvrir que quelques minutes par jour pour donner accès aux lapereaux à la femelle. Cette méthode courante dans les élevages (Gidenne, 2015a), qui permet notamment de contrôler les niveaux d'ingestion de lait et d'assurer une alimentation mère-jeune séparée, a ainsi été appliquée dans nos essais jusqu'à J18. Après sevrage, les lapins étaient logés dans des conditions d'engraissement classiques par groupe de 5 (préférentiellement lapereaux issus de la même portée).

Nos essais ont principalement varié par la nature des aliments apportés, avec des apports d'aliments précoces déposés dans le nid de J3 à J18 (avec des mesures d'ingestion à partir de

J7 dans la majorité des cas) puis complétés par des granulés disponibles de J15 à J35 dans des mangeoires. En engraissement, les animaux étaient restreints quantitativement jusqu'à J64 (restriction entre 73 et 77% de l'ingéré des animaux nourris *ad libitum*).



Photo 2 : Logement des animaux. A gauche, cages expérimentales à alimentation mère-jeunes séparée. A droite, nids avec système d'alimentation précoce pour granulés ou gels

Différentes échelles d'étude

En plus d'une approche zootechnique systématique, nos trois derniers essais se sont intéressés aux conséquences de différentes stratégies d'alimentation avant sevrage sur la digestibilité de l'aliment, la dynamique d'implantation et de fonctionnement de l'écosystème digestif et sur la santé de l'hôte. L'ensemble des mesures que nous avons réalisées sont résumés dans le tableau 4, il s'agit :

- des examen du contenu stomacal et des pesées de l'estomac, du caecum, du reste de l'appareil digestif et de la rate
- des prélèvements de sang pour le titrage des anticorps IgG et du statut oxydant
- des prélèvements de contenus caecaux pour mesurer leur teneur en matière sèche (MS) et en IgA, pour évaluer l'activité fermentaire (mesure pH, teneurs en ammoniac et acides gras volatils) et pour explorer le microbiote (tableau 5).

Tableau 4 : Récapitulatif des expérimentations réalisées lors de ce travail de thèse.

Chapitres	Essais	Articles	Traitements expérimentaux	Effectifs	Mesures
1. Etude du comportement alimentaire du lapereau pour le développement d'un support nutritionnel attractif	(1) Diamètre	Articles 1 et 2 *Animal Feed Science and Technology* et *Data in Brief*	6 lots différant par le diamètre des granulés avant sevrage	60 portées 532 animaux sevrés	Suivi zootechnique (croissance, consommation solide avant sevrage, suivi sanitaire)
	(2) Dureté		6 lots différant par la dureté des granulés avant sevrage	63 portées 539 animaux sevrés	
	(3) Texture	Article 3 *animal*	5 lots différant par la présentation des aliments apportés au nid	60 portées 565 animaux sevrés	
	(4) Arômes		6 lots différant par les arômes apportés au nid au sein de l'aliment starter	72 portées 613 animaux sevrés	
2. Définition de la valeur nutritionnelle d'aliments pré-sevrage	(5) Digestibilité	Article 4 En préparation	4 lots différant par la précocité et la nature des apports solides avant et après sevrage	64 portées 621 animaux sevrés	Suivi zootechnique Digestibilité sous la mère Poids contenus et tissus digestifs Mesures systématiques suite aux chantiers de prélèvements (anticorps, communautés bactériennes, activités fermentaires)
3. Orientation précoce du microbiote et conséquences sur la santé	(6) Physiologie	Article 5 En préparation	4 lots différant par la précocité et la nature des apports solides avant et après sevrage	64 portées 534 animaux sevrés	Suivi zootechnique avec quelques mesures comportementales Poids tractus digestif Mesures systématiques suite aux chantiers de prélèvements Activités métaboliques du microbiote Statut oxydatif Expression de gènes impliqués dans la santé digestive
	(7) Prébiotiques	Article 6 *Frontiers in Veterinary Science*	Précocité des apports et introduction de prébiotiques au nid	44 portées 330 animaux sevrés	Suivi zootechnique Mesures systématiques suite aux chantiers de prélèvements

Tableau 5 : Effectifs pour l'étude du microbiote et des paramètres de santé

Age	Essai (5) digestibilité	Essai (6) physiologie	Essai (7) prébiotiques
18		40	40
21	20		
25	20	40	
29			40
30	20	40	
32	20		
38		40	40
57		40	40
Individus échantillonnés	*80 individus*	*200 individus*	*160 individus*

Etudes expérimentales

Chapitre 1

Etude du comportement alimentaire du lapereau pour le développement d'un support nutritionnel attractif

Introduction

Si la capacité du lapereau à consommer les aliments qui peuvent être déposés dans le nid a été démontrée, aucune cinétique d'ingestion n'a été construite à ce jour du fait de la difficulté de concilier mise à disposition de l'aliment au plus proche des lapereaux et mesures d'ingestion. Outre l'absence de données quantifiées sur l'ingestion solide en début de vie, les informations relatives aux préférences alimentaires du lapereau avant 15 jours d'âge sont très limitées, données essentielles pour proposer un aliment approprié et ainsi stimuler l'ingestion solide post-partum.

Afin de proposer un aliment appétant aux lapereaux allaités, nous avons réalisé plusieurs séries d'essais permettant de caractériser la capacité d'ingestion du lapereau au nid et ses déterminants. La présentation de l'aliment sous forme granulé est très répandue en élevage cunicole. En effet, l'aggrégation de matières premières en un seul produit permet notamment d'éviter que le lapin n'exerce une sélection alimentaire, comportement couramment observé (Prebble et Meredith, 2014; Maertens, 2010). Aussi, nous avons dans un premier temps évalué les effets de différentes granulations sur les préférences du lapin avant sevrage (article 1). Seuls les taux de compression (diamètre/épaisseur) des filières de presse utilisées étaient modulées pour contrôler le diamètre et la dureté des granulés produits. Dans le souci d'une démarche FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, Reusable), les données originales sur l'ingestion du lapereau au nid obtenues dans ces premiers essais ont été partagées sous la forme d'un data paper (article 2). Supposant que le granulé ne soit pas une présentation adaptée à la préhension et la consommation de lapereaux dans le nid, différentes textures d'aliments ont été testées (granulés, miettes de granulés, support hydraté ou matière première crue). Le protocole détaillé de réalisation du support hydraté gélifié est présenté en annexe 1. Enfin, afin d'exploiter l'odorat développé du lapereau nouveau-né, et en l'absence de connaissances sur ses préférences olfactives, trois arômes alimentaires ont été testés en vue d'améliorer l'appétence de l'aliment démarrage, c'est-à-dire l'aliment apporté dans le nid (article 3).

Article 1 : Démarrage de l'ingestion solide du lapereau allaité et mise en évidence de préférences alimentaires en termes de caractéristiques physiques des granulés

Revue Animal Feed Science and Technology, 2019, Volume 225, 114223.
https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114223

C. Paës, L. Fortun-Lamothe, K. Bébin, J. Duperray, C. Gohier, E. Guené-Grand, G. Rebours, P. Aymard, C. Bannelier, A.M. Debrusse, T. Gidenne, S. Combes

Mots clés: lapin, sevrage, consommation solide, filière de compression, préférence alimentaire

Résumé : Le sevrage représente une période critique pour le lapin, caractérisée par une susceptibilité importante aux maladies gastro-intestinales. Stimuler l'ingestion précoce d'aliment solide pourrait contribuer à préserver la santé chez le lapin. Par conséquent, les objectifs de cette étude étaient, premièrement, de quantifier l'ingéré solide précoce, et deuxièmement, de déterminer les préférences alimentaires du jeune lapin en fonction des propriétés physiques des granulés offerts. Des tests en double-choix réalisés avec des granulés issus de différentes filières ont été conduits dans deux essais. Un système d'alimentation original a été développé pour mesurer l'ingestion des lapereaux allaités de façon spécifique, indépendamment de celle des lapines. Les granulés étaient apportés de 3 à 17 jours d'âge dans la boîte à nid et l'ingestion était mesurée quotidiennement. De 15 à 35 jours, les lapereaux recevaient des granulés dans des mangeoires et l'ingestion était évaluée tous les 4 jours. Dans le premier essai, quatre diamètres de granulés étaient testés deux à deux : (A) 2,0, (B) 3,0, (C) 4,0, (D) 6,0 mm. Dans notre seconde expérimentation, des granulés issus de filières de compression de même diamètre (2,5 ou 4,0 mm) mais ayant trois différentes épaisseurs de filière possible, à savoir (E) 10, (F) 12, (G) 14 mm ou (C) 18, (H) 20 and (I) 24 mm, étaient produits. Les granulés de même diamètre étaient testés deux à deux soit un total de 6 combinaisons de comparaisons pour chacun de nos essais (n=10 portée par comparaison). L'ingestion d'aliment solide débutait à 8 jours pour 89 des portées sur 118. Au cours des 17 premiers jours de vie, un lapin ingérait un total de 1,63 ± 0,76 g de matière sèche dans le nid en plus du lait disponible. L'ingestion d'aliment solide à 2 semaines d'âge était corrélée au poids de portée après égalisation (r=0,50 entre 15 et 17 jours ; P<0,05). Aux mangeoires, les lapins consommaient préférentiellement le granulé A (61%, 67% et 86% de consommation relative comparé aux granulés B, C et D). Dans le second essai, le granulé I était moins apprécié que le granulé C dans le nid (P<0,05) et que le granulé H dans les mangeoires (P<0,05). Il a été conclu

que les lapereaux allaités étaient capables de consommer de l'aliment solide dans la boîte à nid et de discriminer les granulés en fonction de leur présentation en situation de libre choix. Fournir aux jeunes lapereaux un système d'alimentation facile d'accès avec une présentation optimale du granulé pourrait contribuer à stimuler l'ingéré solide et par conséquent ouvrir la voie à des études complémentaires sur le contrôle nutritionnel de l'implantation du microbiote.

Animal Feed Science and Technology 255 (2019) 114223

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci

Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties

C. Paës[a,b], L. Fortun-Lamothe[a], K. Bébin[b], J. Duperray[c], C. Gohier[d], E. Guené-Grand[e], G. Rebours[f], P. Aymard[g], C. Bannelier[a], A.-M. Debrusse[g], T. Gidenne[a], S. Combes[a,*]

[a] GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse INP, 31326 Castanet Tolosan, France
[b] CCPA, ZA du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France
[c] EVIALIS, Lieu dit Talhouët, 56250 Saint Nolff, France
[d] MiXscience, 2 avenue de Ker Lann, 35170 Bruz, France
[e] INZO, Rue de l'église, BP50019, 02407 Chierry, France
[f] TECHNA, Route de St-Étienne-de-Montluc, 44220 Couëron, France
[g] INRA, UE1322 PECTOUL, 24 chemin de Borde-Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Rabbit
Weaning
Solid consumption
Pellet die
Feed preference

ABSTRACT

Weaning represents a critical period for rabbit, with a high susceptibility to gastrointestinal diseases. Stimulating early solid feed intake could contribute to preserving health in rabbit. Thus, the aims of this study were, first, to quantify early solid intake and, second, to determine young rabbit pellet preferences according to their physical properties. Double-choice tests of pellets processed with different dies were conducted in two trials. An original feeding system was used to specifically measure consumption of suckling rabbits in the nest independent of that of the does. Pellets were provided from 3 to 17 days in the nest box and intake was measured daily. From 15 to 35 days, kits received pellets in feeders and intake was measured every 4 days. In the first trial, four pellet diameters were tested in pairs against each other: (A) 2.0, (B) 3.0, (C) 4.0 and (D) 6.0 mm. In the second trial, pellets of identical diameter (2.5 or 4.0 mm) were manufactured with three die channel lengths: (E) 10, (F) 12, (G) 14 mm or (C) 18, (H) 20 and (I) 24 mm. For a given diameter, pellets were tested in pairs. This resulted in six combinations per trial (n = 10 litters per combination). Solid feed intake began at 8 days for 89 out of 118 litters. Over the first 17 days of life, a rabbit ingested a total of 1.63 ± 0.76 g of dry matter in the nest in addition to milk. The solid feed intake at 2 weeks of age was correlated with litter weight at the beginning of the experiment ($r = 0.50$ between 15 and 17 days; $P < 0.05$). In the feeders, rabbits selected pellet A (61%, 67% and 86% of relative consumption when compared with B, C and D). In the second trial, pellet I was slightly disliked compared to C when provided in the nest ($P < 0.05$), and compared to H in the feeders ($P < 0.05$). It was concluded that suckling rabbits were able to ingest solid feed in the nest box and to discriminate pellets according to their presentation when a choice was given. Providing young rabbits with an easy-access feeding system and an optimal pellet presentation may help to stimulate early solid intake and thus pave the way for further studies on nutritional control of microbiota implantation.

Abbreviations: ADFom, acid detergent fiber expressed exclusive of residual ash; aNDFom, neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash; DM, dry matter; Lignin (sa), lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid; RC, relative consumption; SC, swelling capacity; SEM, standard error of the mean; WHC, water holding capacity

* Corresponding author.
E-mail address: sylvie.combes@inra.fr (S. Combes).

https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114223
Received 11 January 2019; Received in revised form 27 June 2019; Accepted 15 July 2019
0377-8401/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Despite consequent improvements in rabbit feed formulation and husbandry practices since the 1980s, a high incidence of digestive disorders around the time of weaning can still be observed. In this context, antibiotic use remains high on meat rabbit farms (Méheust et al., 2017). The cost of antimicrobials and the spread of antibiotic-resistant bacteria have increased the need for alternatives to antibiotic use.

Establishing a stable digestive microbiota at an early stage could enhance rabbit resilience to the stress of weaning (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007; Combes et al., 2013). Indeed, relationships between enteric infection and disruption of the normal microbiota (known as dysbiosis) have been highlighted in different species such as rabbit (Sekirov and Finlay, 2009; Bäuerl et al., 2014). As in the case of human children and piglets (Konstantinov et al., 2004; Koenig et al., 2011), the rabbit kit digestive microbiota composition is strongly shaped by solid feed intake (Padilha et al., 1995, 1999). Previous studies demonstrated that ingestion by kits of doe feces left in the nest can speed up colonization of microbial cecum (Kovács et al., 2006; Combes et al., 2014). Solid intake via ingestion of fecal pellets or feed offered in the nest can start 2–3 days after birth (Gidenne et al., 2013; Combes et al., 2014; Kacsala et al., 2017). As opposed to fecal pellet ingestion, neonatal solid feed intake behavior has never been quantified.

Since newborn rabbits are able to ingest solid feed, and since this behavior can contribute to triggering the installation of microbiota, we hypothesize that providing palatable feed to the kits is an opportunity to strengthen rabbit gut health. However, in rabbit farming, kits only have access to pelleted feed when they start leaving the nest box at around 16–18 days (Gidenne and Fortun-Lamothe, 2002). Moreover, no data exists to validate the ability of the physical properties of the common industrial pellet to encourage early feed intake. Preliminary studies investigated the effect of pellet hardness on rabbit intake in rabbits from 2- to 5-weeks old, but this effect could have been combined with feed composition or pellet size effect (Gidenne et al., 2007; Travel et al., 2009). Maertens (1994) previously showed that pellet size had an effect on rabbit intake after weaning, with higher consumption when a large pellet diameter (4.8 mm) was offered, suggesting that the physical properties of feed are key factors to optimize solid feed intake.

The aims of this study were (i) to quantify kit feed intake from 8 to 35 d, and (ii) to determine the optimal pellet diameter and hardness necessary to stimulate the onset of feed intake. To reach these goals, an original feeding system in the nest was designed and nine pellets with different press die specifications (i.e., length and diameter) were offered in double-choice tests before weaning to evaluate kit feed preferences and intake.

2. Material and methods

The study was conducted by the Groupe d'Experimentation Cunicole (GEC) network[1] and the experiments were carried out at the PECTOUL Experimental Unit (INRA, Castanet-Tolosan, France). Animals were handled according to the recommendations for animal care in experimentation in agreement with the EU Directive 2010/63/EU (Anonymous, 2010) and the Journal Officiel de la République Française (Anonymous, 2013).

2.1. Animal management and housing

Female rabbits (hybrid breed PS19; Hypharm, France) were inseminated with semen from male commercial breeds for two successive reproductive cycles (first two lactations). The does and their litter (n = 60 and 63 for the first and second trial, respectively) were raised together in a ventilated breeding unit in individual wire cages (width: 62 x length: 69 x height: 62 cm). Cages were equipped to allow the mother and its litter to be fed separately. In that respect, a wire mesh partition separated the doe from the area containing the kits' feeders. The doe's feeder in the cage was elevated so that the kits could not access to the doe's feed (Fig. 1). Two days after parturition (day 2), nest quality was assessed using a 3-point scale: 1 represented a nest of weak quality in which only wood shavings were found; 2 represented a nest of medium quality in which doe fur was present but insufficient to fully cover the litter; and 3 corresponded to a nest of good quality in which doe fur entirely covered the litter. After nest quality assessment, the litter size was standardized to ten kits per doe by cross-fostering or culling. The doe could access to the nest once a day for suckling (controlled suckling between 8:00 and 9:00 am for 10 min) until day 21. After day 21, the doe could freely access to the nest. Two water nipples were available: one in the doe area and one in the litter space. Feed was offered ad libitum to the youngs in the nest (width: 25 x length: 38 x height: 20 cm) from 3 to 17 days of age using two plastic cups (volume: 30 mL; Ø = 40 mm; height: 32 mm; GOSSELIN®, Le Mans, France), placed opposite the doe's entrance (Fig. 2). The feed present in the nest was removed before suckling to prevent the doe from eating it, then weighed and finally reintroduced after suckling. Cups were carefully maintained in holders (6-cm high) and contained feed pellets that differed by their physical characteristics alone (same formulation). From 15 to 35 d, the same kind of pellets was offered ad libitum outside the nest in the litter area using two feeders, one for each type of pellet tested. The kits' feeders were designed as presented by Fortun-Lamothe et al. (2000), with triangular-shaped openings to limit waste. To avoid confusion between feed placement and pellet preference, the location of cups or feeders containing each pellet type was reversed when feeding measurements were performed. The feeding scheme is summarized in Fig. 3. Milk production was measured as the difference of female weight before and after suckling at 3 or 4, 7, 10, 14, 17 and 21 days. Litter weight after suckling was recorded at 3 or 4, 10, 14, 21, 28 days.

[1] GEC is a French network of companies with expertise on rabbit production and nutrition. It includes CCPA, EVIALIS, INZO, MiXscience and TECHNA.

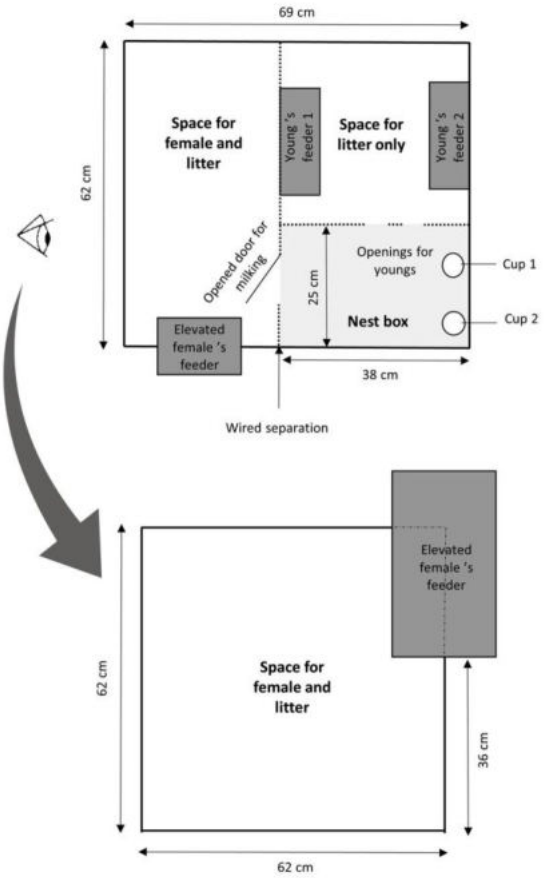


Fig. 1. Housing used to control separately the doe's feed intake and that of its litter, with a limited access to the nest box for the doe. On the top is mapped the view of the cage seen from the top. Below is represented the view of the same cage seen from left side.



Fig. 2. View of the nest box when rabbits were 4-days old. The two cups on the right contained two types of feed pellets differing in either diameter (Trial 1) or compression rate (Trial 2).

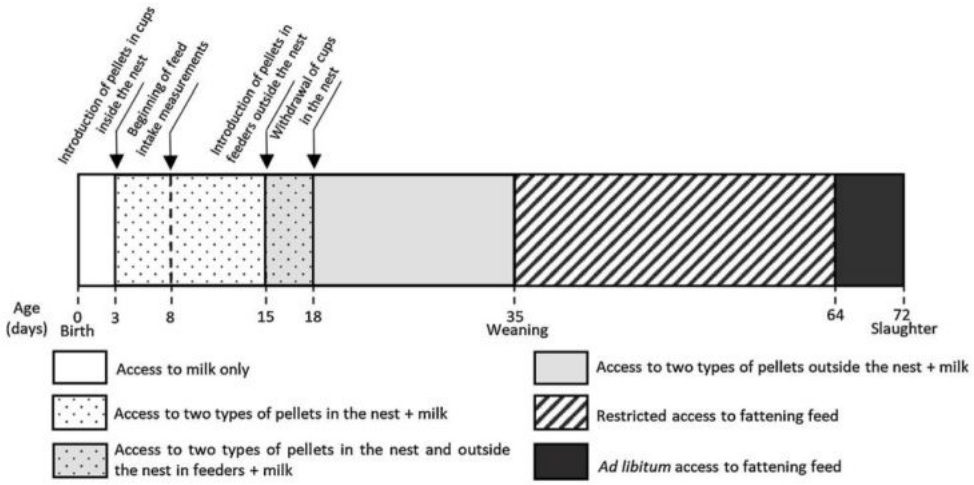


Fig. 3. Experimental design used to characterize suckling rabbit intake and pellet preferences.

At weaning (35 days of age), kits were assigned to cages of five rabbits/cage (width: 78 x length: 46 x height: 30 cm) according to the double-choice preference test conducted and litter of origin. Individual rabbit weight was measured at weaning, at 50 and 64 days of age. Following common feeding strategy in France, the animals were given restricted feed until 64 days in order to achieve an average daily gain of 40 g/day. Animals were then fed freely until slaughter (day 72). Rabbit mortality was recorded daily from 3 to 72 days of age.

2.2. Diet processing

Does were fed a commercial feed (without any antibiotics) adapted to the lactation stage (Table 1). The diet for suckling rabbit was formulated to meet the nutrient needs of both does and kits. The feed mash was manufactured by Euronutrition SAS (Saint-Symphorien, France). Nine kinds of pellets from different dies were then produced (Tecaliman, Nantes, France) from the same mash to ensure that pellets had identical chemical composition. The ingredients and chemical composition of the pelleted feeds are presented in Table 1. In the pelletizer, the meal was delivered to a conditioning chamber where the quantity and pressure of added steam were controlled to ensure that the mash was at 65 °C before flowing into the mill die chamber. To process the pellets, the mash was forced through one of the nine dies with a specific channel length and diameter (Table 2). Die length-to-diameter ratio (also referred to as compression rate) is known to influence hardness (Thomas and Van der Poel, 1996). Therefore, die size was the parameter chosen to obtain the desired pellets: pellets with four different diameters and similar hardness in Trial 1 (A, B, C, D), and pellets with three different hardnesses for two given diameters in Trial 2 (E, F, G and C, H, I).

2.3. Experimental design

From 3–35 days, to assess solid feed preferences, each litter was offered two pellet types while they were still suckling the doe. A complete double-choice feeding protocol was performed in both trials. In the first trial, four pellets were tested in pairs, which resulted in six combinations (AB, AC, AD, BC, BD, and CD, where comparison treatment AB represented pellet A tested against pellet B, etc.). In this trial for diameter preference, we had run out of pellet A stock at 32 days, thus ending the preference trial. Hardness preference was assayed in Trial 2, comparing 2.5-mm-diameter pellets against each other and 4.0-mm-diameter pellets against each other. These comparisons of pellets with the same diameter but with different compression rates resulted in six comparison treatments (EF, EG, FG and CH, CI, HI). Pellet C was used in both trials. The litters were assigned to one double-choice treatment according to doe parity (only primiparous in Trial 1 and a parity rank of 1.9 ± 0.01 in Trial 2) and to kit weight (average body weight at 2 days was 66 ± 1 g per kit in Trial 1 and 72 ± 1 g per kit in Trial 2). Allocation inside the farm was also equally divided between the treatments. Each treatment had ten or eleven litters of ten rabbits at the beginning of the experiment.

2.4. Evaluation of the feed intake

Early feed intake was calculated daily based on the weight of feed offered and refused from 3 to 17 days of age in the first trial using a 0.001-g accuracy scale (OHAUS, Parsippany, NJ, USA). Water loss, measured as the difference of pellet weight between two days in the absence of animals, was measured the first days of the experiment for the four pellets A, B, C and D. After correction for

Table 1
Ingredients and chemical composition of the experimental meals.

	Kits[a]	S.E.[a]	Does
Ingredients (g/kg as-fed basis)			
Wheat	50		54
Barley	148		120
Wheat bran	150		300
Rapeseed whole seed	20		
Rapeseed meal	82		100
Rapeseed oil	5		2
Sunflower whole seed			73
Sunflower meal	240		120
Sunflower husk			77
Alfalfa meal	112		
Sugar beet pulp	110		76
Sugar beet molasses			50
Apple pomace	27		
Cane molasses	30		
Sodium chloride			6
Dicalcium phosphate	1		
Calcium carbonate	6		
L-Lysine, 20%	5		3
Methionine, 15%			2
Threonine, 20%			12
Mineral and vitamin premix[b]	10		5
Coccidiostat[c]	5		
Chemical composition (g/kg as-fed basis)			
Dry matter	909	7.4	890
Ash	81	5.6	80
Crude protein	176	2.3	172
aNDFom[d]	337	5.9	316
ADFom[e]	189	3.3	176
Lignin (sa)[f]	72	1.2	53
Starch	52	3.8	86
Fat content	33	0.6	27
Gross energy (MJ/kg)	17.0	0.3	16.4

[a] Means and standard errors for chemical composition of the nine pre-weaning pellets.
[b] Premix provided per kg of complete feed: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D3, 1000 IU; vitamin E, 50. IU; Cu, 10 mg; Fe, 100 mg; Zn, 50 mg; Mn, 5 mg; I, 0.2 mg; Co, 0.1 mg; Se, 0.2 mg.
[c] Containing 0.5% diclazuril.
[d] Neutral detergent fiber expressed exclusive of residual ash.
[e] Acid detergent fiber expressed exclusive of residual ash.
[f] Lignin obtained with sulfuric acid method.

Table 2
Pellet press dies specifications used to process young rabbit feeds.

Pellet	Trial	Die specification		
		Channel diameter (mm)	Channel length (mm)	Length-to-diameter ratio
A	1	2	10	5
B	1	3.2	16	5
C	1 and 2	4	18	4.5
D	1	6	24	4
E	2	2.5	10	4
F	2	2.5	12	4.8
G	2	2.5	14	5.6
C	1 and 2	4	18	4.5
H	2	4	20	5
I	2	4	24	6

these intrinsic changes, it was found that feed intake was negligible the first week. For this reason, feed intake was measured daily from 8 to 17 days in the second trial. When waste or cup spillage occurred, we considered feed consumption in the two cups as missing data. In these cases, all of the nest material was renewed to ensure that no pellets were left inside the nest. Remaining feed in the feeders was weighed at 18, 21, 25, 28, 32 and 35 days of age. If one kit was found dead between these dates, the remaining feed in the cage was weighed to recalculate feed intake.

Table 3
Physical characteristics of the pellets processed with nine different dies.

	Trial 1					Trial 2				Trial 2			
	A	B	C	D	SEM	E	F	G	SEM	C	H	I	SEM
Die length-to-die width ratio	5	5	4.5	4	NC	4	4.8	5.6	NC	4.5	5	6	NC
Diameter (mm)	2.0	3.0	4.0	6.0	0	2.5	2.5	2.5	0	4.0	4.0	4.0	0
Length (mm)	8.9	8.6	8.8	9.4	0.5	8.2	8.8	8.5	0.2	8.8	8.2	8.5	0.2
Hardness (MPa)	1.19	1.36	1.45	1.06	0.15	1.54	1.52	1.76	0.09	1.45	1.69	1.66	0.11
Durability (%)	95.4	94.8	92.2	85.7	2.3	93.3	95.14	95.4	1.8	92.2	93.8	93.9	1.4
WHC[a] (g of H_20/g of DM)	4.70	5.02	4.95	5.07	0.14	4.96	4.94	5.04	0.27	4.95	5.07	5.28	0.10
SC[b] (ml of H_20/g of DM)	4.98	4.86	4.39	4.16	0.42	4.29	4.24	4.41	0.25	4.39	4.21	4.64	0.36
Particle size distribution (%)													
> 1 mm	45.7	47.5	43.4	40.5	2.8	46.4	45.4	46.9	2.3	43.4	44.8	48.0	3.1
0.5-1 mm	8.9	13.4	10.8	10.3	1.6	10.2	10.7	10.7	1.2	10.8	11.3	10.9	2.1
0.3-0.5 mm	6.9	6.6	5.6	7.2	1.4	8.1	5.9	6.1	1.7	5.6	4.2	5.8	2.3
< 0.3 mm	38.5	32.5	40.3	42.0	2.3	35.3	37.9	36.4	1.5	40.3	39.8	35.3	2.6

[a] WHC: Water holding capacity.
[b] SC: Swelling capacity.

2.5. Physical characteristics of pellets

Pellet length and diameter were measured with a caliper with a resolution of 0.5 mm (ROCH, France). Diameters obtained were in accordance with the die used during the pellet processing (Table 3), with the biggest pellet (pellet D) 3-fold larger than the smallest one (pellet A). Pellet hardness was determined with the Kahl Pellet Hardness Tester (AMANDUS KAHL GmbH & Co. KG, Reinbek, Germany) on a minimum of ten pellets. Each pellet was inserted between two bars with an increasing static pressure to determine the force needed to crack it (Thomas and Van der Poel, 1996). Force values obtained in Newtons were then expressed as a pressure variable to take account of the length and diameter of each pellet tested as follows:

$$H = Hm/(\pi * l * r)$$

where H is the calculated hardness (MPa), Hm is the measured hardness (N), l is the length of the pellet (mm), and r is the pellet radius (mm)

Pellet durability is "the amount of fines returning from pellets after they were subjected to an abrasing action" (Thomas and Van der Poel, 1996). For each measurement, 200 g of feed pellets were tumbled in a SABE drum (SABE Distribution, Chauche, France) at 500 rpm for 20 s. After tumbling, the fines (particles of less than 2 mm) were removed. Durability was expressed as the percentage of remaining pellets (ISO 17831-1:2015). This procedure was repeated three times per pellet type.

The particle size distribution was determined after water and ultrasonic treatments according to the Lebas and Lamboley procedure (1999). Water-holding capacity (WHC) and feed-swelling capacity (SC) were measured for each type of pellet to check for confusing effects since these properties affect satiation (Tan et al., 2017). WHC was determined twice according to the Giger Reverdin (2000) method: 2 g of sample were poured into 10 mL distilled water and left to soak for 24 h, so that water was in excess. After centrifugation, wet supernatant was removed and weighed to measure water absorption. WHC was calculated as the ratio of the supernatant weight to the sample dry matter weight. SC was obtained by dissolving 2 g of sample in 25 mL distilled water. After 1 h at room temperature, the increased volume of the feedstuff due to hydration was measured to determine SC, as previously described by (Arroyo et al., 2012). WHC and SC were measured in triplicate.

2.6. Chemical analysis of the feeds

Chemical analysis was performed on the nine experimental pre-weaning pellets and on the commercial pellets provided to the does using the ISO methods and the procedures described by the European Group on Rabbit Nutrition (EGRAN, 2001). Dry matter (DM) was obtained after 24 h at 103 °C (ISO 6496:1999) and ashes after 5 h at 550 °C. Total nitrogen was determined with the DUMAS combustion method using an automatic analyzer (Vario El cube model; Elementar, Langenselbold, Germany) to approximate the crude protein content (N x 6.25) (ISO 16634-1:2008). Neutral detergent fiber (aNDFom) and acid detergent fiber (ADFom) were measured using the sequential method of Van Soest et al. (1991) with a heat-stable amylase pre-treatment (AFNOR, 1997). Results were expressed exclusive of residual ash. Lignin analyses were performed on ADFom residues by solubilization of cellulose with sulfuric acid (sa). Starch was determined with the enzymatic procedure described by Kozlowski (1994): starch was solubilized in potassium hydroxide and then hydrolyzed with amyloglucosidase. Released glucose molecules were finally quantified with the hexokinase glucose 6-phosphate deshydrogenase system (D-Glucose®; Boëhringer, Mannheim, Germany). Intense ether washing was performed using the Tecator Soxtec system HT (FOSS, Hilleroed, Denmark - acid hydrolysis pre-treatment) to determine crude fat content (ISO 6492:1999). Gross energy was established with adiabatic combustion (Model C5000 adiabatic calorimeter; IKA, Staufen, Germany) (ISO 9831:1998).

2.7. Calculation and statistical analysis

Before weaning, statistical models include the litter as the experimental unit, whereas after weaning, the individual animal is the experimental unit. Feed intake values in the nest (8–17 days) that were three standard deviations away from the mean were removed. These outliers represented less than 1.5% of the dataset. For feed consumption after 17 days of age, the number of kits was adjusted assuming that dead animals did not consume feed two days before their death.

Voluntary feed intake measurements were used to determine feed preferences: relative consumption (RC) was calculated for each pellet within a litter, which is the percentage contribution of a pellet to the total feed intake. For example, in the treatment AB of a given litter, the RC of pellet A was calculated as follows:

$$RC_A = [Amount\ of\ pellet\ A\ consumed/(Amount\ of\ pellet\ A\ consumed + Amount\ of\ pellet\ B\ consumed)] * 100$$

This index was chosen to describe preferences because it is informative, intuitive and has practical appeal (Lockwood III, 1998). RC values could represent total aversion (0%), indifference (50%) or strong preference (100%; Seabolt et al., 2010). If RC was significantly higher than the neutral value of 50%, then a preference for the given pellet was observed inside the treatment. RC values of the first trial were calculated as of 13 days of age because we encountered technical difficulties with the feeding system before this date (cups spilled by the rabbits). In the second trial, RC values could be calculated from 8 to 35 days.

Statistics were performed with R software (R Core Team, 2018). One sample *t*-test was performed to test the RC means compared to the neutral value of 50%. If the RC value did not fit a normal distribution, Arcsine transformation was used. Comparison treatment effect on feed intake, milk intake and growth performance was controlled to ensure that preference responses could be compared between treatments by using one-way analysis of variance. In the second trial, the intake of 2.5-mm pellets was also compared with the intake of 4-mm pellets with ANOVA procedure. A linear mixed model was fitted to investigate inter-litter variability of the feed consumption measurements in the second trial from 8 to 21 days since no milk data were available beyond this date. Daily milk data between 8 and 21 days were obtained with extrapolation of the farm measurements by modeling the lactation curve with a quadratic model (Casado et al., 2006). Time, comparison treatment and nest quality scores were set as fixed categorical factors, and litter weight at equalization and milk consumption were set as quantitative cofactors; the litter was considered to be a random effect. A linear mixed procedure was also applied on post-weaning data with comparison treatment before weaning and rabbit sex as fixed effects, litter and fattening cage as random effects. Mortality data was analyzed using adjusted chi-square according to the Donner and Banting procedure (1989), so that litter cluster was accounted for (Reed, 2004; Princée, 2016). Differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$. If P-value was less than 0.10 but greater than 0.05, then differences among means were considered to suggest a tendency.

3. Results

3.1. Pellet physical characteristics

Measurements of pellet physical characteristics are given in Table 3. In Trial 1, by ranking in increasing order of hardness, we obtained pellets D, A, B and C (pellet C was 36% harder than pellet D). In Trial 2, for the 2.5-mm-diameter pellet group, pellet G had a greater hardness than pellets E and F (+0.3 MPa), whereas for the 4-mm diameter, pellet C was softer than pellets H and I (- 0.2 MPa). These differences in hardness were related to the die length-to-diameter ratio used: 5.6 for G (highest compression rate of its group) and 4.5 for C (lowest compression rate of its group). Pellet D showed a notably low durability (85.7 ± 1.1%) compared to the other pellets (94.3 ± 1.9% on average).

3.2. Feed and milk intake

Considering the whole pellet intake, regardless of the comparison treatments in Trials 1 and 2, we observed that solid feed ingestion in the nest started at 8 days of age, with a mean of 0.03 ± 0.03 g of DM consumed per kit (Fig. 4). One fourth of the litters did not start solid feed intake at 8 days, while one day later, only 9% had not started. At 12 days of age, all the litters were consuming the pellets. Pellet intake progressively increased with age and reached 0.54 ± 0.19 g of DM per rabbit at 17 days. Between 15 and 17 days, the feed was accessible in both the nest and the feeders. The young rabbits preferred to consume feed in the nest rather than in the feeders during this period (+0.20 g of DM/rabbit from 15 to 17 days in the nest compared to the feeder origin; $P = 0.003$). Over the first 17 days of life, a rabbit consumed a total of 1.63 ± 0.76 g of DM in the nest and a total of 2.50 ± 0.44 g of DM from the pellets in both the nest and the feeders. In relation to fresh matter, the pellet intake from 8 to 17 days corresponded to 1.3% of the total milk intake over this period. The feed-to-milk intake ratio increased from 0.1% of the milk intake at the beginning of the experiment (day 8), to 2% of the milk intake at 17 days of age. Interestingly, post-natal feed intake was highly variable between litters (CV = 89% for the total feed intake at 12 days, for example). A statistical model was therefore built to determine which factors had an effect on the daily feed intake using data obtained in the second trial until 21 days of age. Daily milk intake and nest quality score did not affect the solid feed intake (NS). Instead, the body weight at 3 days of age (average weight at 3 days: 109 ± 9 g/rabbit) correlated positively with the litter's post-natal pellet consumption from 12 to 17 days ($P = 0.003$), and the correlation coefficients ranged from 0.3 to 0.5 (Fig. 5). After 21 days of age, the amount of feed consumed quickly increased (Fig. 6) to reach 65 ± 14 g of

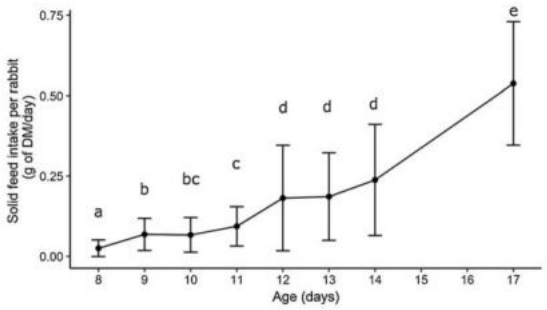


Fig. 4. Dynamic of feed consumption in 8 to 17-day-old rabbits receiving pellets in the nest as of 3 days of age (Trials 1 and 2). From 15–17 days, feed was also available in feeders outside the nest. The intake is the sum of the consumptions of the two types of pellets tested. Results are presented as the mean and standard deviation. The different letters stand for significant differences ($P < 0.05$).

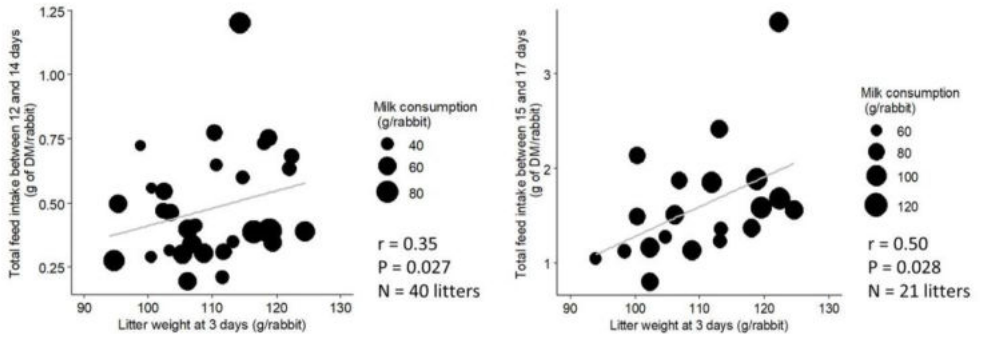


Fig. 5. Relationship between starter feed intake and litter weight (at 3 days of age) in Trial 2. The total feed intake from 12 to 14 days is represented on the left, and the total feed intake from 15 to 17 days is represented on the right. Dot size is proportional to milk consumption.
r stands for the Pearson Correlation, P for the significance level of the correlation, and N for the sample size.

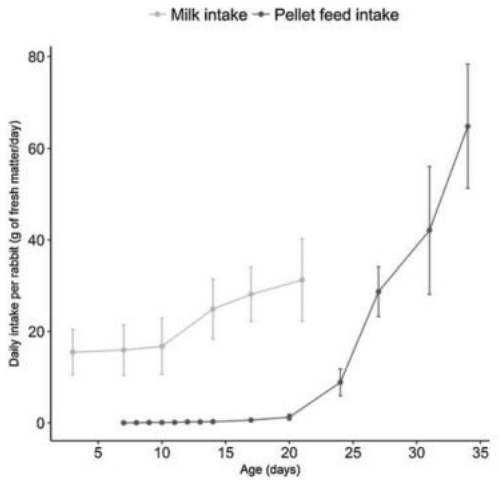


Fig. 6. Feed and milk consumption of suckling rabbits receiving solid pelleted feed as of 3 days of age (Trials 1 and 2). For each litter, the intake is the sum of the consumptions of the two pellets tested. Results are presented as the mean and standard deviation.

Table 4
Effects of the physical properties of the pellets on the feed intake in the feeders from 15 to 35 days (weaning). Values are means of the amount of solid feed ingested per rabbit per day.

Trial 1.								
	Double comparison groups						SEM	P-value
	AB	AC	AD	BC	BD	CD		
Feed intake (g of DM/rabbit/day)								
15-17 days	0.3[ab]	0.4[ab]	0.5[b]	0.2[a]	0.3[ab]	0.2[ab]	0.26	0.025
18-24 days	5	5	6	4	4	5	1.29	0.257
25-31 days	32	31	23	27	28	27	6.30	0.199
32-35 days	NC	NC	NC	56	59	57	NC	NC
Trial 2.								
	Double comparison groups						SEM	P-value
	EF	EG	FG	CH	CI	HI		
Feed intake (g of DM/rabbit/day)								
15-17 days	0.9	0.7	0.8	0.9	1.0	0.7	0.30	0.349
18-24 days	6	6	5	5	4	5	1.63	0.387
25-31 days	41	39	37	40	36	36	5.32	0.523
32-35 days	62	59	61	61	63	52	10.7	0.563

NC: not calculable because we ran out of pellet A as of 32 days.
[ab] Means denoted by a different letter indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

DM per kit on average at weaning. Concomitantly, the milk yield curve reached a plateau at around 21 days (292 ± 75 g of milk/doe).

The total feed intake in the feeders was similar between comparison treatments (Table 4) except at the beginning of the first trial (15–17 days). However, the precision of the mean estimates for this period was low as indicated by the standard error of the mean (SEM). We compared intake of 2.5-mm pellets vs. 4-mm pellets in Trial 2, a situation where no choice between diameters was given (EF, EG and FH treatments compared to CH, CI and HI treatments). Between 21 and 27 days, the 2.5-mm pellet intake tended to be higher than the 4-mm pellet intake ($P = 0.068$), but no effect was observed from 15 to 35 days ($P = 0.645$).

3.3. Pellet preferences

RC value of the 6-mm-diameter pellet (D) was greater than 50% when offered with the 2-mm-diameter pellet (A) in the nest ($P = 0.002$). No other preference was expressed in the nest within treatments of the first trial (Fig. 7). In contrast with what was observed in the nest, clear-cut aversion was found for pellet D compared to A, B (3.2 mm) and C (4 mm) in the feeders, with RC values below 50% of total feed intake (RC of 14% in the double-choice group AD, 28% in BD and 27% in CD; $P < 0.001$; Fig. 7). Relative

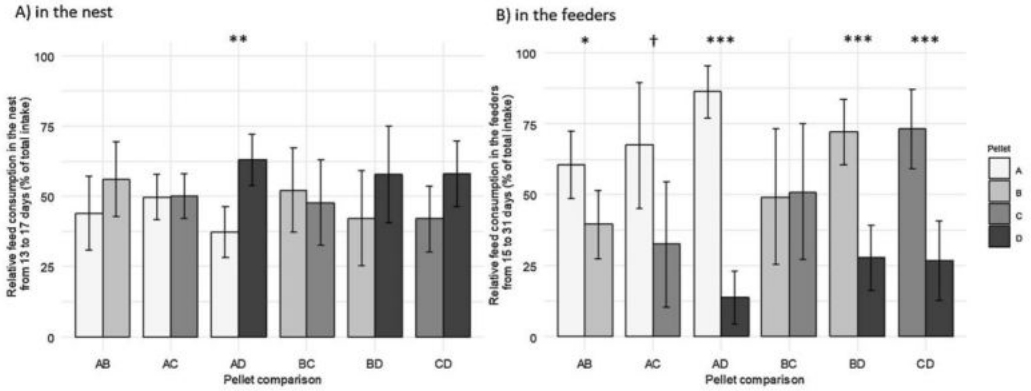


Fig. 7. Relative pellet consumption in the nest (A) and in the feeders (B) for the first trial. The animals had the choice between two pellets that differed in diameter (A: 2 mm; B: 3.2 mm; C: 4 mm; and D: 6 mm). Results are presented as the mean and standard deviation.
The symbols represent significantly different preference values (†: $P < 0.1$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

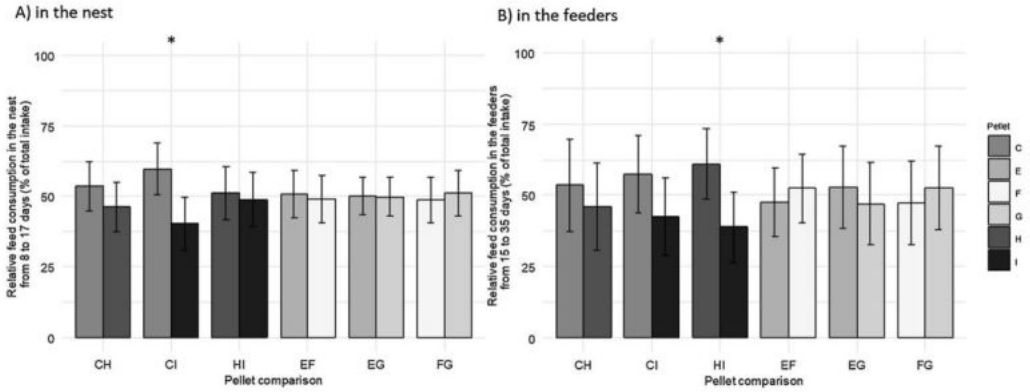


Fig. 8. Relative pellet consumption in the nest (A) and in the feeders (B) for the second trial. The young rabbits had the choice between two pellets of the same diameter (E, F, G: 2.5 mm, and C, H, I: 4 mm) that differed by compression rate. Results are presented as the mean and standard deviation.
The symbols represent preference values significantly different by 50% (*: $P < 0.05$).

consumption of A was greater than 50% when it was offered against B (61%; $P = 0.021$) and D (86%; $P < 0.001$), and tended to be greater than 50% compared to C (67%; $P = 0.081$).

In the second trial, RC values within the double-choice groups EF, EG and FG did not significantly differ from 50%, meaning that no preference was expressed throughout the whole trial (Fig. 8). In the nest, slight avoidance was noticed for I compared to C (RC of 40%; $P = 0.014$, when compared to the 50% neutral value) but this response was no longer significant in the feeders ($P = 0.117$). When H was present with I in the feeders, the latter was avoided since its relative consumption was less than 50% (39%; $P = 0.020$).

3.4. Health and growth performances according to treatments

Throughout both trials, all animals remained healthy: the mortality was low (4.5% from 3 to 35 days and 1.8% from 36 to 72 days) and was not affected by the pellets offered before weaning (NS). Milk intake was similar between groups as well as feed intake from 18 days of age to weaning.

Growth performances are reported in Tables 5 and 6. Rabbit weights before weaning were not affected by the comparison treatments (NS). Double-choice treatment had an effect on the daily weight gain between 21 and 35 days of age in the first trial ($P = 0.039$), but the Tukey follow-up test performed on the six group means was not significant for any pair of means. The gender did not affect growth after weaning, thus the sex effect was removed from the final model. Rabbit growth performances during the fattening period did not differ between comparison treatments.

4. Discussion

We hypothesized that stimulating early solid feed intake would contribute to preserving the health of young rabbits through a positive action on cecal microbiota implantation. We thus aimed to, first, quantitatively describe early feed intake and, second, to determine young rabbit pellet preferences according to their physical properties.

4.1. Characterization of feed intake patterns

To our knowledge, this study is the first to provide comprehensive quantitative data on the solid intake of suckling rabbits. A nest feeding system was especially developed to measure post-natal rabbit feed intake. Previous studies dealing with the feeding capacity of young rabbits provided gradual amounts of pellets in the nest. They visually observed solid intake (Kacsala et al., 2017) or measured the consumption by counting the number of feed pellets left (Gidenne et al., 2013). By providing quantitative feed intake records, this study provided new insights into the occurrence, magnitude and variability of this behavior.

Suckling rabbits were able to consume some feed pellets as of 8 days of age. Before this age, the diet of young rabbits depends on milk supply alone. The absence of solid intake during the first week might be explained by a lack of capability since mastication is functional as of 13 days and kits are still learning to masticate until 4 weeks of age (Langenbach et al., 2001). Furthermore, while the olfactory system is fully developed at birth, the onset of visual functions is estimated to be at around 7–8 days of age (Gottlieb, 1971). These ontogenetic parameters should be considered when developing feed adapted to the young rabbit, for example, by adding sensory functional ingredients in the feed or by offering feed with an optimal texture for the kit's masticatory system. In this study, pellet size and hardness were investigated since we assumed that rabbits would prefer soft and small pellets because they are easier to chew.

Table 5
Effects of physical properties of the pellets on growth performance before weaning.

Trial 1.

	Double comparison groups						SEM	P-value
	AB	AC	AD	BC	BD	CD		
Number of litters	10	8	10	10	10	10		
Live weight (g/rabbit)								
3 days	86	86	84	86	85	84	7	0.976
10 days	171	176	168	173	177	174	16	0.941
14 days	222	229	216	222	234	224	20	0.689
21 days	302	317	303	311	326	309	28	0.687
28 days	532	558	525	509	530	520	42	0.511
Average daily gain (g/day)								
3 – 21 days	12.0	12.8	12.2	12.5	13.4	12.5	1.4	0.627
21 – 35 days	38.6	38.4	33.8	33.6	35.6	35.9	3.3	0.039
Feed conversion ratio								
21 – 28 days	0.46	0.50	0.54	0.47	0.49	0.52	0.05	0.081
28 – 35 days	NC	NC	NC	1.04	1.04	0.97	NC	NC

Trial 2.

	Double comparison groups						SEM	P-value
	EF	EG	FG	CH	CI	HI		
Number of litters	10	11	11	10	11	10		
Live weight (g/rabbit)								
4 days	110	112	108	109	105	107	7	0.713
14 days	280	279	269	282	273	272	22	0.880
21 days	381	385	378	387	378	372	31	0.960
28 days	646	643	628	639	606	601	44	0.353
Average daily gain (g/day)								
4 – 21 days	15.9	16.1	15.9	16.4	16.0	15.5	1.5	0.967
21 – 35 days	43.2	40.1	40.6	40.1	40.8	37.0	3.5	0.140
Feed conversion ratio								
21 – 28 days	0.46	0.47	0.46	0.45	0.42	0.48	0.06	0.660
28 – 35 days	1.14	1.20	1.13	1.22	1.09	1.15	0.10	0.226

NC: not calculable because we ran out of pellet A as of 32 days.

In the present study, we were able to determine the evolution of solid feed intake in kits. As previously described (Gidenne et al., 2010), the amount of solid feed ingested outside the nest remained low until 21 days, before a sharp increase. The early onset of solid feed intake allowed by a nest feeding system did not modify this general pattern. In the nest, the between-litter variability of the solid feed intake was high, especially in the early period. Our results showed that the maternal ability of the doe, assessed together with milk intake and nest quality, did not affect the early feeding in the nest or in the feeders. Bonachera et al. (2017) found, on the contrary, that the higher the milk intake was during early lactation (0–17 days), the higher the feed intake (17–28 days) was, which suggests that high milk intake could promote solid intake. However, these authors did not study the correlation between the feed intake and the corresponding milk intake at an early stage (before 17 days of age). At this age, we hypothesized that other factors could explain dietary intake, including litter weight at standardization, which was positively correlated with the early feed intake of the litter. At the within-litter level, a similar conclusion was reached by Pajor et al. (1991) who studied the variation of solid feed intake of suckling piglets. They demonstrated that piglets of high birth weight ate more pre-weaning feed than their littermates of lower birth weight. This could be explained by greater needs and a more developed digestive system in heavier animals (de Passillé et al., 1989). However, these findings were not consistent with the research of Bruininx et al. (2004) who did not report a relationship between the piglets' birth weight and individual early feed consumption. Better knowledge of the animal related factors that affect solid feed intake variability is of importance in order to increase both the number of rabbits that exhibit early feed intake and the levels of ingestion.

4.2. Pellet processing and effects on suckling rabbits' preferences

This study attempted to analyze separately diameter and hardness effects by using pellets with different diameters and constant compression rate, and vice versa. However, hardness differences were found between pellets of different diameters in Trial 1, whereas the pellet compression rates were similar. Inversely, for pellets in Trial 2 with the same diameter, different compression rates led to similar hardness. These unexpected results might be explained by the heterogeneity of the internal pellet structure inherently caused by the diverse raw materials that make it up. Thomas and Van der Poel (1996) confirmed the large variation of fragmentation-type measurements for a given hardness device. For this reason, hardness measurements should be carefully interpreted. As expected, the

Table 6
Effects of physical properties of the pellets on rabbit growth performance after weaning.

Trial 1.

	Double comparison groups						SEM	P-value
	AB	AC	AD	BC	BD	CD		
Number of rabbits at weaning	98	75	92	93	85	89		
Live weight (g/rabbit)								
35 days	842	859	777	782	824	812	58	0.118
50 days	1225	1259	1195	1222	1227	1196	46	0.487
64 days	1808	1907	1822	1824	1855	1798	67	0.517
Average daily gain (g/d)								
35–50 days	25	27	28	29	27	26	3	0.259
50–64 days	41	46	44	43	45	43	3	0.370

Trial 2.

	Double comparison groups						SEM	P-value
	EG	FG	EF	CH	CI	HI		
Number of rabbits at weaning	102	102	74	91	89	81		
Live weight (g/rabbit)								
35 days	986	947	934	889	948	959	62	0.228
50 days	1506	1510	1552	1511	1512	1477	43	0.591
64 days	2132	2138	2218	2152	2130	2133	61	0.518
Average daily gain (g/d)								
35–50 days	37	37	38	35	38	39.	2	0.784
50–64 days	44	45	47	45	44	47	3	0.344

pellet processing of this experiment did not alter pellet chemical composition and hydration properties, which suggests that post-ingestive effects were similar between feeds. Thus, dietary preferences were considered to be a good indicator of feed palatability, which is defined as the "physical and chemical properties of the diet that are associated with promoting or suppressing feeding behavior during the pre-absorptive or immediate post-absorptive period" (McArthur et al., 1993). In the first trial, results suggested a shift of preferences between the nest and the feeder, with a slight preference for the pellet with the greatest diameter over the lowest (6.0 mm over 2.0 mm) in the first days of the experiment, whereas the rabbits rejected 6.0-mm-diameter pellets a few days before weaning. The initial preference expressed for the 6.0-mm pellets may be explained by an overestimation of their intake due to their low durability index. Indeed, pellets of low durability produce a greater amount of fines, which are not consumed by the rabbits (Maertens, 2010) but are counted as consumed with food weighing method. Pellet durability could not be controlled with our experimental design during the pelletizing since die size has an intrinsic effect on durability (Oduntan and Koya, 2016). In the feeders, we were able to rank the pellets by order of preference: first: 2.0-mm-diameter pellets; second: 3.0- and 4.0-mm-diameter pellets; and third: 6.0-mm-diameter pellets. Regarding pellet physical properties, pellets with diameters ranging between 2.0 and 4.0 mm had similar hardness, durability and hydration properties, so we could therefore conclude that the higher palatability of 2.0-mm-diameter pellets was due to their small diameter. Pellet presentation can modify feed sensory characteristics such as appearance and feed texture sensation. Ease of prehension of small pellets may partly explain their attractiveness for the litters since rabbits are known to eat pellets one by one (Maertens, 1994). Regarding the largest pellets, they were found to have a low durability index, which could negatively affect their palatability since rabbits do not like fines as previously discussed. Therefore, it remains unclear to what degree the large diameter of these pellets is responsible for their low palatability. In the second trial, rabbits slightly avoided eating the 4.0-mm-diameter pellet processed with the highest compression rate when facing another kind of 4.0-mm-diameter pellet. However, this avoidance was only visible in one of the two comparison combinations in the nest and in the feeders. Limited statistical power due to the sample size used in the present study (n = 10 litters) may have reduced the chance to detect moderate magnitude preferences for pellets with a lower compression rate both in the nest and the feeders. Physical measurements performed on the pellet with the highest compression rate did not highlight any specific characteristics when compared to other 4.0-mm-diameter pellets. Consequently, the effects of compression rate on pellet palatability still need to be investigated.

Overall, in the present study, no clear preference pattern in the nest was determined. The small quantity of feed consumed in the nest, which requires high measurement accuracy, may explain why we did not detect preferences. This phenomenon can also be explained by the low activity of the kits during the two first weeks of life: their exploration of the nest is limited at that time and feed consumption probably occurred randomly. In contrast, in the feeders, suckling rabbits were able to differentiate pellets according to their diameter.

4.3. Stimulation of the early feed intake and implications

Currently, rabbit pellets are manufactured with a diameter of 3.0 or 4.0 mm (Acedo-Rico et al., 2010). High palatability of 2.0-

mm-diameter pellets in the present study suggests that a preferential use of small-diameter pellets could be advocated to stimulate early consumption. However, some studies have pointed out that when domestic caged rabbits expressed a preference for a specific feed rather than another, the daily feed intake could be similar between the two types of feed once they were offered alone (Gidenne et al., 2010). Nevertheless, these studies were performed on fattening rabbits, and suckling rabbits may present specific feed intake regulations. In the first double-choice trial, total feed intakes of treatments providing the smallest pellet did not differ from the feed intake of other treatments, except between 15 and 17 days (however those results might be meaningless due to low precision). It could suggest that the higher palatability of the small pellets is not sufficient to increase feed intake. On the contrary, in the second trial in this study, there was a trend towards a higher feed intake in the feeders for the treatments with 2.5-mm pellets when compared to treatments with 4.0-mm pellets. Experiments where one kind of pellet is tested per litter (no-choice tests) are now required to ensure that the feed intake increases with small pellets and to evaluate further consequences on rabbits growth.

In the current study, the onset of solid feed was advanced by eight days compared to conventional rabbitries where the solid feed intake behavior starts at around 16 days of age (Gidenne and Fortun-Lamothe, 2002). The substrates precociously reaching the gut from the solid feed are likely to stimulate the microbiota implantation process. Indeed, it was shown that intake of fecal pellets left behind by the doe in the first 10 days after delivery plays a role in cecal microbiota colonization (Kovács et al., 2006; Combes et al., 2014), even if the ingestion is small (a mean of ten fecal pellets per litter with free milking conditions). The feed is also a key factor for microbiota activity, as highlighted by Kovács et al. (2006) through an early weaning experiment: when the rabbit solid feed intake was stimulated as of 21 days of age by preventing milk supply, the cecal microbiota fermentation activity significantly increased. Seeding the microbiota of neonatal gut with healthy commensal bacteria is essential to optimize rabbit health since it its known that microbiota strongly interacts with mammal health (Mage et al., 2006; Combes et al., 2018). The effect of early feeding on the rabbit health needs to be further investigated since it could not be studied with our experimental design (all the litters had access to pellets as of 3 days of age).

5. Conclusion

Intake of supplemental solid feed provided in the nest was observed as of 8 days of age. The high variability of feed consumed during the early suckling period was partially explained by the litter weight at the beginning of the experiment: heavier litters were associated with higher solid feed intake at two weeks of age. Outside the nest, suckling rabbits were able to discriminate pellets according to their diameter with the following preferences: 2 mm > (3.2 and 4 mm) > 6 mm diameter pellets. The effect of compression rate on the kits' feeding behavior needs to be further investigated. In terms of implications, this research shows that it is possible to promote post-natal feed intake through a nest feeding system and that pellet palatability can be improved before weaning with an optimal presentation. The acceleration and the increase in the solid intake before weaning could contribute to the acquisition and maturation of the kit microbiota and, hence, contribute to improved health.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by the Institut Carnot Santé Animale, France [eFeedIT-ICSA-2015].

The authors gratefully acknowledge the assistance of M. Moulis and J-M Bonnemere at the rabbit experimental unit, as well as the technical help of M. Segura for starch analysis (INRA, GenPhySE unit). They also would like to thank F. Enjalbert for constructive criticism of the manuscript (ENVT, GenPhySE unit).

References

Acedo-Rico, J., Méndez, J., Santomá, G., 2010. Feed manufacturing. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), 2010. The Nutrition of the Rabbit, 2nd edition. CAB International, Wallingford, UK, pp. 200–221.

AFNOR, 1997. Norme Française homologuée. Aliments des animaux - Détermination séquentielle des constituants pariétaux. Méthode par traitement aux détergents neutre et acide et à l'acide sulfurique. AFNOR, PARIS, NF V, pp. 18–122.

Anonymous, 2013. Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. JORF n°0032 du 7 février 2013 (accessed 17 June 2019). https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2013/2/1/AGRG1231951D/jo/texte.

Anonymous, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. OJ L 276, 33–79.

Arroyo, J., Auvergne, A., Dubois, J.P., Lavigne, F., Bijja, M., Bannelier, C., Fortun-Lamothe, L., 2012. Effects of presentation and type of cereals (corn or sorghum) on performance of geese. Poult. Sci. 91, 2063–2071.

Bäuerl, C., Collado, M.C., Zúñiga, M., Blas, E., Martínez, G.P., 2014. Changes in cecal microbiota and mucosal gene expression revealed new aspects of epizootic rabbit enteropathy. PLoS One 9 (8), e105707.

Bonachera, A.A., Cervera, C., Martínez-Paredes, E., Ródenas, L., Pascual, J.J., Blas, E., 2017. Milk intake in kits: not only the total amount matters. World Rabbit Sci. 25, 159–166.

Bruininx, E.M.A.M., Schellingerhout, A.B., Binnendijk, G.P., van der Peet-Schwering, C.M.C., Schrama, J.W., den Hartog, L.A., Everts, H., Beynen, A.C., 2004. Individually assessed creep food consumption by suckled piglets: influence on post-weaning food intake characteristics and indicators of gut structure and hind-gut fermentation. Anim. Sci. 78, 67–75.

Casado, C., Piquer, O., Cervera, C., Pascual, J.J., 2006. Modelling the lactation curve of rabbit does: towards a model including fit suitability and biological interpretation. Livest. Sci. 99, 39–49.

Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., Gidenne, T., 2013. Engineering the rabbit digestive ecosystem to improve digestive health and efficacy. Animal 7, 1429–1439.
Combes, S., Gidenne, T., Boucher, S., Fortun-Lamothe, L., Bolet, G., Coureaud, G., 2018. Pour des lapereaux plus robustes au sevrage : des bases biologiques aux leviers d'action en élevage. INRA Prod. Animales 31 (2), 105–116.
Combes, S., Gidenne, T., Cauquil, L., Bouchez, O., Fortun-Lamothe, L., 2014. Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status. J. Anim. Sci. 92, 652–665.
De Passillé, A.M., Pelletier, G., Ménard, J., Morisset, J., 1989. Relationships of weight gain and behavior to digestive organ weight and enzyme activities in piglets. J. Anim. Sci. 67, 2921–2929.
Donner, A., Banting, D., 1989. Adjustment of frequently used chi-square procedures for the effect of site-to-Site dependencies in the analysis of dental data. J. Dent. Res. 68, 1350–1354.
EGRAN, 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. World Rabbit Sci. 9, 57–64.
Fortun-Lamothe, L., Boullier, S., 2007. A review on the interactions between gut microflora and digestive mucosal immunity. Possible ways to improve the health of rabbits. Livest. Sci. 107, 1–18.
Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T., Lapanouse, A., De Dapper, J., 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.
Gidenne, T., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Zemb, O., 2013. Capacité d'ingestion d'aliment sec par le lapereau au nid: Interaction avec l'ingestion de fèces dures maternelles. Proc. 15èmes Journées de la Recherche Cunicole 89–92.
Gidenne, T., De Dapper, J., Lapanouse, A., Aymard, P., 2007. Adaptation du lapereau à un aliment fibreux distribué avant sevrage: comportement d'ingestion, croissance et santé digestive. Proc. 12èmes Journées de la Recherche Cunicole 109–112.
Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., 2002. Feeding strategy for young rabbit around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. Anim. Sci. 75, 169–184.
Gidenne, T., Lebas, F., Fortun-Lamothe, L., 2010. Feeding behaviour of rabbits. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), Nutrition of the Rabbit. CABI, Wallingford, UK, pp. 233–252.
Giger Reverdin, S., 2000. Characterisation of feedstuffs for ruminants using some physical parameters. Anim. Feed Sci. Technol. 86, 53–69.
Gottlieb, G., 1971. Ontogenesis of sensory function in birds and mammals. In: Tobach, E., Aronson, L., Shaw, E. (Eds.), The Biopsychology of Development. Academic Press, New York, pp. 67–128.
Kacsala, L., Szendrő, Z., Gerencsér, Z., Radnai, I., Kovács, M., Kasza, R., Nagy, I., Odermatt, M., Atkári, T., Matics, Z., 2017. Early solid additional feeding of suckling rabbits from 3 to 15 days of age. Animal 12, 28–33.
Koenig, J.E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A.D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L.T., Ley, R.E., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108 (Suppl 1), 4578–4585.
Konstantinov, S.R., Favier, C.F., Zhu, W.Y., Williams, B.A., Kluss, J., Souffrant, W.B., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L., Smidt, H., 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. Anim. Res. 53, 317–324.
Kovács, M., Szendrő, Zs, Milisits, G., Biro-Nemeth, E., Radnai, I., Posa, R., Bonai, A., Kovacs, F., Horn, P., 2006. Effect of nursing method and faeces consumption on the development of bacetroides, lactobacillus and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. Reprod. Nutr. Dev. 46, 205–210.
Kozlowski, F., 1994. L'amidon, quel dosage pour quel échantillon. Cah. Techn. INRA 35, 5–22.
Langenbach, G.E., Weijs, W.A., Brugman, P., van Eijden, T.M., 2001. A longitudinal electromyographic study of the postnatal maturation of mastication in the rabbit. Arch. Oral Biol. 46, 811–820.
Lebas, F., Lamboley, B., 1999. Liquid phase sifting determination of the size of particles contained in pelleted rabbits feeds. World Rabbit Sci. 7, 229–235.
Lockwood III, J.R., 1998. On the statistical analysis of multiple-choice feeding preference experiments. Oecologia 116, 475–481.
Maertens, L., 2010. Feeding systems for intensive production. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), Nutrition of the Rabbit. CABI, Wallingford, UK, pp. 253–266.
Maertens, L., 1994. Influence du diamètre du granulé sur les performances des lapereaux avant sevrage. Proc. 6èmes Journées de la Recherche Cunicole 325–332.
Mage, R.G., Lanning, D., Knight, K.L., 2006. B cell and antibody repertoire development in rabbits: the requirement of gut-associated lymphoid tissues. Dev. Comp. Immunol. 30, 137–153.
McArthur, L.H., Kelly, W.F., Gietzen, D.W., Rogers, Q.R., 1993. The role of palatability in the food intake response of rats fed high-protein diets. Appetite 20, 181–196.
Méheust, D., Chevance, A., Moulin, G., 2017. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016. Rapport annuel. (accessed 14 June 2019). https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-01612084.
Oduntan, O.B., Koya, O.A., 2016. Effect of speed, die sizes and moisture contents on durability of cassava pellet in pelletizer. Res. Agric. Eng. 61, 35–39.
Padilha, M.T.S., Licois, D., Gidenne, T., Carré, B., 1999. Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively milk-fed young rabbits. Reprod. Nutr. Dev. 39, 223–230.
Padilha, M.T.S., Licois, D., Gidenne, T., Carré, B., Fonty, G., 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. Reprod. Nutr. Dev. 35, 375–386.
Pajor, E.A., Fraser, D., Kramer, D.L., 1991. Consumption of solid food by suckling pigs: individual variation and relation to weight gain. Appl. Anim. Behav. Sci. 32, 139–155.
Princée, F.P.G., 2016. In: Princée, F.P.G. (Ed.), Exploring Studbooks for Wildlife Management and Conservation. Inbreeding. Springer International Publishing, Norfolk, UK, pp. 185–186.
R Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org.
Reed, J.F., 2004. Adjusted chi-square statistics: application to clustered binary data in primary care. Ann. Fam. Med. 2, 201–203.
Seabolt, B.S., van Heugten, E., Kim, S.W., Ange-van Heugten, K.D., Roura, E., 2010. Feed preferences and performance of nursery pigs fed diets containing various inclusion amounts and qualities of distillers coproducts and flavor. J. Anim. Sci. 88, 3725–3738.
Sekirov, I., Finlay, B.B., 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. J. Physiol. 587, 4159–4167.
Tan, C., Wei, H., Zhao, X., Xu, C., Peng, J., 2017. Effects of dietary fibers with high water-binding capacity and swelling capacity on gastrointestinal functions, food intake and body weight in male rats. Food Nutr. Res. 61, 1308118.
Thomas, M., Van der Poel, A.F.B., 1996. Physical quality of pelleted animal feed 1. Criteria for pellet quality. Anim. Feed Sci. Technol. 61, 89–112.
Travel, A., Mirabito, L., Chanay, I., Souchet, C., Galliot, P., Weissman, D., Corrent, E., Davoust, C., 2009. Préférences alimentaires du lapereau selon le diamètre du granulé, dans le cadre d'une alimentation séparée mère-jeunes. Proc. 13ème Journées de la Recherche Cunicole 2–5.
Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Article 2 : Jeu de données sur l'ingestion précoce d'aliment solide et les performances de croissance de lapins allaités recevant des granulés différant par leur diamètre ou taux de compression dans le cadre d'un test de préférences en double-choix

Revue Data in Brief, 2020,Volume 29, 105196
https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105196

C. Paës, P. Aymard, A-M. Debrusse, F. Laperruque, C. Bannelier, K. Bébin, J. Duperray, C. Gohier, E. Guené-Grand, G. Rebours, T. Gidenne, L. Fortun-Lamothe, S. Combes

Mots clés: lapin, ingestion d'aliment, comportement alimentaire précoce, qualité du nid, taux de compression, granulation, présentation de l'aliment

Résumé: Le sevrage constitue une période critique pour la santé des lapins, avec une sensibilité élevée aux troubles digestifs. Favoriser la consommation d'aliment solide des lapereaux allaités de manière précoce dans le nid pourrait contribuer à maintenir leur santé autour du sevrage. La majorité des données disponibles concernant l'ingestion d'aliment du lapin ne concerne que la période où ces derniers sont capables de quitter le nid, c'est-à-dire autour de 16 jours. Nous fournissons ici un jeu de données unique illustrant la dynamique du démarrage d'ingestion solide de lapereaux allaités de 8 jours d'âge au sevrage. Nous avons quantifié le comportement d'ingestion d'aliment solide du lapereau et déterminé ses préférences alimentaires en utilisant neuf granulés présentant différentes propriétés physiques, différant soit par leur diamètre soit par leur taux de compression. En complément des données de l'article compagnon de Paës et al [1], nous fournissons (i) la description des neuf granulés expérimentaux produits, (ii) la description du système de notation en 3 points pour l'évaluation de la qualité du nid, (iii) des renseignements complémentaires sur le dispositif d'alimentation au nid, (iv) les données d'ingestion de lait et les calculs pour modéliser la courbe de lactation, (v) les données d'ingestion de granulés en fonction des caractéristiques physiques de ces derniers.

Data set on early feed intake and growth performances of rabbits fed during the suckling period with pellets differing in diameter or compression rate using a double-choice testing design

Charlotte Paës[1,3], Patrick Aymard[2], Anne-Marie Debrusse[2], François Laperruque[1], Carole Bannelier[1], Karine Bébin[3], Joël Duperray[4], Charly Gohier[5], Emeline Guené-Grand[6], Gwénaël Rebours[7], Thierry Gidenne[1], Laurence Fortun-Lamothe[1], Sylvie Combes[1]*

[1]*GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse INP, 31320 Castanet Tolosan, France*

[2]*INRA, UE1322 PECTOUL, 24 chemin de Borde-Rouge, 31326 Castanet-Tolosan, France*

[3]*CCPA, ZA du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France*

[4]*EVIALIS, Lieu dit Talhouët, 56250 Saint Nolff, France*

[5]*MiXscience, 2 avenue de Ker Lann, 35170 Bruz, France*

[6]*WISIUM, Rue de l'église, BP50019, 02407 Chierry, France*

[7]*TECHNA, Route de St-Étienne-de-Montluc, 44220 Couëron, France*

Corresponding author(s)
Sylvie Combes (sylvie.combes@inra.fr)

Abstract
Weaning is a critical period for the health of rabbits, with a high sensitivity to digestive diseases. Allowing early consumption of solid feed in the nest of the suckling rabbit could help to maintain its health around weaning. In general, previous studies have focused on feed intake of rabbits when they are able to leave the nest, i.e. around 16 days. Herein, we provide a unique dataset of the dynamics of the onset of feed intake in suckling rabbits from 8 days to weaning. We quantified the solid feed intake behaviour and determined the dietary preferences for pellets according to their physical properties using nine pellets differing in diameter or compression rate. Additionally to the data provided in Paës *et al*. [1] we provide (i) the description of the nine pellets processing (ii) the description of the 3 point-scale system for nest quality evaluation, (iii) details on the device used to provide pellets in the nest, (iv) milk intake data and milk intake curve calculation and (v) pellet intake data according to physical characteristics.

Keywords: rabbit; feed intake; onset of feeding behaviour; doe's nest quality; pellet compression rate; pelleting; nutrition; feed presentation

Specifications Table

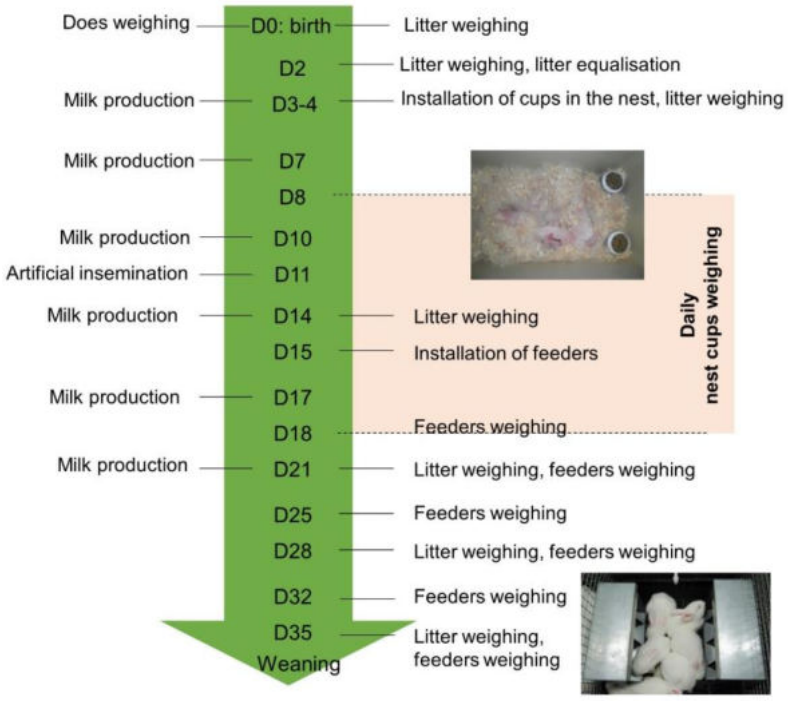
Subject	Animal Science and Zoology
Specific subject area	Rabbit nutrition, feed technology, feed physical characteristics, livestock intake behaviour
Type of data	Table Figure
How data were acquired	Feed intake in the cups in the nest was calculated based on the weight of feed offered and refused measured with an OHAUS scale (Parsippany, NJ, USA). Milk intake, litter weight and feed intake in the feeders were assessed using a scale (SWR08-10S Plateforme 310X275 Trolley, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) linked to an automatic recording system (Teo, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) with bluetooth connection. Individual weights were recorded at 50 and 64 days of age using a scale (SWR08-10S Plateforme 310X275 Trolley, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) linked to an automatic recording system (AGPA, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) with bluetooth connection. Nest quality was evaluated thanks to a 3 point-scale score based on representative photographs.
Data format	Raw Analyzed
Parameters for data collection	The experiments to determine early intake were conducted under standard farm procedure for rabbits with an adapted feeding system. Double-choice feeding test of pellets processed with different dies were conducted in two trials. In a first trial, pellets of 2.0, 3.2, 4.0 and 6.0 mm diameter were tested in pairs. In a second trial, pellets of identical diameter (2.5 or 4.0 mm) but manufactured with three die channel lengths: 10, 12, 14 mm or 18, 20 and 24 mm were compared in pairs.
Description of data collection	Early intake measurements were performed at the litter level before weaning. Pellet intake was measured daily in the nest between 8 and 17 days of age and at 18, 21, 25, 28, 32 and 35 days of age in the feeder. Milk intake was measured at 3 or 4, 7, 10, 14, 17 and 21 days

	by weighing the does before and after nursing. Litters were weighed after suckling at 3 or 4, 10, 14, 21 and 28 days of age. Individual rabbit weights were recorded at 50 and 64 days of age.
Data source location	INRA, PECTOUL Experimental Unit Castanet-Tolosan France
Data accessibility	With the article and raw data on (i) the nest quality scoring according to a 3 point-scale system, (ii) kits milk intake; (iii) pellet intake in double-choice preference test in the nest; (iv) pellet intake in double-choice preference test in the feeders; (v) weight of litter until weaning; and (vi) weight of the rabbits after weaning are available in this article as 6 supplementary files.
Related research article	Paës C, Fortun-Lamothe L, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Bannelier C, Debrusse AM, Gidenne T and Combes S 2019. Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. Animal Feed Science and Technology 255, 114223. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114223

Value of the Data

- These data provide detailed information about manufacturing characteristics of pellets designed for suckling rabbits, their intake dynamics and the growth performances of rabbits between 8 and 64 days of age
- These data will be useful to academic and business researchers in the animal feed sector
- These data present two major interests. First, they could be useful to researchers interested in creep feeding innovations helping to find out relationships between physical characteristics of pellets and intake in young rabbits. Second, they will contribute to a better understanding of the physical characteristics of pellets resulting from controlled technical processes
- In this way, these data could be implemented in predictive models for both onset of intake behaviour and technical processes of pellet manufacturing

Data Description

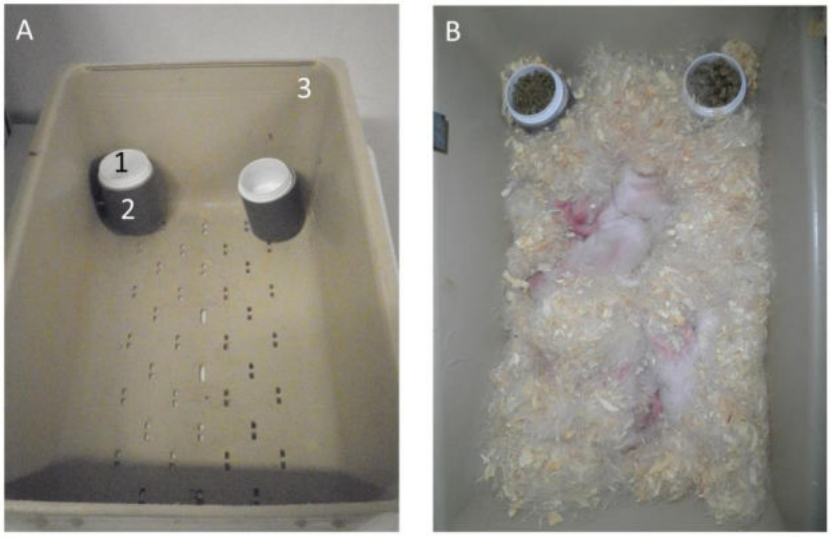


	Trial 1				Trial 2					
Pellet	A	B	C	D	E	F	G	C	H	I
Diameter (mm)	2	3.2	4	6	2.5	2.5	2.5	4	4	4
Die channel length (mm)	10	16	18	24	10	12	14	18	20	24
Pellet double choice experimental group	AB - AC - AD BC - CD				EF - EG - FG			CH - CI - HI		

Figure 1: Timeline scheme. The days of age (D) of the rabbits are indicated by the time line. Nest quality was assessed at day 2, before litter equalization. All rabbits had access to a double-choice test with pellets differing in their physical properties. From 3 days in trial 1 or 4 days in trial 2 to 18 days of age, rabbits were provided pellets in two cups placed in the nest according to their treatment assignment. In trial 1, six combinations of two pellets differing in their diameters were tested. In trial 2, pellets of the same diameter but with different compression rates were tested in pairs: 3 combinations with the diameter 2.5 mm and 3 combinations with the diameter 4 mm. A total of 10 litters were assigned to each one of the paired test comparison using stratified randomization (does parity for trial 2, litter weight at 2 days, location in the farm)

The objectives of the study were to determine the intake dynamics at the onset of feed intake in suckling rabbits. Solid intake was quantified inside and outside the nest from 8 days to weaning at the litter level. In addition, we measured consumption of milk. We determined dietary preferences of pellets according to their physical properties at the litter level using pellets differing in diameter or compression rate. A schematic representation of the experimental design is presented in Figure 1. In this experiment, nine pellets were processed by Tecaliman

(Nantes, France). Table 1 provides all technical characteristics of pellet processing. Pellets were provided in cups placed in vertical holding devices fixed to the nest (Figure 2).



1: Cups: 30 mL; height: 32 mm; diameter: 40 mm (GOSSELIN®, Le Mans, France)
2: Holder: PVC tube ; height 60 mm; diameter 50 mm
3: Nest box: length 38 cm; width 25 cm; height 20 cm

Figure 2: Device for feeding rabbits with pellets in the nest (A). Illustration of double-choice preference test in trial 1 with pellet A on the left and pellet D on the right of the nest (B). The kits were three days old. Cups were inverted laterally each day in the nest.

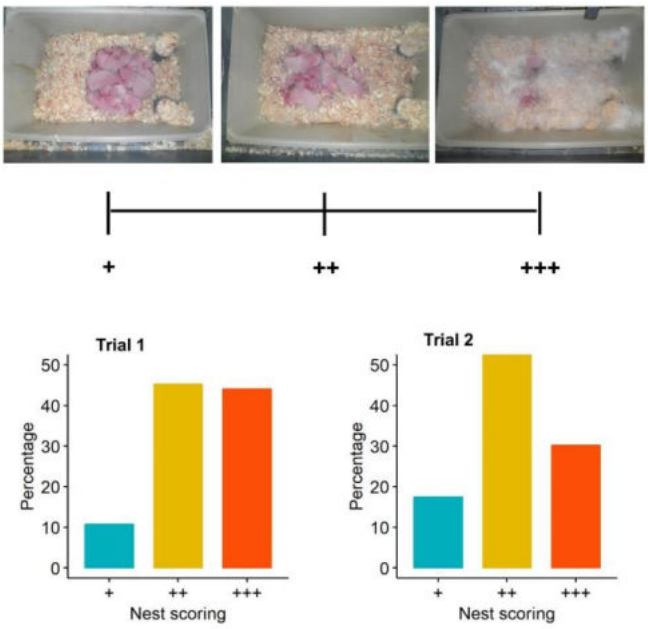


Figure 3: Three point-scale to assess nest quality and scoring distribution over the two trials

The nest quality was scored 2 days after farrowing. Figure 3 provides the 3-point scale reference used to assess nest quality. Distribution of scorings over the two trials is presented in Figure 3 (raw data are provided in supplementary file1). Milk intake was measured every 2 or 3 days (raw data are provided in supplementary file2) and lactation curve was calculated until 21 days (Figure 4) and further used in statistical modelling. Rabbits had *ad libitum* access to pellets in

the nest and in the feeders before weaning. After weaning rabbits were fed restricted. The amount of feed delivered after weaning is detailed in Table 2. Raw data on intake in the nest and in the feeders, weight of the litters until weaning and individual weight of the rabbits after weaning are provided as raw data in supplementary files 3-6.

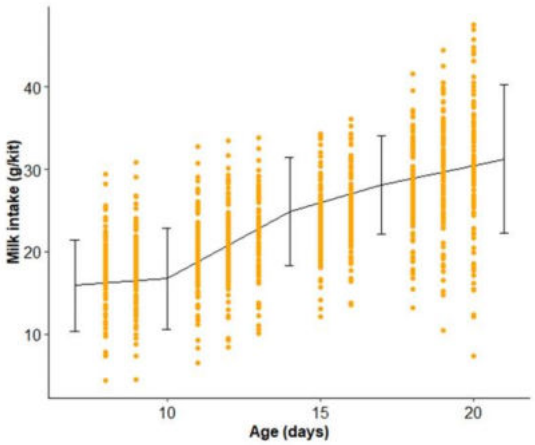


Figure 4: Milk intake curve from 7 to 21 days of age. Black line represents data collected in the farm at 7, 10, 14, 17 and 21 days in the two trials. Orange dots stand for calculated data obtained with a quadratic model.

Experimental Design, Materials, and Methods

All experimental procedures were conducted in compliance with the recommendations for animal care in experimentation in agreement with the EU Directive 2010/63/EU [2] and the Journal Officiel de la République Française [3].

In order to determine whether the technological characteristics of the pellets influences young rabbits feed intake, at the onset of solid feeding behaviour, two trials using double-choice tests were carried out (Figure 1). In the first trial, pellest from dies with different diameters were tested. In the second trial, pellets from different die lengths were tested at constant diameter. Four pellets were tested for the diameter test (pellets noted A, B, C and D) and six pellets were tested for differences in compression rate ratio (feeds C, E, F, G, H, I) (Table 1). Pellets were provided *ad libitum* in cups placed in vertical holding devices fixed to the nest (Figure 2) and in feeders in the cage. We provide here more details on pellet processing characteristics, nest quality evaluation, milk production measurement and milk curve calculation and intake data before weaning for each kind of pellet.

Pellet processing characteristics: The same mixed mash was used to produce the nine experimental pellets. Die dimensions were modulated to produce the different pellets and parameters of conditioning, cooling and drying were kept similar during manufacturing (Table 1). Conditioning occurred with steam addition at 1.7 bar before pelleting with a Kahl 14 – 175 pellet press through one of the nine experimental dies. Pellet length was set at 8 mm for all the

pellets. Physical characteristics of the feed obtained (hardness, durability, particles size and hydration properties) are presented in Paës *et al.* [1]

Table1: Manufacturing characteristics of the pellets

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Die channel diameter/length (mm)	2/10	3.2/16	4/18	6/24	2.5/10	2.5/12	2.5/14	4/20	4/24
Steam (bar)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
Temperature (°C)									
Mash at the entrance of the conditioner	12.3	16.4	17.5	17.2	15.5	17.4	16.0	17.4	15.5
Mash leaving the conditioner	65.1	65.1	65.2	65.2	65.1	65.1	65.1	65.2	65.2
Pellets just pressed	79.1	81.4	73.3	72.1	72.3	73.7	74.5	73.0	73.2
Flow rate (kg/h)	56.0	56.0	55.0	56.0	55.6	56.1	55.4	55.3	56.6

Animal handling: Litters were equalized to ten rabbits at 2 days of age, there was no replacement in case of death. During the first trial, females were inseminated on day 11 after farrowing and could therefore be both lactating and pregnant. Suckling was controlled until day 21 e.g. kits had access to the does for a fixed time (circa 10 minutes). The kits were individually identified from weaning (day 35). After weaning, rabbits were divided into groups of 5 (preferably between littermates). Any individual or litter showing clinical signs of illness (diarrhea,...) was removed from the experiment (mortality and eliminations were recorded daily). After weaning, sanitary events were recorded and presented in the supplementary file 6 with the following attributes: 11 stands for skinny rabbits, 12 for rabbits showing breathing problems, 13 for rabbits with digestive problems, 15 for diarrhea cases, 21 stands for very skinny rabbits, 23 for rabbits with severe digestive problems, 27 for wry neck, 43 when one abscess or more were observed, 50 stands for healthy rabbits.

Housing: The detailed characteristics of the housing used to control separately the doe's feed intake and that of its litters were provided as specific figures in Paës *et al.* [1]. Briefly, before weaning, the animals were raised in cages with separate mother/kits feeding systems. The mother's area was accessible to the kits and contained a raised feeder that was impossible for the kits to access. The space dedicated to kits was separated from that of the female by wire mesh and it contained two feeders that the female could not reach and a nest box. The nest was accessible to the female through a sliding door that allowed controlled suckling. After weaning, the animals were housed in collective cages of five (width: 78 x length: 46 x height: 30 cm).

Nest quality measurement: Nest quality was measured by a scoring system based on a 3-point scale for both trials two days after birth, before litter equalization. It consisted in evaluating the

amount of fur deposited by the female rabbit in the nest: a score of 1 was given if no fur is present, 2 when fur was present in the nest but did not completely cover the kits and 3 when the fur completely covered the kits (Figure 3).

Milk consumption measurement and milk intake curve calculation: Milk intake is estimated by weight difference of the female before and after nursing (Lebas, 1968) using a scale (SWR08-10S Plateforme 310X275 Trolley, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) linked to an automatic recording system (Teo, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) with bluetooth connection [5,6]. Raw data are provided as supplementary file 2. Estimation of daily milk consumption from 8 to 21 days was needed to investigate its relationship with early solid feed intake. Milk intake curve was thus modeled for each doe and each trial thanks to data obtained at 3 or 4, 7, 10, 14, 17 and 21 days (Figure 4). Quadratic equation was used since it is one of the best models to predict the daily milk yield of rabbit does [7]:

$$Y = a + b * X + cX^2$$

where Y is the daily milk intake and X is the rabbit age ; a, b and c are estimated coefficients specific to each female for a given trial

Feeding plan and double-choice experimental design: Kits had an *ad libitum* access to the pellets from 3 to 17 days in two cups (30 mL; height: 32 mm; diameter: 40 mm; GOSSELIN®, Le Mans, France) fixed to the nest in a holder to keep them in place while facilitating the daily handling for intake measures (Figure 2) and from 15 days onwards in two feeders introduced into the kits space until weaning. Both, cups and feeders were inverted laterally each day in the nest or cage, respectively. After weaning, animals were quantitatively fed restricted until 60 days of age to achieve an average daily gain of 40 g/day. The amount of feed distributed is given in Table 2. Rabbits were then fed *ad libitum* until commercial slaughter weight.

Table 2: Amount of feed distributed after weaning from 35 to 59-60 days of age

Age (days)	**Feed distributed (g/rabbit/day)**	
	Trial 1	Trial 2
35	50	90
36-42	60	90
43-49	75	130
50-52	90	140
53-56	110	140
57-59	125	150
60	140	*Ad libitum*
61-72	*Ad libitum*	*Ad libitum*

The litters (n = 60 in trial 1 and 63 in trial 2, respectively) were equalized to ten kits, 2 days after birth by cross-fostering or culling. The litters were then distributed into one of the six experimental groups in each trial depending on their mothers' parity and location in the farm (n = 10-11 litters per experimental group). Each experimental group corresponded to a complete double-choice feeding protocol where rabbits had access to two pellets provided in the two cups

in the nest and in the two feeders in the kits' space. The experimental group AB refers to the pellets A tested against B and similar terminology was used for other groups. Diameter preferences were evaluated in trial 1 and six combinations were tested: AB, AC, AD, BC, BD, and CD. Difference in compression rate was evaluated in trial 2 for two pellet diameters resulting in six other combinations: EF, EG, FG and CH, CI, HI for 2.5 and 4 mm, respectively.

Early Intake measurements and growth performances: Before suckling, cups were removed daily from the nest to prevent the doe from eating in the nest, then weighed (OHAUS, Parsippany, NJ, USA) and reintroduced after suckling. A significant intake was observed from 8 days on. Data were indicated as missing when at least one of the two cups containing the pellets was spilled or soiled or if waste had been observed. Outliers were defined as being outside the confidence interval [Average daily consumption for a given experimental group ± 3 x Standard deviation]. Data are provided as supplementary file 3.

Feeders for pellet intakes measurements were weighed at 18, 21, 25, 28, 32 and 35 days of age. Litter were weighed after suckling at 3 or 4, 10, 14, 21 and 28 days of age. The weight was automatically recorded using a scale (SWR08-10S Plateforme 310X275 Trolley, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) linked to an automatic recording system (Teo, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) with bluetooth connection [4, 5]. Raw data are provided as supplementary files 4 and 5. Individual weights were recorded at 50 and 64 days of age using a scale (SWR08-10S Plateforme 310X275 Trolley, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) linked to an automatic recording system (AGPA, Balea, Saint Mathieu de Tréviers, France) with bluetooth connection [4, 5]. Raw data are provided as supplementary files 6

Acknowledgments
This work was supported by the Institut Carnot Santé Animale, France [eFeedIT-ICSA-2015] and by the INRA metaprogram focused on the integrated management of animals' health (GISA; eFedBiota). The authors gratefully acknowledge the assistance of M. Moulis and J-M Bonnemere at the rabbit farm.

Competing Interests
The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships which have, or could be perceived to have, influenced the work reported in this article.

Supplementary files

File1_Nest_quality_scoring.csv: Nest quality scoring according to the 3 point-scale system presented in the figure 3 (FEMALE_ID; NEST_QUALITY_SCORING; TRIAL)

File2_Milk_Intake.csv: Milk intake in g per rabbit (TRIAL, FEMALE_ID, AGE, GROUP, MILK_INTAKE_PER_RABBIT, FEMALE_PARITY)

File3_Pellet_intake_in_the_nest.csv: Double-choice preference test pellet intake in g per rabbit in the nest cups (TRIAL; FEMALE_ID; PELLETS; DAY; NUMBER_OF_KITS_IN_THE_LITTER; LITTER_CONSUMPTION; KIT_CONSUMPTION)

File4_Pellet_intake_in_feeders.csv: Double-choice preference test pellet intake in g per rabbit in the cage feeders (TRIAL; FEMALE_ID; PERIOD; GROUP; PELLETS; KIT_CONSUMPTION)

File5_Rabbit_weight_before_weaning.csv: Weight of litter and average weight of the rabbit at 3, 10, 14, 21, 28 and 35 days of age. (TRIAL; FEMALE_ID; GROUP; NUMBER_OF_KITS_IN_THE_LITTER; DAY; LITTER_WEIGHT; KIT_WEIGHT)

File6_Rabbit_weight_after_weaning.csv: Weight of the rabbits after weaning at 50 and 64 days of age (TRIAL; RABBIT_ID; LITTER_OF_ORIGIN; FATTENING_CAGE; GROUP; AGE; RABBIT_WEIGHT; HEALTH_SCORING)

References

[1] C. Paës, L. Fortun-Lamothe, K. Bébin, J. Duperray, C. Gohier, E. Guené-Grand, G. Rebours, P. Aymard, C. Bannelier, A.-M. Debrusse, T. Gidenne, S. Combes, Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties, Animal Feed Science and Technology. 255 (2019) 114223. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114223.

[2] Anonymous, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance, 2010. http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj/eng (accessed June 14, 2019).

[3] Anonymous, Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, 2013. https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/2013/2/1/AGRG1231951D/jo/texte (accessed June 14, 2019).

[4] F. Lebas, Mesure quantitative de la production laitière chez la lapine., Annales de Zootechnie. 17 (1968) 169–182.

[5] F. Laperruque, C. Staub, Le système d'information Sicpa Expérimentations. Cahier des Techniques de l'INRA, 78-81. (2018)

[6] H. Lagant, C. Allain, J. Bailly, S. Barbey, J. Barrieu, M.-C. Batut, Y. Baumard, H. Caillat, S. Colette, D. Jaccaz, A.-M. Debrusse, F. Laperruque, S. Normant, A. Patinote, L. Ravon, F. Reigner, J. Savoie, Les systèmes d'Informations de phénotypage des animaux à l'Inra. Cahier des Techniques de l'INRA, 53-67. (2018)

[7] C. Casado, O. Piquer, C. Cervera, J.J. Pascual, Modelling the lactation curve of rabbit does: Towards a model including fit suitability and biological interpretation, Livestock Science. 99 (2006) 39–49. https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.05.019.

Article 3 : Exploration du comportement alimentaire du lapereau allaité : étude de l'acceptation de différentes présentations de l'aliment démarrage et attractivité d'additifs sensoriels

Revue Animal, 2020, Volume 14, Issue 8, pp. 1629-1637
https://doi.org/10.1017/S1751731120000038

C. Paës, L. Fortun-Lamothe, G. Coureaud, K. Bébin, J. Duperray, C. Gohier, E. Guené-Grand, G. Rebours, P. Aymard, C. Bannelier, A.M. Debrusse, T. Gidenne, S. Combes

Mots clés: lapereau, aliment démarrage, ingestion d'aliment solide, préférence, additif sensoriel

Résumé : Le but de cette étude était de déterminer l'acceptation de différentes présentations de l'aliment par le lapin ainsi que ses préférences en termes d'arômes en début de vie afin de stimuler son ingestion solide, dans un objectif de préservation de la santé. Deux essais ont été conduits pour évaluer les effets de la présentation de l'aliment et de l'ajout d'arômes sur l'attractivité de l'aliment démarrage. Les aliments démarrage testés étaient mis à disposition dans le nid de 3 à 17 jours d'âge avec un allaitement contrôlé, et l'ingestion journalière était mesurée à partir de 8 jours d'âge. Dans le premier essai, cinq aliments différant par leur présentation étaient testés séparément (n=60 portées). Trois présentations d'aliments déshydratés ont été choisies : un granulé commercial (P), des miettes de granulés (cP) et des miettes de bouchons de pulpe de betterave (cBP). Des aliments riches en eau étaient également apportés sous la forme de betterave fourragère crue (B) ou d'aliment semi-solide sous forme de gel produit à partir de pulpe, de jus de betterave fourragère et d'agar (gB), soit un total de 5 traitements expérimentaux dans le premier essai. Dans la seconde expérimentation, des tests en double-choix ont été réalisés sur 4 aliments gélifiés (n=72 portées), soit un total de 6 comparaisons. Ces gels agar étaient réalisés à base de farine de granulés avec ou sans additif sensoriel : un gel contrôle non odorisé et trois gels comprenant 0,20% d'arôme banane, 0,06% d'arôme fruits rouges et 0,10% d'arôme vanille respectivement. Dans notre premier essai, les lapereaux consommaient plus de gB que les autres présentations d'aliments, en matière fraîche

(P<0,001), avec un ingéré total de 7,0 ± 1,8 g/lapin entre 8 et 17 jours d'âge. En matière sèche, les consommations totales de granulés P (1,6 ± 0,4 g de MS/lapin) et de gel gB (1,4 ± 0,4 g de MS/lapin) étaient les plus élevées, tandis que cBP était très peu consommé (0,3 ± 0,1 g of MS/lapin). La supplémentation en vanille de l'aliment démarrage gélifié induisait une légère hausse de l'ingestion (consommation relative de 57% comparé au lot contrôle, P=0,001) par rapport aux autres gels (aromatisés ou non). L'ingestion de gel était indépendante de la consommation de lait mais était corrélée au poids de portée à 3 jours d'âge (r=0,40, P<0,001). Dans les deux essais, la croissance du lapin avant et après sevrage n'était pas affectée par le type d'aliment précoce fourni. Nos résultats ont confirmé que l'apport d'un aliment démarrage favorisait la consommation d'aliment solide du lapin à des stades précoces. L'apport d'un aliment sous forme de gel favorisait la consommation d'aliment par les lapins et une supplémentation en vanille augmentait son appétence. Dans une perspective d'optimisation de l'ingéré solide précoce du lapereau allaité, des études complémentaires pour explorer l'importance des caractéristiques de l'aliment démarrage semblent nécessaires.

Insights into suckling rabbit feeding behaviour: acceptability of different creep feed presentations and attractiveness for sensory feed additives

C. Paës[1,3], L. Fortun-Lamothe[1], G. Coureaud[2], K. Bébin[3], J. Duperray[4], C. Gohier[5], E. Guené-Grand[6], G. Rebours[7], P. Aymard[1], C. Bannelier[1], A.M. Debrusse[1], T. Gidenne[1], S. Combes[1]

[1]*GenPhySE, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse INP, 31320 Castanet-Tolosan, France*

[2]*Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, CNRS, INSERM, Université Claude Bernard, Lyon 1, 69675 Bron Cedex, France*

[3]*CCPA, ZA du Bois de Teillay, 35150 Janzé, France*

[4]*EVIALIS, Lieu dit Talhouët, 56250 Saint Nolff, France*

[5]*MiXscience, 2 avenue de Ker Lann, 35170 Bruz, France*

[6]*INZO, Rue de l'église, BP50019, 02407 Chierry, France*

[7]*TECHNA, Route de St-Étienne-de-Montluc, 44220 Couëron, France*

Corresponding author: Sylvie Combes. E-mail: sylvie.combes@inra.fr

Short title: Identification of optimal rabbit creep feeds

Abstract

The aim of this study was to determine the rabbit's acceptability for different feed presentations and its preferences for flavours at an early stage of life in order to stimulate its solid feed intake, which may help preserving health. Two trials were conducted to evaluate the effects of physical form and flavouring on creep feed attractiveness. All the diets tested were provided in the nest from 3 to 17 days in a controlled nursing situation, and the daily intake per litter was recorded as of 8 days of age. In the first trial, five feed presentations were tested separately (n=60 litters). Three dry presentations were chosen: commercial pellet (P), crumb from commercial pellet (cP) and crumb from beet pulp pellet (cBP). Hydrated feeds were also provided with either raw fodder beetroot (B) or a semi-solid feed in agar gel form produced with fodder beetroot juice and pulp (gB), which resulted in five treatments for the first experiment. In the second trial, double-choice tests were performed on four feed gels (n=72 litters), leading to six comparison treatments. These agar gels were made of pellet mash without or with a sensory additive: one non-odorised control gel and three gels with 0.20% banana flavour, 0.06% red berry flavour and 0.10% vanilla flavour, respectively. In the first trial, kits ate more gB in fresh matter than other feed presentations (P<0.001), with a total intake of 7.0 ± 1.8 g/rabbit from 8 to 17 d. In dry matter, the total consumption of pellets P (1.6 ± 0.4 g of DM/rabbit) was the highest together with the gB form (1.4 ± 0.4 g of DM/rabbit), whereas cBP was barely consumed (0.3 ± 0.1 g of DM/rabbit). Gel feed supplemented with vanilla was slightly more consumed than other flavoured and non-odorised gels (relative consumption of 57% when compared to control gel; P=0.001). The gel feed intake was independent of the milk intake but was correlated with the litter weight at 3 d (r=0.40, P<0.001). In both trials, rabbit growth before and after weaning was not affected by the type of creep feed provided. Our results confirmed that providing creep feed promotes the solid intake of rabbits at early stages. Gel feed form motivated rabbits to eat and vanilla flavour supplementation increased the feed palatability. Those creep feed characteristics

should be explored further for seeking effective stimulation of the onset of the feed intake in suckling rabbit.

Keywords: rabbit kit, creep feed, solid feed intake, preference, flavouring additive

Implication

In order to stimulate the onset of the feed intake as a way to promote gut health, this study aimed to determine the most suitable feed presentation for suckling rabbits. Our findings suggest that technological solutions with high water content and low hardness should be considered when manufacturing creep feed. Moreover, our results have shown that some flavouring compounds, such as vanilla flavour, may influence creep feed attractiveness for young rabbits. Hence, our trials pave the way for further studies on early nutritional control of the young rabbit health status.

Introduction

In commercial rabbit farming, digestive disorders are frequently observed around weaning and are the major cause of mortality (Marlier et al., 2003). A survey conducted in French rabbitries in 2017 revealed that the mortality rate between birth and sale reached 25% with 9% of deaths observed after weaning (Lebas, 2018). To reduce economic losses and decrease the use of antibiotic treatments, a new system to manage young rabbits is urgently needed.

Rabbits encounter several challenges during weaning: besides that they have to become behaviorally independent from their mothers and to adapt to exclusive solid diets rich in starch and vegetal proteins, they might face new housing and companions (Combes et al., 2013). In pig industry, extensive research is devoted to nutritional strategies targeting a smooth transition from milk to dry feeds in order to alleviate weaning stress (Pluske et al., 2005).

In rabbit farms, solid feed is introduced in the pre-weaning period but to our knowledge, no feeding system adapted to suckling kits has been developed yet. Therefore, young rabbit usually starts to consume pellets as of 16-18 days of age when it is able to leave the nest and catch

pellets in the doe's feeder (Gidenne and Fortun-Lamothe, 2002), whereas some experiments revealed the kit's ability to ingest solid substrate as early as 3 days (Combes et al., 2014; Kacsala et al., 2018). To develop new management practices, attempts to better understand young rabbit feeding behaviour are essential. Previous studies demonstrated the importance of diet presentation for growing rabbits, with a strong preference for pellets over alternative presentations (mash, raw materials, etc; Maertens, 2010). A recently published paper highlighted the influence of pellet diameter on the preferences of the suckling rabbit (Paës et al., 2019). However, the feed properties that influence the young rabbit's voluntary feed intake before weaning remain largely unknown. The use of aromatic substances as additives seems promising to improve feed palatability since the rabbit's olfactory system is fully developed at birth (Gottlieb, 1971; Coureaud et al., 2007, 2008).

The first pellets consumed by young rabbits in commercial farms may not be adapted for grasping and chewing, and we hypothesized that other feed presentations may be more suitable for these young animals. In an attempt to stimulate early feed intake, we aimed to test (1) the suitability of different feed forms to encourage the creep intake, and (2) the young rabbit's attraction for aromatic compounds before weaning. Throughout this paper, we use the term "creep feeding" to refer to the solid feeding of rabbit kits in the nest while they are still suckling. In the first trial, five feeds that differed by their presentation were provided in the nest with a single choice to determine their consumption by the young rabbit and to thus evaluate their acceptability. Dry presentations were tested with complete feed pellets, crumbled-pellets and crumbled beet pulp. Pieces of fresh beets and mashed beets included in a feed gel (semi-solid feed) were also provided. In the second trial, three commercial aromatic substances were included in a semi-solid feed form (agar gels) and provided in the nest following a double-choice experimental procedure to assess flavour preferences.

Material and methods

Animal housing and management

The study was conducted by the collaborative network of the Groupe d'Experimentation Cunicole (consortium of the companies CCPA, EVIALIS, INZO, MiXscience and TECHNA). The experiments were carried out at the PECTOUL Experimental Unit (INRA, Castanet-Tolosan, France, agreement B31 113 16). Animals were handled according to the guidelines for animals used in experiments, according to EU 2010/63/EU and in agreement with French legislation (NOR:AGRG1238753A 2013).

Female rabbits (hybrid breed PS19; Hypharm, France) were inseminated with semen from commercial male breeds for two consecutive reproductive cycles. The does and their litter (n=60 and 72 in Trials 1 and 2, respectively) were raised in a ventilated breeding unit in individual wire cages (61 x 69 x 49 cm, including the nest box: 38 x 25 x 20 cm). Temperature varied between 16°C and 30°C (average temperature of 21°C and 20°C for the first and second trial). Cages were equipped to allow the mother and its litter to be separately fed (Paës *et al*., 2019). The day of birth was designated as postnatal day 0 (0 d). At 2 d, nest quality was assessed using a 3-point scale: 1 corresponded to a nest of weak quality in which only wood shavings were found; 2 a nest of medium quality in which doe fur was present but insufficient to fully cover the litter; and 3 a nest of good quality in which doe fur entirely covered the litter. After nest quality assessment, the litter size was standardised to ten kits per doe by cross-fostering or culling. Litters were assigned to treatments at 3 d by stratified randomisation on the does' parity (first to fifth parturition, three parities on average), the litter weight at standardisation (79 ± 9 and 69 ± 10 g/kit in Trials 1 and 2, respectively) and the allocation in the farm (n=3 rooms). Controlled suckling was applied once a day in the morning between 8:00 a.m and 9:00 a.m until 21 d. Two water nipples were available: one in the doe area and one in the litter space, outside of the nest. In both trials, feed was offered *ad libitum* to the young rabbits in the nest from 3 to

17 d using plastic cups (30 mL; height: 32 mm; diameter: 40 mm; GOSSELIN®, Le Mans, France). Cups present in the nest were removed before suckling to prevent the doe from eating in the nest, then weighed and finally reintroduced after suckling. The feed contained in the cups varied according to the experimental treatment. In both trials, all the litters received commercial pre-weaning pellets (P) *ad libitum* from 15 to 35 d in one feeder outside the nest, inaccessible to the doe. At weaning (35 d), kits were assigned to cages of five rabbits according to the experimental group before weaning and the litter of origin. Consistent with common feeding strategies in France, the animals were submitted to restricted feeding until 64 d in order to achieve an average daily gain of 40 g/day. Animals were then fed freely until slaughter (72 d).

Experimental groups and diets

In the first trial, 3 days after parturition, litters were divided into five experimental groups (n=12 per group) with one single choice of creep feed provided in the nest. In group P, kits received commercial pellets (length: 11 ± 3 mm, diameter: 3.5 mm), formulated for rabbit females and their litter (Table 1). In groups cP and cBP, kits received crumbs from the same pellets P or crumbs from commercial sugar beet pulp pellets, respectively. To obtain the crumbs, pellets were ground with a rotor mill (Pulverisette 14; FRITSCH, Idar-Oberstein, Germany). Crumbs that passed through a 2.8-mm sieve but retained on a 2-mm sieve were used for the experiment. In the three groups (P, cP and cBP), feed was provided in a cup maintained horizontally in a holder to keep it in place while facilitating the daily handling for ingestion measures. Kits of the two other groups had access to hydrated feed onto a cup vertically clipped on one side of the nest. In all the cases, cups were placed at the nest material surface for better accessibility. Hydrated feed was either raw fodder beetroots (*Beta vulgaris var. crassa)* cut into cylinders to fit into the cups (B), or agar gel feed poured into cups and obtained by mashing the fodder beetroots (gruel aspect, treatment gB). To prepare gels, fodder beetroot juice was extracted and mixed with a part of the remaining pulp. The mixture was then heated to 80°C to allow the addition of agar (pulp-to-juice ratio of 1:4 with 0.2% of agar). The beetroot cylinders were cut

and changed every 2 days whereas the gels were renewed every day. Figure 1 illustrates the presentations cBP, B and gB.



Figure 1 : Pictures illustrating alternatives to pellets provided in rabbit litter nests from 3 to 17 d. In the upper part of the figure: crumbled beet pulp pellets (cBP) and gels made with fodder beetroots (gB). In the bottom part of the figure: raw fodder beetroots (B).

In the second trial, a double-choice feed preference test was conducted. All the feeds provided from 3 to 17 d were in the form of gels and differed only by the flavouring formulation incorporated. Gels contained either no aroma (labelled N), banana flavour (mix of flavouring substances 15 % w/w on vegetal carrier, labelled B), red berry flavour (mix of flavouring substances 10 % w/w on vegetal carrier, labelled R) or vanilla flavour (mix of flavouring substances 10 % w/w on vegetal carrier, labelled V). The three sensory additives were provided by Phodé (Terssac, France). To produce feed gels, non-odorised commercial pellets were transformed into mash (particles size smaller than 2 mm), and the mash and the flavouring

additive were then quickly mixed with hot water (80-90°C) and agar (mash-to-water ratio of 1:4 with 0.6 % of agar). Following the supplier's recommendations, flavours were incorporated at 0.20 %, 0.06 % and 0.10 % for the B, R and V gel groups, respectively, in order to provide the same level of olfactory perception. The products and dosages are in compliance with regulation (EC) N° 1831/2003. The four types of gels were tested in pairs in two different cups vertically clipped onto the two opposite sides of the nest (height: 7.5 cm), which resulted in six experimental groups: BN, BR, BV, NR, NV and RV, where treatment BN represents gel B tested against gel N for example (n=12 litters per comparison group). To avoid confusion between feed location and flavour preference, the position of each kind of flavoured gel was reversed every day when the gels were renewed.

Chemical composition analysis was performed on creep feeds in the first trial using ISO methods (DM and ash for dry feed: ISO 6496:1999; nitrogen content: ISO 16634-1:2008; crude fat content: ISO 6492:1999; gross energy: ISO 9831:1998) and the procedures described by the European Group on Rabbit Nutrition (EGRAN, 2001). For hydrated feeds (B, gels gB, N, B, R and V), DM was obtained by freeze-drying for 48 h. Since the same commercial pellets P as those in the first trial were used to produce the feed gels in the second trial, only DM content was evaluated on these semi-solid feed (N: 243; B: 252; R: 259; and V: 253 g of DM/kg). The chemical composition of the experimental meals is given in Table 1. Hardness was determined 40 times with the Kahl Pellet Hardness Tester (AMANDUS KAHL GmbH & Co. KG, Reinbek, Germany) on pellets P (12 ± 3 kg force) and on the commercial sugar beet pulp pellets used to make up the cBP diet (66 ± 9 kg force).

Table 1: Ingredients of commercial pellets provided in the rabbit nest (Trial 1) and in the rabbit feeder (Trials 1 and 2), and chemical composition of the experimental feeds of the first trial. Commercial pellets (P), crumbled pellets (cP), sugar beet pulp pellet crumbs (cBP), raw fodder beetroots (B), and agar gels containing the pulp and juice of fodder beetroots (gB) were all provided in the rabbit nest.

Ingredients (g/kg as fresh matter)	
	P and cP [a]
Barley	174
Wheat bran	301
Rapeseed meal	30
Rapeseed oil	2
Sunflower whole seed	236
Sunflower husk	89
Sugar beet pulp	95
Sugar beet molasses	50
Sodium chloride	6
Calcium carbonate	12
L-Lysine, 20%	1
Mineral and vitamin premix [b]	5

Chemical composition (g/kg of fresh matter except for gross energy)				
	P and cP	cBP	B	gB
Dry matter [c]	890	909	236	204
Gross energy (MJ/kg)	16.4	16.6	3.9	3.2
Crude protein	172	82	9	9
Crude fat	27	2	2	1
Neutral detergent fibre	316	488	26	24
Acid detergent fibre	176	223	13	9
Acid detergent lignin	53	25	5	1
Ash	80	10	11	12
Starch	97	3	1	1

[a] Chemical analyses were performed on pellets P only, assuming that crumbles cP have similar composition

[b] Premix provided per kg of complete feed: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D3, 1000 IU; vitamin E, 50. IU; Cu, 10 mg; Fe, 100 mg; Zn, 50 mg; Mn, 5 mg; I, 0.2 mg; Co, 0.1 mg; Se, 0.2 mg.

[c] At distribution.

Zootechnical measurements

Rabbit mortality was recorded daily from 3 to 72 d. Early feed intake was calculated daily at the litter level from 8 to 17 d in the first trial and from 10 to 17 d in the second trial using a 0.001-g accuracy scale. When waste or cup spillage occurred in one cup, we considered the daily feed consumption as missing data. In both trials, autogenic change in mass (water loss

due to evaporation or moisture absorption) was evaluated for each type of feed in one empty nest per room from 8 to 17 d. The amounts of pellets offered in the feeders and refused were weighed at 15, 18, 21, 25, 28, 32 and 35 d. If one kit was found dead between these dates, the remaining feed in the cage was weighed to recalculate feed intake. Milk production was measured as the difference of female weight before and after suckling (Lebas, 1968; Maertens *et al.*, 2006) at 3, 7, 10, 14, 17 and 21 d. Litter weight after suckling was recorded at 3, 14, 21 and 28 d. Individual rabbit weight was measured at weaning, at 50 and 64 d.

Intake calculation and statistical analysis

Autogenic changes in the mass of pellets, crumbled-pellets and crumbled beet pulp were negligible (weight loss under the measurement uncertainty). Water loss was taken into account for raw beetroots and gel feeds intakes based on the evaporation measured in the controlled nests (n=3 per room). In the first trial, a daily correction factor in grams was applied. For the gel feeds in the second trial, water loss amounted to 6% of the initial gel quantity supplied, regardless of the day and the experimental treatment. This correction was thus applied to the intake measurements. In the first trial, multiple imputations using predictive mean matching were performed (*mice* package in R) on feed presentations with missing data in order to calculate the total intake in the nest. Dietary intake and performance data before weaning (the litter as the experimental unit) were analysed by a one-way ANOVA followed by a post-hoc Tukey HSD test in the case of significant results. A linear mixed procedure was applied on post-weaning performance data (the rabbit as the experimental unit) with experimental group as a fixed effect and litter as a random effect. We modelled daily milk intake at 11, 12, 13, 15 and 16 d from data obtained in the farm with a quadratic model (Casado *et al.*, 2006). These longitudinal data were used in a linear mixed model aiming to investigate factors affecting feed gel consumption in the nest for the second trial. The notation of our model performed with *lmer* function in R was:

$$\text{Gel intake} \sim \text{Milk intake} + \text{Weight} + \text{Day} + \text{Nest} + (1|\text{Litter})$$

Gel intake: daily consumption of gel feeds by the litter
Milk intake: daily consumption of milk by the litter
Weight: litter weight at 3 d
Day: between 10 and 17 d
Nest: nest quality (on a 3-point scale)

To determine flavour preference in the second trial, relative consumption was calculated for each feed gel within a litter, which is the percentage contribution of one gel type to the total intake. For example, for a given litter of BN treatment, the relative consumption of gel B was calculated as follows:

$$\textit{Relative consumption}_{B} = \frac{\text{Gel B intake}}{\text{Gel B intake} + \text{Gel N intake}} * 100$$

If the relative consumption value of a gel was significantly higher than the neutral value of 50% (sample *t*-test), then a preference for the given gel was considered within the treatment. When relative consumption values did not fit a normal distribution, arcsine transformation was used. All statistical analyses were performed using R software (R Core Team, 2018). Differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$.

Results

Growth performance and health status

In the first trial, the mortality rates were 3.2% from 3 to 35 d and 1.6% from 36 to 72 d. They were not affected by the creep feed offered before weaning. In the second trial, mortality rates were 8.6 and 5.9% before and after weaning, respectively, and no experimental group effect on mortality was observed. In both trials, milk intake was similar between groups until 21 d. Similarly, the growth of the rabbits before and after weaning was not affected by the type of creep feed provided in the nest or by the sensory additives used (Table 2 and Supplementary Tables S1 and S2).

Table 2: Feed intake before weaning and live weight of 2 and 5 week-old rabbits according to the type of creep feed provided in the nest (Trial 1). Commercial pellets (P), crumbled pellets (cP), sugar beet pulp pellet crumbs (cBP), raw fodder beetroots (B), and agar gels containing the pulp and juice of fodder beetroots (gB) were all provided in the rabbit nest. Means ± sd denoted by a different letter indicate significant differences between treatments.

	P	cP	cBP	B	gB	RMSE	P-value
n (litters)	12	12	12	12	11		
Total creep feed intake in the nest (g/rabbit)[1]							
Fresh matter	1.9 ± 0.5 ^{c}	0.8 ± 0.4 ^{b}	0.3 ± 0.1 ^{a}	1.0 ± 0.4 ^{b}	7.0 ± 1.8 ^{d}	0.8	***
DM	1.6 ± 0.4 ^{b}	0.7 ± 0.4 ^{ab}	0.3 ± 0.1 ^{a}	0.2 ± 0.1 ^{a}	1.4 ± 0.4 ^{b}	0.3	***
Commercial pellet intake in the feeder (g of DM/day/rabbit)							
15 – 18 d	0.2 ± 0.1	0.8 ± 0.8	0.5 ± 0.5	0.7 ± 0.8	1.2 ± 0.8	0.7	ns
18 – 21 d	3 ± 1 ^{a}	3 ± 1 ^{a}	4 ± 2 ^{ab}	4 ± 2 ^{ab}	5 ± 2 ^{b}	1.5	**
21 – 25 d	14 ± 3 ^{a}	14 ± 3 ^{a}	15 ± 3 ^{ab}	16 ± 3 ^{ab}	18 ± 3 ^{b}	3.1	*
25 – 32 d	44 ± 9 ^{a}	53 ± 6 ^{b}	55 ± 7 ^{b}	57 ± 15 ^{b}	56 ± 6 ^{b}	9.4	**
32 – 35 d	47 ± 13	53 ± 5	53 ± 8	54 ± 13	56 ± 6	9.6	ns
Cumulative pellet intake in the feeder (g of DM/rabbit)							
15 – 35 d	535 ± 58 ^{a}	536 ± 58 ^{ab}	560 ± 54 ^{b}	606 ± 180 ^{b}	593 ± 60 ^{b}	101	**
Live weight before weaning (g/rabbit)							
14 d	269 ± 25	268 ± 19	262 ± 21	255 ± 37	252 ± 26	26	ns
35 d	945 ± 106	930 ± 100	916 ± 104	922 ± 96	921 ± 99	101	ns

[1] Calculated with imputed values when necessary with a maximum of three out of nine imputed values recorded per litter.

Feed intake

Higher waste or cup spillage were observed for dry feeds: missing values accounted for 10%, 13%, 15%, 2% and 0% of consumption data respectively for P, cP, cBP, B and gB. Fresh matter and dry matter (DM) intakes in the nest were affected by the type of feed from the beginning of the first experiment (Figure 2 and Table 2). The daily intake of fresh gel gB was greater than the other creep feeds as of 8 d ($P<0.001$). In fresh matter, the total feed intake of gB was 7 times higher than the intake of raw fodder beetroots B. The fresh intake of P feed was greater than the other dry feeds as of 9 d (0.1 g/rabbit, $P=0.01$), and this difference was maintained throughout the experiment (+1.1 and +1.6 g of P feed fresh matter consumed in the nest per rabbit compared to cP and cBP, respectively). The cBP feed was almost not consumed

throughout the whole experiment (0.3 ± 0.1 g of fresh matter/rabbit in total). Regarding B presentation, a significant decrease in intake was observed the days the creep feed was not changed (-39%; P<0.001) as for instance at 15 and 17 d in Figure 3. On a DM basis, total feed intake of gB and P were the highest ones (1.6 ± 0.4 and 1.4 ± 0.4 g/rabbit), and daily intakes were similar throughout the experiment, except at 17 d (+34% for pellets P compared to gB; P=0.03). The type of creep feed provided in the nest appeared to have a subsequent effect on the intake in the feeder before weaning (Table 2). In particular, pellets consumption in the feeder was significantly lower in the P group from 18 to 32 d than in the gB group (-18%).

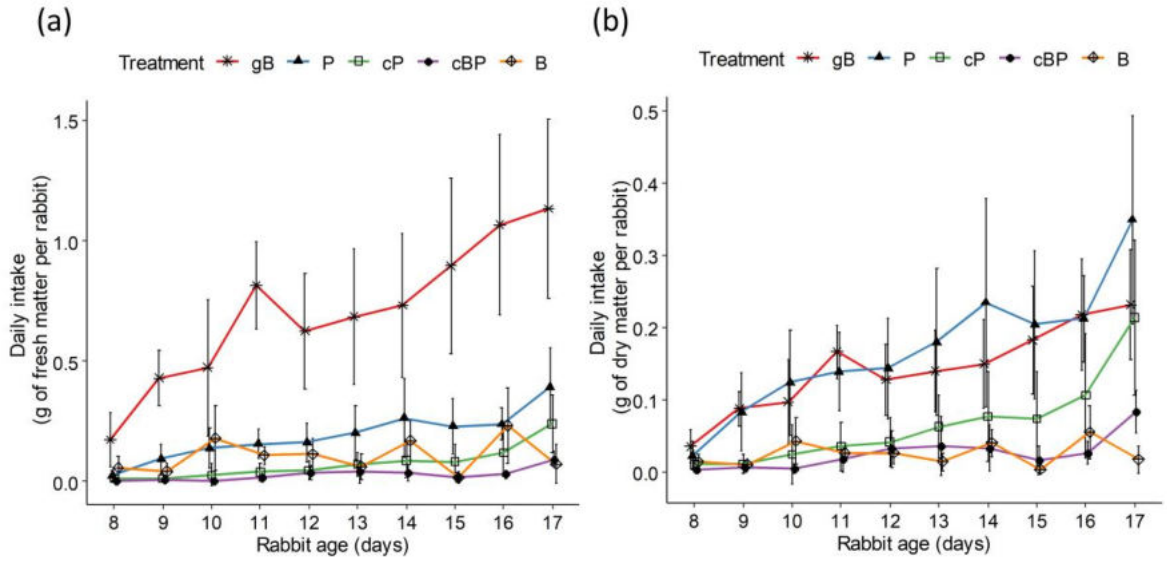


Figure 2: Kinetics of consumption of different creep feed types by young rabbits in fresh (a) or dry matter (b) (means ± sd, Trial 1). In the nest, in addition to doe milk, kits received commercial pellets (P), crumbled pellets (cP), crumbled beet pulp pellets (cBP), raw fodder beetroots (B) or gels made with fodder beetroots (gB).

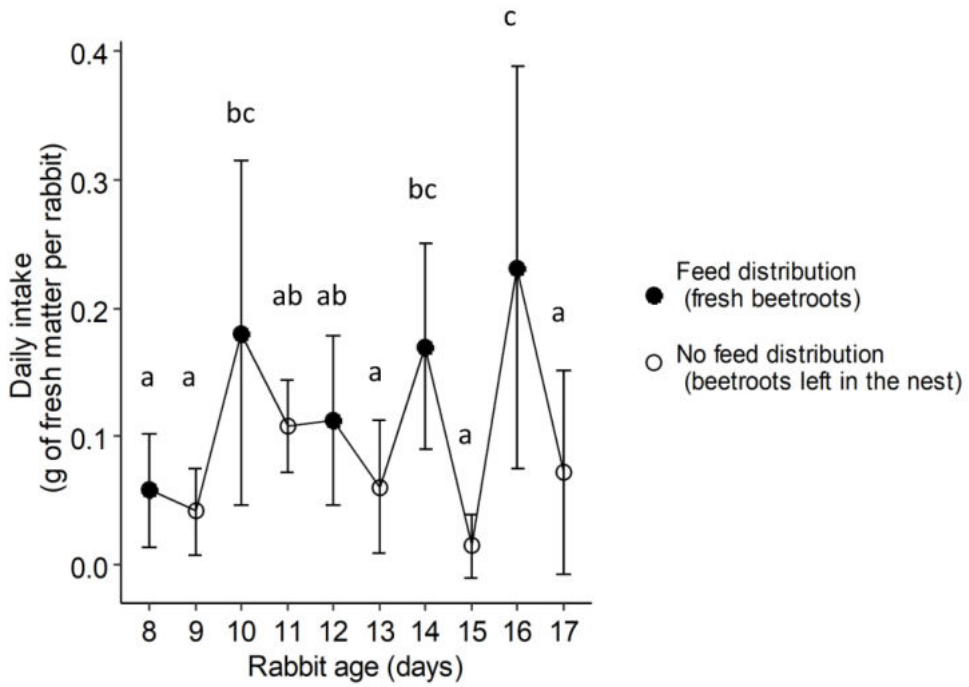


Figure 3: Intake pattern of raw fodder beetroots (B) provided in the rabbit nest from 8 to 17 d (Trial 1). On the day of distribution, beetroots were replaced by fresh ones and left in the nest for 2 days. Different letters indicate significant differences between days.

In the second trial, over the period 10–17 d, rabbits consumed a total of 5.0 ± 1.2 g of fresh gels in the nest/animal, which is equal to 1.2 ± 0.4 g of DM. In comparison, the gB intake in the first trial for a comparable period (10 – 17 d) was 1.3 ± 0.3 g of DM/rabbit and was not significantly different. The total intake in the nest, obtained by combining the intake of the two cups presented per cage, was similar between the six comparison groups (Figure 4 for the creep feed intake kinetics regardless of the treatments). Within each treatment, we observed that relative consumption of gels containing vanilla aroma was greater than 50% when presented against gel B (56 ± 7 %; P=0.03), gel N (57 ± 9%; P=0.001) and gel R (58 ± 7%; P=0.006), meaning that a preference was expressed for vanilla flavour (Figure 5). No other preference was expressed in the nest within treatments. The pellet intake in the feeder did not differ between the groups in this second trial.

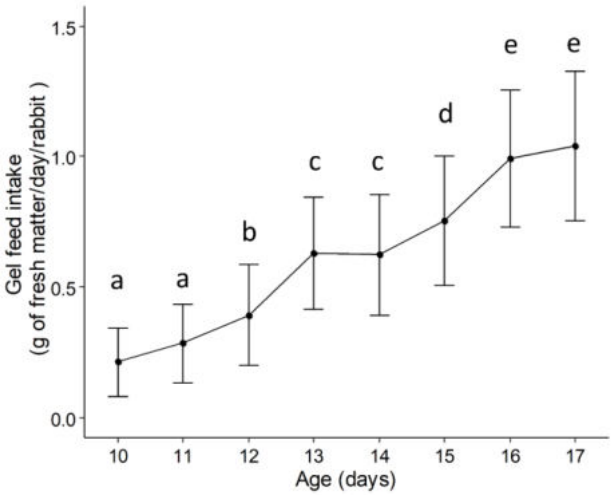


Figure 4: Kinetics of semi-solid creep feed intake by suckling rabbits, regardless of the flavour additive included (Trial 2). Means ± sd denoted by different letters indicate significant differences between days.

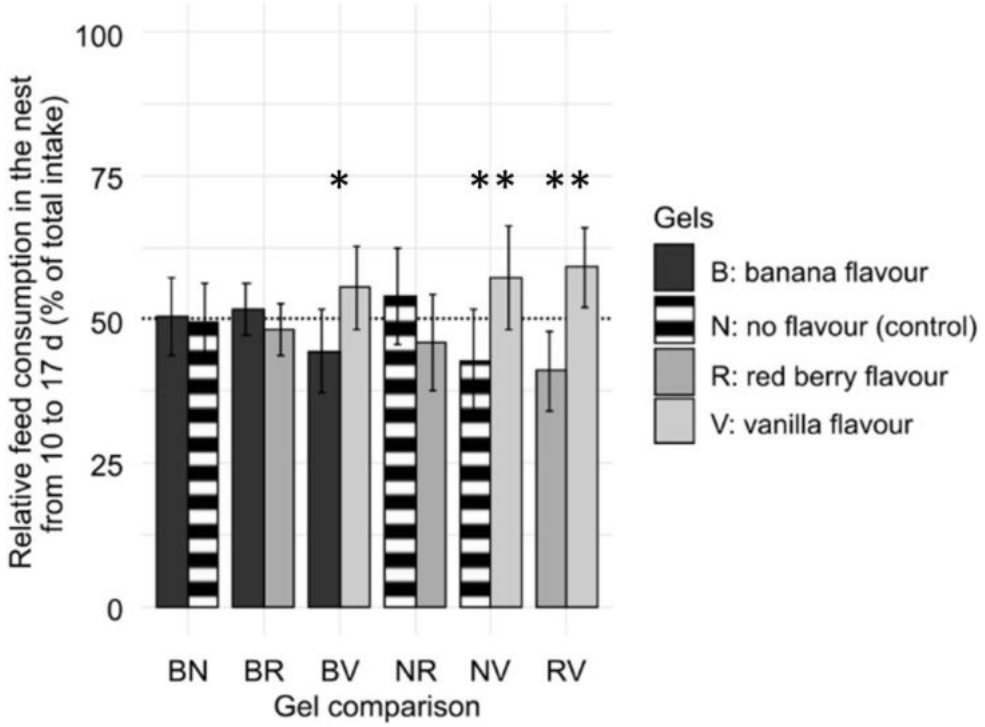


Figure 5

Relative consumption of experimental gels from 10 to 17 d (Trial 2). In the nest, kits had the choice between two gels that differed in flavour (N: no flavour, B: banana flavour, R: red berry flavour, V: vanilla flavour). For a flavour in a given comparison treatment, a relative consumption value significantly superior to 50% is understood as the expression of a preference. Results are presented as means ± sd.

We analysed the factors influencing the early feed intake (10 - 17 d) in the second trial to study between-litter variability of creep feed intake. We found that daily milk intake did not affect the corresponding daily solid feed intake. Similarly, total milk intake throughout this period and nest quality had no significant effect on the total creep feed intake (Figure 6). Instead, the litter weight at 3 d of age (average BW at 3 d: 95 ± 11 g/rabbit) influenced the daily creep feed intake (P<0.001) and was positively correlated with the total creep feed consumption (r=0.40; P<0.001, Figure 6). Gel feed intake started on average at 10 d for the heaviest litters (100-121 g/rabbit at 3 days) and one day later for the lightest ones (66-91 g/rabbit at 3 days; P=0.03). Similarly, the litters that started to consume creep feed at 10 d (n=38 litters, 55% of the flock) were significantly heavier at equalisation (+8 g of BW/rabbit; P=0.04) than litters that ingested feed at 12, 13 or 14 d (n=16 litters, 23% of the flock).

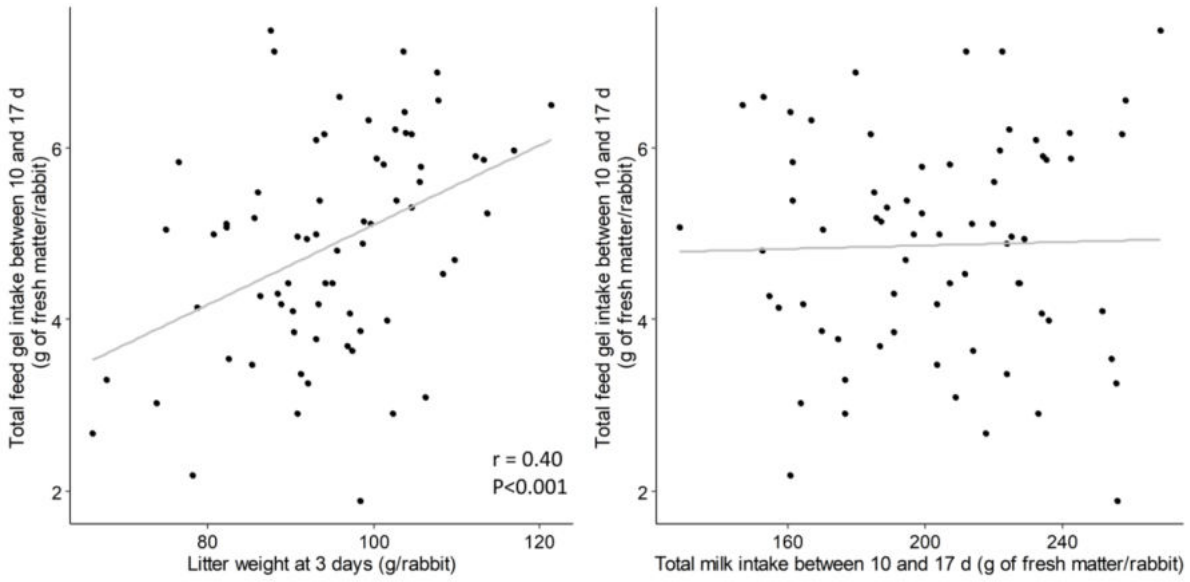


Figure 6: Early feed intake according to the litter weight at the beginning of the experiment (3 d) and the milk intake, regardless of the experimental treatments (N=69 litters, Trial 2). On the left: the relationship between the total feed gel intake in the nest and the litter weight at 3 d. On the right: the relationship between the total feed gel intake and the corresponding total milk intake.

Discussion

In commercial rabbitries, kits only have access to solid feed when they are able to move to the doe's feeder, generally from 16-18 d. Yet, previous studies demonstrated that the onset of solid intake can occur prior these ages when early access to a substrate was provided (Kovács et al., 2006; Combes et al., 2014; Kacsala et al., 2018; Paës et al., 2019). In mammals, digestive health is under control of gut microbiota (Fortun-Lamothe and Boullier, 2007). Considering that introduction of solid feed in the diet is a major regulator of microbiota implantation (Bian et al., 2016; Read et al., 2019), we assumed that solid feed ingestion at an early stage should be promoted since it may exert positive effects on rabbit's development. In this regard, the aim of this study was to obtain insight into the acceptability of feed presentations and flavour preferences in order to propose tools for promoting early feed intake. To our knowledge, this study provides never published information about non-pelleted feed presentations dedicated to suckling rabbits. We confirmed in the first trial that suckling rabbit was able to consume solid feed as early as 8 days. Higher intakes in fresh matter were observed with gel presentation while preferences for vanilla aromatic compound were detected in the 3 situations it was provided.

In the first trial, the objective was to compare creep feeds that differed by their presentation alone. For technical reasons, the feed types (e.g. complete feed, sugar and fodder beets) differed between the creep meals tested, which can influence the intake, in addition to the effects of feed shape and texture. However, it was hoped that these confusing effects could be avoided by comparing diets that shared the same main ingredients such as pellet vs. crumbled pellet and raw fodder beet vs. fodder beet gel. The onset of solid feed intake was stimulated with pellets compared to crumbled pellets. As far as we know, no previous studies investigated the use of crumbled feed in rabbit production. Crumbs between 2 and 2.8 mm may be less well adapted to the rabbit's grasping than the pellets tested. Early intake increased by 86% with the beet gel compared to the corresponding raw materials. Since hardness is known to affect rabbit feeding

behaviour (Maertens, 2010), this better acceptability could be explained by the softness of the gel-type feed. The pellets used to produce beetroot crumbs were six times harder than the complete feed pellets, which could also explain the low intake of beetroot crumbs compared to complete feed crumbs. In addition to hardness, the feed presentation attractiveness seemed to be affected by its freshness since the raw beetroot intake varied greatly from day to day, showing fluctuations according to its dry matter content. This unexpected freshness effect suggests that the kits' intake is partly driven by thirst. This could explain why fresh chicory (*Chicorium intybus L.*) was found to be attractive at a very early age in young rabbits (DM: 5%; Castellini et al., 2007) as well as fresh young grass stalks as of 13 d (Langenbach et al., 2001). Knowing that the kit cannot access water before it is able to leave the nest, these observations support the idea that the water requirements of young rabbits may not be met in commercial conditions.

Among all the creep feed tried, the feed gel seems interesting since it induced the highest intake of fresh matter and a significant dry intake occurred at an early stage. Benefits of diets in gruel form for piglets management were summarised by Brooks and Tsourgiannis (2003): a liquid diet provides a dry matter content similar to that of sow's milk, which encourages intake, satisfies young pigs' needs for nutrients and water, and eliminates the problem for piglets of learning to satisfy hunger and thirst separately. In our experiment, DM of beetroot feed gel (20%) was close to that of doe's milk (30% expected according to Maertens et al., 2006). As for pigs, it could be hypothesized that gel consumption partly "mimics" milk feeding, making gels attractive to kits. However, detailed monitoring of the kits behaviour is necessary to evidence this assumption. Moreover, this feed form might be more adapted to young rabbits, whose mastication is not fully functional at 13 d (Langenbach et al., 2001; Coureaud et al., 2008b) since it does not require being crushed. However, one limitation of this gel presentation for a putative commercial use is the time-consuming aspect of the preparation. Consequently,

some technical adaptations should be further developed. Contrary to what we previously thought, classical pellets (length: 11 mm; ⌀: 3.5 mm) were also adequate to feed rabbit kits since they showed significant intake as of 9 days and high total intake values in DM.

It is interesting to note that when creep feed was proposed in the nest, it had some effect on pellet intake several days later, i.e., a few days before weaning. Animals receiving pellets in the nest seemed to delay the intake of the same pellets provided outside of the nest, which, however, did not affect their growth. Maertens (1994) noted that a switch of pellet diameters at weaning (⌀ 2.5 mm followed by 4.8 mm) increased the intake and the daily weight gain compared to a stable pellet presentation (⌀ 4.8 mm before and after weaning). In our study, when the feed presentation changed from hydrated form to pellet, higher feed intake were observed compared to the situation where pellets were provided constantly through the pre-weaning period. Further investigations are necessary to confirm if a change in feed presentation before weaning can increase its attractiveness. Our results also highlighted the fact that milk consumption was not disturbed by the creep feed intake until 21 d (last milking measurement). This does not support the hypothesis of Kacsala et al. (2018) who proposed that early solid feeding of young rabbits could reduce the "pressure" on the doe for milk production and delivery.

Given the attractiveness of the gel and its ease of use for intake measurements (no waste or cup spillage), we continued the study using the gel texture by incorporating mash pellets and different aromas. Data suggest that the vanilla flavour tested in the current study conditions improved the semi-solid creep feed palatability in early stages of the suckling period. The interest of flavour additives on feed palatability and intake for rabbits has been previously described, for example with thyme during the rabbit fattening period (Fekete and Lebas, 1983), but to our knowledge, the present results are the first to highlight the potential interest of vanilla flavour. An effective way to contribute to vanilla attractiveness could be to add the aromatic component in the doe's diet since it can promote kits preferences for it (Bilkó et al., 1994). This

phenomenon can be explained by the perinatal chemical continuity induced by certain aromas contained in the doe's diet, which are both present and detected by the fetus and then the neonate in the amniotic fluid and in the colostrum (Schaal et al., 1998; Coureaud et al., 2002; Guiraudie-Capraz et al., 2005). We are aware that attractiveness was evaluated here at the litter and not at the individual level, and it might therefore be subject to wide inter-individual variability such as that described for juvenile pigs exposed to different sensory ingredients (Clouard et al., 2012). It also has to be underlined that the preference for vanilla remained moderate in our conditions, and that despite this preference, the total intake in the nest of litters receiving vanilla gel was similar to other groups. As suggested by Lebas (2011) who tested increasing incorporation of formaldehyde in rabbit diets, the nutritional value of the feed seems to be the major driver of the rabbit ingestion, rather than the sensory experience, except in the case of clear-cut aversion . Thus, further experiments must be done to determine preferences for vanilla at the individual level and its putative use to consistently favour solid feed consumption in the nest.

Finally, this study underlines the effects of animal-related factors on the onset of solid feed intake. Whereas it has been demonstrated that solid intake between 16 and 25 days depends on the milk availability (Fortun-Lamothe and Gidenne, 2000), the creep feed consumption was independent of the milk intake between 10 and 17 days at the litter level. The lack of correlation between creep feed intake and the corresponding milk intake corroborates with the study of Paës et al. (2019), performed with similar methods. These results are likely explained by the early period studied where the feed-seeking-behaviour of the kits is limited. In this study, litter weight after standardisation affected, on the one hand, the amounts of creep feed ingested and, on the other, the date at which solid feed intake began. Increased solid intake was found for the heaviest rabbits, as previously shown by Pajor et al. (1991) at the within-litter level in suckling piglets. The superior intake of heavy rabbits could be explained by higher mobility or greater

nutrients needs, as well as digestive systems with greater degrees of maturity in terms of enzymatic activity and digestive tract size (de Passillé et al., 1989). Further studies are now required to determine the non-dietary factors that may affect the suckling rabbit's willingness to eat creep feed.

Acknowledgements

This work was supported by the Institut Carnot Santé Animale. We are grateful to Phodé for providing us with sensory ingredients and process recommendations. We would like to acknowledge Jean-Marie Bonnemere and Michel Moulis for their assistance at the rabbit experimental unit, as well as Muriel Segura for her technical support for feed analysis. The authors are grateful to Gail Wagman for her correction of the English spelling.

Declaration of interests

None

References

Bian G, Ma S, Zhu Z, Su Y, Zoetendal EG, Mackie R, Liu J, Mu C, Huang R, Smidt H and Zhu W 2016. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. Environmental Microbiology 18, 1566–1577.

Bilkó Á, Altbäcker V and Hudson R 1994. Transmission of food preference in the rabbit: The means of information transfer. Physiology & Behavior 56, 907–912.

Brooks PH and Tsourgiannis CA 2003. Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig. In Weaning the Pig, Concepts and Consequences (ed JR Pluske, J Le Dividich, MWA Verstegen), pp. 81–116. Wageningen Academic Publishers, Netherlands.

Casado C, Piquer O, Cervera C and Pascual JJ 2006. Modelling the lactation curve of rabbit does: Towards a model including fit suitability and biological interpretation. Livestock Science 99, 39–49.

Castellini C, Cardinali R, Rebollar PG, Dal Bosco A, Jimeno V and Cossu ME 2007. Feeding fresh chicory (Chicoria intybus) to young rabbits: Performance, development of gastro-intestinal tract and immune functions of appendix and Peyer's patch. Animal Feed Science and Technology 134, 56–65.

Clouard C, Meunier-Salaün M-C and Val-Laillet D 2012. The effects of sensory functional ingredients on food preferences, intake and weight gain in juvenile pigs. Applied Animal Behaviour Science 138, 36–46.

Combes S, Gidenne T, Boucher S, Fortun-Lamothe L, Bolet G and Coureaud G 2018. Pour des lapereaux plus robustes au sevrage : des bases biologiques aux leviers d'action en élevageWhat tools for more robust rabbit at weaning ?. INRA Productions Animales 31, 105–116.

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. Journal of Animal Science 92, 652–665.

Coureaud G, Fortun-Lamothe L, Langlois D and Schaal B 2007. The reactivity of neonatal rabbits to the mammary pheromone as a probe for viability. Animal 1, 1026–1032.

Coureaud G, Fortun-Lamothe L, Rödel H, Monclús R, Schaal B 2008. Development of social and feeding behaviour in young rabbits. In Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, 10-13 June 2008, Verona, Italy, pp. 1131-1146.

Coureaud G, Schaal B, Hudson R, Orgeur P and Coudert P 2002. Transnatal olfactory continuity in the rabbit: Behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. Developmental Psychobiology 40, 372–390.

EGRAN 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. World Rabbit Science 9, 57–64.

Fekete S and Lebas F 1983. Effect of a natural flavour (Thyme extract) on the spontaneous feed ingestion, digestion coefficients and fattening parameters. Magy. Állatorvosok Lapja 38, 121-125.

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. Livestock Science 107, 1–18.

Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2000. The effects of size of suckled litter on intake behaviour, performance and health status of young and reproducing rabbits. Annales de Zootechnie 49, 517–529.

Fortun-Lamothe L, Gidenne T, Lapanouse A and De Dapper J 2000. Technical note : An original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother - young relations. World Rabbit Science 8, 177–180.

Gidenne T and Fortun-Lamothe L 2002. Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. Animal Science 75, 169–184.

Gottlieb G 1971. Ontogenesis of sensory function in birds and mammals. In The biopsychology of development (eds. E Tobach, L R Aronson and E Shaw), pp. 67–128. New York Academic Press.

Guiraudie-Capraz G, Slomianny M-C, Pageat P, Malosse C, Cain A-H, Orgeur P and Nagnan-Le Meillour P 2005. Biochemical and Chemical Supports for a Transnatal Olfactory Continuity through Sow Maternal Fluids. Chemical Senses 30, 241–251.

Kacsala L, Szendrő Z, Gerencsér Z, Radnai I, Kovács M, Kasza R, Nagy I, Odermatt M, Atkári T and Matics Z 2018. Early solid additional feeding of suckling rabbits from 3 to 15 days of age. Animal: An International Journal of Animal Bioscience 12, 28–33.

Kovács M, Szendrõ Zs, Milisits G, Biro-Nemeth E, Radnai I, Posa R, Bonai A, Kovacs F and Horn P 2006. Effect of nursing method and faeces consumption on the development of Bacteroides, Lactobacillus and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. Reprod. Nutr. Dev. 46, 205–210.

Langenbach GE, Weijs WA, Brugman P and van Eijden TM 2001. A longitudinal electromyographic study of the postnatal maturation of mastication in the rabbit. Archives of Oral Biology 46, 811–820.

Lebas F 1968. Mesure quantitative de la production laitière chez la lapine. Annales de Zootechnie 17, 169–182.

Lebas F 2011. Incidence de la présence accidentelle de formol dans l'alimentation sur le comportement alimentaire et les performances de croissance du Lapin. In Proceedings of 14. Journées de la Recherche Cunicole, 22-23 November, Le Mans, France, pp. 29-31.

Lebas F 2018. Performances moyennes des élevages cunicoles en France pour l'année 2017. Cuniculture Magazine 45 : 22-26 (résultats RENACEB). Retrieved on 19 February 2019, from http://www.cuniculture.info/Docs/Magazine/Magazine2018/mag45-22-Renaceb.html.

Maertens L 1994. Infuence du diamètre du granulé sur les performances des lapereaux avant sevrage. In Proceedings of 6. Journées de la Recherche Cunicole, 6-7 December, La Rochelle, France, pp. 325-332.

Maertens L 2010. Feeding systems for intensive production. In Nutrition of the rabbit (eds. C de Blas and J Wiseman), pp. 253–266. CABI; Wallingford; UK.

Maertens L, Lebas F and Szendrö Z 2006. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. World Rabbit Science 14, 205–203.

Marlier D, Dewree R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A and Vindevogel H 2003. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. Annales de Medecine Veterinaire 147, 385–392.

Paës C, Fortun-Lamothe L, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Bannelier C, Debrusse A-M, Gidenne T and Combes S 2019. Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. Animal Feed Science and Technology 255, 114223.

Pajor EA, Fraser D and Kramer DL 1991. Consumption of solid food by suckling pigs: individual variation and relation to weight gain. Applied Animal Behaviour Science 32, 139–155.

Pascual J.J., Cervera C and Fernandez-Carmona 2001. Effect of solid food intake before weaning on the performance of growing rabbits. Proceedings of the 2nd Meeting of Workgroups 3 and 4. COST Action, Godollo, Hungary, p.48.

de Passillé AM, Pelletier G, Ménard J and Morisset J 1989. Relationships of weight gain and behavior to digestive organ weight and enzyme activities in piglets. Journal of Animal Science 67, 2921–2929.

Pluske JR, Payne HG, Williams, I. H. and Mullan BP 2005. Early feeding for lifetime performance of pigs. Recent advances in animal nutrition in Australia, 15, 171-181.

Read T, Fortun-Lamothe L, Pascal G, Le Boulch M, Cauquil L, Gabinaud B, Bannelier C, Balmisse E, Destombes N, Bouchez O, Gidenne T and Combes S 2019. Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. Frontiers in Microbiology 10.

Schaal B, Marlier L and Soussignan R 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. Behavioral Neuroscience 112, 1438–1449.

Chapitre 2

Définition de la valeur nutritionnelle d'aliments pré-sevrage

Introduction

Pourtant nécessaires à la formulation d'un aliment adapté aux lapereaux allaités, nos connaissances relatives à la digestion du jeune lapin sont limitées. A ce jour, seule trois études ont quantifié les valeurs de digestibilité fécales de portées de lapereaux allaités. Ces études ont permis de mesurer la digestion dans l'ensemble du tractus digestif de lapereaux entre les périodes de 25-27 jours et de 28-31 jours d'âge (avant le sevrage) avec une correction pour l'accroissement du volume digestif (Debray et al., 2003; Gidenne et al., 2007b), ou de 24 à 28 jours à travers différentes méthodes (Gallois et al., 2008a). Au cours de notre travail de thèse, nous avons complété ces premiers résultats par une évaluation plus précise de la digestibilité fécale de lapereaux allaités de 21 à 35 jours d'âge ayant eu accès à un aliment solide soit dès 8 jours soit à partir de 15 jours. Deux régimes alimentaires différant par leur ratio fibres digestibles/amidon ont été étudiés. Ces deux aliments ont été formulés pour obtenir la même concentration en fibres ADF (Acid Detergent Fiber). Le choix de moduler ce ratio repose sur l'hypothèse que la fraction « fibres digestibles » (contenant les fibres rapidement fermentescibles) agirait préférentiellement dans l'ensemble caecum-côlon, via une fermentation rapide des hémicelluloses et des pectines. En revanche, l'apport d'amidon stimulerait l'ingestion (Debray et al., 2002; Xiccato et al., 2003; Gidenne et al., 2007b) et la croissance du lapin via une digestion enzymatique dans la partie supérieure du tractus digestif.

Spécificités méthodologiques

En élevage, des grilles permettant de collecter les fèces des lapereaux ont été placées sous chacune des cages en évaluation de la digestibilité, sous l'espace spécifique aux lapereaux (Photo 3). L'allaitement contrôlé était maintenu pour éviter de collecter les fèces de femelles. Un tri éventuel était réalisé pour enlever les fèces de lapines tombées pendant l'allaitement. Cette collecte de fèces était complétée de mesures répétées de l'ingestion de lait et d'aliment tous les 3 ou 4 jours.

La méthode de référence européenne pour mesurer la digestibilité fécale (Perez et al., 1995) d'aliments destinés au lapin n'est précise que pour des lapins âgés d'au moins 42 jours et a dû être adaptée pour tenir compte des spécificités du lapereau. Ainsi, afin de prendre en compte le temps de transit moyen de l'aliment chez le lapin (en moyenne 20 heures), les périodes de mesures d'ingestion était décalées de 24 heures par rapport aux collectes de fèces. Par exemple, nous avons considéré que les portions non digestibles de l'aliment digérées à 21 jours étaient présentes dans les fèces collectées à 22 jours comme proposé par Gallois et al. (2008a). Afin de

prendre en compte d'éventuelles fractions lactées indigestibles se retrouvant dans les fèces, une portion de l'excrété a été déduite pour certains composants de l'aliment, en prenant en compte les valeurs de digestibilité du lait définies par Gidenne et al. (2018), à savoir 94% pour la matière sèche et les protéines brutes et 97% pour l'énergie brute. Enfin, quatre prélèvements permettant d'estimer l'accroissement du contenu du tube digestif ont également été réalisés pour corriger les valeurs de coefficients de digestibilité de la matière sèche, selon les recommandations de Gidenne et al. (2005a).



Photo 3 : Grille de collecte des fèces placée sous l'espace des lapereaux afin de mesurer la digestibilité fécale d'une portée.

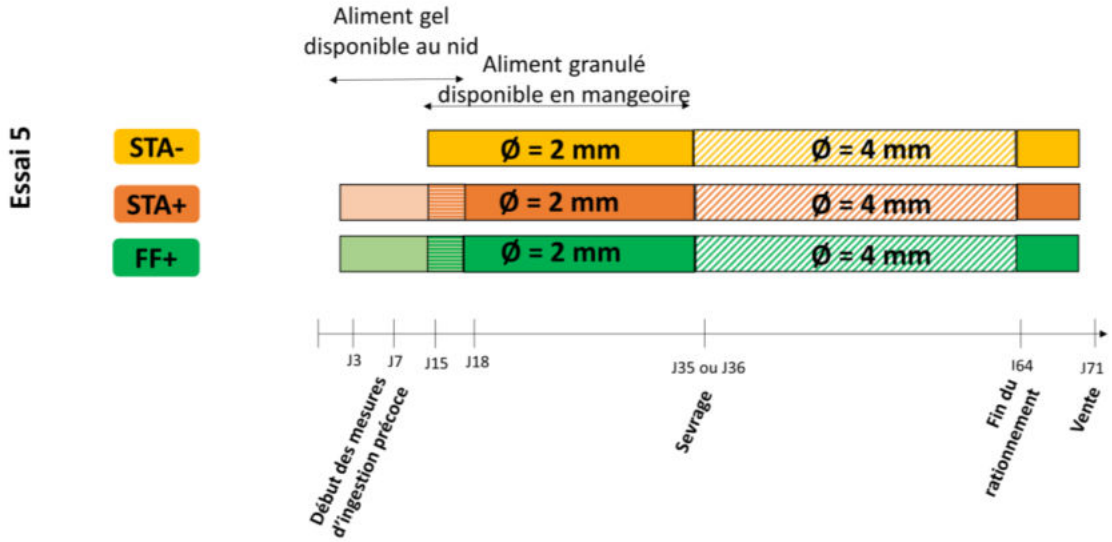


Figure 27 : Schéma expérimental de l'essai 5. L'aliment STA est enrichi en amidon (starch) tandis que l'aliment FF est enrichi en hémicelluloses et fibres rapidement fermentescibles. Le signe + indique la présence d'un aliment démarrage gélifié mis à disposition des lapereaux à partir de 3 jours d'âge.

Article 4 : Capacités digestives du lapereau allaité : effets de la date d'introduction et de la composition de l'aliment démarrage

Paës C., Gidenne T., Bannelier C., Bébin K., Duperray J., Gohier C., Guené-Grand E., Rebours G., Aymard P., Combes S.

En préparation

Résumé :

La mise à disposition précoce d'aliment dans le nid représente une stratégie biomimétique pour stimuler l'ingestion d'aliment solide, avec l'objectif d'améliorer la santé digestive. Afin de formuler un aliment démarrage adéquat, il est essentiel de déterminer sa valeur nutritionnelle. Cependant, l'évaluation de la capacité digestive du lapereau allaité demeure difficile puisque les lapereaux sont élevés en groupe avec leur mère, et que la morphologie et l'activité du système digestif sont fortement remodelés pendant la transition alimentaire du sevrage. Pour analyser la capacité digestive du jeune lapin, nous avons mesuré la digestibilité de l'aliment entre 21 jours et le sevrage, chez des portées ayant reçu ou non un aliment précoce, et nourries ensuite (dès 15 jours d'âge) avec un granulé pré-sevrage, avec une variation du ratio fibres digestibles/amidon (régimes iso-lignocellulosiques, iso-énergetiques et iso-proteiques). Un système d'alimentation séparé mère-jeunes avec allaitement contrôlé a été utilisé pour mesurer l'ingéré solide et l'excrétion fécale de 30 portées. Un aliment démarrage sous la forme de gel était mis à disposition de 20 portées à partir de 3 jours d'âge. La dynamique de développement du tractus digestif et l'ingestion de lait étaient pris en compte dans nos calculs pour corriger les coefficients de digestibilité. La digestibilité de la matière sèche, des protéines brutes, de l'énergie et des fractions fibreuses (NDF, ADF, Hcell) étaient élevées entre 21 et 24 jours d'âge (66%, 73%, 70%, 49%, 43% et 59%respectivement) avant de chuter entre 25 et 27 jours (-18%, -12%, -19%, -33%, -38%, -27%). La mise à disposition d'un aliment « démarrage » n'affectait pas les valeurs de digestibilité fécales. A l'inverse, la composition du granulé pré-sevrage affectait fortement la digestibilité de l'aliment. Les coefficients de digestibilité apparents des lapereaux ayant reçu un aliment enrichi en fibres fermentescibles (26% vs 21%) étaient significativement plus élevés concernant les fractions NDF (+9% durant toute la période de collecte), ADF (+11% entre 21 et 24 jours et +6% entre 28 et 29 jours) et hémicelluloses (+12% durant toute la période de collecte). Au contraire, les animaux ayant reçu un aliment enrichi en amidon (11% vs 5%) présentaient une meilleure digestion des protéines (+5% entre 25 et 27 jours et +2% deux jours plus tard) et de l'énergie brute (+4% entre 30 et 31 jours). Notre étude originale révèle l'existence d'une courte période durant laquelle la capacité digestive du lapereau semble dépassée par l'afflux de matière sèche dans le tractus digestif. La nature et la proportion des ingrédients utilisés étaient capables de moduler la digestion des lapereaux lors de l'eaccroissement de la part d'alimentation solide. Ces résultats pourraient être exploités pour affiner la formulation d'aliments pré-sevrage.

Article 4

SUCKLING RABBIT DIGESTIBILITY: EFFECTS OF THE AGE AT INTRODUCTION OF A STARTER FEED AND ITS COMPOSITION

Paës C.[1,2], Gidenne T.[1], Bannelier C. [1], Bébin K.[2], Duperray J.[3], Gohier C.[4], Guené-Grand E.[5], Rebours G.[6], Aymard P.[1], Combes S.[1*]

[1]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326, Castanet Tolosan, France; [2]CCPA, ZA du Bois de Teillay, F-35150 Janzé, France; [3]EVIALIS, Lieu dit Talhouët, F-56250 Saint Nolff, France; [4]MiXscience, 2 avenue de Ker Lann, F-35170 Bruz, France; [5]Wisium, Rue de l'église, BP50019, F-02407 Chierry, France; [6]TECHNA, Route de St-Étienne-de-Montluc, F-44220 Couëron, France; [*]Corresponding author: sylvie.combes@inra.fr

ABSTRACT

Early feeding in the nest is a promising biomimetic strategy to stimulate solid feed intake, in order to improve gut health. To formulate adequate starter feed, it is essential to determine the nutritional values of the pre-weaning diets. However, the assessment of suckling rabbits' digestion is challenging since the kits are raised together with their mother along with the fact that gut morphology and functionalities are deeply changing during the transition from milk to solid feed. To analyze the digestive capacity of the young rabbits, a 15-days digestibility trial was performed from 21 days of age to weaning in rabbits provided with early feeding or not and receiving pre-weaning diets differing by their digestible fibres/starch content only (iso-lignocellulosic, iso-energetic and iso-proteic diets). A mother-litter separate feeding system with controlled suckling was used to monitor intake and faecal excretion of 30 litters. All the litters had access to pellet feeds from 15 days. A starter feed in a form of a gel was provided as early as 3 days of age to twenty of the litters. Gut development dynamics and milk intake were taken into account to correct faecal digestibility calculations. Digestibility coefficients of dry matter, crude protein, gross energy, and fibre fractions (NDF, ADF, HCell) were high between 21 and 24 days (66%, 73%, 70%, 49%, 43% and 59% respectively) and were followed by a sharp decrease between 25 and 27 days (DM: -18%; CP: -12%; Gross energy: -19%; NDF: -33%; ADF: -38%; HCell: -27%). The time of introduction of starter feed did not modify faecal digestibility. Conversely, the pre-weaning pellets composition strongly affected the whole-tract digestibility. The digestion of the rabbits which received a diet enriched in digestible fibres (26% vs 21%) was higher regarding NDF (+9% during the whole collection period), ADF (+11% between d21 and d24 and +6% between d28 and d29) and Hcell compoments (+12% during the whole collection period). On the contrary, rabbits receiving a diet enriched with starch (11% vs 5%) had improved protein digestion (+5% between d25 and d27 and +2% two days after) as well as gross energy digestion (+4% between d30 and 31%). This original study revealed a short period where digestive capacity of the rabbit seemed to be overwhelmed by the sudden influx of dry matter in the gut. The nature and proportion of dietary ingredients of the pre-weaning diets were able to modify whole tract digestibility while solid feed intake part was growing.The present data could be implemented in the future for pre-weaning feed formulation.

Key words: Digestibility, Pre-weaning, Solid feed intake, Feed transition, Digesta increment.

INTRODUCTION

Pre-weaning period represents a sensitive dietary transition for the young rabbit, sometimes followed by enteropathies. From 21 to 31 days, dry feed intake is multiplied by 14, along with a sharp drop of milk intake (Fortun-Lamothe and Gidenne, 2000), and corresponds to a sharp

shift in nutrient intake profile: milk-based diet rich in fats and proteins shifts to a plant-based diet rich in carbohydrates. Moreover, rabbit digestive functionalities before weaning are still developing (Gallois et al., 2008b). Recent studies highlighted possibilities for a small solid feed ingestion of 8-days-old rabbits on-farm (Paës et al., 2019) together with positive effects of pellet feed intake stimulation from 18 days on kits growth (Read et al., 2015) and digestive ecosystem maturation (Read et al., 2019). Thus, allowing adequate feed intake before weaning (time of introduction and feed quality) appears as a promising strategy to improve the health management of the young rabbit. With this study, we aimed to extend our scarce knowledge of the young rabbit's digestion ability, in relation with early solid feed intake stimulation. We performed a 15-days digestibility trial from 21 days of age to weaning for young rabbits fed in the nest a starter diet (in form of gel) or not, with two distinct diet formulations. The two diets tested differed by the ratio digestible fibers/starch and represent different feeding strategies. We assumed that digestible fibers (DF), that include water soluble polysaccharides (soluble hemicelluloses and soluble pectic substances, β-glucans, fructans, etc.) would stimulate microbiota fermentation in the hindgut (Gidenne, 2015). High starch levels would target host development through the supply of energy after almost complete hydrolysis in the intestine (Gidenne and Perez, 1993) and would presumably stimulate the early feed intake (Debray et al., 2002).

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental design

Forty-eight crossbred litters (commercial lines Hyplus PS19 x Hyplus PS59; Hypharm, France) were raised with their doe in a wire mesh cage allowing a separate feeding of the litter (Paës et al., 2019 adapted from Fortun-Lamothe et al., 2000) INRAE experimental farm, Castanet-Tolosan, France). Two days after parturition (d2) litter size was standardized to 10 kits and nest quality was assessed based on the quantity of does' hairs covering the litters. Does were fed a commercial diet separately from their kits. At d3, litters were allocated to two groups (kits body weight: 100±8 g). In the early feeding groups (STA+ and FF+), the litters were fed from d3 to d17 a starter gel form, while no starter feed was supplied to the third group (STA-). Starter feed gels were processed with mash from the kits pellets, either enriched in starch (STA+), either enriched in digestible fibers (among rapidly fermentable fibres, FF+ group). The mash was supplemented with vanilla flavor (0.06%, Phodé, Terssac, France) before being thoroughly mixed with three times its weight of hot water and 0.6% of agar. Starter feed gels were daily processed and provided inside plastic cups into the nest. All the litters had access to 2.5-mm-diameter pellets, either enriched in starcg (STA- and STA+) either enriched in rapidly fermentable fibres (FF+), as of d15. Weaning occurred at d36. Litters were weighed at days 3, 14, 21, 28 and 35 and milk intake was measured at days 4, 7, 10, 14 and 17. Mortality and health status of all the rabbits were registered daily.

Two experimental diets were formulated to obtain iso-protein, iso-energy, iso-ADF and iso-ADL feed that only differed by the ratio DF/starch (1.7 and 5.5). To achieve this feed formulation, the same ingredients were used with higher levels of cereals (barley, wheat) and sunflower meal in the diet rich in starch (STA) and higher concentrations of wheat bran fraction, beet and grape pulp in the diet rich in rapidly fermentable fibres (FF, resp. +16%, +8% and +1.6% of those ingredients compared to STA diet (Table 1). Digestible fibres is considered as the sum of hemicelluloses (NDF-ADF) and water-insoluble pectins, whereas rapidly fermentable fibres (RFF) is calculated as TDF-NDF (Gidenne, 2015).

Digestibility trial

Ten litters among the sixteen of each group were selected to assess faecal nutrient digestibility from d21 to d35. In half of those litters, one kit was sacrificed at days 21, 25, 30 and 35 to evaluate increment of digesta content. Meanwhile, kits from non-sampled litters were removed to maintain litter size. Digestibility was evaluated at the litter-level with controlled suckling. The faeces of kits were collected daily with a perforated aluminum plate placed under the kits' allotted space (38 x 62 cm) and then were weighed. Milk intake was assessed during digestibility trial at days 21, 24, 28, 31 and 35. Feed intake and feed waste were recorded every 3 or 4 days.
Milk consumption was considered to calculate dry matter (DM), crude protein (CP) and fat digestibility by using milk digestibility values determined by Gidenne *et al*. (2018). The increase of gut contents before weaning was taken into account for DM digestibility calculation by adding it to the faecal DM excretion, following the methodology recommended to determine young rabbits digestive efficiency (Gidenne et al., 2005). Regarding the weight increment of the stomach content, we considered that 94% of the digesta was digestible (mainly milk) and only the remaining 6% were kept for correction.

The formula to calculate DM faecal digestibility coefficient (FDC, %) was:

$$\text{DM FDC} = \frac{DM\ intake\ (undigested\ milk+feed) - DM\ excreted\ (faeces+gut\ digesta\ increase)}{DM\ intake\ (undigested\ milk+feed)} \text{ X } 100$$

Chemical Analyses

Faeces were dried at 80°C for 24h, then half part was dried at 103°C for 24h to determine DM excreted per litter. Faeces dried at 80°C were grounded and pooled in 5 periods (d22-25, d26-28, d29-30, d31-32 and d33-35) to obtain sufficient quantities for further analysis: DM, ash, nitrogen, crude fat, gross energy, NDF, ADF and ADL (EGRAN, 2001). Feed starch content was determined with enzymatic method (AFNOR NF V03-606). DM content of starter feed gels was obtained by freeze-drying for 48h and was equal to 25%. Pellets hardness was measured with Kahl device and was equaled to 2,0 MPa for STA pellets and 2,7 for FF pellets (n=40 measurements/pellet). Ammonia and volatile fatty acids were assessed in caecal digesta at d25, d30 and d35 respectively with a continuous flow analyzer (SAN++, Skalar, Norcross, USA) and gas chromatography equipment (CPG HP 7890A, Agilent, Santa Clara, USA).

Statistical Analysis

Data were analyzed with R software by analysis of variance for data collected once and by linear mixed model to fit longitudinal data (age, experimental group and gender if known as fixed effects and litter as random effects).

Table 1: Ingredients and chemical composition of the experimental diet

	STA (starch) diet	FF (rapidly fermentable fibres) diet
Ingredients (%)		
Sunflower meal	25.00	20.00
Barley	15.00	2.40
Wheat bran	12.80	21.00
Alfalfa	6.90	6.00
Beet pulp	6.70	22.20
Apple pomace	6.00	4.00
Cane molasses	5.50	5.20
Wheat	5.20	2.00
Straw	5.00	2.10
Rapeseed meal	3.50	5.80
Rapeseed whole seed	2.30	2.30
Grape pulp	2.20	3.80
Calcium carbonate	1.18	0.78
L-Lysine 25%	0.56	0.36
Rapeseed oil	0.50	0.50
Threonine 10%	0.42	0.26
Methionine 15%	0.24	0.30
Mineral and vitamin premix[1]	1.00	1.00
Chemical composition (g/kg as fed-basis)		
Dry matter	893	905
Ash	67	69
Crude protein	160	160
NDF	356	387
ADF	215	217
ADL	73	73
Hemicelluloses (NDF-ADF)	141	170
Total Dietary Fibre (TDF) [2]	331	389
Rapidly fermentable fibres (TDF-NDF)	66	94
Digestible fibers "DF"	207	264
Starch	119	48
Ratio rapidly DF/starch	1.74	5.50
Fat content	28	26
Gross energy (MJ/kg)	17.0	16.7
Digestible energy (MJ/kg) [2]	9.3	9.3

[1]Premix provided per kg diet: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D_3, 1,000 IU; vitamin E, 50 IU; Fe, 100 mg; Cu, 10 mg; Mn, 5 mg; Co, 0.1 mg; I, 0.2 mg; Zn, 50 mg; Se, 0.2 mg

[2] calculated with WUFFDA software according to tables of ingredients (Maertens et al., 2002 updated in 2017)

RESULTS AND DISCUSSION

The experiment was performed in good sanitary conditions since the pre-weaning mortality reached only 3.4%. The consumption of starter feed was similar between early feeding groups and reached in total 5.3±1.5 g/kit of starter feed gel (1.3±0.4 g in DM) from d3 to d17. However, a slight drop of STA+ gel intake was observed at days 10 and 12 (Figure 1). Starter feed intake was not affected by nest quality. Pellets intake between d15 and d18 averaged 0.6±1.1 g of DM/kit in the two groups, before a four-fold increase at d21. Experimental groups tended to affect the total intake of pellets in feeders (P=0.06). The total consumption of pellets rich in starch was significantly higher than pellets with higher rapidly fermentable fibers/starch ratio (comparison STA+ and STA- vs FF+, P=0.04, + 43 g of DM between d15 and d35) in accordance with observations of Debray et al. (2002). However, growth performances of the 48 litters were similar between groups presumably because milk intake was equal between animals before weaning (Figure 2).

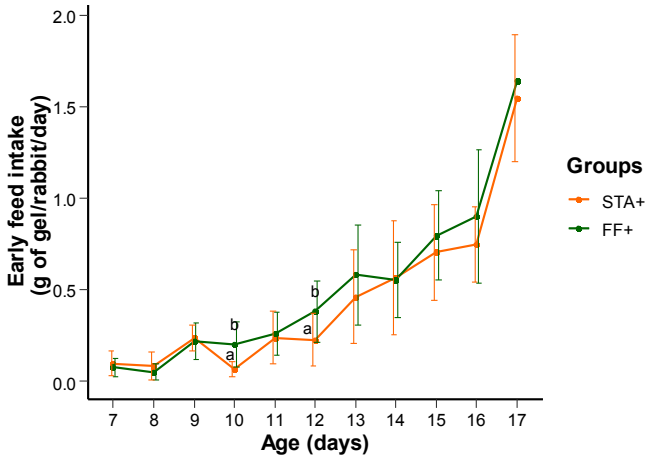


Figure 1: Kinetics of the starter feed intake by suckling rabbits in the nest from d7 to d17.

Table 2: Characteristics of the 30 litters monitored during the digestibility trial period (d21-35)

	STA-	STA+	FF+	Prob.	RMSE
Initial body weight (d21, g/kit)	396	379	363	0.13	45
Final body weight (d35, g/kit)	947	952	916	0.28	66
Daily weight gain (g)	41	40	40	0.54	4
Total feed intake (g of DM/kit)	454	490	429	0.06	66
Daily feed intake between d21&d25 (g/kit/day)	10	11	9	0.07	3
Daily feed intake between d32&d35 (g/kit/day)	56	59	51	0.31	14
Milk intake at d21 (g of FM/kit)	34	30	33	0.31	5
Milk intake at d35 (g of FM/kit)	3	3	6	0.49	7
Digesta content increment (total tract, g of DM)	16	19	20	0.48	5

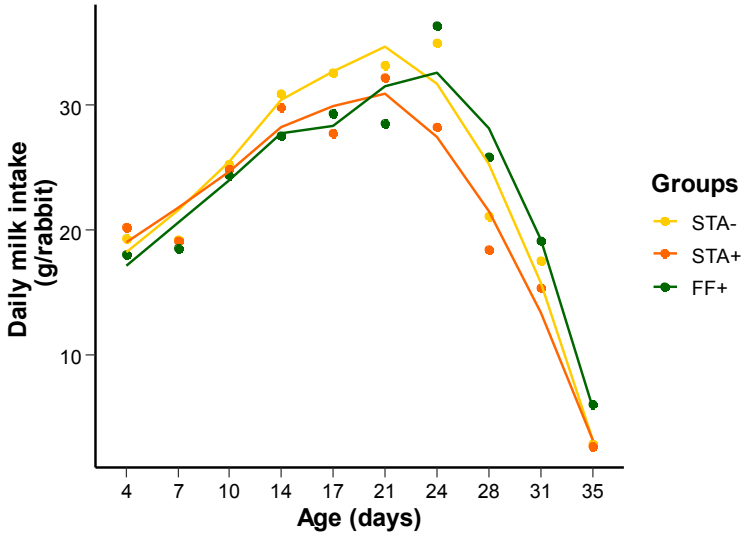


Figure 2: Milk intake according to the experimental treatments (n=16 litters per group before 21 days and then n=10). Each dot stands for the data collected on-farm, while curves are computed with a t-based estimation (loess estimation from *geom_smooth* function).

Rabbit gut tract rapidly evolves before weaning (Figure 3), in response to solid feed intake stimulation (Gallois et al., 2008). Since the digestive content greatly increased during the digestibility trial measurements (+18 g of DM, see Table 2), raw data were corrected for caecal and intestinal contents as well as for the increase of stomach indigestible content. The correction values based on digesta increase (Table 3) contributed to a decrease of raw DM FDC estimates (-3.8% from d21 to d34). On the opposite, implementation of milk dry matter intake corrections increased raw DM FDC values (+0.8 % from d21 to d34), with stronger effects at the lactation peak. On overall, taking into account those two corrections prevented an overestimation of DM FDC.

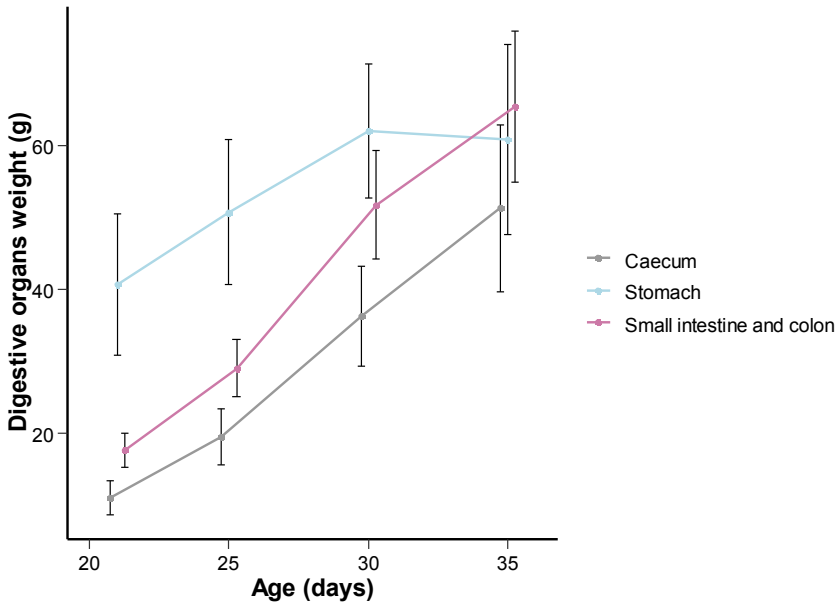


Figure 3: Digestive tract development during the digestibility trial (n=15 kits/age)

Table 3: Digesta increment values used to correct DM FDC (based on n=15 rabbits/period).

		Digesta content growth (in g of DM)		
	Raw DM FDC (before any corrections)	**Small intestine + colon**	**Caecum**	**Stomach (indigestible part only)**
d21-24	72.2±3.4^{C}	0.97	1.69	0.12
d25-27	53.4±3.1^{A}	1.47	1.80	0.06
d28-29	65.4±2.0^{B}	0.85	0.92	-0.01
d30-31	65.5±2.6^{B}	0.66	1.19	-0.06
d32-34	65.5±2.7^{B}	1.17	1.73	-0.12

Means±SD with different letters indicate means that significantly differ with the time

Strikingly, digestibility coefficients (Table 4) peaked at the onset of solid feed intake (d21-24), and dropped in the next period (d25-27; DM: -18%; CP: -12%; Gross energy: -19%; NDF: -33%; ADF: -38%; HCell: -27%). From d28 to d34, the digestibility increased again and stabilized, though a lower digestibility of NDF and HCell was observed at the end of the assay (d32-34). (Debray et al., 2003; Gidenne et al., 2007) observed similar pattern with high digestibility between 25 and 27 days followed by a decrease in the following period (d28-31) with further decrease at weaning except for fat. In a few days, rabbit digestive system has to overcome important substrates changes: in our experiment, the pellet DM intake became equivalent to DM milk intake between d21 and d25 and quickly exceeded it. An adaptation process to solid feed diet can explain the decrease of digestibility observed at d25-27. Limited enzymatic activities in pancreas and small intestine are indeed observed before 32 days (Debray et al., 2003), combined with the decline of the enzymes active in early life such as observed for trypsine at 28 days (Gallois et al., 2008). We also hypothesized that, since the caecotrophy starts around 25-28 days (Orengo and Gidenne, 2007), it could mathematically induce a digestibility drop. Indeed, the new intake of caecotrophes induces additional faecal excretion possibly leading to an underestimation of digestibility coefficients. On the contrary, when caecotrophy behaviour is settled, the excretion of caecotrophes products is balanced by the intake of previous caecotrophes.

Ammonia content and caecal pH did not vary with time and experimental group before weaning. However, the total VFA content increased between d25-30 (+17%; $P<0.01$) with higher quantities of acetate (+13 Mmol; $P<0.001$) and lower proportion of propionate between d30-35 (-1.2%, $P<0.01$). Those results are characteristics of the fermentation pattern before weaning (Gallois et al., 2008) but they do not explain the decrease of fibre digestibility observed shortly before weaning, which should be further explored.

Early supply of solid feed did not affect faecal digestibility, whatever the nutrient (comparison between STA+ and STA-) nor modify gut fermentation patterns. Regarding the latter aspect, it should however be noticed that caecum's activity parameters were not evaluated before d25 due to insufficient sample quantities. It is therefore difficult to conclude on the direct effects of early feed supplementation on caecum environment, which occurred until d17. Indeed, limited adaptive response of enzymes activities to feed quantities input early was previously demonstrated with early weaning procedures (Gallois et al., 2008).

Table 4: Whole tract apparent digestibility of nutrients before weaning after corrections for dry matter milk intake and digesta content increment when applicable

	Digestibility coefficients (%)											
	DM (corrected)				CP (corrected)				Gross energy (corrected)			
	STA-	STA+	FF+	Age effect	STA-	STA+	FF+	Age effect	STA-	STA+	FF+	Age effect
d21-24	65.6±2.0	64.4±3.4	66.9±1.7	C	74.1±2.4	71.6±2.3	73.9±3.1	B	70.4±3.3	68.1±2.9	72.1±2.4	D
d25-27	48.3±2.6	49.0±3.0	47.0±5.2	A	63.0±2.6 ^{b}	63.1±2.6 ^{b}	57.7±5.3 ^{a}	A	53.1±2.7	53.6±3.0	52.1±4.8	A
d28-29	60.9±2.5 ^{a}	60.8±2.0 ^{a}	63.9±1.6 ^{b}	B	72.5±2.5	72.4±2.1	73.6±2.0	B	64.6±2.2	64.3±2.1	65.2±1.7	C
d30-31	61.7±2.2	63.1±2.4	62.8±1.5	B	72.1±2.3	73.8±2.8	72.1±1.6	B	63.3±2.1 ^{b}	64.6±2.3 ^{b}	60.1±2.0 ^{a}	B
d32-34	63.2±0.9	61.0±4.9	62.5±1.4	B	75.0±0.9 ^{b}	72.7±3.9 ^{ab}	71.8±1.6 ^{a}	B	64.3±1.7	62.4±4.5	62.7±1.6	B
	NDF				ADF				Hemicelluloses			
	STA-	STA+	FF+	Age effect	STA-	STA+	FF+	Age effect	STA-	STA+	FF+	Age effect
d21-24	44.1±5.6 ^{a}	47.1±6.4 ^{a}	56.9±3.9 ^{b}	E	41.1±7.6 ^{a}	37.0±6.3 ^{a}	49.8±4.2 ^{b}	C	56.5±5.3 ^{a}	55.1±5.3 ^{a}	66.0±6.3 ^{b}	D
d25-27	13.5±6.0 ^{a}	12.9±4.7 ^{a}	20.9±8.5 ^{b}	A	4.0±6.2	1.3±7.7	7.0±8.7	A	26.6±5.7 ^{a}	32.3±5.5 ^{ab}	38.9±10.7 ^{b}	A
d28-29	33.7±3.9 ^{a}	34.3±4.0 ^{a}	44.0±2.5 ^{b}	D	26.1±4.4 ^{a}	24.2±3.6 ^{a}	30.9±3.8 ^{b}	B	47.0±7.4 ^{a}	48.4±6.7 ^{a}	60.8±3.2 ^{b}	C
d30-31	34.1±3.6 ^{a}	31.6±3.5 ^{a}	40.9±2.5 ^{b}	C	25.0±3.8	25.9±3.9	29.1±4.4	B	41.7±4.7 ^{a}	46.6±4.7 ^{a}	56.0±3.7 ^{b}	C
d32-34	26.6±8.4 ^{a}	30.0±2.6 ^{ab}	38.2±2.5 ^{b}	B	24.4±2.5	20.6±9.7	26.7±3.9	B	38.7±4.0 ^{a}	36.0±7.0 ^{a}	52.9±4.4 ^{b}	B

Means±SD with different letters on the same row indicate treatment effects (Benjamini-Hochberg test).

On the contrary, diet composition induced different digestibility outputs. FDC values regarding NDF, ADF and hemicellulsoes fractions were significantly higher when rabbits received a feed with a high DF/starch ($P<0.001$). Similar reduction of fibres digestion with reduced supply of digestible fibre contents was reported by Debray et al. (2003) before weaning and by Gidenne and Perez (2000) and Xiccato et al. (2008) during fattening period and was likely related to the different nature of fibres in the diets. Indeed, in FF diet, respectively 22 % and 30% of ADF and hemicelluloses fractions were provided by beet pulp. It is known that pulp cellulose is highly accessible for bacteria, thus explaining higher degradation of ADF fraction even though ADF input was similar between diets(Bertin et al., 1988). Nitrogen digestibility coefficients were found higher during the periods d25-27 (+5.3%) and d28-29 (+2.1%) for rabbits that received STA diet. Those results are in agreement with Debray et al. (2003) who observed a decrease of protein assimilation with substitution of starch by fibres. Again, those differences of crude protein digestion may arise from different botanical origin of dietary ingredients. According to the EGRAN tables of ingredients (Maertens et al., 2002 updated in 2017), wheat, barley and sunflower meal (higher inclusion in STA diet) respectively contain 6%, 8% and 28% of digestible proteins while wheat bran, beet and grape pulps (lower inclusion in STA diet) contain 11%, 5% and 1% of them.

CONCLUSIONS

In this study, we provided original data on suckling rabbit digestion and we outlined a specific kinetics, presumably related to the dietary transition that occurs before weaning. Early stimulation of solid feed intake did not induce significant changes on rabbit nutrients digestion. However, the ratio digestible fibers/starch of our starter feeding system modified whole-tract digestibility before weaning, but this was not related to changes of fermentative activities.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to A-M. Debrusse, M. Moulis, and J-M. Bonnemere for their assistance at the rabbit experimental unit and wish to thank I. Ahn for her help in the determination of digestive content.

REFERENCES

Bertin C, Rouau X and Thibault JF 1988. Structure and properties of sugar beet fibres. J. Sci. Food Agr. 44, 15–29.

Debray L, Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2002. Influence of low dietary starch/fibre ratio around weaning on intake behaviour, performance and health status of young and rabbit does. Animal Research 51, 63–75.

Debray L, Le Huerou-Luron I, Gidenne T and Fortun-Lamothe L 2003. Digestive tract development in rabbit according to the dietary energetic source: correlation between whole tract digestion, pancreatic and intestinal enzymatic activities. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 135, 443–455.

EGRAN 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. World Rabbit Science 9, 57–64.

Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2000. The effects of size of suckled litter on intake behaviour, performance and health status of young and reproducing rabbits. Annales de Zootechnie 49, 517–529.

Fortun-Lamothe L, Gidenne T, Lapanouse A and De Dapper J 2000. Technical note : An original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother - young relations. World Rabbit Science 8, 177–180.

Gallois M, Le Huërou-Luron I, Fortun-Lamothe L, Lallès JP and Gidenne T 2008. Adaptability of the digestive function according to age at weaning in the rabbit: I. Effect on feed intake and digestive functionality. Animal 2, 525–535.

Gidenne T 2015. Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. Animal 9, 227–242.

Gidenne TN, Bannelier C, Gallois M, Segura M and Lambrecht V 2018. Milk digestion in the young rabbit: methodology and first results. World Rabbit Science 26, 269.

Gidenne T, Debray L, Fortun-Lamothe L and Le Huerou-Luron I 2007. Maturation of the intestinal digestion and of microbial activity in the young rabbit: Impact of the dietary fibre:starch ratio. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 148, 834–844.

Gidenne T, Feugier A and Lacroix S 2005. Digestive efficiency of the early weaned young rabbit: method of measurement and effect of the ratio protein/energy in the diet. In (ed. G. Bolet), pp. 141–144. ITAVI.

Gidenne T and Perez JM 1993. Effect of dietary starch origin on digestion in the rabbit. 2. Starch hydrolysis in the small intestine, cell wall degradation and rate of passage measurements. Animal Feed Science and Technology. 42, 249–257.

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

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

Orengo J and Gidenne T 2007. Feeding behaviour and caecotrophy in the young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. Applied Animal Behaviour Science 102, 106–118.

Paës C, Fortun-Lamothe L, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Bannelier C, Debrusse A-M, Gidenne T and Combes S 2019. Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. Animal Feed Science and Technology 255, 114223.

Read T, Fortun-Lamothe L, Pascal G, Le Boulch M, Cauquil L, Gabinaud B, Bannelier C, Balmisse E, Destombes N, Bouchez O, Gidenne T and Combes S 2019. Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. Frontiers in Microbiology 10.

Xiccato G, Trocino A, Carraro L, Fragkiadakis M and Majolini D 2008. Digestible fibre to starch ratio and antibiotic treatment time in growing rabbits affected by epizootic rabbit enteropathy. In (ed. A.T. G. Xiccato S.D. Lukefahr), pp. 847–851. Fond. Ini. Zooprofilattiche E Zoot. publ. Brescia Italy.

Chapitre 3

Orientation précoce du microbiote et conséquences sur la santé

Introduction

La mise au point d'un dispositif alimentaire adapté au jeune lapereau lors de la première phase de ce travail de thèse nous a permis de disposer d'un modèle expérimental d'ingestion précoce stimulée. La modulation de la composition de l'aliment apporté aux jeunes lapereaux sous forme de gel (Annexe 1 pour les modalités de fabrication de l'aliment expérimental) nous a permis de compléter ce modèle pour étudier les changements de composition et de fonctionnement du microbiote digestif induits par une alimentation solide post-natale. Dans un premier temps la composition nutritionnelle de la farine alimentaire a été modulée de façon à faire uniquement varier le ratio en fibres digestibles/amidon (essai 6, article 5). En effet, ces deux fractions auraient des effets opposés sur la physiologie du lapin : les fibres digestibles agiraient préférentiellement dans la partie distale du tractus digestif (stimulation des activités fermentaires, Jacquier et al., 2014) tandis que l'amidon modulerait le comportement alimentaire et la croissance du lapin (Debray et al., 2002a; Xiccato et al., 2003; Gidenne et al., 2007b) via une digestion enzymatique presque complète dans la partie supérieure du système digestif. Dans un second temps, l'ajout de deux types de prébiotiques commerciaux dans l'aliment apporté au nid a été testé (essai 7, article 6) en tant que « preuve de concept » (substrats non digérés dans l'intestin spécifiquement dirigés vers la flore). Les schémas expérimentaux de ces deux essais sont résumés en figure 28.

Spécificités méthodologiques

Plusieurs types de mesures ont été combinées dans l'essai 6 afin d'évaluer les potentiels bénéfices santé offerts par la stimulation de l'ingéré solide en début de vie et afin d'établir les mécanismes physiologiques sous-jacents. Aux approches de métagénomique et métabolomique, ont été combinées une quantification des transcrits présents dans les tissus de l'iléon et du caecum ainsi que des immunoglobulines présentes dans la lumière caecale (IgA) et le sang (IgG). La mesure des teneurs en espèces réactives de l'oxygène a également été réalisée dans le sérum pour évaluer l'homéostasie redox suite à nos traitements.

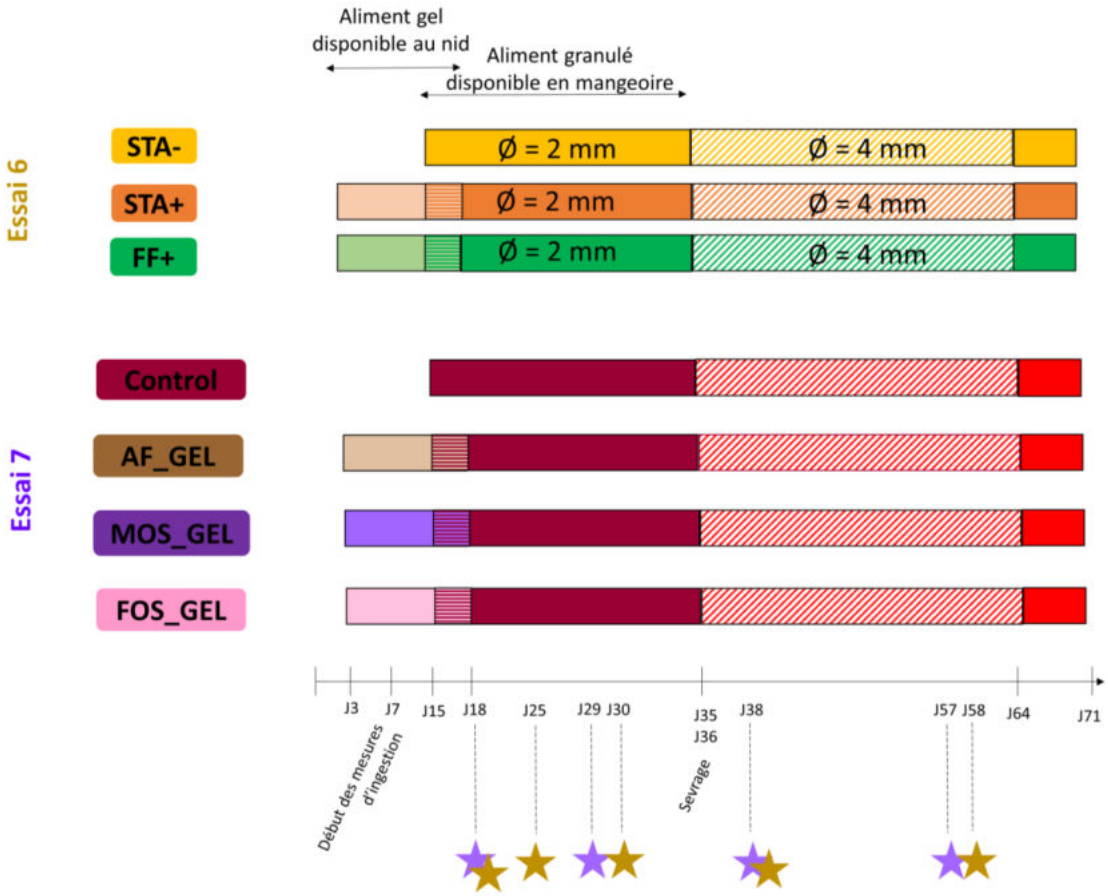


Figure 28 : Schémas expérimentaux des essais 6 et 7. Un aliment apporté au nid sous forme de gel était disponible aux lapereaux des lots STA+, FF+, AF_GEL, MOS_GEL et FOS_GEL de 3 à 18 jours d'âge. L'aliment STA est enrichi en amidon (starch) tandis que l'aliment FF est enrichi en fibres rapidement fermentescibles. MOS désigne le mélange de mannan-oligosaccharides et β-glucanes incorporé au gel. FOS désigne les fructo-oligosaccharides incorporées au gel. Les flèches désignent les jours de prélèvements (en marron pour l'essai 6 et en violet pour l'essai 7).

Article 5 : La quantité et la qualité d'aliment solide consommé en début de vie orientent la composition et l'activité du microbiote caecal et modulent l'expression de gènes dans le tissu intestinal

En préparation

C. Paës, T. Gidenne, C. Barilly, K. Bébin, J. Duperray, C. Gohier, E. Guené-Grand, G. Rebours, M. Beaumont, S. Combes

Résumé :

Le microbiote caecal est essentiel pour le maintien de l'homéostasie digestive. Les lapins d'élevage sont sujets aux troubles digestifs post-sevrage, et un contrôle de l'implantation du microbiote constitue ainsi une solution innovante de préservation de la santé. L'environnement post-natal étant un déterminant fort de la succession écologique des espèces bactériennes du microbiote digestif, notre étude s'est intéressée aux conséquences d'une initiation précoce de l'ingestion d'aliment solide. L'objectif était de stimuler l'ingestion solide du lapereau allaité en modulant l'âge d'accès à l'aliment et sa composition. Les lapereaux du lot STA+ avaient accès dès 3 jours d'âge à un aliment gélifié disponible au nid jusqu'à 17 jours tandis que cet aliment précoce n'était pas mis à la disposition des animaux du lot STA-. Dans les lots STA+ et FF+, deux types d'aliments étaient apportés précocement au nid, ne variant que par leur ratio en fibres digestibles/amidon (ratio de l'aliment "starch" = 1,7 et ratio de l'aliment "fermentable fibres" = 5,5). Un aliment granulé riche en amidon (STA- et STA+) ou en fibres digestibles (FF+) était distribué à tous les lapins de 15 à 71 jours d'âge en trémie. La composition et l'activité des communautés bactériennes ont été examinées dans le caecum par analyse d'ADNr 16S et par métabolomique NMR, respectivement. Le transcriptome de l'iléon et du caecum ainsi que les teneurs en IgA caecales et IgG plasmatiques ont également été déterminés à différents stades de vie du lapereau. Le contrôle de l'ingestion solide nous a permis de valider la prise d'aliment dans le nid au sein des lots STA+ et FF+ avec une consommation significativement plus élevée dans le lot FF+ (+0,4 g de matières sèches/lapin, P=0,009).

L'introduction précoce d'aliment solide était associée à une accélération de la maturité du microbiote dès 18 jours d'âge en termes de composition et de structure (distances de Wunifrac) avec en particulier une réduction du nombre de membres de la famille Bacteroidaceae au profit des Ruminococcaceae. L'activité fermentaire du microbiote était également modulée suite à l'apport de gel avec notamment une hausse des teneurs caecales en acétate (x 1.7) et butyrate (x1.6) dans le caecum de lapereaux de 18 jours issus du lot STA+ comparé aux lapereaux du lot STA-. La composition de l'aliment apporté induisait des changements de composition du microbiote avec une moindre diversité alpha et un processus de maturation plus lent suite à l'ingestion d'un régime riche en fibres fermentescibles par rapport à l'ingestion d'un aliment enrichi en amidon (comparaison FF+/STA+). Probablement en lien avec ces modulations du microbiote, des effets du régime alimentaire sur le métabolisme microbien des acides gras volatils et des acides aminés étaient détectés à 18 jours. Une réduction de l'expression des gènes *Gpx2, Tnfsf13b* et *pigR*, participant à l'équilibre redox ou la réponse humorale (production et transport d'IgA), était observée à 18 jours dans le lot STA+ par rapport aux animaux du lot FF+. Si les espèces bactériennes présentes suite à l'ingestion d'un aliment appauvri en fibres fermentescibles au profit de l'amidon étaient plus proches des communautés bactériennes d'un lapin de 58 jours, l'enrichissement en amidon de l'aliment ne semblait en revanche pas participer à une accélération de la maturité de la muqueuse caecale. L'ensemble de ces résultats démontrent l'impact d'une alimentation précoce sur la construction du microbiote et confirment l'importance de l'alimentation post-natale dans la construction de l'holobionte lapin. Nos conclusions devront être complétées d'analyses supplémentaires mobilisant des effectifs plus importants pour conclure quant à l'intérêt d'une stratégie de stimulation de l'ingéré solide précoce sur la santé.

Article 5

Quantity and quality of solid food intake early in life modulates the composition and activity of the rabbit caecal microbiota and affect the gut gene expression.

INTRODUCTION

Mammals gut is colonized by a vast number of bacterial cells, suggesting that the host and its inhabiting microbiota constitutes a "superorganism" [1]. The resident microbiota is essential to its host since it can restrict the growth and colonization of pathogens [2], provide vitamins and energy through short-chain fatty acids production [3] and contribute to the development of the host immune system [4-6]. Microbiota balance is therefore essential to prevent the progression of enteric infection [6,7]. In particular, the use of germ-free mice models underlined that the exposure to microorganisms in early life is required for the establishment of a normal host immune system [8,9].

The microbiota ecosystems develop concomitantly with the host chronological development [10]. Microbiota development is first under influence of the maternal milk, a substrate that contains lipids, prebiotics, immunoglobulins, microorganisms, and other microbiota-shaping compounds [10-12]. The uptake of dietary solids later in life represents a new step in the dynamic construction of gut microbiota, with strong modification of the lumen characteristics leading to change of bacterial population and metabolic adaptations [10,13]. For those reasons, the introduction of solid food is considered as one of the main driver of the mammals microbial succession [14-16]. Those postnatal changes not only represent changes in bacterial composition and growth, but also depicts an evolution towards a stable state more resistant to perturbations [17-18]. The higher permissiveness of the neonatal microbiota thus represents a window opportunity for early manipulation of the gut microbiota through the diet [19].

To promote healthy microbial colonization in infants, recent studies therefore focused on the formulas of complementary foods (nutritional values and prebiotics supplementation) to accompany the decrease of breastfeeding through the weaning transition [20,21]. In livestock systems, where the weaning represents a critical component of the farm management, the introduction of a starter food during the lactation stage represents an opportunity to promote a beneficial host/microbiota co-maturation. The supply of solid food before weaning was thus found to induce strong modifications of epithelial bacterial communities

and some key immune-related gene's expression in preweaned lambs [22]. Prebiotics or probiotics-supplemented creep food were also found to affect gut microbial population in pigs [23]. Besides, solid food consumption by suckling piglets was found to increase their dry matter intakes early after weaning, suggesting improved capacity of the piglets to cope with weaning [24-25]. In rabbit breeding systems, which also face health preservation issues, creep feeding practice is not developed despite the ability of the rabbit to consume food few days after birth in wild [26] or on-farm conditions [27-29]. Moreover, the first food that rabbits accessed before weaning in commercial conditions might not be suitable to their needs, and nutritional requirements for the young rabbit are still lacking [30].

To address this research gap, the present study aims to evaluate the relevancy of feeding strategies for suckling rabbits including starter diets to modulate microbiota colonization and metabolic activiy, and subsequently the rabbit intestinal development. We postulated that precocious arrival of substrates in the gut would accelerate the gut maturation and positively contribute to immune functions, with variations depending on the quality of the starter food. In preparation of this study, palatable food in a gel form for suckling rabbits was identified as a suitable food to optimize solid intake early in life [29]. Starter foods in a gel form were provided from 3 to 17 days and differed by their content in fermentable fibres, to stimulate caecal microbial activity, and starch, that may favour young rabbits intake due to its high energy content [31,32]. After starter diet supplementation, pellets with a similar dry matter composition than gels were provided until sale. The development of caecal microbial communities in the gut and their metabolic activities were measured before and after weaning. Gene expression in ileon and caecal tissues were analyzed as a proxy of gut health in addition with the evaluation of redox parameter in blood.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Experimental Design

Forty-eight crossbred litters (commercial lines Hyplus PS19 x Hyplus PS59) were raised with their doe (INRAE, Castanet-Tolosan, France) using a mother-litter separate feeding system. All the litters had access to a specific pelleted feed from 15 days in addition with doe milk. Two days after parturition (d2), litter size was standardized to 10 kits. At d3, litters were allocated to three experimental groups

according to their body weight (kit weight: 99±9 g) and the doe's parity. In the early feeding groups (STA+ and FF+) the litters were fed from 3 to 17 days a starter feed in a gel form in addition with milk, while no starter feed was supplied to the control group (STA-). The intake of starter feed gel was assessed daily from 7 days and the gel water loss due to evaporation was taking into account. Starter feed gels were processed with the kits' pellets transformed into mash. This mash was supplemented with vanilla flavor (0.06%, Phodé, Terssac, France) before being thoroughly mixed with three times its weight of hot water and 0.6% of agar. Starter feed gels were produced daily and were provided to suckling rabbits directly in the nest inside plastic cups. The DM content of starter feed gels equaled 26% while it amounted to 89% in the pellets. Mortality was registered daily and growth was regularly assessed by weighing litters before weaning (day 36) or individuals after weaning. Milk intake was measured as the difference of female weight before and after suckling at 3, 7, 10, 14, 17 and 21 d. Milk dry matter was estimated to reach 30% based on a review paper on rabbit milk composition (Maertens et al., 2010).

Experimental diets

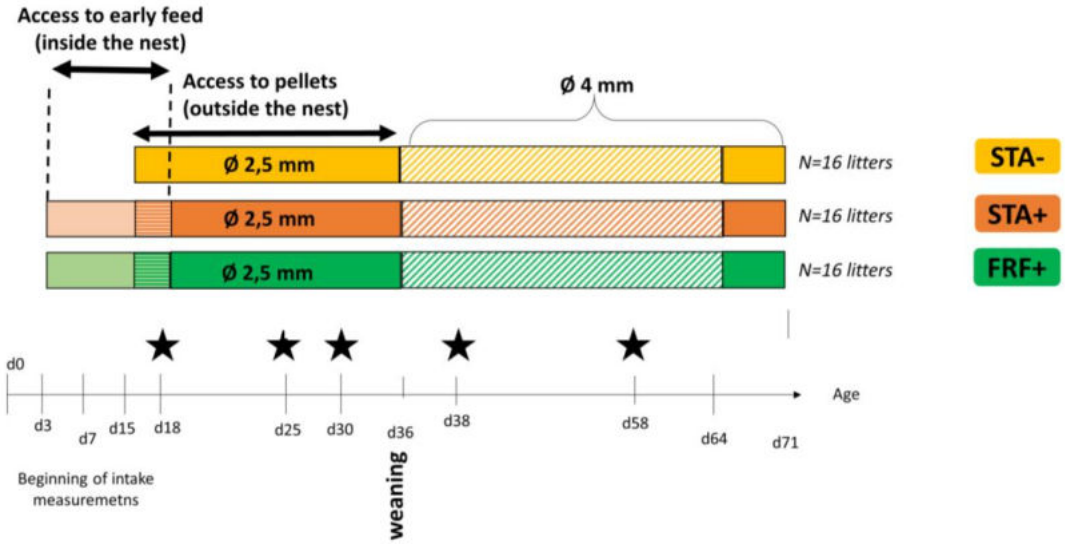


Figure 1: Experimental design.

The animals were fed iso-protein, iso-energy, iso-ADF and iso-ADL experimental diets that only differed by the ratio digestible fibres/starch (1.7 and 5.5). To achieve this feed formulation, similar ingredients were used with higher levels of cereals (barley, wheat) in the diet rich in starch (STA) and higher concentrations of wheat bran fraction, beet and grape pulp in the diet rich in digestible fibers

(fermentable fibres, FF group) (Table 1). Digestible fibres, are considered as the sum of hemicelluloses (NDF-ADF) and rapidly fermentable fibres (that includes the nonstarch, non-NDF polysaccharides with soluble pectic substances, β-glucans, fructans, and gums) and can be simply calculated as TDF-ADF [35]. Those diets were brought through all the rabbit productive life and were thus formulated to cover both suckling and fattening rabbits' nutritional requirements based on the nutritional requirements currently known. The feed were manufactured and pelleted at 2 and 4 mm diameter (Euronutrition SAS, Saint-Symphorien, France). In accordance with the suckling rabbits preferences previously assessed, 2-mm-diameter pellets were provided before weaning from 15 days in the three experimental groups and were changed to 4-mm diameter pellets afterwards (Figure 1).

Table 1: Ingredients and chemical composition of the experimental diets

	STA diet	**FF diet**
Ingredients (%)		
Sunflower meal	25.00	20.00
Barley	15.00	2.40
Wheat bran	12.80	21.00
Alfalfa	6.90	6.00
Beet pulp	6.70	22.20
Apple pomace	6.00	4.00
Cane molasses	5.50	5.20
Wheat	5.20	2.00
Straw	5.00	2.10
Rapeseed meal	3.50	5.80
Rapeseed whole seed	2.30	2.30
Grape pulp	2.20	3.80
Calcium carbonate	1.18	0.78
L-Lysine 25%	0.56	0.36
Rapeseed oil	0.50	0.50
Threonine 10%	0.42	0.26
Methionine 15%	0.24	0.30
Mineral and vitamin premix1	1.00	1.00
Chemical composition (g/kg as fed-basis)		
Dry matter	893	905
Ash	67	69
Crude protein	160	160
NDF	356	387
ADF	215	217
ADL	73	73
Hemicelluloses (NDF-ADF)	141	170
TDF2	331	389
Rapidly fermentable fibres (TDF-NDF)	66	94
Starch	119	48
Ratio digestible fibres/starch	1.7	5.5
Fat content	28	26
Gross energy (MJ/kg)	17.0	16.7

[1]Premix provided per kg diet: vitamin A, 10,000 IU; vitamin D_3, 1,000 IU; vitamin E, 50 IU; Fe, 100 mg; Cu, 10 mg; Mn, 5 mg; Co, 0.1 mg; I, 0.2 mg; Zn, 50 mg; Se, 0.2 mg

[2]TDF: Total Dietary Fibre, calculated with WUFFDA software according to tables of ingredients [36]

Sample Collection

At days 18, 25, 30, 38 and 58, ten kits per group were sacrificed by electronarcosis and exsanguination. Healthy rabbits that exhibited an interest for starter feed (visual observations) were selected before weaning. Blood samples were collected from aorta during slaughtering in EDTA tubes immediately stored on ice and inside sterile Eppendorf tubes for serum preparation. After centrifugation (800g for 10 min at 4°C), the plasmas were stored at -20°C until further analysis. Regarding serum preparation, after collection of the whole blood, the Eppendorf tubes were let undisturbed at room temperature for 20 minutes. The clot was then removed by centrifuging tubes at 1,800 x g for 10 minutes in a regular centrifuge and the resulting supernatant was collected and transferred into new tubes, then stored at -20°C. Immediately after slaughter, caecum digesta were collected in sterile conditions and stored at -80°C. Fresh caecal content were also collected and diluted in H_2SO_4 (at 2% w/v) to quantify volatile fatty acid (VFA) and ammonia (NH_3) concentrations at days 25, 30, 38 and 58 (insufficient quantities at day 18 for the collection). Caecal pH was measured by introducing a glass electrode at the ileoceacal junction (VWR Collection SP225, Radnor, Pennsylvanie, USA). Within the first minutes of slaughter, segments of the caecal (3 cm from the *Sacculus Rototondus*) and ileal tissues (2 cm from the ileoceacal junction) were collected, washed in ice-cold PBS and snap-frozen in liquid nitrogen for tissue RNA extraction. Finally, the weights of the caecum, the caecum appendix, the stomach and the spleen were recorded.

ELISA measurements and evaluation of oxidative stress

ELISA procedure was used to quantify IgG in plasma and IgA concentration in caecum digesta. As a preliminary step for the latter measurement, caecal content was diluted at 50 mg/mL in TBS buffer. After shaking thoroughly, the samples were centrifuged (3000 g, 10 min, 4 °C). The supernatants were collected and stored at -20°C until analysis. Total IgG or IgA contents were determined in duplicates by sandwich ELISA in 96-well plates coated with specific polyclonal goat anti-rabbit IgG or IgA antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA). Appropriate sample dilutions were performed according to the rabbit age: from 1:16000 to 1:32000 for IgG and from 1:12 to 1:800 for IgA determination. Plates were read at 450 nm in GloMax® Discover plate reader (Promega, Madison, WI) to construct the standard curve based on a four-parametric model. IgG in plasmas were quantified by

using a reference IgG serum (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA). Regarding IgA, twelve caecal content samples were pooled to build a reference sample for the standard curve construction. Relative IgA concentrations were then interpolated from this curve. Results with intra-assay coefficients of variation lower than 20% were kept (Wong et al., 2004).

Oxidative stress status of the rabbits was assessed on serum samples by quantifications of the derivatives of reactive oxygen metabolites levels (hydroperoxydes primarily which are by-products of free radicals) following the procedure of the d-ROM test (Diacron International, Grosseto, Italy).

Evaluation of caecal microbiota activity

Ammonia (NH_3) and Volatile Fatty Acids (VFA) were measured quantitatively respectively with a colorimetric method using a continuous flow analyzer (SAN++, Skalar, Norcross, Georgia USA) as previously described by (Verdouw et al., 1977, and with gas chromatography (CPG HP 7890A, Agilent, Santa Clara, California, USA) following the method of Filípek and Dvořák [38] . Results were expressed according to the liquid phase of caecal content after determination of cecal samples fresh matter by drying at 103°C for 24h.

The same methodology presented by Beaumont et al. [39] was used to perform NMR metabolomics on the caecal content collected at days 18, 25, 30, 38 and 58. Caecal contents (100 mg) were homogenized in 500 µL phosphate buffer in 2mL FastPrep tubes by using a FastPrep Instrument (MP biomedicals, Irvine, CA). After centrifugation (12 000 g, 4°C, 10 min), supernatants were collected. The extraction step was repeated on the pellet. Supernatants were pooled and centrifuged twice (18 000 g, 30 min, 4°C). The resulting supernatant (600 µL) was transferred to a 5 mm NMR tube. All NMR spectra were obtained with an Avance III HD NMR spectrometer operating at 600.13 MHz for ^{1}H resonance frequency using a 5 mm inverse detection CryoProbe (Brucker, Billerica, MA) in the Axiom-MetaToul metabolomics platform (Toulouse, France). ^{1}H NMR spectra were acquired at 300 K using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill spin-echo pulse sequence with presaturation. Pre-processing of the spectra (group delay correction, solvent suppression, apodization with a line broadening of 0.3, Fourrier transform, zero order phase correction, shift referencing on TSP, baseline correction, setting of negative values to zero) was

performed in the galaxy tool Workflow4Metabolomics following guidelines [40]. After water region (4.5 – 5.1 ppm) exclusion, spectra (0.5 – 9 ppm) were bucketed (0.01 ppm bucket width) and normalized by sample weight in Workflow4Metabolomics. Representative samples were characterized by 2D NMR experiments (^{1}H-^{1}H COSY and ^{13}C-^{1}H HSQC). For metabolite identification, 1D and 2D NMR spectra of pure compounds prepared in the same buffer and acquired with the same spectrometer were overlayed with samples spectra.

16S rRNA gene sequencing and sequence analysis

Total genomic DNA was extracted from 50 mg of caecal digesta using Quick-DNA Fecal/Soil Microbe 96 Kit (ZymoResearch, Irvine, California) according to manufacturer's instruction after mechanical lyses at 30 Hz for 15 min (TisueLyzer II, Qiagen, Hilden, Germany). 16S rRNA V3-V4 region was amplified by PCR and paired reads were sequenced by MiSeq Illumina Sequencing in the Genomic and Transcriptomic Platform (INRA, Toulouse, France) as previously described [41]. The raw sequences obtained (30376 per sample on average) were cleaned, clustered into operational taxonomic unit and affiliated to taxa (SILVA132 database) using the FROGS pipeline [42]. After the filtering step, the mean number of reads per sample was 18,550 (min: 9,110 – max: 35,735). A phyloseq object (McMurdie and Holmes, 2013) containing the OTUs table (OTU abundance for each sample with taxonomic classification) as well as sample information was then built for subsequent analysis. Additionally, three taxonomical datasets were generated from this phyloseq object for phylum, family and genus levels.

Gene expression profiling

Caecal and ileal tissues were homogenized in TRI reagent (ZymoResearch, Irvine, CA) with one sterile stainless steel 5mm diameter bead (Qiagen) by using a TissueLyzer (Qiagen) with two 3 min cycles at 30 Hz. After centrifugation (12 000 g, 4°C, 10 min), 300 µL of supernatant was used for RNA extraction by using Direct-zol kit (ZymoResearch) following the manufacturer instruction, including a DNAse I treatment. RNA concentration and quality were analyzed with NanoDrop 8000 (ThermoFisherScientific). cDNA were prepared from 1µg RNA with Superscript II (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer instructions. High throughput real-time qPCR was performed separately for each tissue using the Biomark microfluidic system with three 96.96 Dynamic Array™ IFC for gene expression (Fluidigm, San Francisco, CA) according to the manufacturer

recommendations. The sequences of the primers used are presented in Supplemental table 1. Data were analyzed with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with *Gapdh* and *Top1* used as a reference genes respectively for caecal and ileal genes.

Calculation and statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 3.5.1). Significance was declared at $P < 0.05$ and tendency at $P<0.10$.

Longitudinal intakes, growth data (after log transformation on weight performances), immunoglobulins (after log transformation), VFA, NH3 and hydroperoxides concentrations were analyzed with the linear mixed procedure of nlme package. The mixed model included age, experimental groups and their interaction as fixed effects, litter as random effect and a correction for age heteroscedasticity. Post-hoc comparisons were made with emmeans package using false discovery rate adjustment.

Microbiome, metabolomics and host transcriptome data were analyzed with separate investigations of starter food intake (comparisons STA-/STA+) and composition (comparisons STA+/FF+) effects to support eased interpretation. Within-community diversity (α-diversity) was evaluated through Inverse Simpson and Shannon metrics with phyloseq package after rarefaction of the OTU table at 9,110 sequences. To examine differences in community structure, Weighted Unifrac distances (Wunifrac), which incorporate both abundances and phylogenetic information, were calculated on the rarefied matrix. Betadisper function (vegan package) was used to control the assumption of homogeneity of Wunifrac distances dispersion among groups. A PERMANOVA (vegan package, function Adonis) was then used to test whether composition among groups was similar or not. To evaluate community evolution dynamic to reach stability i.e. maturity, the Wunifrac distances to reach 58 days microbiota structure were evaluated at the different sampling points. Relative abundances of the phylum, family and genus levels were fourth root transformed and analyzed with linear mixed model (age and experimental groups of interest as fixed effects and litter as random effect) with false discovery rate adjustments. Similarly, multiple linear regressions were performed on metabolites concentrations (29 metabolites identified) and gene expression data (48 and 45 genes respectively in caecal and in ileal tissues) by using linear mixed models (age and experimental groups of intest as fixed effects and litter

as random effect) with false discovery rate adjustments after log10 transformation to improve homoscedasticity of residuals.

RESULTS

Intake pattern of the suckling rabbits

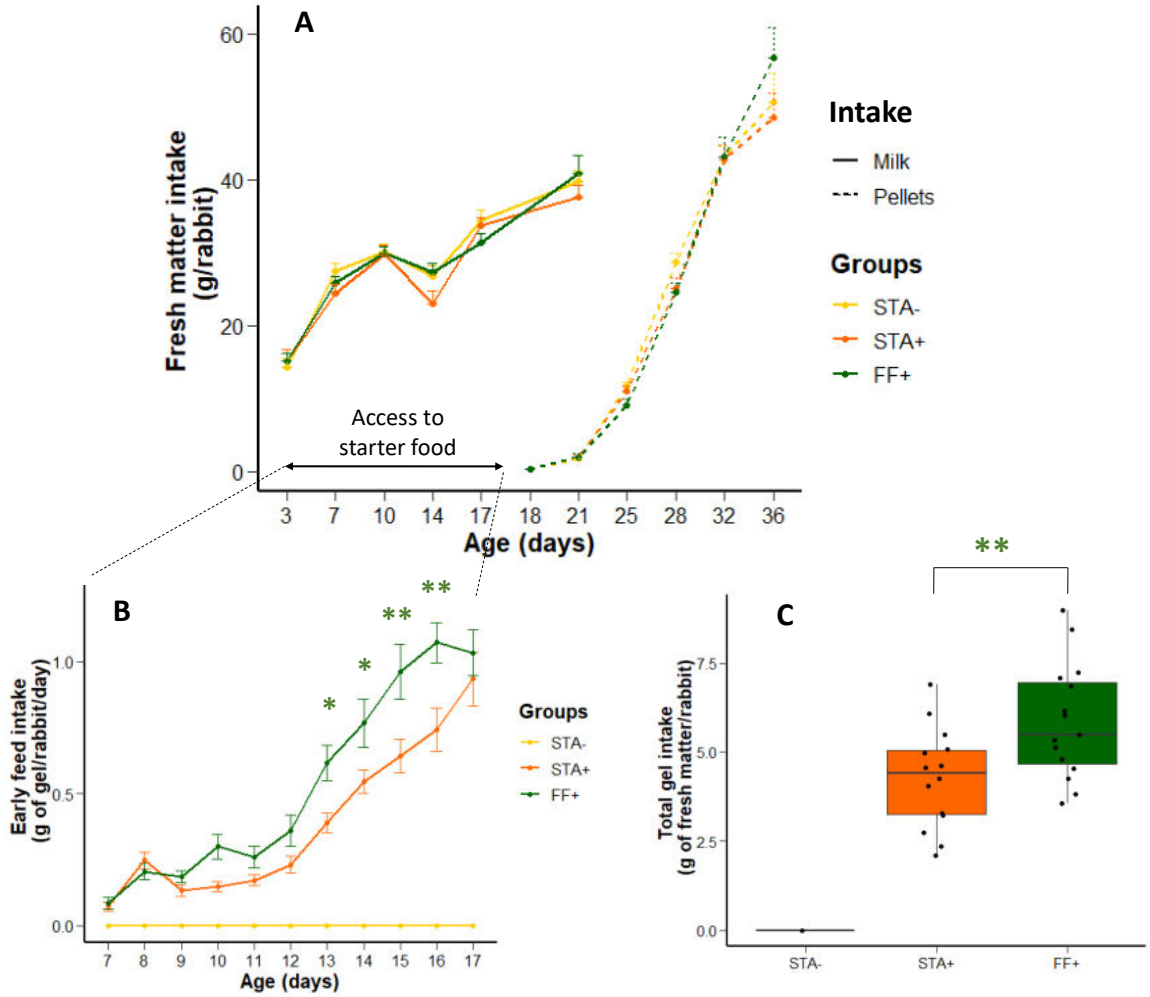


Figure 2: (**A**): Suckling rabbits' intake pattern (milk and solid food including gels and then pellets) between 3 days and weaning. (**B**) and (**C**): Focus on early consumption of gels in the nest (kinetics and total amounts consumed).

The intake of gels in the nest was first controlled and evaluated to ensure that rabbits did not reject the starter food. Starter foods were consumed from 7 days with higher gel intake levels observed for FF+ gels compared to STA+ gels from 13 to 16 days of age (Figure 2 B). As a result, the total gel intake in the nest of FF+ rabbits (5.8±0.4 g of raw gels/rabbit, an average of 1.5g of dry matter intake) was significantly higher than the intake of gels made with starch-enriched mash (4.3±0.4 g of raw gels/rabbit, an average of 1.1 g of dry matter intake ; P=0.009) (Figure 2C). The intake of gels was variable between

litters with a difference of 4-fold between the maximum and the minimum values of starter food intake. The number of visits to the cups, a variable used to approximate the individual feeding inside the nest within litters, was also variable with a range of 5 to 10 visits per day on average (Figure S1). Subsequent intake of the pellets provided in feeders was similar between groups (total consumption from 15 days to weaning: 359±8 g). The milk, alternatively consumed by rabbits, did not differ between treatments until 21 days (Figure 2A). During the period 15-17 days, suckling rabbits had both access to pellets and gels, but they consumed significantly more of the latter (+1.5 g of fresh matter, $P<0.001$). It was estimated that gel consumption at 17 days accounted for 3% of the raw intake and 10% of the total dry matter at this age. Altogether, our results highlight that providing starter food gels promoted pre-weaning solid food ingestion by suckling rabbit and these effects were amplified when the gels contained digestible fibers-enriched mash.

Rabbit growth and health

We analyzed the consequences of solid food ingestion modulation (effects of early supply of foods and diet composition changes) on growth and health of young rabbits. Mortality rates were low with only 1.3% of deaths from 3 days to weaning and only one dead rabbit reported during fattening period. Weaning weights were equal between groups, during the suckling period, at weaning (984±6 g/rabbit) and during fattening period (2359±13 g/rabbit at 64 days). Similarly, the weights of the rabbits sampled for microbiota investigation were similar (Figure 3A). A few days before weaning (28-35 days of age), the average daily gain of the litters was higher in FF+ group compared to STA- and STA+ rabbits (respectively +7 g/day and +6 g/day, $P<0.01$) (Figure 3B). The caecum weight (digesta + tissue) of rabbits from FF+ group was higher compared to STA+ group at 30 days (+10 g, $P=0.042$). The growth of the appendix, stomach and the spleen was not affected by the treatments.

Systemic and local immune response were assessed by measuring respectively the levels of plasma IgG, caecal IgA and the concentration of hydroperoxydes in serum. Immunoglobulins concentrations varied greatly with age (Figure 3C and 3D) with highest levels of IgA at 18 days due to passive immunity (i.e. milk IgA). The caecal IgA concentrations did not vary with the treatments while plasmatic IgG concentration was lower in STA+ compared to STA- group at 30 days (-1.2 mg/mL, $P=0.024$) and

compared to FF+ rabbits at 58 days (-1.2 mg/mL, P=0.002). (Figure 3D). At 30 days, hydroperoxides levels tended to be higher in STA- group than STA+ group (P=0.082, Supplemental Table 2).

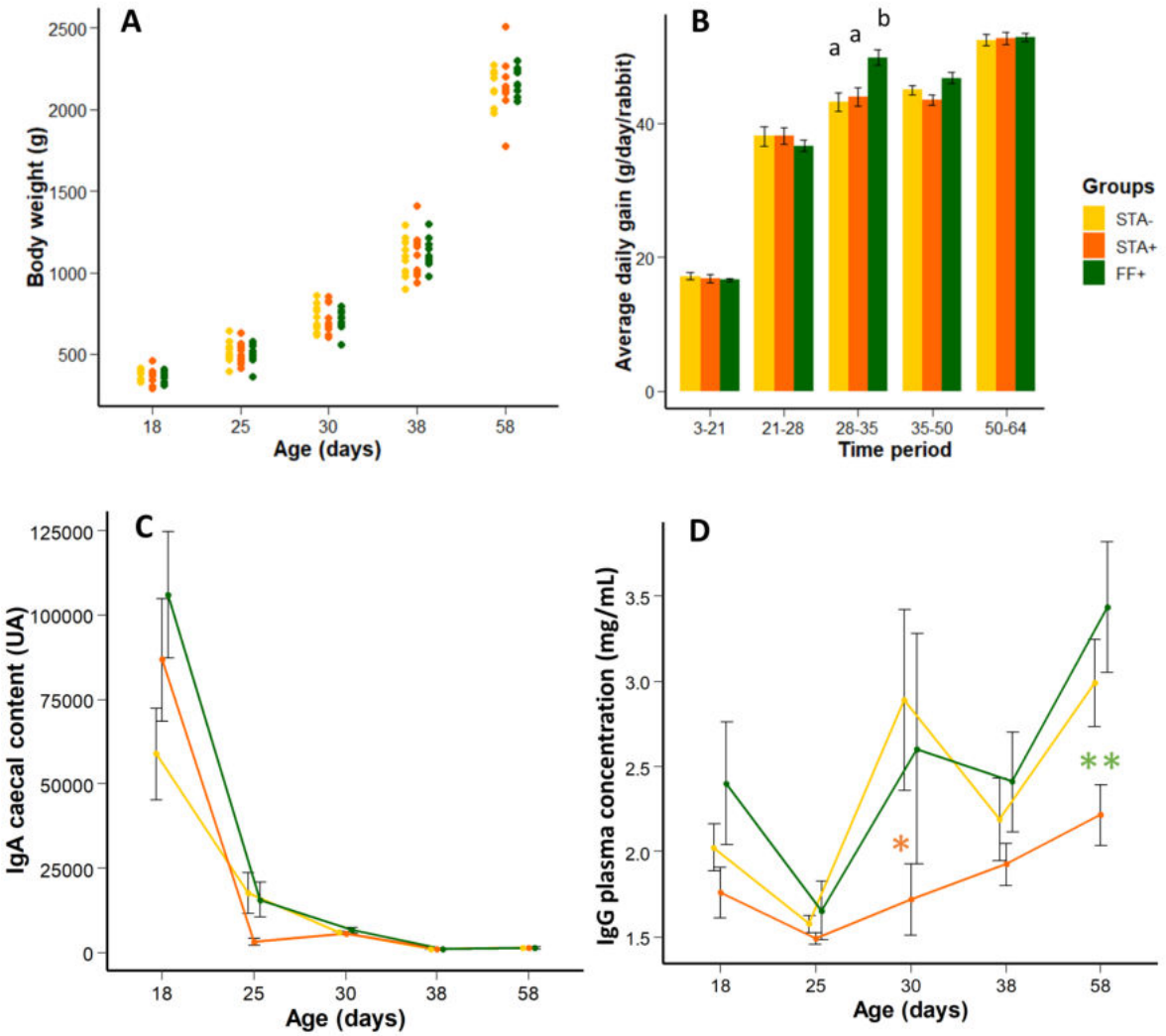


Figure 3: Growth and health parameters of the rabbits raised during this experiment. **(A)** Individual weights of the rabbits sampled for microbiota and transcriptome analysis, **(B)** Average daily gain from group assignment (day 3) to the end of food rationing (64 days), **(C)** caecal IgA content and **(D)** plasmatic IgG content.

Characteristics of the rabbit caecal microbiota

The age was a strong driver of gut microbial ecological succession with marked effects of the beginning of high levels of solid feed consumed (between 18 and 35 days). Increased ages were associated with significant increase of the three alpha diversity scores (P<0.001). Beta diversity analysis also highlighted overwhelming time-related effects on microbiota structure (P<0.001, R^2=32-34%) or composition (P<0.001, R^2=67-68%). Microbiota colonization was sequential: bacterias from Bacteroidetes phyla

were predominant in caecal microbiota at 18 days and were gradually replaced by bacteria from Firmicutes phyla. As they are already well describe [41,43], those changes of caecal communities across time will not be more detailed to focus on the effects of starter food introduction (comparison STA-/STA+), and of diet composition (STA+/FF+).

Table 2: Results of PERMANOVA test examining the effects of early food intervention (STA- and STA+ groups) and age on two beta diversity metrics (Bray Curtis and unweighted Unifrac distances matrices).

	Bray Curtis			**Wunifrac**		
	F	*P-value*	*R2*	*F*	*P-value*	*R2*
Experimental Groups	1.5	0.081	0.011	4.8	0.015	0.017
Age	5.9	0.001	0.345	24.4	0.001	0.678
Groups x Age	0.9	0.733	0.053	0.9	0.575	0.025

Starter food intake effects

To assess effects of early ingestion of a starter gel food, we compared results obtained in STA- and STA+ groups. Alpha-diversity indices were significantly affected by early starter food intake (P=0.076, P=0.002 and P=0.017 regarding the number of OTUs, Shannon and InvSimpson indices) (Figure 4A). The InvSimpson was higher in STA+ group compared to STA- group at 30 days (P=0.023). Early access to starter food had moderate effect on microbiota phylogenetic structure (R^2=2%, PERMANOVA, weighted Unifrac (Wunifrac) distances) (Table 2). From d18 until d38, the Wunifrac distance to reach 58-day-old community structure was shorter (P<0.01) when early feed intake was stimulated (Figure 4B). Among the six bacterial phyla identified, there was a trend for higher proportions of Firmicutes and lower relative abundances of Bacteroidetes in the caecums from STA+ group (P=0.068 in both cases). Among the 10 most abundant families detected, we observed lower proportions of Bacteroidaceae when rabbits had early access to food (P=0.044) as well as higher abundances of Ruminococcaceae (P =0.044; Figure 4D).

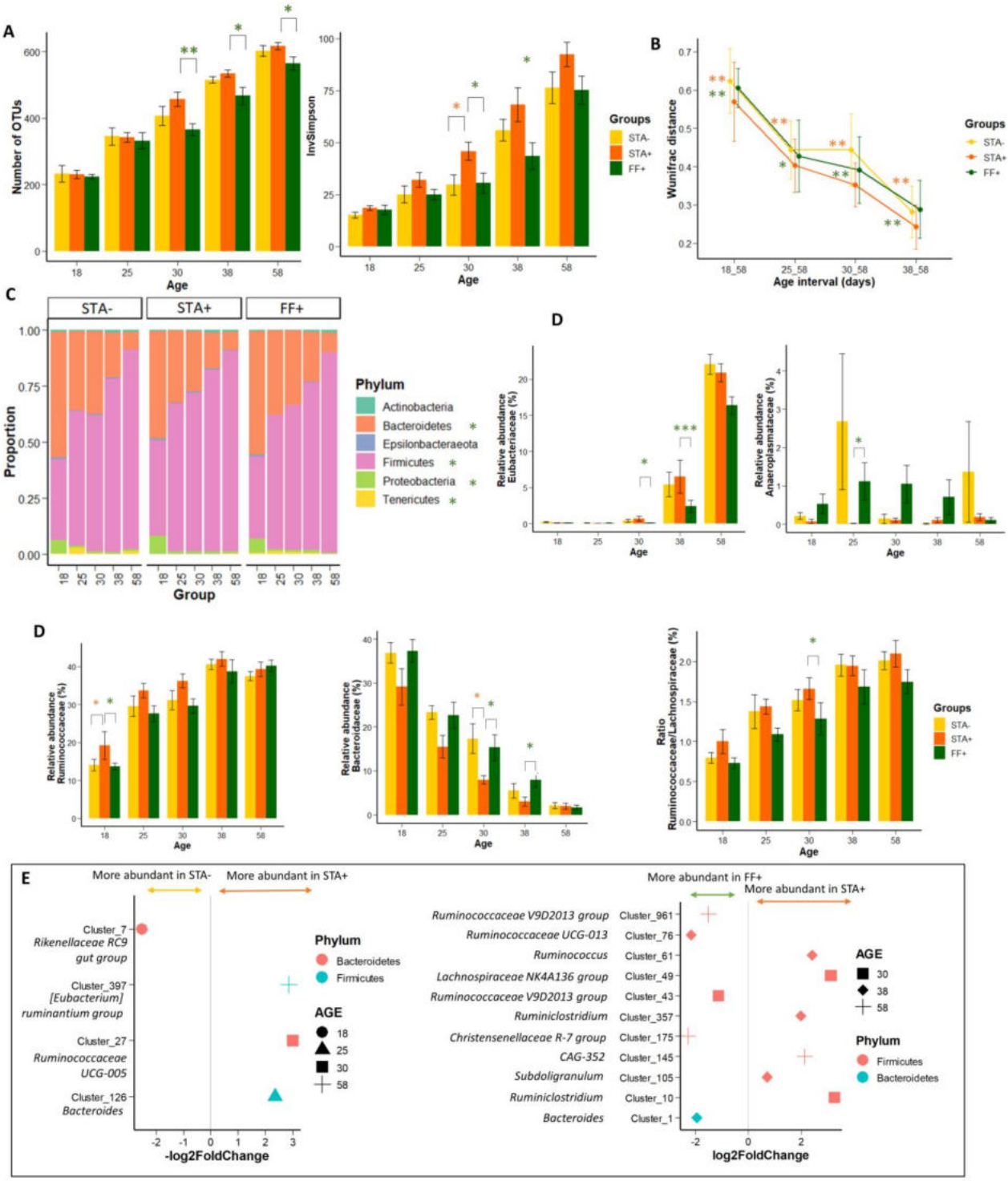


Figure 4: Analysis of differences of microbiota implantation and colonization according to the experimental groups before and after weaning. **(A)**: comparison of alpha-diversity indices, **(B):** dissimilarity of the bacterial communities from 58 days of age, **(C):** phylum distribution across the groups, **(D):** families that significantly differed according to experimental groups and **(E):** results of differential analysis of counts data for OTU affiliated at the genus level.

Orange stars represent significant differences between STA- and STA+ treatment while green stars emphasize significant differences between STA+ and FF+ treatment.

The proportions of the 69 genus identified (64% with taxonomic affiliation) was similar between STA- and STA+ groups. Sixteen bacterial OTUs were differentially abundant with early feeding treatments among which 4 were abundant (>30 normalized counts) and with a known genus (Figure 4E). In the d18 samples, one significant difference of abundance was found for an highly abundant OTU (normalized counts=328) affiliated to *Bacteroides* genus with 2.5 Log_2-fold changes more sequences in the absence of early feeding. Interestingly, one OTU belonging to *[Eubacterium] ruminantium group* was more abundant in STA+ group (Log_2-FC=2.9) at 58 days, 41 days after the end of starter food supplementation.

Table 3: Results of PERMANOVA test examining the effects of diet strategy (STA+ and FF+ groups) and age on two beta diversity metrics (Bray Curtis and unweighted Unifrac distances matrices).

	Bray Curtis			**Wunifrac**		
	F	*P-value*	R^2	*F*	*P-value*	R^2
Experimental Groups	2.8	0.003	0.021	6.9	0.002	0.024
Age	5.4	0.001	0.321	24.2	0.001	0.666
Groups x Age	1.0	0.478	0.059	1.2	0.281	0.032

Diet composition effects

The comparison of STA+ and FF+ allows us to assess the effect of diet composition on microbiota. Alpha-diversity indices were significantly affected by the diet composition (P=0.001, P<0.001 and P=0.051 regarding the number of OTUs, Shannon and InvSimpson indices). The number of OTUs was significantly higher in STA+ group at 30, 38 and 58 days and similarly, InvSimpson indices significantly increased at 30 and 38 days in the caecum of STA+ rabbits compared to FF+ rabbits (Figure 4A). Diet composition had significant effects on microbiota phylogenetic structure (PERMANOVA, weighted Unifrac distances, Table 3) with changes in microbial communities driven by groups to a lesser extent than age (R^2=2%). From d18 until d38, the Wunifrac distance to reach 58-day-old community structure was greater for the caecal bacterial communities of FF+ rabbits (Figure 4B). At the phylum levels, diet composition effects were reported on Bacteroidetes (+5% in FF+ on average, P=0.022), Firmicutes (-6% in FF+, P=0.022), Tenericutes (+0.6% in FF+, P=0.022) and Proteobacteria proportions (-4% in FF+, P=0.032) (Figure 4C). Consequently, the ratio Firmicutes/Bacteroidetes was significantly higher

in STA+ group (P=0.022). Differences in the relative abundances of 5 families among the 33 identified were observed and the 4 most-abundant (>1% of relative abundance) are presented in Figure 4D. At 18 days, lower proportion of Ruminococcaceae were found in FF+ group (-5.4%, P=0.05). At 30 and 38 days, Bacteroidaceae showed higher relative abundance in FF+ group (+7%, P=0.04 and +5% P=0.005 respectively). Due to those changes, the ratio Ruminococcaceae/Bacteroidaceae was significantly lower in FF+ group at 30 days of age. No significant differences of relative abundances were observed in the 30 most-abundant genus. Fifty-eight bacterial OTUs were differentially abundant with early feeding treatments among which 11 were abundant (>30 normalized counts) and with a known genus (Figure 4E). Significant differences of abundances were found from 30 days of age. In particular, higher proportion of two OTU from *Ruminococcaceae V9D2013 group* (Log_2-FC=-1.1 and Log_2-FC=-1.5) and one OTU of *Bacteroides* genus (Log_2-FC=-1.9) were found in the caecum of FF+ group at 30, 58 and 30 days respectively. Higher proportions of two OTU belonging to *Ruminiclostridium* genus were observed in STA+ group at 30 and 38 days (Log_2-fold=3.2 and Log_2-fold=2.0 respectively).

Gut microbiota metabolic activities

As a next step, we investigated the changes of metabolites content in the lumen to assess the modification of gut microbiota activities in relation with the taxonomic modifications presented above. Microbiota fermentation by-products were measured in caecal content metabolome by NMR spectroscopy (relative quantification) from day 18. Absolute quantities of volatile fatty acids and ammonia concentrations were measured from 25-days. Caecal metabolome was under the influence of age factor (that includes ontogenic and nutritional potential effects ; Figure S2) and main changes occurred between 18 and 25 days with the onset of solid feeding, and 38 and 58 days in the late fattening period. Twenty-nine metabolites were identified and their relative concentration varied with the age with the exception of the 3-methyl-2-oxovalerate. We will focus herein on the specific effects of the dietary interventions.

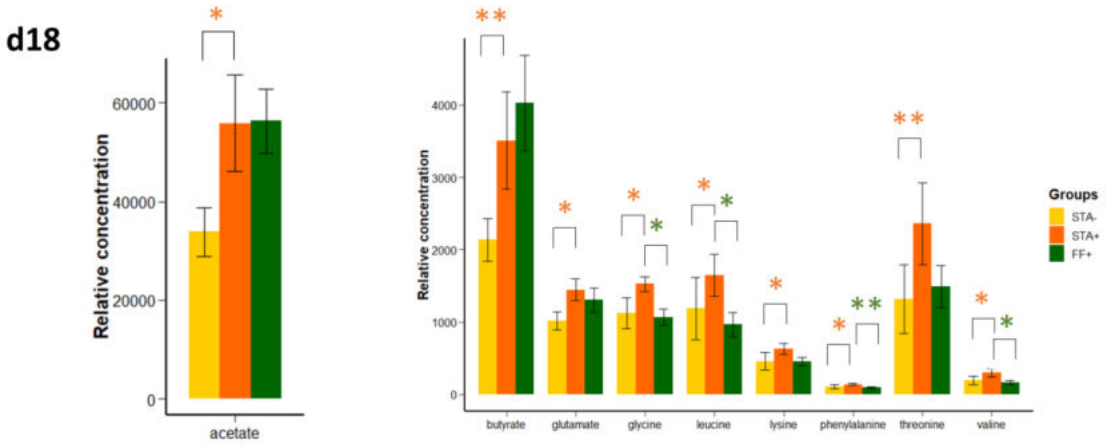


Figure 5: Effects of early solid food stimulation on caecal metabolites relative concentrations at 18 days. Orange stars represent significant differences according to early ingestion (STA- and STA+ treatment) while green stars indicate significant differences according to diet composition when early ingestion was allowed (STA+ and FF+ treatment).

Starter food intake effects (Supplemental Table 3)

The relative concentrations of nine caecal metabolites were significantly affected at 18 days by the early food intake stimulation (Figure 5). Among those, the concentrations of the short-chain fatty acids (SCFA) acetate (major SCFA in the rabbit gut) and butyrate were respectively increased by 1.7-fold and 1.6-fold in STA+ group at 18 days when compared with STA- group. Similarly, the concentrations of the amino acids glycine, leucine, lysine, valine, threonine, phenylalanine and glutamate were higher in the caecum of STA+ rabbits. At following ages, similar metabolic activities were observed, except that higher contents of the minor SCFA 3-methyl-2-oxobutyrate were found in the caecum of STA- rabbit at 30 days (7-fold increase, $P<0.001$). Microbial environmental parameters of the caecum assessed by pH and NH_3 concentrations were similar between the two groups throughout the experiment.

Diet composition effects (Supplemental Table 4)

STA+ treatment was associated with increased levels of phenylalanine ($P=0.001$) and valine ($P=0.025$) in the caecal content at 18 and 58 days when compared to the FF group (Figure 5). The caecal levels of glucose ($P<0.001$) and glutamate ($P=0.002$) were also higher in STA+ caecum at 38 and 58 days. The concentration of the amino-acid glycine was found in greater proportion in STA+ caecum at 18 and 58 days. On the contrary, FF+ treatment had higher caecal relative concentration of methanol throughout

the experiment (P<0.001) and galactose from 25 days (P<0.001). At 18 days, the content of 3-(3-hydroxyphenyl)propionate was significantly higher in the caecum of rabbits from FF+ group (+80%, P=0.007) and at 30 days higher levels of acetate (+35%, P=0.027) were observed in this group. At 58 days, the SCFA profile was modified by the diet composition with higher proportions of acetate (+3%, P=0.006) and lower proportions of butyrate (+3%, P=0.001) in FF+ group (Figure 6). Higher dry matter content were observed in animals that received STA diet from 25 days of age compared to rabbits that received FF diet (+2% on average, P<0,001). Other environmental parameters of the caecum (pH, NH_3) did not differ between the experimental groups.

Altogether, the early introduction of enriched starch solid food was associated with accelerated maturity of the microbiota and modulation of its fermentation activity. Conversely, a slower maturation process was observed following the ingestion of a diet rich in fermentable fibre.

Transcriptome analysis in caecum and small intestine mucosa

Microbiota-host crosstalk is particularly rich at the gut mucosal interface. Therefore, we assessed the regulation of the caecum and ileal mucosa transcriptome, by reverse transcriptase-polymerase chain reaction followed by a high-throughput microfluidic qPCR array. Heatmap representations (Figure S3) highlighted the maturation of the caecal and ileal epithelium cells with high production of transcripts associated with barrier function in early life (genes encoding for antimicrobials peptides such as as *Reg3γ, Ang, Def-β1, Np4*, mucins and tight junction productions) followed by upregulation of genes involved in both innate and adaptative immunity (redox signaling with *Gpx1*, *Gpx2* and *Sod1,* and IgA transport with *pigR*).

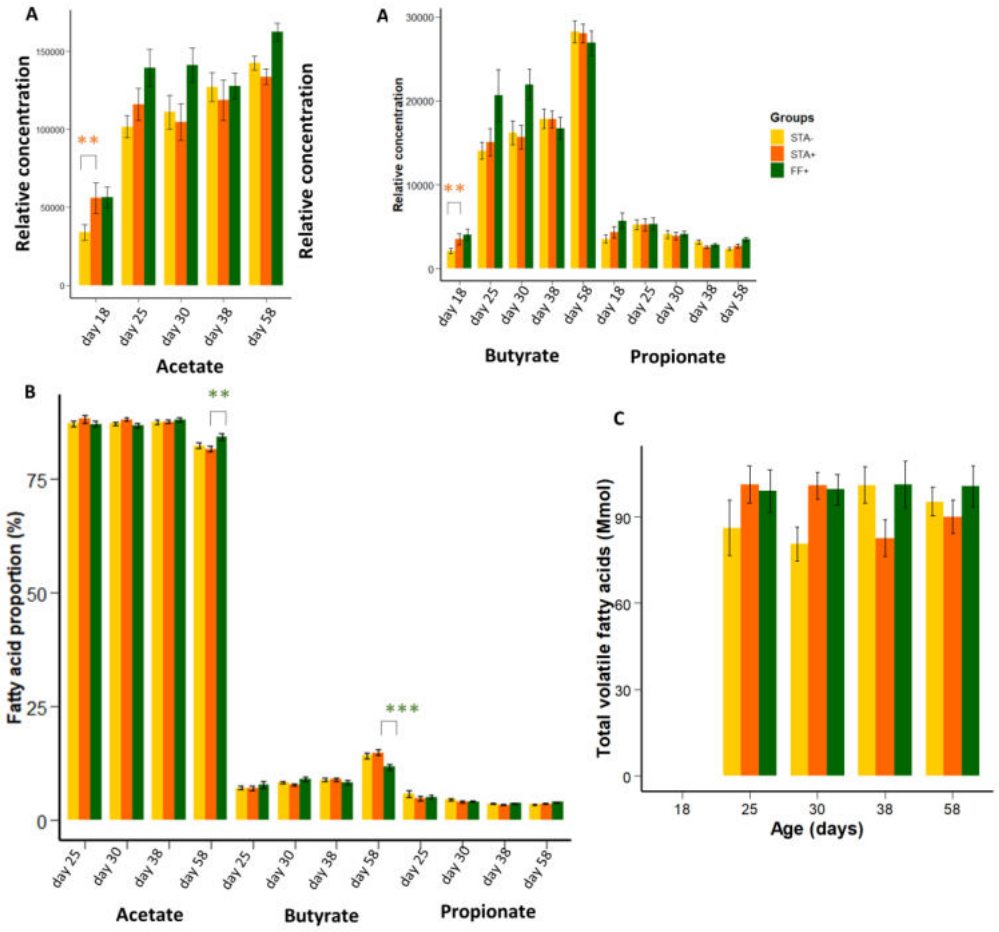


Figure 6: **(A):** Relative concentrations of the main caecal short chain fatty acids throughout the time based on NMR measurement. **(B):** Proportion of the main SCFA to the total quantities of SCFA **(C)** based on absolute concentrations obtained by gas chromatography measurements. The effects of groups were investigated. Orange stars represent significant differences between STA- and STA+ treatment while green stars emphasize significant differences between STA+ and FF+ treatment.

Starter food intake effects

Gene expression of the IgA-secretion stimulating cytokine *Tnfsf13b* (TNF Superfamily Member 13b) was lower in the caecum of the rabbits from groups STA+ compared to STA- at 18 days (P=0.004, -0.5 FC). Long-term effects of the early life treatment were found at 58 days on the expression of the genes coding for the SCFA transporter *Mct1* (Monocarboxylate Transporter 1) (P=0.009, +0.8 FC for STA+), the transmembrane mucine *Muc13* (Mucin 13) (P=0.008, -0.5 FC for STA+) and the innate immune protein *CD14* (Monocyte differentiation antigen CD14) (P=0.005, -0.8 FC for STA+). Based on our multiple univariate analysis, the ileal expression of the 45 genes studied did not differ according to the treatment throughout the experiment.

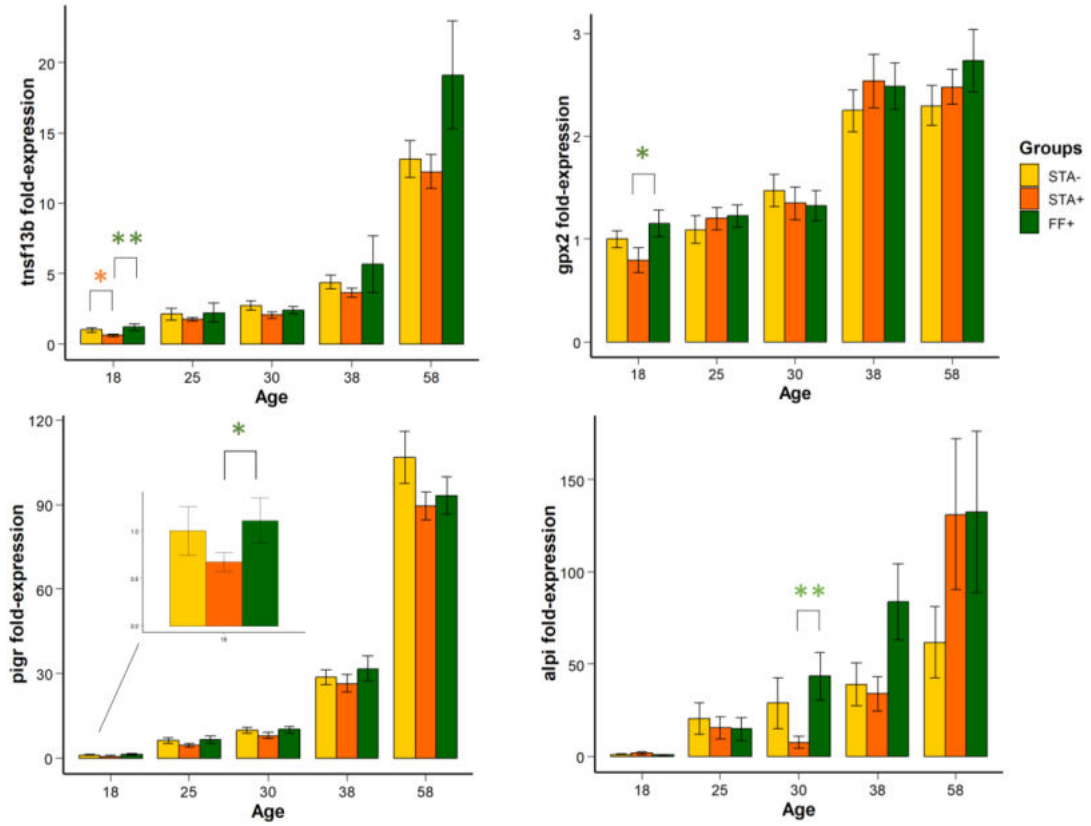


Figure 7: Genes differentially expressed in the caecal mucosa between the experimental treatments (18-days-old rabbits from STA- group as reference group).

Orange stars represent significant differences between STA- and STA+ treatment while green stars emphasize significant differences between STA+ and FF+ treatment.

Diet composition effects

To identify gene expression patterns differentially expressed between FF+ and STA+, we performed linear mixed models. We observed that the gene *Tnfsf13b* was more expressed in the caecum of FF+ rabbits compared to STA+ at 18 days of age (P=0.003, +0.6 FC, Figure 7) as well as the IgA epithelial transporter *pigR* (polymeric immunoglobulin receptor, P=0.03, +0.4 FC) and the gene coding for the antioxidant enzyme *Gpx2* (glutathione peroxidase 2, P=0.02, +0.4 FC). At 30 days of age, higher gene expression of the epithelial differenciation marker *alpi* (Intestinal Alkaline Phosphatase) was found in caecal mucosa of FF+ group (P=0.014, +36 FC). At 58 days of age, higher gene expression of the amino acid transporter *Lat2* (Linker For Activation Of T Cells Family Member 2) were measured in the ileon of FF+ group (P=0.002, +0.021 FC).

DISCUSSION

To take advantages of the ecosystem services offered by gut microbiota, the nutritional control of microbiota implantation is a promising avenue of research for a better health management. Because the intake of feed, especially in the early life, was found to be one of the major influential factors of microbiota implantation in mammals [15,16,44] and especially in rabbit [41], our study was designed to test different feeding strategies from 3 days of age. The objectives of this study were to investigate the effects of 1) starter food supply and 2) starter food type. To answer those two questions, a starter food in a form of a gel was provided in the nest in order to stimulate solid ingestion in early life and the nutritional ratio fermentable fibres/starch was modulated.

Starter food intake pattern

Suckling rabbits exhibited eating pattern inside the nest as early as 7 days of age, following a natural feeding habit [26]. The intake values of gels inside the nest was consistent with previous studies [28,29] and represented an extent of the total dry matter intake of 10% at the most. Eating behaviour was variable between litters, with higher intake of the gels enriched with fermentable fibres. Fibre-rich starter food gels were presumably more palatable for suckling rabbits [45], who are known to present a selective feeding pattern when different food presentations are offered [29], a behaviour also highlighted in rabbit pets [46], wild or fattening rabbits [47,48]. Moreover, when pups had both access to pellets and gels, a preference for gels regarding pellets was observed. Our indirect estimation of the gels intake inside the nest through video assessment underlined individual variations of interest of the young pups for the gels. Those individual variations of starter food intake are well-known in pig production [49]**.** Efforts to evaluate deeper the within-litter variations of early eating pattern appear necessary since marked differences of intake induce differential amounts of nutrients reaching the gut, therefore possibly affecting microbiota and health parameters.

Postnatal stimulation of the solid intake and impacts on caecal ecosystems

The intake of starter food resulted in higher evenness and richness of the caecal bacterial communities the week preceding the weaning, as reported by Shannon and InvSimpson indices [50]. Besides, the caecal bacterial community structure and composition of rabbits that received early feed intake were closer to

the 58-days-microbiota across sampling time, a final point that can be considered as a steady state [41]. Another clue of microbiota maturity acceleration with solid food intake stimulation was the increased proportions of Ruminococcaceae family, a major family of weaned rabbits gut communities [41], together with a decrease of Bacteroidaceae family before weaning, a taxa that is typical of a "milk-oriented microbiota" [17,51]. We hypothesized that reaching faster an established and stable microbiota may be beneficial for the young rabbit since digestive troubles generally occur in the two weeks following weaning (at 35-49 days) [52], when the microbiota is still developing [43]. Those results confirm previous evidences of starter food effects on microbiota maturity [53] where the stimulation of solid feed intake from 15 days in rabbits was associated with an increase in Firmicutes phylum and the maturity index of the rabbit ecosystem Ruminococcaceae/Lachnospiraceae ratio.

Some taxonomic modifications induced by starter food were found after the onset of solid food intake, while the management of the rabbits receiving starch-enriched diet was similar. This persistent effects might be explained by an adaptation time or by the alteration of the gut ecological niche induced by early changes of microbiota feature [54]. Indeed, different metabolites were present in the gut ecological niche (lumen) of 18-days-old rabbits that received or not a starter food. In particular, higher levels of butyrate were quantified at the end of early food stimulation, a metabolite which contributes to gut health thanks to its anti-inflammatory and immunomodulatory potential [55,56]. This butyrate may have been produced from acetate (previously produced from resistant polysaccharides) by butyrate producers bacteria from Eubacteriaceae family according to the proposed model of Baxter et al. [57]. Concomitantly with increased production of total SCFA with starter food supplementation, higher levels of caecal amino acids were found, which may suggest a metabolic switch towards dietary polysaccharides degradation at the expense of amino acids catabolism [58].

Modulation of the young rabbit's diet and impacts on caecal ecosystems

Dietary fibers fractions represent a major modulator of digestive rabbit physiology due to their influence on the rate of passage, mucosal functionality and their role of substrate for gut microbiota [35]. There are several types of dietary fibers, with different physicochemical properties: the resistant starch, nonstarch polysaccharides from plant walls or nondigestible oligosaccharides [59]. The resistance of pectins and

resistant starch to mammalian enzymes together with the health benefits of their fermentation by the microbiota suggest a prebiotic potential in humans [60,61]. The originality of this study was to only modulate the starch and the digestible fibers fractions to study further physiological effects. However, with our experimental design, the effects of the starter food nature could not be distinguished from the effects of pellets composition even though at 18 days, solid intake predominantly came from starter food.

From 18 days of age, microbiota profile was affected by the fermentable fibre/starch ratio. The importance of dietary fibers and starch ratio for microbiota establishment was previously observed in the caecum of weaned rabbit when the dietary neutral detergent fiber/starch ratio was modified [62]. Briefly, high ratio of fermentable fibres/starch was associated with lower richness and evenness (both reduction of InvSimpson and Shannon metrics) in our study, meaning that a few species dominated the gut ecosystem. In mice adult models, it was suggested that maintaining microbiota richness (high richness) and the abundance of dominant bacteria (low evenness) in the intestine is essential for health [63]. Thus interpretation of the changes of alpha-diversity indices in the current study in terms of health outcome appears difficult. When rabbits received higher amounts of starch and lower amounts of fermentable fibres, their gut microbial communities reached faster a mature state as highlighted with beta diversity and taxonomic analysis. Indeed, the ratio Firmicutes/Bacteroidetes was higher in the gut of rabbits that received starch diet throughout their life, a ratio that increases during the transition from young to adults [64,65,41]. and that was proposed as an indicator of microbiota maturity [43]. Besides, the bacterial family ratio Ruminococcaceae/Lachinospiraceae, which increases with age, was higher when rabbits had early and maintained access to starch-enriched food. The latter ratio is considered as an important marker for intestinal health [66]. Those results were unexpected since previous study reported that rabbits fed on high-fibres diet (modulation of total fiber inputs, NDF) exhibited higher ratio Firmicutes/Bacteroidetes [67]. We hypothesized that the presence of resistant starch in the starch fraction contributed to this maturity. Resistant starch refers to all starch and starch degradation products that are not absorbed in the small intestine of healthy individuals [68]. Up to date, scant attention was paid to this fraction in rabbits diets. Yet, cereals such as barley and wheat contain resistant starch (between 5 to 14

g/100 g of dry matter according to *in vitro* measurement) [69]. Glucose is generally readily absorbed in the rabbit small intestine [70] and the higher levels of free glucose in the caecum of rabbits receiving higher proportions of cereals is likely the result of starch degradation by specific degrading bacteria, thus supporting our hypothesis regarding resistant starch intake. The amylase activity in the pancreas and small intestine of 25 days-old rabbits is very low [71] and we may expect higher levels of starch flow in the caecum of those rabbits. Such resistant starch have the ability to modulate the gut microbiota [57]. It was reported that the abundance of the genus *Ruminococcaceae_UCG-005* increased when mice were supplemented in resistant starch [72], which corroborates with our study that highlighted higher abundance of one OTU of this taxa with starch supplementation in early life. Differences of dietary resistant starch or fermentable fibres uptake modified metabolites content of the lumen. Interestingly, higher levels of caecal methanol were found when rabbits received higher quantities of soluble fibres. This result appear consistent since this diet was rich in pectins, a substrate that can be fermented into methanol by specific intestinal bacteria such as members of *Bacteroides* genus [73], for which one OTU was found abundant when the ratio fermentable fibre/starch was high. The volatile fatty acid fermentation pattern was also modified with the diets since at 58 days higher proportions of acetate and lower proportions of butyrate were found after fermentable fiber supplementation. Those results confirm previous evidences where higher rates of acetate and lower rates of butyrate were found in the caecum of rabbits fed diets with high levels of sugar beet pulp (which is rich in rapidly fermentable fibres) [74,75]. This higher content of acetate was likely due to the pectin content of the diet rich in digestible fibres, which was found to be quickly degraded into acetate with *in vitro* fermentation of human stools [76]. In this *in vitro* experiment, higher pectin fermentation was related with higher baseline levels of Lachnospiraceae, a family from Clostridiales order that was in higher proportion with fermentable fiber supplementation in our current study. The existence of genes associated with pectin-cleaving chains in the genome of Lachnospiraceae corroborates with those observations [77].

Modulation of genes expression in intestinal tissues

Gut biological functions were investigated in caecal and ileal tissues. Diets induced few changes in the ileal epithelial cells transcriptome. We formulate two hypothesis to explain those results. First, limited

changes of the mucosa-associated ileal microbiota could explain the absence of significant result. Then, if microbiota changes however occurred, the large ileal bacterial taxonomic variation within-group as noticed in human and pigs studies [78,79] may have attenuate the transcriptomic outcome.

On the contrary, the quality of the gels provided in the nest had immediate effects on caecal transriptome. Indeed, the intake of a starter diet low in fermentable fibres was associated with decreased levels of the transcripts of *Gpx2, Tnfsf13b* and *pigR* at 18 days old. These two latter genes are necessary for the development of the IgA secretion while *Gpx2* regulates the redox balance (antioxidant). *Alpi* gene expression, encodes a digestive brush-border enzyme and therefore considered as an intestinal marker of differentiation, was also downregulated at 30 days when the ratio fermentable fiber/starch was low. Interestingly, high expression of those genes were found in weaned rabbits, thus suggesting that soluble fibers replacement by starch in early life did not contribute to accelerate the intestinal maturation when provided before weaning.

Health status and growth

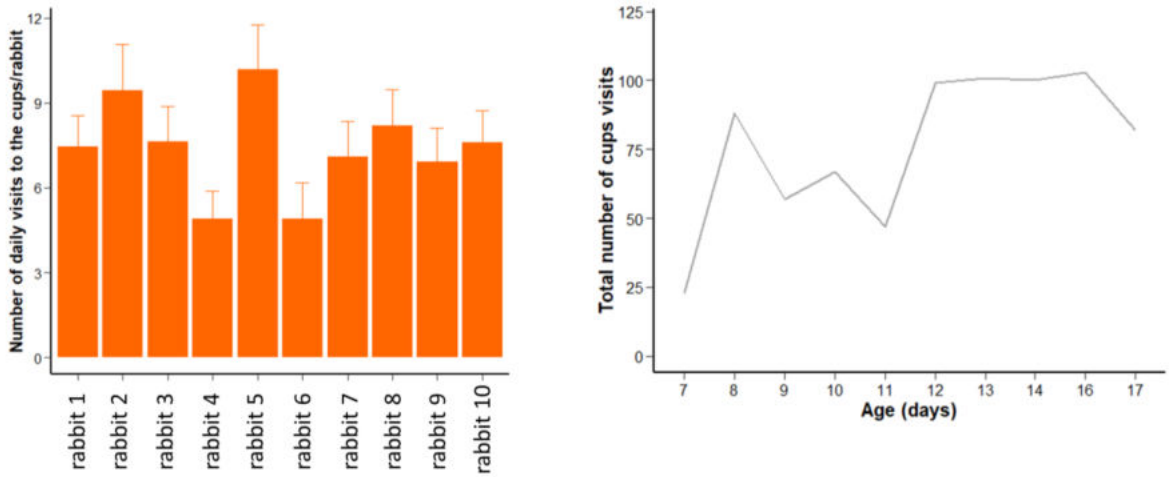
The replacement of starch by wheat bran and beet pulp did not impair rabbits' growth. . Those ingredients provide substrates that are rapidly fermented in the caecum, possibly leading to similar whole-tract digestibility as previously reported with similar diets [80]. Similarly, the supply of feed in early life period did not have any effect on productive performance as previously observed with different starter feed [29,53]. The systemic immune system was modulated by the experimental treatments with a slower age-dependant increase of IgG when rabbits precociously received a diet rich in starch. The interpretation of this result should be treated with caution but those reduced levels of IgG may indicate a lower antigenic or non-specific stimulation of the immune system.

CONCLUSION

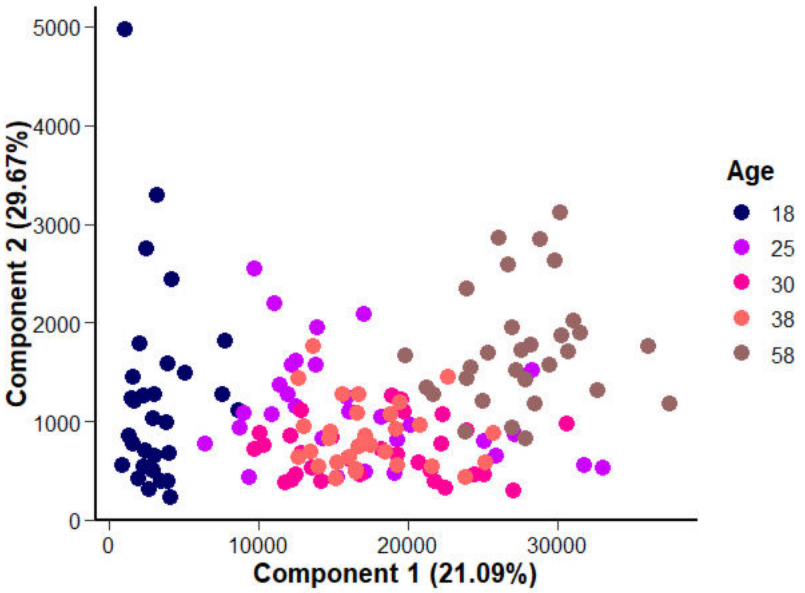
Despite the small quantities of starter food ingested in the nest, precocious arrival of substrates induced significant changes of gut microbiota colonization as well as metabolomics responses. Starter feeding induced an acceleration of caecal microbiota toward a stable state with increased levels of acetate and butyrate in early life, suggesting health benefits. The nature of the compounds provided inside the starter food modified the host caecal gene expression with an upregulation of the genes involved in the rabbit

immunity when high contents of fermentable fibres were provided through a nest-feeding system. When diets differing by their fermentable fiber/starch ratio were maintained later in life, microbiota profile was reshaped with a reduced diversity when this ratio was high, that was interpreted as a clue of a selective microbiota implantation. This experiment revealed the ability of starter food to shape the microbial ecological succession in suckling animals. This nutritional device may be helpful to explore ability of other dietary compounds or prebiotics to modulate host phenotype through modulation of its microbiota. Respective to fibre/starch ratio, further experiments should be carried out to conclude on the consequences of such early feeding stimulation on health outcomes.

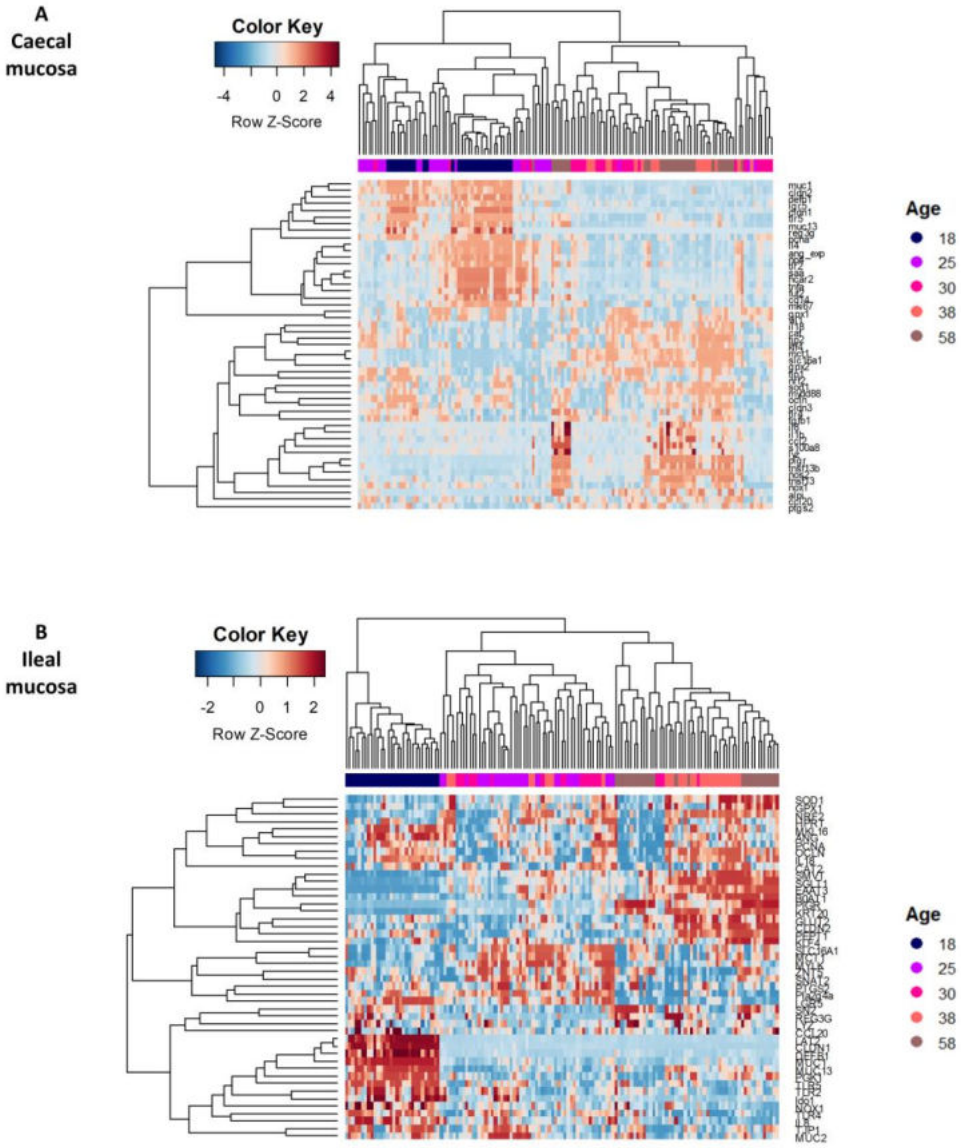
Supplemental Figure S1: Investigation of the rabbit behaviour at the onset of food intake. On the left is represented the number of visits to the cups per day within one litter (group STA+). On the right the graph stands for the total number of visits to the cups through the experiment for two litters (groups STA+ and FF+).



Supplemental Figure S2: Analysis of the caecal metabolome of the gut microbiota according to the rabbits' age. Individual plot of projection to latent structure discriminant analysis (PLS-DA) is represented.



Supplemental Figure S3: Analysis of the transcriptome maturation of the caecal and ileal mucosas according to the rabbits' age.



Supplemental Table 1: qPCR primers sequences used.

Gene symbol	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Alpi	TGCTCTCGGTGATGTACAGG	TCACGTCGATGTCCATGTTG
Ang	CTTTCCAGGTCACCACTTGC	TTTTGGCAGCACACACTCAA
Aqp8	CCATCGGCTTCTCCGTCGT	CCAATGACGAACCTGATGAGCACT
Atoh	CGCCAAAGAACTTGTCGCCC	TCCTCCCTAACTCGCCTCGT
B0at1	CCAGACCTGCGACATGAAC	TTCCCGAACATGGACGACAG
Ca2	TGGGGCTCATCCGATGGACA	GCCTGGTGTAGCACTGCCAA
Cat	TCCCGATACTCACCGTCATC	CGTTCAGCACTTTCACGTAGA
Ccl2	TTCACCAACAAGACCATCTCA	TGGGTTGTGGAATAAGAGGTCA
Ccl20	GTGTGCAGATCCGAAGAAGG	GCTAGACCTTCAATGATGTGCA
Cd14	TAGACCTCAGCCACAACTCG	AGGTTCCAGACATCCCCATC
Cldn1	TCCAGTGCAAAGTCTTCGAC	CAGCCAGTGAAAAGAGCCTG
Cldn2	CATCGTGACAGCAGTTGGTT	CCTGAGCAGCCTGGATATCA
Cldn3	CATGTCTATGGGCCTGGAGA	CTGCACCACACAGTTCATCC
Defb1	TGACCATTACAAATGCGCCA	CGTAGCAGGTACCCTCGATT
Duox2	ACGCGGATGGCGTGTATCAA	CTCACCACGTCGGAGAGCAC
Eaat3	TTGTGTTGGTGGTGAGCATC	AAAACAGGCCTGCACGAG
Ffar2	TCTCGTCGTCTCGCTTCCAG	GACCTTCAGTTCCACGGTGC
Ffar3	TCTCGTCGTCTCGCTTCCAG	GACCTTCAGTTCCACGGTGC
Fut2	TCATGCCTCAGGTGTGGAAG	TGGTCATGACGGTGTGGTTA
Gapdh	AGGTCGGAGTGAACGGATT	ATGGCGACAACATCCACTTT
Gpx1	ATTGAGAATGTGGCGTCGC	CATGAAGTTGGGCTCGAACC
Gpx2	GTAGACTTCAACACGTTCCGG	TTGAGGTAGGTGAAGACGGG
Hes	CCAAGCTGGAGAAGGCCGATA	GCGGTATTTCCCCAGTACGC
Ido	AATGCAGCCCCACTTTCTACTTA	TAGCGTCTGTGCTCCAAGTCG
Il10ra	GAGGTGGGGACGTTCTGCTT	ATGCTGAGGTTGGTCGCAGT
Il18	TGTAAGCCTCTCTGTGAAGTGT	TCTTATCTTTCTGTCCTGCGAGA
Il1b	CAACAAGTGGTGTTCTCCAT	GAGGTGCTGATGTACCAGT
Il4	GAAGCTGAGCAACTGTCCTG	TCTTGCATGGCGGTCTTTAG
Il8	TGGCTCTCTTGGCAACCTTC	CAGAACTGCAGCTTCACAAAGAGT
Klf4	AGAAGCATCTCGGGCAATTC	AGTCGCTTCATGTGGGAGAG
Krt20	GCTGCAGAACCAGATTAAGGATGC	GCTAGGCGTATCGCCCTCTC
Lat2	AACCTTCCCAGAGCCATCTT	TGACACCCAGGAGCTTCTCT
Lgr5	TAACTGGAACTGCGAACCTG	AGCTAAATTCAGGGACCGGA
Lyz	AGGTGTGAGTTGGCCAGAAC	ACCAGTAGCGGCTATTGATCT
Mki67	TGGAGTAATCTATGTGGGCCA	CACCAAGAGCCTTTCACCAAA
Mct1	GGCTTCCTTCTGCAATACCG	ACACAGCAGTTCAGTAGGCA
Muc1	GCGCTGGCCATCATCTATTT	GCCCTGGTGAATGACATGTC
Muc13	TTTGGCTACAGTGGAGTGGG	TGGTTTGCGTAGGGGTTTTG
Muc2	AGCGATGACTTCAGGACGGC	GTCGTGACAGCTGGACTGGG
Myd88	GGATGGTGGTGGTCGTCTC	TTCTTCATGGCCTTGTACTTGA
Neurog3	GCTCACCAAGATCGAGACGC	GGCCCGTAGAAGCTGTGGTC
Nos2	GAACTCTCAGCTCATCCGGT	CACCTCGAGCACAATGTCAG
Nox1	GGTCACTCCCTTTGCTTCCA	TATTGCTGCATGGCCAACAA
Np4	GGATGAAACCTCCCCTCTTGA	ATTGACTGTGCAGGACCCAG
Nrf2	AATTCGCCGACTCTGACTCT	TTTTCGAGGACTGGGACTCC
Ocln	TGGAATGACGGGTCTCTACG	CGGTGTGGACTTGTAGGACT
Pcna	GCCGAGACCTCAGCCATATT	TGTCCCATGTCGGCAATTTT
Pept1	CCCCAAAGCCAATGAAGTCC	CAAGGCTGGGTGTGATCAT
pigR	GGAGCCATTGACAACCCAAG	CTTGGGCTCCTCAATCTCCA
Pla2g4a	CGTCAAGCCCGACGTCTCTG	GCACTTCCCCAGACACCCAT
Ptgs2	TACGGTGAAAACTGCTCCAC	GAGGTTAGAGAAGGCTTCCCA
Pyy	GCTGAACCGCTACTACGCCT	GACCTGACGGGACGGTTCTC
Reg3γ	ATGGACATGGATGGGAGTGG	GGGTAACTGCGCATCACAAT
S100a8	AGGAAATTACCACGCCCTCT	CGGACACGCCTATCTTCACA
S100a9	GAGGACCTGGACACGAACC	GGAGGCTTTATTTTCCCCACC
Smoc2	CCTTGCAAATCTTTTCCGTTCTGA	CTTCCTCGATGGCCGACTGG
Smvt	CTGGAGCTGCGGTTCAATA	GTCAGCACTGACAGCCACAG

Gene symbol	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Sn2	CAAAGATGAACGGAGGAGCC	TGGCATTGCTGAGATTGAACA
Snat2	CGATGTCAAGCTACCTCTTCA	CAGCAGTGACAGAGGGAGAA
Sglt1	AGAGTGGGCAGCTCTTTGAT	CGGTTCCATAGGCAAACTCG
Sod1	GATTCCATGTCCACCAGTTTG	CCTTTGCCCAAGTCGTCTTC
Sox9	TGCTGAACGAGAGCGAGAAGC	CTGCCCATTCTTCACCGACTTC
Spdef	CCGCTCCATCCGCCAGTATT	CCCTCAGACTGGGTGCACAA
Tgfb1	GTGGACAGCAACAACAAAATCT	CAACTCCAGTGACATCGAAGG
Tjp1	GACCACTCCAGACAGTCTCC	CTGAGTTAGGCAGGACACCA
Tjp2	CAGGGTGGTCATGGTTAACG	GCCTGCTCCTCTCACTGTAT
Tlr2	GATGGATTTTGCCGGAGTCC	TCGTAGCTCTGCAGGTTTGA
Tlr4	CATGTCTCAGAACTGCACTTTC	CCACAGCCACTAGTTTCTGC
Tlr5	ACCTCGCCCACAACAAGATA	GGGATCTGAATGTTTGGGCC
Tnfa	GGAGGAAGAGTCCCCAAACAA	ATCTGGGCCACAGGGTTGA
Tnfs13	CACTTCTTCACCTTGTTCCCA	CCGGGGAATTACGACACTCA
Tnfsf13b	AGGAAGAAGCGTGCCGTT	AGTACCCGGTTTCTTTGACC
Znt5	CGGATCCCCTCTGTTCTCTC	CAGAATGGCGCCAGAAATGA

Supplemental Table 2: Concentrations of reactive oxygen metabolites in rabbits' serum according to their age and groups. Means ± se are given.

Age	**STA-** (UCARR unit)	**STA+** (UCARR unit)
18d	84 ± 12	74 ± 14
25d	173 ± 24	130 ± 18
30d	254 ± 38	183 ± 43
38d	219 ± 37	180 ± 26
58d	304 ± 41	339 ± 39
Age effect	P <0.001	
Group effect	P = 0.127	
Age * Group effect	P = 0.476	
Age	**FF+** (UCARR unit)	**STA+** (UCARR unit)
18d	81 ± 17	74 ± 14
25d	120 ± 17	130 ± 18
30d	155 ± 18	183 ± 43
38d	168 ± 20	180 ± 26
58d	266 ± 31	339 ± 39
Age effect	P <0.001	
Group effect	P = 0.283	
Age * Group effect	P = 0.960	

Supplemental Table 3: Effects of early feeding procedure on the caecal metabolome evaluated by NMR. Selected metabolites among the 29 identified are presented. Means ± se are expressed as relative expression. Significant differences within-age are outlined.

		18d		25d		30d		38d		58d		P-value		
		STA-	STA+	STA-	STA+	STA-	STA+	STA-	STA+	STA-	STA+	Age	Group	Age * Group
SCFA	acetate	33831±4884	55882±9827	101628±7053	111024±10918	111024±10918	115853±10356	126816±9271	118522±12902	142544±4463	133627±5114	<0.001	0.274	0.035
	butyrate	2137±297	3510±676	14039±1013	15057±1641	16199±1391	15647±1417	17859±1176	17819±1000	28243±1314	28070±1112	<0.001	0.177	0.051
	propionate	3526±481	4346±659	5216±577	5266±743	4082±512	3893±423	3193±264	2554±165	2350±170	2714±213	<0.001	0.707	0.370
	valerate	812±122	881±159	837±71	866±68	937±76	796±55	744±52	689±80	1133±104	1196±86	<0.001	0.726	0.827
Aminno acids	threonine	1313±474	2361±567	973±94	989±98	761±78	764±96	977±86	1179±220	1779±157	1686±176	<0.001	0.151	0.029
	valine	191±60	297±56	231±33	274±37	172±31	212±30	225±35	325±47	492±44	611±67	<0.001	0.014	0.724
	phenylalanine	108±29	139±14	154±8	174±15	150±9	162±9	138±8	144±8	182±14	207±12	<0.001	0.026	0.237
	lysine	455±122	625±77	549±37	550±82	412±45	437±48	536±44	490±46	910±53	962±42	<0.001	0.406	0.105
	leucine	1186±433	1645±292	1085±105	1187±224	702±80	646±87	723±77	887±112	1812±200	2006±193	<0.001	0.265	0.092
	glycine	1124±216	1526±102	985±79	1006±94	642±45	620±45	581±60	772±126	988±136	1224±128	<0.001	0.052	0.140
	glutamate	1014±126	1446±148	1813±132	1591±129	1961±145	2002±189	2063±213	2481±222	2794±246	3275±230	<0.001	0.052	0.108
Oses	glucose	307±29	407±210	1979±180	1958±195	1746±273	1577±84	2217±154	2757±368	3055±278	3014±226	<0.001	0.320	0.660
	galactose	126±29	117±44	75±10	54±12	72±17	45±7	39±8	56±17	45±4	50±7	0.001	0.381	0.277
	methanol	1060±155	994±119	3094±293	2928±496	3573±676	2859±504	3390±586	3722±626	2739±194	2798±262	<0.001	0.594	0.803

Supplemental Table 4: Effects of feed composition on the caecal metabolome evaluated by NMR. Results performed on selected metabolites among the 29 identified are presented. Means ± se are expressed as relative expression. Significant differences within-age are outlined.

		18d		25d		30d		38d		58d		P-value		
		FF+	STA+	FF+	STA+	FF+	STA+	FF+	STA+	FF+	STA+	Age	Group	Age * Group
SCFA	acetate	56315±6496	55882±9827	139305±11880	111024±10918	141197±10798	115853±10356	127608±8140	118522±12902	162234±5610	133627±5114	<0.001	0.019	0.721
	butyrate	4027±660	3510±676	20641±3104	15057±1641	21964±1828	15647±1417	16746±1320	17819±1000	26886±1443	28070±1112	<0.001	0.089	0.294
	propionate	5695±936	4346±659	5340±2199	5266±743	4149±358	3893±423	2819±173	2554±165	3494±248	2714±213	<0.001	0.140	0.752
	valerate	793±67	881±159	1037±98	866±68	1210±90	796±55	835±71	689±80	1071±44	1196±86	<0.001	0.070	0.099
Aminno acids	threonine	1490±288	2361±567	1056±117	989±98	1303±214	764±96	1172±95	1179±220	1518±169	1686±176	<0.001	0.918	0.009
	valine	163±30	297±56	248±20	274±37	194±17	212±30	244±93	325±47	384±79	611±67	<0.001	0.008	0.156
	phenylalanine	94±15	139±14	159±15	174±15	141±13	162±9	129±11	144±8	145±9	207±12	<0.001	<0.001	0.171
	lysine	456±60	625±77	583±52	550±82	565±88	437±48	557±34	490±46	783±41	962±42	<0.001	0.946	0.078
	leucine	963±171	1645±292	1118±194	1187±224	725±102	646±87	953±124	887±112	1388±128	2006±193	<0.001	0.204	0.090
	glycine	1068±110	1526±102	976±103	1006±94	647±60	620±45	691±131	772±126	765±73	1224±128	<0.001	0.010	0.063
	glutamate	1303±171	1446±148	1627±152	1591±129	1728±173	2002±189	1847±98	2481±222	1904±138	3275±230	<0.001	<0.001	0.055
Oses	glucose	337±38	407±210	1525±102	1958±195	1431±134	1577±84	1753±99	2757±368	1874±141	3014±226	<0.001	<0.001	0.260
	galactose	65±13	117±44	136±28	54±12	85±13	45±7	114±33	56±17	85±9	50±7	0.797	<0.001	0.020
	methanol	1658±330	994±119	5365±1004	2928±496	4278±447	2859±504	3705±364	3722±626	5610±994	2798±262	<0.001	<0.001	0.364

REFERENCES

1. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. Biochem J 474, 1823–1836 (2017).

2. McKenney, E. S. & Kendall, M. M. Microbiota and pathogen 'pas de deux': setting up and breaking down barriers to intestinal infection. Pathog Dis 74, (2016).

3. den Besten, G. et al. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. J. Lipid Res. 54, 2325–2340 (2013).

4. Cheng, H.-Y., Ning, M.-X., Chen, D.-K. & Ma, W.-T. Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens. Front Immunol 10, (2019).

5. Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E. The microbiome and innate immunity. Nature 535, 65–74 (2016).

6. Sekirov, I. & Finlay, B. B. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. The Journal of Physiology 587, 4159–4167 (2009).

7. Bäuerl, C., Collado, M. C., Zúñiga, M., Blas, E. & Martínez, G. P. Changes in Cecal Microbiota and Mucosal Gene Expression Revealed New Aspects of Epizootic Rabbit Enteropathy. PLoS ONE 9, (2014).

8. Olszak, T. et al. Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. Science 336, 489–493 (2012).

9. Al Nabhani, Z. et al. A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. Immunity 50, 1276-1288.e5 (2019).

10. Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R. & Blaser, M. J. Role of the microbiome in human development. Gut 68, 1108–1114 (2019).

11. Baranyi, M., Thomas, U. & Pellegrini, A. Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (Oryctolagus cuniculus) milk. Journal of Dairy Research 70, 189–197 (2003).

12. van den Elsen, L. W. J., Garssen, J., Burcelin, R. & Verhasselt, V. Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gateway to Allergy Prevention? Front. Pediatr. 7, (2019).

13. Gosalbes, M. J. et al. Metabolic adaptation in the human gut microbiota during pregnancy and the first year of life. EBioMedicine 39, 497–509 (2019).

14. Koenig, J. E. et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 Suppl 1, 4578–4585 (2011).

15. Konstantinov, S. R. et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. Environ. Microbiol. 8, 1191–1199 (2006).

16. Bian, G. et al. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. Environ. Microbiol. 18, 1566–1577 (2016).

17. Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 69, 1035S – 1045 (1999).

18. Laitinen, K., Mokkala, K. & Kalliomaki, M. Chapter 8 - Impact of Early Nutrition on Intestinal Microbiome: Effects on Immunity and Long-Term Health. in Early Nutrition and Long-Term Health (eds. Saavedra, J. M. & Dattilo, A. M.) 203–228 (Woodhead Publishing, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100168-4.00008-2.

19. Torow, N. & Hornef, M. W. The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. The Journal of Immunology 198, 557–563 (2017).

20. Sen, P., Mardinogulu, A. & Nielsen, J. Selection of complementary foods based on optimal nutritional values. Sci Rep 7, 5413 (2017).

21. McKeen, S. et al. Infant Complementary Feeding of Prebiotics for the Microbiome and Immunity. Nutrients 11, 364 (2019).

22. Liu, J., Bian, G., Sun, D., Zhu, W. & Mao, S. Starter feeding altered ruminal epithelial bacterial communities and some key immune-related genes' expression before weaning in lambs. J Anim Sci 95, 910–921 (2017).

23. Shim, S. B., Verstegen, M. W. A., Kim, I. H., Kwon, O. S. & Verdonk, J. M. A. J. Effects of feeding antibiotic-free creep feed supplemented with oligofructose, probiotics or synbiotics to suckling piglets increases the preweaning weight gain and composition of intestinal microbiota. Archives of Animal Nutrition 59, 419–427 (2005).

24. Muns, R. & Magowan, E. The effect of creep feed intake and starter diet allowance on piglets' gut structure and growth performance after weaning. J Anim Sci 96, 3815–3823 (2018).

25. Pluske, J. R., Turpin, D. L. & Kim, J.-C. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. Animal Nutrition 4, 187–196 (2018).

26. Hudson, R. & Distel, H. The Pattern of Behaviour of Rabbit Pups in the Nest. Behaviour 79, 255–271 (1982).

27. Kacsala, L. et al. Early solid additional feeding of suckling rabbits from 3 to 15 days of age. Animal 12, 28–33 (2018).

28. Paës, C. et al. Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. Animal Feed Science and Technology 255, 114223 (2019).

29. Paës, C. et al. Insights into suckling rabbit feeding behaviour: acceptability of different creep feed presentations and attractiveness for sensory feed additives. (2020).

30. Gidenne, T. & Fortun-Lamothe, L. Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. Animal Science 75, 169–184 (2002).

31. Debray, L., Fortun-Lamothe, L. & Gidenne, T. Influence of low dietary starch/fibre ratio around weaning on intake behaviour, performance and health status of young and rabbit does. Animal Research 51, 63–75 (2002).

32. Read, T. et al. Feed composition at the onset of feeding behaviour influences slaughter weight in rabbits. Livestock Science 184, 97–102 (2016).

33. Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T., Lapanouse, A. & De Dapper, J. Technical note : An original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother - young relations. World Rabbit Science 8, 177–180 (2000).

34. Maertens, L., Lebas, F. & Szendro, Z. S. Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. World Rabbit Science 14, 205–230 (2010).

35. Gidenne, T. Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. Animal 9, 227–242 (2015).

36. Maertens, L. et al. Nutritive value of raw materials for rabbits: EGRAN tables 2002. World Rabbit Science 10, 157–166 (2002).

37. Wong, R. C. W. et al. A multi-centre evaluation of the intra-assay and inter-assay variation of commercial and in-house anti-cardiolipin antibody assays. Pathology 36, 182–192 (2004).

38. Filípek, J. & Dvořák, R. Determination of the Volatile Fatty Acid Content in the Rumen Liquid: Comparison of Gas Chromatography and Capillary Isotachophoresis. Acta Vet. Brno 78, 627–633 (2009).

39. Beaumont, M. et al. Gut microbiota derived metabolites contribute to the gut barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. Gut microbes (Submitted).

40. Giacomoni, F. et al. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. Bioinformatics 31, 1493–1495 (2015).

41. Read, T. et al. Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. Front. Microbiol. 10, (2019).

42. Escudié, F. et al. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 34, 1287–1294 (2018).

43. Combes, S. et al. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. Fems Microbiology Ecology 77, 680–9 (2011).

44. Yáñez-Ruiz, D. R., Abecia, L. & Newbold, C. J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. Front Microbiol 6, 1133 (2015).

45. Tschudin, A., Clauss, M., Codron, D., Liesegang, A. & Hatt, J. M. Water intake in domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus) from open dishes and nipple drinkers under different water and feeding regimes. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 95, 499–511 (2011).

46. Prebble, J. L. & Meredith, A. L. Food and water intake and selective feeding in rabbits on four feeding regimes. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 98, 991–1000 (2014).

47. Bhadresa, R. Food Preferences of Rabbits Oryctolagus cuniculus L. at Holkham Sand Dunes, Norfolk. Journal of Applied Ecology 14, 287–291 (1977).

48. Maertens, L. Feeding systems for intensive production. in Nutrition of the rabbit (eds. De Blas, C. & Wiseman, J.) 253–266 (CABI; Wallingford; UK, 2010). doi:10.1079/9781845936693.0253.

49. Bruininx, E. M. a. M. et al. Individually assessed creep food consumption by suckled piglets: influence on post-weaning food intake characteristics and indicators of gut structure and hind-gut fermentation. Animal Science 78, 67–75 (2004).

50. Morris, E. K. et al. Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. Ecol Evol 4, 3514–3524 (2014).

51. Charbonneau, M. R. et al. Human developmental biology viewed from a microbial perspective. Nature 535, 48–55 (2016).

52. Marlier, D. et al. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. Annales de Medecine Veterinaire 147, 385–392 (2003).

53. Mattioli, S. et al. Dehydrated Alfalfa and Fresh Grass Supply in Young Rabbits: Effect on Performance and Caecal Microbiota Biodiversity. Animals 9, 341 (2019).

54. Kopac, S. M. & Klassen, J. L. Can They Make It on Their Own? Hosts, Microbes, and the Holobiont Niche. Front. Microbiol. 7, (2016).

55. Hamer, H. M. et al. Review article: the role of butyrate on colonic function. Aliment. Pharmacol. Ther. 27, 104–119 (2008).

56. Arpaia, N. & Rudensky, A. Y. Microbial metabolites control gut inflammatory responses. PNAS 111, 2058–2059 (2014).

57. Baxter, N. T. et al. Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions with Three Fermentable Fibers. mBio 10, (2019).

58. Oliphant, K. & Allen-Vercoe, E. Macronutrient metabolism by the human gut microbiome: major fermentation by-products and their impact on host health. Microbiome 7, (2019).

59. Mudgil, D. & Barak, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. International Journal of Biological Macromolecules 61, 1–6 (2013).

60. Chung, W. S. F. et al. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. FEMS Microbiol. Ecol. 93, (2017).

61. Slavin, J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. Nutrients 5, 1417–1435 (2013).

62. Zhu, Y., Wang, C. & Li, F. Impact of dietary fiber/starch ratio in shaping caecal microbiota in rabbits. Canadian Journal of Microbiology 61, 771–784 (2015).

63. Cheng, W. et al. Effect of Functional Oligosaccharides and Ordinary Dietary Fiber on Intestinal Microbiota Diversity. Front. Microbiol. 8, (2017).

64. Mariat, D. et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiol 9, 123 (2009).

65. Zhao, W. et al. The Dynamic Distribution of Porcine Microbiota across Different Ages and Gastrointestinal Tract Segments. PLoS One 10, (2015).

66. Combes, S., Gidenne, T., Cauquil, L., Bouchez, O. & Fortun-Lamothe, L. Coprophagous behavior of rabbit pups affects implantation of cecal microbiota and health status. Journal of Animal Science 92, 652–665 (2014).

67. Wu, Z., Zhou, H., Li, F., Zhang, N. & Zhu, Y. Effect of dietary fiber levels on bacterial composition with age in the cecum of meat rabbits. Microbiologyopen 8, (2018).

68. Asp, N.-G. & Björck, I. Resistant starch. Trends in Food Science & Technology 3, 111–114 (1992).

69. Giuberti, G., Gallo, A., Moschini, M. & Masoero, F. New insight into the role of resistant starch in pig nutrition. Animal Feed Science and Technology 201, 1–13 (2015).

70. Blas, E. & Gidenne, T. Digestion of starch and sugars. in The nutrition of the rabbit. (ed. Wiseman, C. D. B. and J.) vol. Chapter 2 17–38 (Wallingford, UK, 1998).

71. Debray, L. Nutrition du lapereau en periode de sevrage ; interaction avec les besoins nutritionnels de la femelle. (Inst. Nat. Polytech. Toulouse, 2002).

72. Zhang, L. et al. Metabolic phenotypes and the gut microbiota in response to dietary resistant starch type 2 in normal-weight subjects: a randomized crossover trial. Sci Rep 9, 1–11 (2019).

73. Dorokhov, Y. L., Shindyapina, A. V., Sheshukova, E. V. & Komarova, T. V. Metabolic Methanol: Molecular Pathways and Physiological Roles. Physiological Reviews 95, 603–644 (2015).

74. Trocino, A., Fragkiadakis, M., Radaelli, G. & Xiccato, G. Effect of dietary soluble fibre level and protein source on growth, digestion, caecal activity and health of fattening rabbits. World Rabbit Science 18, 199–210 (2010).

75. Jacquier, V., Combes, S., Oswald, I. P., Rogel-Gaillard, C. & Gidenne, T. Early modulation of the cecal microbial activity in the young rabbit with rapidly fermentable fiber: Impact on health and growth. Journal of Animal Science 92, 5551–5559 (2014).

76. Bang, S.-J. et al. The influence of in vitro pectin fermentation on the human fecal microbiome. AMB Express 8, (2018).

77. Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J. & Leschine, S. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. Diversity 5, 627–640 (2013).

78. Rettedal, E. et al. Alteration of the Ileal Microbiota of Weanling Piglets by the Growth-Promoting Antibiotic Chlortetracycline. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5489–5495 (2009).

79. Booijink, C. C. G. M. et al. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. Environ. Microbiol. 12, 3213–3227 (2010).

80. Gidenne, T., Jehl, N., Lapanouse, A. & Segura, M. Inter-relationship of microbial activity, digestion and gut health in the rabbit: effect of substituting fibre by starch in diets having a high proportion of rapidly fermentable polysaccharides. British Journal of Nutrition 92, 95–104 (2004).

Article 6 : Introduction précoce d'aliments solides : les niveaux d'ingestion importent plus que la supplémentation en prébiotiques pour moduler le microbiote digestif

Revue Frontiers in Veterinary Science, 2020, 7:261
doi : 10.3389/fvets.2020.00261

Charlotte Paës, Thierry Gidenne, Karine Bébin, Joël Duperray, Charly Gohier, Emeline Guené-Grand, Gwénaël Rebours, Olivier Bouchez, Céline Barilly, Patrick Aymard, Sylvie Combes

Résumé :

Le sevrage représente une période critique pour la santé des jeunes animaux. Une meilleure gestion de la transition d'une alimentation lactée à un régime exclusivement solide via l'introduction précoce de substrat nutritionnel représente une stratégie biomimétique prometteuse de contrôle du microbiote et de préservation de la santé. Dans cette étude, un substrat solide sous forme gélifié permettant de stimuler l'ingestion solide de lapereaux allaités a été utilisé et les effets sous-jacents de cette stimulation sur la colonisation du microbiote ont été étudiés. Quarante portées réparties dans quatre lots expérimentaux en maternité ont été utilisées. Tous les lapereaux avaient accès à un aliment solide sous forme de granulés disponibles hors du nid à partir de 15 jours. Excepté pour les lapins du groupe témoin (CONTROL), un aliment démarrage sous forme de gel était apporté dans le nid entre 3 et 18 jours, gel non supplémenté en additif (AF_GEL) ou contenant 4% de fructo-oligosaccharides (FOS_GEL) ou 4% de manann-oligosaccharides et β-glucanes (MOS_GEL). Après 18 jours, tous les lapins étaient élevés dans des conditions similaires. Le contenu caecal des 160 lapins était échantillonné à 18, 29, 38 et 57 jours d'âge puis analysé par un séquençage d'ARNr 16S. Les lapereaux consommaient en moyenne 3,95 ± 1,07 g d'aliment démarrage (matière fraîche) avec des niveaux d'ingestion plus élevés lors d'une supplémentation en fructo-oligossacharides (+1,2 g, $P<0,05$). Cette ingestion précoce affectait sur le long terme la consommation ultérieure de granulés (+17 g de 15 à 21 jours, $P<0,05$). Les indices d'alpha diversité étaient similaires entre les groupes et la supplémentation en prébiotiques n'induisait pas de modifications

spécifiques du microbiote. Au contraire, les niveaux d'ingestion au nid constituaient une meilleure variable explicative des profils microbiens et ceci jusqu'à 57 jours d'âge. Lorsque les lapins consommaient d'importantes quantités d'aliment démarrage, les proportions de bactéries fibrolytiques augmentaient telles que les familles Lachnospiraceae et Ruminococcaceae. Cependant, les paramètres fermentaires n'étaient pas affectés par l'ingestion précoce à 29, 38 et 57 jours d'âge. L'enrichissement des connaissances sur la régulation de l'implantation du microbiote au démarrage de l'ingestion solide ouvre la voie à de nouvelles études sur la maturation des écosystèmes digestifs. Ces résultats confirment en outre l'importance qui doit être accordée à l'optimisation de la formule alimentaire apportée en début de vie pour un meilleur contrôle de la santé digestive.

Early introduction of solid foods: ingestion level matters more than prebiotics supplementation for shaping the gut microbiota

Charlotte Paës[1,2], Thierry Gidenne[1], Karine Bébin[2], Joël Duperray[3], Charly Gohier[4], Emeline Guené-Grand[5], Gwénaël Rebours[6], Olivier Bouchez[7], Céline Barilly[1], Patrick Aymard[1], Sylvie Combes[1*]

[1]GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, ENVT, F-31326, Castanet Tolosan, France

[2]CCPA, ZA du Bois de Teillay, F-35150 Janzé, France

[3]EVIALIS, Lieu dit Talhouët, F-56250 Saint Nolff, France

[4]MiXscience, 2 avenue de Ker Lann, F-35170 Bruz, France

[5]Wisium, Rue de l'église, BP50019, F-02407 Chierry, France

[6]TECHNA, Route de St-Étienne-de-Montluc, F-44220, Couëron, France

[7]GeT-PlaGe, Genotoul, INRAE, F-31326, Castanet Tolosan, France

*** Correspondence:**
Corresponding Author: Sylvie Combes, sylvie.combes@inra.fr

Keywords: early life, rabbit, microbiome, weaning, gel starter diet, oligosaccharides, FOS, MOS

Abstract

Weaning is a critical period for the health of young animals. Better management of the dietary transition from milk to exclusive solid food through the early introduction of a nutritional substrate is a promising biomimetic strategy to control the implantation of the microbiota and preserve the young animals' health. In this study, we provided experimental solid substrate in a gel form to stimulate the intake of suckling rabbits and investigate the effects on microbiota implantation and colonization. Forty litters were divided into four experimental groups three days after birth. All the rabbits had access to solid food from 15 days outside the nest. Except for the CONTROL group, rabbits were offered inside the nest from 7 to 18 days starter food gels either free of additives (AF_GEL) or which contained 4% of fructo-oligosaccharides (FOS_GEL) or 4% of mannan-oligosaccharides and β-glucanes mixture (MOS_GEL). After 18 days, the animals were reared in similar conditions. Cecal content of 160 rabbits were sampled at 18, 29, 38 and 57 days and analyzed using 16S rRNA gene sequencing. Pups consumed on average 3.95 ± 1.07 g of starter food gels (fresh matter) with higher intake when it was supplemented in fructo-oligosaccharides (+1.2 g ; $P<0.05$). This early starter food gel intake had long-term impact on ensuing intake of pellets (+17 g from 15 to 21 days, $P<0.05$). Alpha-diversity indexes were similar between groups and prebiotics supplementation did not induce clear microbiota pattern shift. Conversely, starter food intake levels was a better explanatory factor of differential microbial compositions up to 57 days. When rabbits consumed more starter food, highest proportions of bacteria with plant-degradation abilities such as species from Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families were observed at 18 days of age. However, fermentative activities were not affected by starter food intakes at 29, 38 and 57 days. By providing comprehensive results on the regulation of microbial community structure at the onset of solid food intake, this research paves the way for further studies on digestive

ecosystems maturation. In the light of our results, future research should tend to optimize postnatal food composition for better control of gut health.

1. Introduction

Young mammals are prone to enteritis diseases around weaning (e.g. pigs, ruminants, rabbits…), which represents a stressful period with the end of milk consumption concomitantly with the separation from the mother. Although the etiology of these digestive disorders is no clear yet, the gut microbiota may play a pivotal role. Indeed, disruption of the gut microbiota homeostasis, characterized by greater abundances of opportunistic and pathogenic species and decreased abundances of fibrolytic and butyrate-producing bacteria, appeared to predispose the youngs to enteric infections (Bäuerl et al., 2014; Argüello et al., 2018; Jin et al., 2018). On the contrary, when equilibrium between mammalian host and gut microbiota is established, the microbiota will contribute to host defense in different aspects (Sekirov and Finlay, 2009). In particular, gut microbiota prevents the establishment of detrimental bacteria by competition for shared nutrients and niches (Kamada et al., 2013). Besides this "barrier" function, numerous studies underlined the action of gastrointestinal microbiota on the immune system (Hooper et al. 2012). The early-life exposure to gut microbiota is in particular determinant for the establishment of a normal immune function (Olszak et al., 2012; Al Nabhani et al., 2019). Microbiota signals are also involved in antibody repertoire diversification (Lanning et al. 2000, 2005; Choi et al. 2017).

Shift between dynamic bacterial succession in the young gut microbiota and more stable communities in the adult is a common pattern of mammal's colonization process (Mackie et al. 1999). Longitudinal studies in young mammals underlined highly variable gut taxonomies between neonatal animals followed by the establishment of "climax" communities with greater uniformity in late post-weaning states (human: Yatsunenko et al., 2012, rabbit: Combes et al., 2011, pig: Motta et al., 2019, calf: Rey et al., 2014). As a consequence of this immaturity, the

early post-natal stage represents a period of permissiveness that has been described as a "window of opportunity" for microbiota and immune system engineering (Torow and Hornef, 2017). Gut microbiota manipulation in early life can be performed through different tools such as dietary intervention. Indeed, numerous studies evidenced that the introduction of solid feed strongly affects gut microbiota (Padilha et al., 1999; Koenig et al., 2011; Bian et al., 2016) since dietary nutrients provide substrates for microbial growth. Rabbit pup is a good model to study early dietary intervention incidence on gut microbiota installation. Unlike other altricial species, rabbit pups are able to ingest solid substrates shortly after birth in wild conditions in the burrow (Hudson et Distel 1982). Under control breeding conditions, it was demonstrated that pups exhibit coprophagous behaviour within the first week of life (Kovács et al. 2006; Combes et al. 2014) and significantly consume the food provided in the nest from 8 days of age (Kacsala et al., 2018; Paës et al., 2019). The ability of the suckling rabbit to consume food at an early stage can therefore be used as a biomimetic strategy to study the intestinal colonization of bacterial community capable of positive interactions with host health. Little is known on the effects of the quality of solid food ingested on early life on the gut microbiota but the use of prebiotics to target taxonomic bacterial groups of interest appears promising. Prebiotic is a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit (Gibson et al., 2017). They contribute to digestive health preservation by functioning as anti-adhesives preventing pathogen implantation, stimulate immune maturation and gut barrier function, and serve as fermentable substrates for gut bacteria. The use of mannan-oligosaccharides (MOS) in pre- and post-weaning rabbit diets effectively promoted cecal fermentation and gut barrier (Bovera et al. 2012; Oso et al. 2013; Volek et al. 2007). Moreover, prebiotics are present in mammal's milk (Coppa et al., 2004; Maertens et al., 2010; Bode, 2012) and are essential to support development of commensal microbiota in the infant. In human, to mimic the beneficial effects of milk oligosaccharides (HMOs) on commensal microbiota, fructo-oligosaccharides (FOS) are

routinely added to infant formula (Verkhnyatskaya et al., 2019). FOS are known to selectively modulate the composition of gut microbiota and its metabolic activity (Respondek et al., 2013; Gibson et al., 2017). Thus maintaining prebiotics supplementation at the milk/solid diet transition by providing non digestible carbohydrates in the starter diet might ensure the installation of a proper ecological succession of bacterial species.

Taken together, in the present study, we hypothesized that early solid dietary intervention would drive microbiota establishment toward installation of a host beneficial microorganism community and that prebiotics supplementation would potentate those effects. In agreement with the findings of Paës et al. (2020) hydrated starter diet was given to suckling rabbits to stimulate early solid ingestion and to monitor it. The effects of solid food supplemented or not with prebiotics (FOS or MOS) from 3 to 18 days-old were assessed in terms of animal development, microbiota colonization and fermentative activity up to 57 days of age. To our knowledge, this study is the first one to investigate the effects of post-natal solid food supplementation on rabbit microbiota structure.

2. Materials and Methods

2.1 Ethics statement

This study was carried out at the PECTOUL Experimental Unit (INRA, Castanet-Tolosan, France). Animals were raised and handled according to the European Union recommendations on the protection of animals used for scientific purpose (2010/63/EU) and in agreement with French legislation (NOR: AGRG1238753A 2013). The experiment received the approval of the local ethical committee (SSA_2019_001).

2.2 Animal management

2.2.1 Animals handling and housing

Commercial rabbits raised for meat production purpose were used for the experiment (crossbreed of the maternal line Hyplus PS19 and the paternal line Hyplus PS59; Hypharm, France). Before weaning, the does and their pups were housed together in a wire cage (width: 62 x length: 69 x height: 62 cm) equipped with a nest for the pups (width: 25 x length: 38 x height: 20 cm) as previously reported by Paës et al. (2019). The cage food system allowed the monitoring of the pups ingestion only. Two days after parturition (d2), nest quality was assessed on a 3-point scale such as a nest of good quality corresponded to a nest fully covered by doe fur. After nest quality assessment, the litter size was standardized to ten pups per doe by cross-fostering or culling. From 3 to 21 days, nursing was controlled and pups had access to milk once a day, which is a common feature in rabbit species (Zarrow et al, 1965). All the rabbits received commercial food pellets ad libitum from 15 to 35 days in a feeder designed for youngs (Fortun-Lamothe et al., 2000) that the female could not reach. Pre-weaning pellets intake was measured every 4 days. At weaning (d35), pups were assigned to new cages of five rabbits according to their origin. Until day 64, they were fed the same post-weaning commercial diet with restricted feeding at 79% of ad libitum intake (Gidenne et al., 2012). No antibiotics were provided to pups and their mother through all the experiment. Chemical composition analysis was performed on commercial diets using ISO methods (DM and ash for dry food: ISO 6496:1999; nitrogen content: ISO 16634-1:2008; crude fat content: ISO 6492:1999; gross energy: ISO 9831:1998) and the procedures described by the European Group on Rabbit Nutrition (EGRAN 2001). Chemical composition of the diets and experimental design are presented in Table 1 and Figure 1A. To evaluate pups growth, the litter weight after suckling was recorded at days 3, 14, 21 and 28. Rabbits were individually weighed at weaning, days 50, 64 and 71.

Table 1| Ingredients and chemical composition of the commercial diets provided

	Before weaning	After weaning
Ingredients (g/kg as-fed basis)		
Wheat bran	301	251
Wheat		84
Sunflower meal (high proteins)	236	101
Sunflower meal (low proteins)		77
Sunflower husk	89	100
Barley	174	
Sugar beet pulp	95	187
Sugar beet molasses	50	50
Alfalfa		80
Rapeseed meal	30	30
Rapeseed oil	2	3
Calcium carbonate	12	19
Salt	6	7
Fortibut +		5
L-Lysine Monochloride	1	1
Mineral and vitamin premix	5	5
Chemical composition (g/kg as-fed basis)		
Ash	64	87
Crude protein	176	154
Neutral detergent fiber (NDF)	319	375
Acid detergent fiber (ADF)	165	205
Acid detergent lignin (ADL)	51	64
Hemicellulose (NDF-ADF)	154	171
Cellulose (ADF-ADL)	114	140
Starch	131	78
Fat content	25	19
Gross energy (kcal/kg)	3917	3803

2.2.2 Experimental groups

A total of 44 litters were equally allotted between four experimental groups at 3 days by stratified randomization on the does' parity (multiparous does, five parities on average), the litter weight at standardization (72 ± 7 g) and the allocation in the farm (n=3 rooms). In the

CONTROL group, classical feeding scheme was applied by providing solid food access from day 15 with commercial pellets (Figure 1).

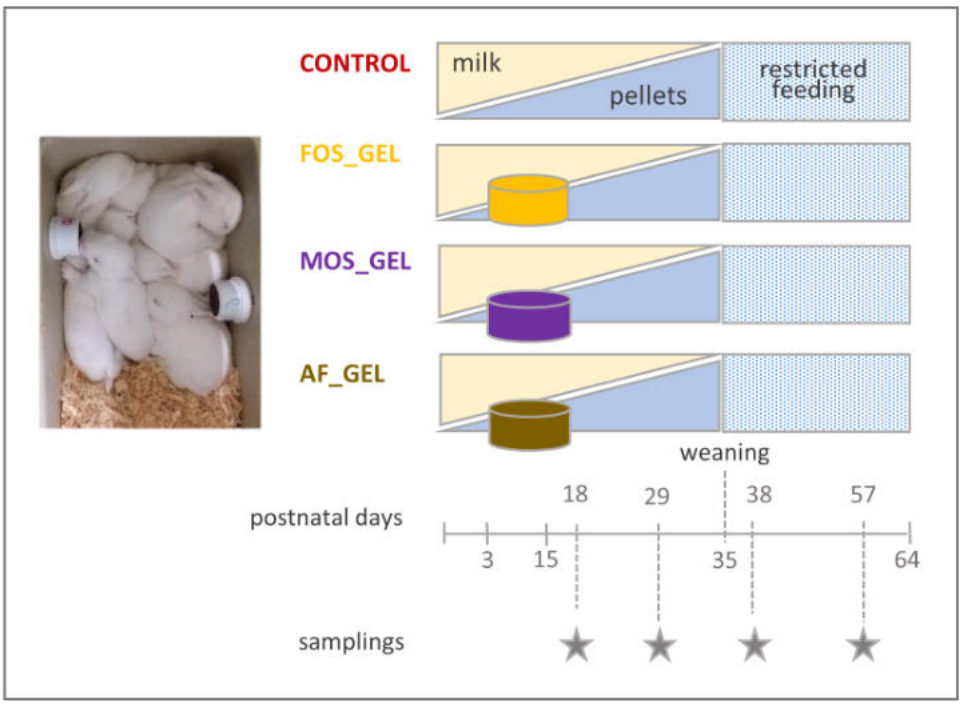


Figure 1: Experimental design: three groups of 11 rabbit litters were provided with a starter food in a gel form from 3 to 17 days of age in addition with doe milk. The additive composition of the gels varied according to treatments (FOS: fructo-oligosaccharides, MOS: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided).

In the three other groups, a starter food was offered from 3 to 17 days in an hydrated gel form. The starter food gel was provided inside two plastic cups (volume: 30 mL; Ø=40 mm; height: 32 mm; GOSSELIN®, Le Mans, France) vertically clipped on each side of the nest (Figure 1). The gels were removed before suckling to prevent the doe from eating them. The starter food gel were renewed every day and their consumption was measured from 7 days of age. To process the gels, the commercial pellets provided during the pre-weaning period were first mashed (particle sizes smaller than 2 mm). Attractive flavouring additive was added to the mash (vanilla flavor at 0.06% supplied by Phodé, Terssac, France). For diets including prebiotics, the corresponding additive (powder form) was also mixed with mash at this stage. Dry products

were then thoroughly mixed with hot water (80-90°C) and agar (mash-to-water ratio of 1:4 with 0.6 % of agar) to shape the gels. Litters which received starter food gels without additive belonged to the AF_GEL (Additive Free Gel) group. Prebiotics used were either fructo-oligosaccharides (group FOS_GEL) or a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes (group MOS_GEL). Short chain fructo-oligosaccharides were provided as Profeed® (Tereos, Lille, France). This product is obtained by a bio-enzymatic process from beet sugar. It is characterized by a degree of polymerization between 3 and 5 and it is composed of three Glucose-Fructose chains (GFn where n stands for the number of fructose units linked together): GF2, GF3 and GF4 resulting in a final concentration of 95% of FOS. Lallemand Animal Nutrition (Blagnac, France) provided mannan-oligosaccharides and β-glucans combination as AGRIMOS®. This additive is obtained by the autolysis of yeast cell walls of Saccharomyces cerevisiae leading to a final concentration of 45% of MOS. Manufacturers' recommendations for inclusion levels for post weaned rabbits are typically close to 2 kg per ton of feed (0.2 %). Considering the specificity of our experimental design (supplementation during a short period and low intake levels), we brought both additives at 0.9% in gels, which equals to 4% of dry matter. Dry matter (DM) content of starter food gels obtained by freeze-drying for 48 h were similar between gels types (FOS_GEL: 26.3%, MOS_GEL: 25.6% and AF_GEL: 26.0%). Knowing the high moisture content of starter food gels, water losses due to evaporation were evaluated daily for each kind of gel. Those autogenic changes in the mass of gels were taken into account with a correction factor based on the quantity of gel supplied. Feed intake before weaning was measured at the litter-level and expressed per rabbit. For food consumption after 17 days of age, the number of pups was adjusted assuming that dead animals did not consume food two days before their death.

2.3 Digestive tract development measurement and cecal content sampling

At days 18, 29, 38 and 57, ten pups per group (one pup per litter) were randomly selected, weighed and sacrificed by electronarcosis and exsanguination (in total n=160). Blood samples were collected from aorta during slaughtering in EDTA tubes immediately stored on ice. After centrifugation (800g for 10 min at 4°C), the plasmas were stored at -20°C until further analysis. The cecum was isolated and weighed before collection of the digesta in sterile tubes (storage at -80°C). At days 29, 38 and 57, cecal pH was measured by introducing a glass electrode at the ileocecal junction (VWR Collection SP225, Radnor, Pennsylvanie, USA) and fresh cecal contents were in sufficient quantities to be sampled for the following dosages: DM (2 g), volatile fatty acids (VFA) (1 g diluted in 2 mL of H2SO4 at 2% w/v) and ammonia (1 g diluted in 3 mL of H2SO4 at 2% w/v). The cecum was then emptied and weighed with an OHAUS scale (Parsippany, New Jersey, USA). Finally, stomach, small intestine and colon were isolated and weighed.

2.4 Evaluation of cecal microbiota fermentative activity: Ammonia and Volatile Fatty Acids (VFA) concentration determinations

Ammonia (NH3) and VFA were analyzed after centrifugation and dilution at 1:10. Ammonia concentrations were quantified using a colorimetric method with a continuous flow analyzer (SAN++, Skalar, Norcross, Georgia USA) as previously described by (Verdouw et al., 1977). Volatile fatty acids were determined by gas chromatography (CPG HP 7890A, Agilent, Santa Clara, California, USA) following the method of Filípek and Dvořák (2009). Results were expressed according to the liquid phase of cecal content after determination of cecal samples fresh matter by drying at 103°C for 24h.

2.5 ELISA measurements

ELISA procedure was used to quantify IgG in plasma and IgA concentration in cecum digesta. As a preliminary step for the latter measurement, cecal content was diluted at 50 mg/mL in TBS buffer. After shaking thoroughly, the samples were centrifuged (3000 g, 10 min, 4 °C). The supernatants were collected and stored at -20°C until analysis. Total IgG or IgA contents were determined in duplicates by sandwich ELISA in 96-well plates coated with specific polyclonal goat anti-rabbit IgG or IgA antibody (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA). Appropriate sample dilutions were performed according to the rabbit age: from 1:16000 to 1:32000 for IgG and from 1:12 to 1:800 for IgA determination. Plates were read at 450 nm in GloMax® Discover plate reader (Promega, Madison, WI) to construct the standard curve based on a four-parametric model. IgG in plasmas were quantified by using a reference IgG serum (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA). Regarding IgA, ten cecal content samples were pooled to build a reference sample for the standard curve construction. Relative IgA concentrations were then interpolated from this curve. Results with intra-assay coefficients of variation lower than 20% were kept (Wong et al., 2004).

2.6 DNA extraction and PCR amplification of Bacterial 16S Ribosomal Genes for Illumina Sequencing

Total genomic DNA was extracted from 50 mg of cecal digesta using Quick-DNA Fecal/Soil Microbe 96 Kit (ZymoResearch, Irvine, California) according to manufacturer's instruction after mechanical lyses at 30 Hz for 15 min (TisueLyzer II, Qiagen, Hilden, Germany). 16S rRNA V3-V4 region was amplified by PCR and paired reads were sequenced by MiSeq Illumina Sequencing in the Genomic and Transcriptomic Platform (INRA, Toulouse, France) as previously described (Read et al., 2019).

2.7 Sequence Analysis

The Galaxy-supported FROGS pipeline (Escudié et al., 2018) was employed to process the 7,503,813 16S ribosomal DNA amplicon sequences obtained. Amplicons without any

ambiguous base, with a length between 350 and 500 nucleotides and matching with V3 and V4 proximal PCR primer sequences, were kept for clustering. Reads were clustered into OTUs (operational taxonomic units) using the iterative growth process SWARM (aggregation distance = 3) (Mahé et al., 2014). Chimera were detected using VSEARCH (Rognes et al., 2016) and then discarded (15.3% of the total sequences corresponding to 41.8% of total OTUs determined). Remaining OTUs were filtered to keep OTUs present at least in 3 samples and representing more than 0.005% of all sequences .

The mean number of reads per sample was 30,025 (min: 14,110 – max: 61,030). OTUs taxonomic affiliation was performed using the BLAST algorithm against SILVA SSU Ref NR 132 database with a pintail quality of 80 (Quast et al., 2013). A phyloseq object (McMurdie and Holmes, 2013) containing the OTUs table (OTU abundance for each sample with taxonomic classification) as well as sample information was built for subsequent analysis. Within-community diversity metrics (α-diversity), including Shannon and Inverse Simpson were calculated with phyloseq package after rarefaction of the OTU table at 14,110 sequences. In order to evaluate the repeatability of OTUs relative abundances, 16S rDNA sequences from 15 cecal samples extracted, sequenced and processed twice according to the same procedure were compared. As previously observed by Benson et al. (2010), the quantification of OTUs with low abundances is poorly repeatable (Figure 2A). We chose the threshold of 0.5% of relative abundances for quantitative repeatability according to Figure 2B. With such filter, OTUs relative abundance differed by 1.4 fold on average between two DNA extraction and 16S sequencing analysis of a same sample. As a consequence, the OTUs with average relative abundances below 0.5% within each group age*treatment were removed before further statistical analysis.

2.8 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (version 3.5.1). Differences were considered to be significant when $P \leq 0.05$. Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) multivariate regression model was used to identify the OTUs that allow discrimination of the response variable using mixOmics (Le Cao et al., 2016) package (version 6.6.0). This model takes as input OTUs counts after Total Sum Scaling (TSS) normalization and Centered Log Ratio Transformation (CLR) to predict the response variable (either experimental group or early food intake level). The effects of the groups on the discriminant OTUs identified with PLS-DA were analyzed with multiple regression models by controlling the false discovery rate after fourth root transformation applied on relative abundances to improve normality and homoscedasticity. Taxonomic assignments to family and genus obtained by BLAST were considered with a cutoff of 80% for coverage and respectively 80% and 97% for identity. Taxonomic relative abundances at phylum, family and genus levels, diversity indexes (number of observed OTU, Shannon and InvSimpson indexes), cecal parameters (pH, VFA, NH3), longitudinal intakes and performances data were analyzed with the linear mixed procedure of nlme package. The mixed model included age, groups of interest and their interaction as fixed effects, litter as random effect and a correction for age heteroscedasticity was applied on intakes and performances data. Post hoc comparisons were made with emmeans package using false discovery rate adjustment. The total intake in the nest (from 7 to 17 days) was analyzed using nest quality and experimental group as categorical factors, and litter weight at equalization as quantitative covariable. Mortality data was analyzed using adjusted chi-square according to the Donner and Banting procedure (1989), so that litter cluster was accounted for (Reed, 2004; Princée, 2016).

2.9 Data access

All raw sequences were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) under accession number PRJNA589727.

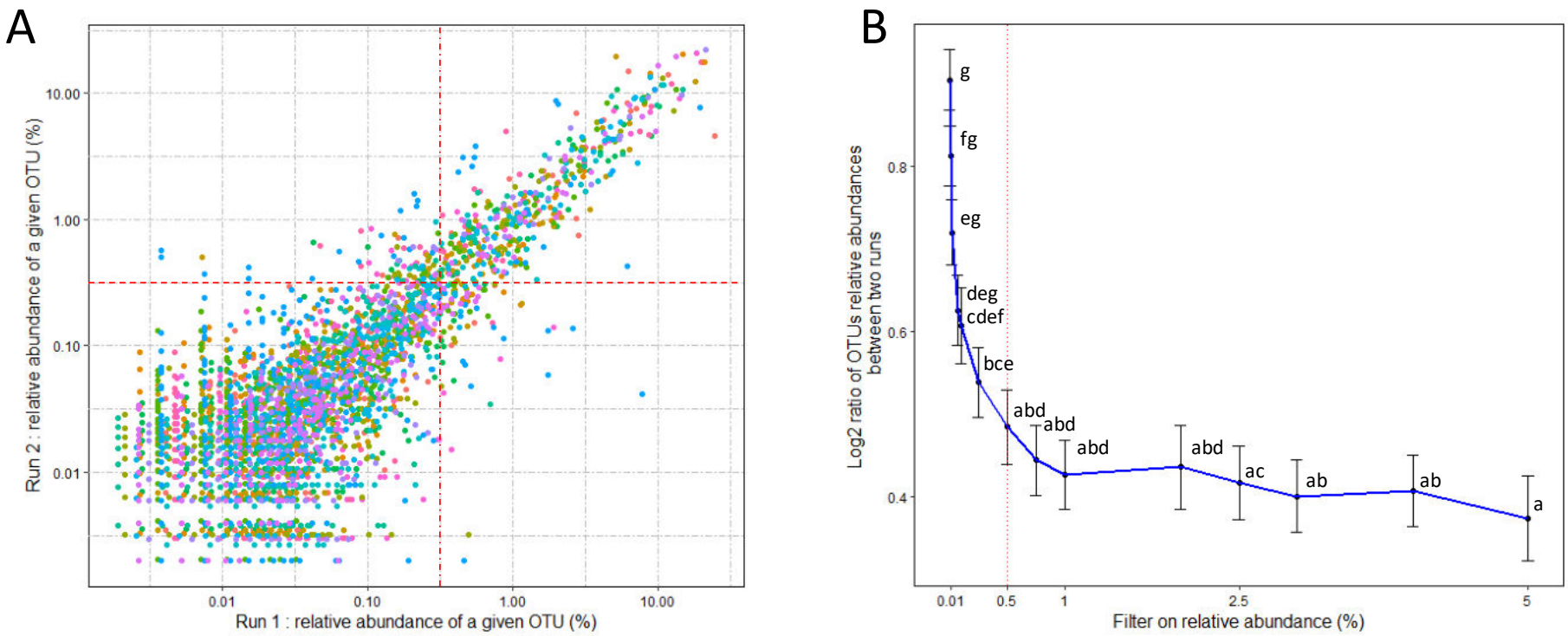


Figure 2: Comparison of OTUs relative abundances obtained from 15 rabbit cecal samples extracted and sequenced on two times **(A)**. Technical procedures and bioinformatics treatments were similar for replications. The colours stand for the different rabbit samples. Axis are represented on a log10 scale. Evaluation of a threshold on OTUs relative abundances for quantitative repeatability **(B)**. Binary log ratio of the relative abundances of each OTU on the two extraction and sequencing analysis for a given sample were calculated as function of selected filter on the relative abundance. Means followed by a common letter are not significantly different by Tukey HSD test at the 0.05 level of significance. The minimum threshold filter of 0.5% was selected

3. Results

3.1 Effects of starter food gels and prebiotics supplementation on solid food ingestion by suckling rabbits

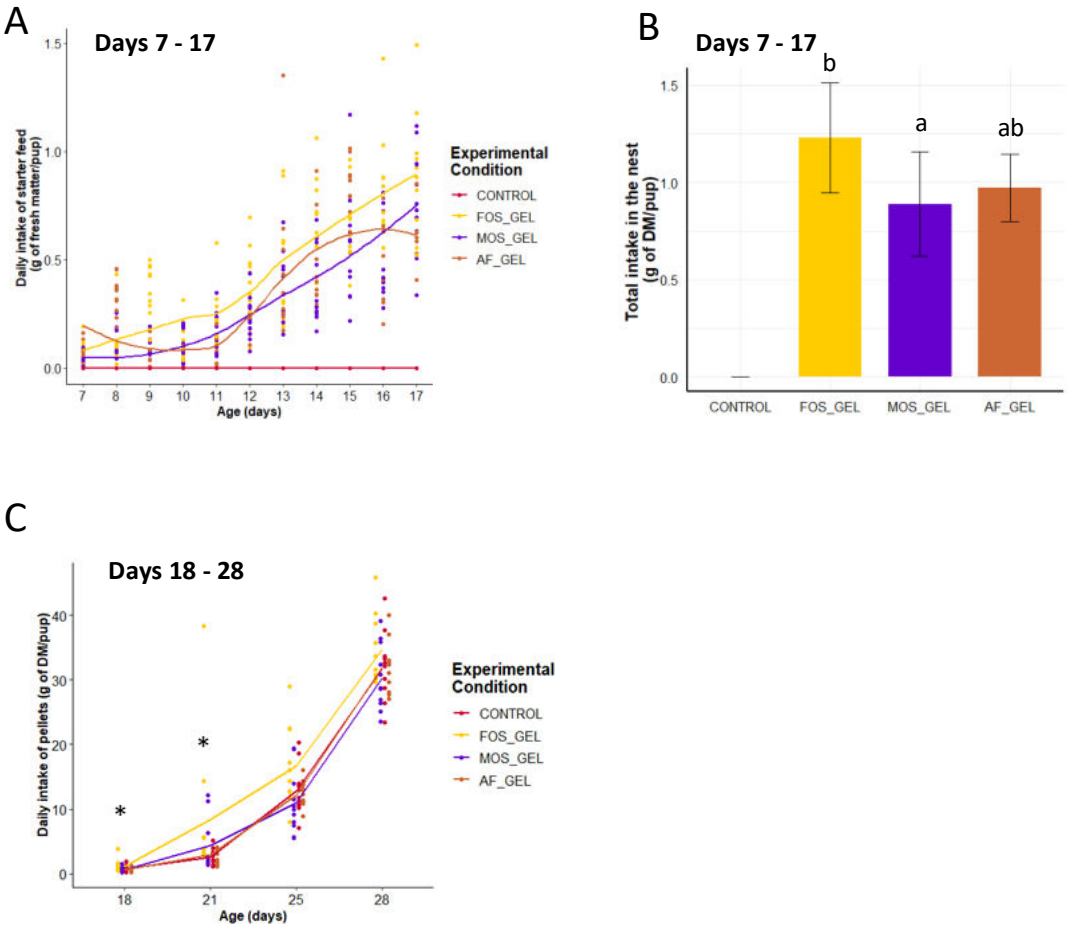


Figure 3: Early life ingestion of starter food gels according to treatment and long-term effects of early dietary interventions on subsequent pellets intake before weaning in rabbit. **A.** Kinetic of starter food gels ingestion from 7 to 17 days of age of rabbit pups in the nest, where each point stands for one litter's intake; **B** Total starter food gel intake in the nest form 7 to 17 days of age, means with different letters differ at $p<0.05$**; C** Daily Intake of pellets from 18 to 28 days of age in young rabbits. Significant differences between experimental groups found within ages are represented with a star. FOS_GEL: fructo-oligosaccharides, MOS_GEL: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF_GEL: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided)

The first step or our study was to evaluate if starter food gels provided from 3 to 15 days of age promoted early life solid ingestion by suckling rabbits and if these effects were modulated by prebiotics supplementation (FOS or MOS). Rabbit pups began to ingest the starter food gels provided in the nest as early as 7 days of age, with high variability between litters (Figure 3A).

Daily ingestion was significantly affected by the type of gels provided (P=0.014). Total gel intake in the nest amounted to 3.95 ± 1.07 g of fresh matter and 1.03 ± 0.27 g of DM per pup on average. Total starter food gel intake in the nest was significantly higher for FOS_GEL compared to MOS_GEL group (+1.3 g of fresh matter, P=0.011) and tended to be higher for FOS_GEL than AF_GEL group (+1.0 g of fresh matter, P=0.057) (Figure 3B). Considering the initial prebiotic concentration of the additives used and their rate of incorporation into the gel, pups from FOS_GEL group ingested a total of 47 ± 11 mg/rabbit while MOS_GEL ingested 16 ± 4 mg/rabbit of FOS and MOS, respectively. The weight of the litter after standardization (day 3, average rabbit weight of 98.2 ± 10.4 g) positively affected the total starter food gel intake (P=0.028; Pearson correlation=0.41) while the nest quality score did not affect early food ingestion. All the rabbits had access to similar pellets from 15 days of age but their intake levels varied according to the dietary intervention in early life (Supplemental Table S1). Pre-weaning pellets intake was significantly higher in FOS_GEL group than others with 17 additional grams of dry matter consumed from 15 to 21 days (P<0.05) (Figure 3C). Altogether, our results show that providing starter food gels promoted pre-weaning solid food ingestion by suckling rabbit and these effects were amplified when the gels were supplemented with the prebiotic FOS.

3.2 Effects of starter food gels and prebiotics supplementation on growth and health of young rabbits

As a next step, we analyzed the consequences of the stimulation of solid food ingestion induced by starter food gels and prebiotics on growth and health of young rabbits. Thirteen rabbits were found dead shortly after equalization and before rabbit pups began to eat starter gel food (3-6 d). Overall mortality stabilized after this period and was equaled to 2.8% from 7 to 35 days and to 0.6% after weaning. The survival between 7 and 35 days was numerically lower in the litters from MOS_gel group (Figure 4A) but this was not significant ($\chi 2$=2.9, df=3, P= 0.403). Relative to CONTROL group the odd ratios calculated in FOS_GEL, MOS_GEL and AF_GEL

were equal to 0.5 ((1/89)/(2/88)), 2.7 ((5/82)/(2/88)), and 1 ((2/88)/(2/88)) respectively. Animal weights before and after weaning and average daily gains were not affected by experimental treatments (Figure 4B and Supplemental Table S2). We analyzed immunoglobulins in plasma and cecal content as markers of young rabbit's immune status. IgA relative concentration in cecal content was the highest at 18 days ($p<0.05$), probably due to passive immunity (Figure 4C). Indeed, IgA relative concentration in cecal content dropped as milked ingestion decreased and reached the lowest level at day 38 (when rabbits only eat solid food). Then, cecal IgA concentration increased at day 57 ($p<0.05$), probably linked to the development of the young rabbit adaptive immune system. IgA levels were affected by the interaction age * experimental group ($P=0.009$) with effects visible as of 29 days of age (Figure 4D). At 29 and 57 days, cecal IgA levels were significantly higher for rabbits from FOS_GEL than AF_GEL. Similarly, higher cecal IgA concentrations were found for FOS_GEL group compared to AF_GEL and MOS_GEL groups at 57 days. Plasma levels of IgG varied with age ($P<0.001$) but were similar between groups (Figure 4E). Similarly to cecal IgA relative concentration, IgG plasma levels was the highest at 18 days ($p<0.05$) reached the lowest level at day 29-38 according to the evolution of passive immunity provided by milk. Then, IgG plasma concentration tended to increase at day 57, probably linked to the development of the young rabbit adaptive immune system. Overall, our results show that the stimulation of early life solid food ingestion by starter food gels had no effect on growth and health status of young rabbits. In contrast, supplementation of the starter food gel with the prebiotic FOS increased IgA concentration in the caecum.

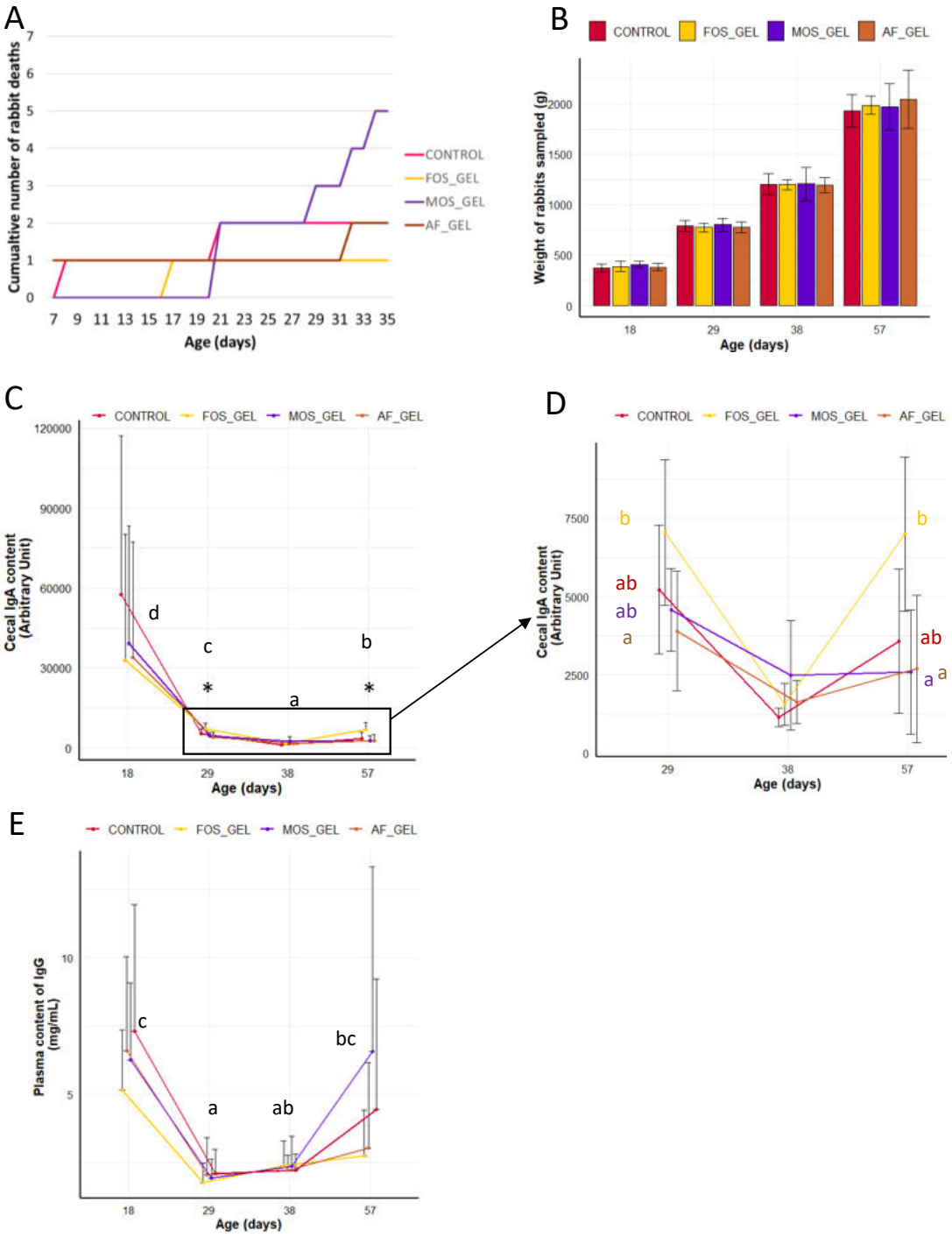


Figure 4: Health parameter and growth of the rabbits according to early dietary interventions in the nest in form of a starter gel food. Mortality from 7 to 35 days of age **(A)**. Rabbit weight from 18 days to 57 days **(B)**. Caecal IgA **C and D)** and plama IgG levels **(E)** in rabbit. The animals sampled for immunoglobulins analysis were healthy and had comparable live weight between groups **(B)**. Significant differences between experimental groups found within ages are represented with a star. The additive composition of the gels varied according to treatments (FOS_GEL: fructo-oligosaccharides, MOS_GEL: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF_GEL: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided)

3.3 Effects of starter food gels and prebiotics supplementation on the microbiota of young rabbits

We evaluated the effects of starter food gels intake and prebiotics on the gut microbiota diversity and composition in young rabbits. Besides the expected increase of observed OTU and diversity indexes (Shannon and InvSimpson) with age, no significant difference could be pointed out regarding early nutritional intervention at the different time points of the analysis (Table 2).

Table 2| Effects of early nutritional interventions on alpha-diversity metrics of rabbit microbial cecum ecosystems (mean ± standard deviation). The additive composition of the starter food gels varied according to treatments (FOS: fructo-oligosaccharides, MOS: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided)

Age (days)	Experimental group	Number of observed OTUs	Shannon index	InvSimpson index
18	AF_GEL	259 ± 67	3.42 ± 0.42	14.1 ± 6.2
	FOS_GEL	272 ± 64	3.61 ± 0.28	17.2 ± 4.6
	MOS_GEL	248 ± 53	3.44 ± 0.31	14.5 ± 4.3
	CONTROL	259 ± 52	3.47 ± 0.35	16.1 ± 6.0
29	AF_GEL	425 ± 83	4.39 ± 0.43	36.5 ± 13.0
	FOS_GEL	418 ± 71	4.47 ± 0.21	38.8 ± 9.3
	MOS_GEL	444 ± 64	4.57 ± 0.26	44.6 ± 10.9
	CONTROL	411 ± 110	4.21 ± 0.59	30.2 ± 11.6
38	AF_GEL	506 ± 65	4.80 ± 0.21	55.6 ± 17.8
	FOS_GEL	468 ± 105	4.58 ± 0.47	47.8 ± 28.9
	MOS_GEL	530 ± 95	4.77 ± 0.33	52.6 ± 16.8
	CONTROL	489 ± 89	4.68 ± 0.27	48.0 ± 13.9
57	AF_GEL	581 ± 52	5.12 ± 0.14	75.0 ± 12.7
	FOS_GEL	579 ± 59	5.11 ± 0.14	73.4 ± 14.8
	MOS_GEL	596 ± 55	5.07 ± 0.20	64.8 ± 17.4
	CONTROL	593 ± 46	5.04 ± 0.19	66.4 ± 16.3
P value				
Age		<0.001	<0.001	<0.001
Group		0.926	0.759	0.691
Age * Group		0.616	0.326	0.125

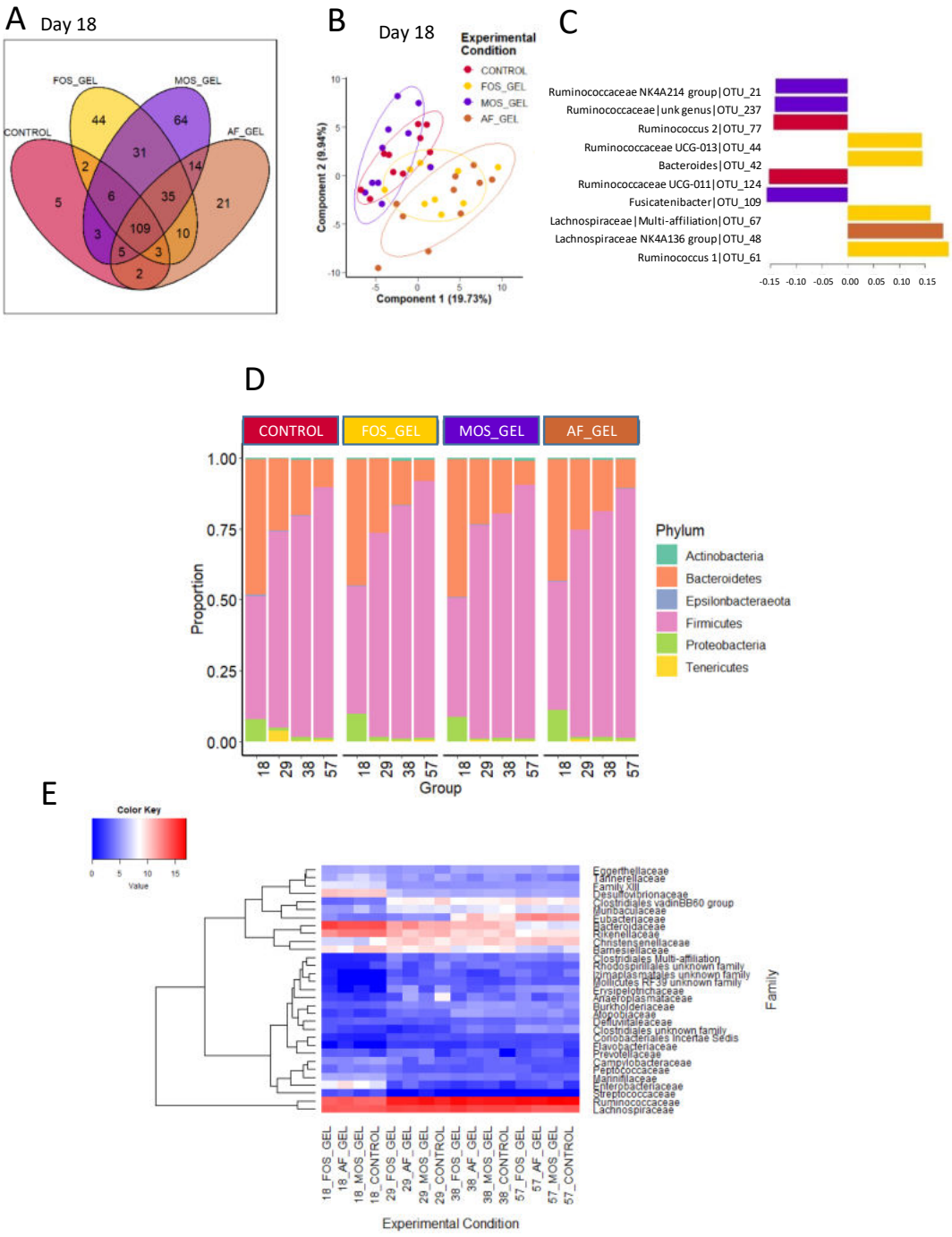


Figure 5: Venn diagram (**A**): occurrence of the OTUs across the cecal microbiota of 18 days-old rabbits according to early nutritional intervention in form of a starter gel food. The OTUs present in at least 75% of the samples within each group were kept to build the diagram. Partial least square discriminant analysis (PLSDA**, B and C**) at the onset of early solid food ingestion (d18) to classify samples according to the experimental group; 80% confidence ellipses are represented **(B)**. Loading of the 10 discriminant OTUs according to component 1 **(C)**. Phylum **(D)** and family **(E)** distributions according to early food intake level. The heatmap was built with rarefied counts data after fourth root transformation. The additive composition of the gels varied according to treatments (FOS_GEL: fructo-oligosaccharides, MOS_GEL: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF_GEL: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided).

For analyses at the OTU level, we focused on the earliest time point (i.e., day 18) corresponding to the end of the gel supply. A Venn figure was displayed to represent shared OTUs in each experimental group of 18 days-old rabbits based on the OTUs present in at least 75% of individuals of each group e.g. representative of the core bacterial community at this age (Figure 5A). Among the 354 OTUs studied, 31% of the OTUs were shared among all the rabbit cecal ecosystems, which accounted for 82% of total relative abundances. Only 5 OTUs were specific to CONTROL group while the other groups exhibited more specific taxa patterns. Animals from FOS_GEL and MOS_GEL groups respectively had 12% and 18% of specific OTUs but the latter only represented in total 0.4 and 0.9% of total relative abundances respectively. The 35 OTUs that were shared between groups with early nutritional interventions (FOS_GEL, MOS_GEL and AF_GEL) accounted for 6% of relative abundances. Regarding the OTUs not present in the CONTROL group (219 OTUs), they accounted for 12% of total relative abundances. In addition to the Venn diagram analysis, a PLS-DA procedure was performed to determine if experimental groups had their own microbial composition signature based on OTUs with relative abundance superior to 0.5% (Figure 5B). The PLS-DA individual plot at 18 days on the two first components suggested two clusters: CONTROL/MOS_GEL and FOS_GEL/AF_GEL (Figure 5B). Among the discriminant OTUs, the OTU_61 affiliated to Ruminococcus group was significantly higher in MOS_GEL than in FOS_GEL group ($p<0.05$) while OTU_48 affiliated Lachnospiraceae NK4A136 group had greater level in MOS_GEL and CONTROL than in FOS_GEL group (Figure 5C and supplemental figure S1). As expected, OTU taxonomic assignation revealed that gut microbiota composition shift was coincident with ageing and increased levels of solid food in rabbit diets with a progressive decrease of Bacteroidetes and Proteobacteria phyla (resp. from 46% and 9% at 18 days to 9% and 1% at 57 days) and a sharp increase of Firmicutes phylum (from 44% at 18 days to 89% at 57 days) (Figure 5D). Tenericutes phyla tended to be affected by the experimental group ($P=0.08$). A

total of 99.5% and 68.1% of the sequences could be assigned at the family and genus levels. The proportions of families with relative abundances superior to 0.5% were similar between the four experimental groups (Figure 5E). Overall, our results show that the stimulation of early life solid food ingestion by starter food gels had no effect on alpha diversity but seemed to allow the implantation of specific OTUs, some of them being related to the prebiotic supplementation. However their abundances in the ecosystem remained moderate.

3.4 Effects of the level of early life solid food ingestion on the microbiota of young rabbits

Based on our observation that MOS_GEL group had the lowest solid food intake compared to FOS_GEL and AF_GEL and that its microbiota composition clustered with that of the CONTROL group with no gel supplementation, we hypothesized that ingestion levels in the nest was a structural factor of bacterial communities' implantation rather than the prebiotics supplementation we performed. Consequently, we input a new categorial variable in our analysis based on the total starter food intake in the nest of the litters sampled: it was either null (Null group, n=10 litters), below the median (<3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, n=15) or above the median (>3.8 g, n=15). One litter from MOS_GEL group was classified with high early food intake ("above the median"), while they were five in the group AF_GEL and nine in the group FOS_GEL (Supplemental Figure S2). Pellets intake were also the highest in rabbits from "above the median" group at 18 and 21 days (+15 g of dry matter from 15 to 21 days) (Supplemental Figure S3). A new Venn figure was built based on the OTUs present in at least 75% of individuals of the three intake level groups (Figure 6A). This diagram clearly emphasized the presence of specific OTUs in relation with early solid food ingestion. They represented 219 OTUs out of 354 (62%) with a higher proportion of OTUs belonging to Ruminococcaceae family and a lower number belonging to Bacteroidaceae family compare to the shared OTUs ($\chi2$=4.95, df = 1, p-value = 0.026 and $\chi2$= 7.26, df = 1, p-value = 0.007, respectively (Figure 6B). Cumulated specific OTUs of "above median" and "below median"

groups respectively represented 4.2 and 0.5% of total relative abundances (Supplemental Figure S4). Subsequent PLS-DA two component projection at 18 days (Figure 6C) suggested that individuals who consumed the highest quantities of gel in the nest are clustered in a separate group. Among the 22 discriminant OTUs (Figure 6D), the OTU_67 and OTU_14 affiliated respectively to Lachnospiraceae family and to Ruminoclostridium 6 genus, exhibited the highest relative abundances in rabbits with the highest starter food gel ingestion level in the nest (above median group) (Supplemental figure S5).This clustering pattern was also observable at 29 days of age (Supplemental Figure S6). Interestingly, few days after weaning, the levels of early food ingestion was still affecting microbiota composition. Indeed, supervised multivariate analysis at 38 and 57 days (Supplementary Figure S6) revealed that three intake levels groups still exhibited differences of microbial communities. However, from 29 days of age PLS-DA total explained variance was low (~ 10% on the two first components).

Analysis of the taxonomic assignation of OTUs revealed that the abundances of Tenericutes phylum in the cecum of 29-days-old rabbits with no previous access to starter food gels was respectively 36 and 6 times greater than for rabbits with high ($P<0.001$) and intermediate early food intake ($P=0.02$) (Figure 7A). The distribution of the 32 taxonomic families in rabbits cecum was similar regardless of early food ingestion (Figure 7B) except for Prevotellaceae which was more abundant at 29 days when suckling rabbits consumed high quantities of gels ($P=0.009$) and which tended to be higher in 18-days-old rabbits of this group ($P=0.057$). At genus level, only Paraprevotella genus was affected by early food intake levels with greater abundance in rabbits from “above median” intake group ($P=0.02$). Altogether, our results show that starter gel food intake levels was a better explanatory factor of differential microbial compositions up to 57 days. When rabbits consumed more starter food, highest proportions of bacteria with plant-degradation abilities such as species from Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families were observed.

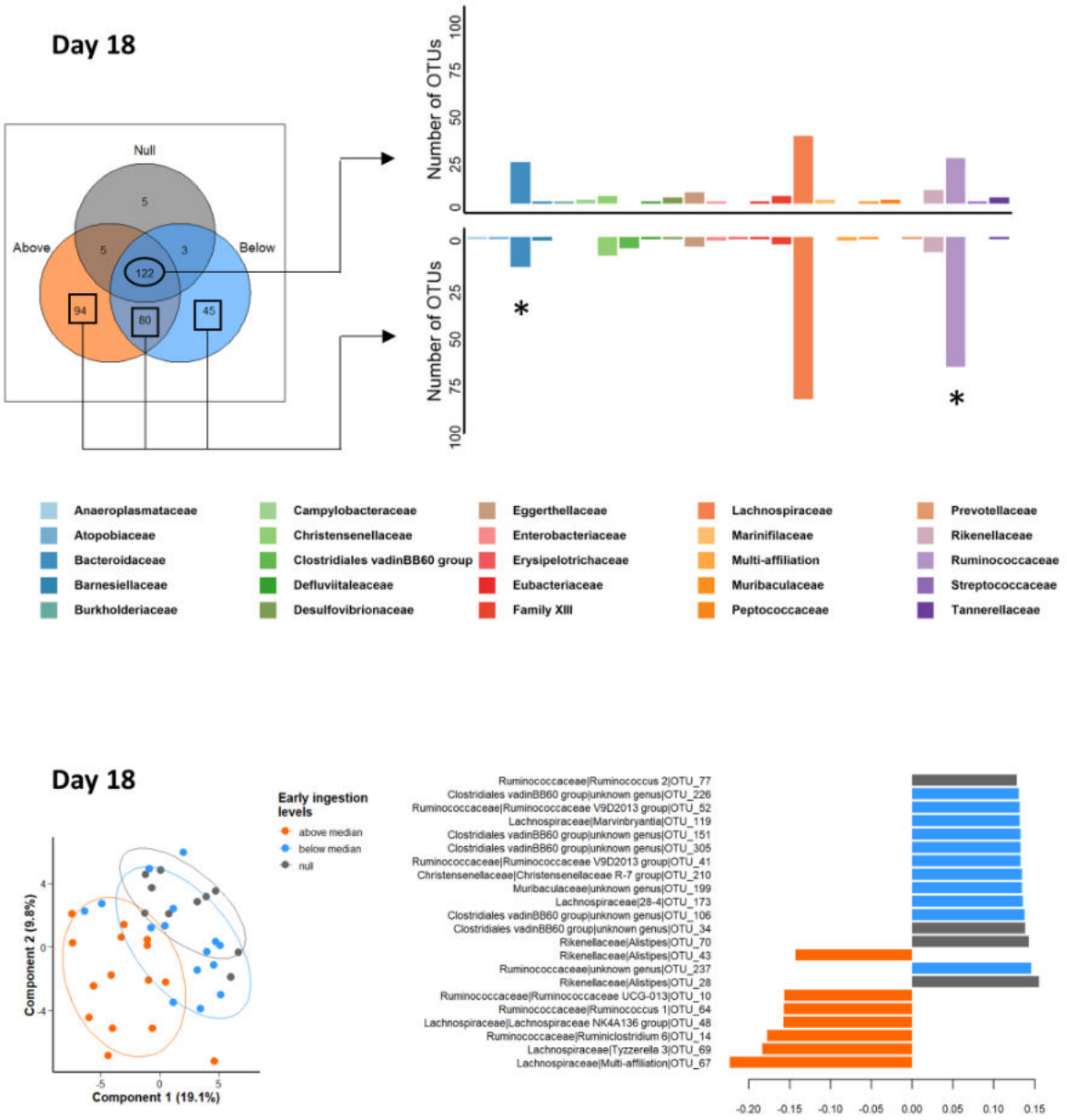


Figure 6: Venn diagram (**A**): occurrence of the OTUs across the cecal microbiota of 18 days-old rabbits according to starter food gel ingestion level. The OTUs present in at least 75% of the samples within each group were kept to build the diagram. Distribution among bacterial family affiliation of the OTUs shared by all the rabbits (**B** upper barplot) and by the rabbit with a starter gel food ingestion in the nest only (**B** lower barplot). Partial least square discriminant analysis **(C and D)** at the onset of early solid food ingestion (d18) to classify samples according to starter gel food ingestion level; 80% confidence ellipses are represented **(C)**. Loading of the 22 discriminant OTUs according to component 1 **(D)**. Null group: no food intake corresponding to the ten CONTROL group litters, Below median group: with an intake under 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters) and Above median group: an intake over 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters).

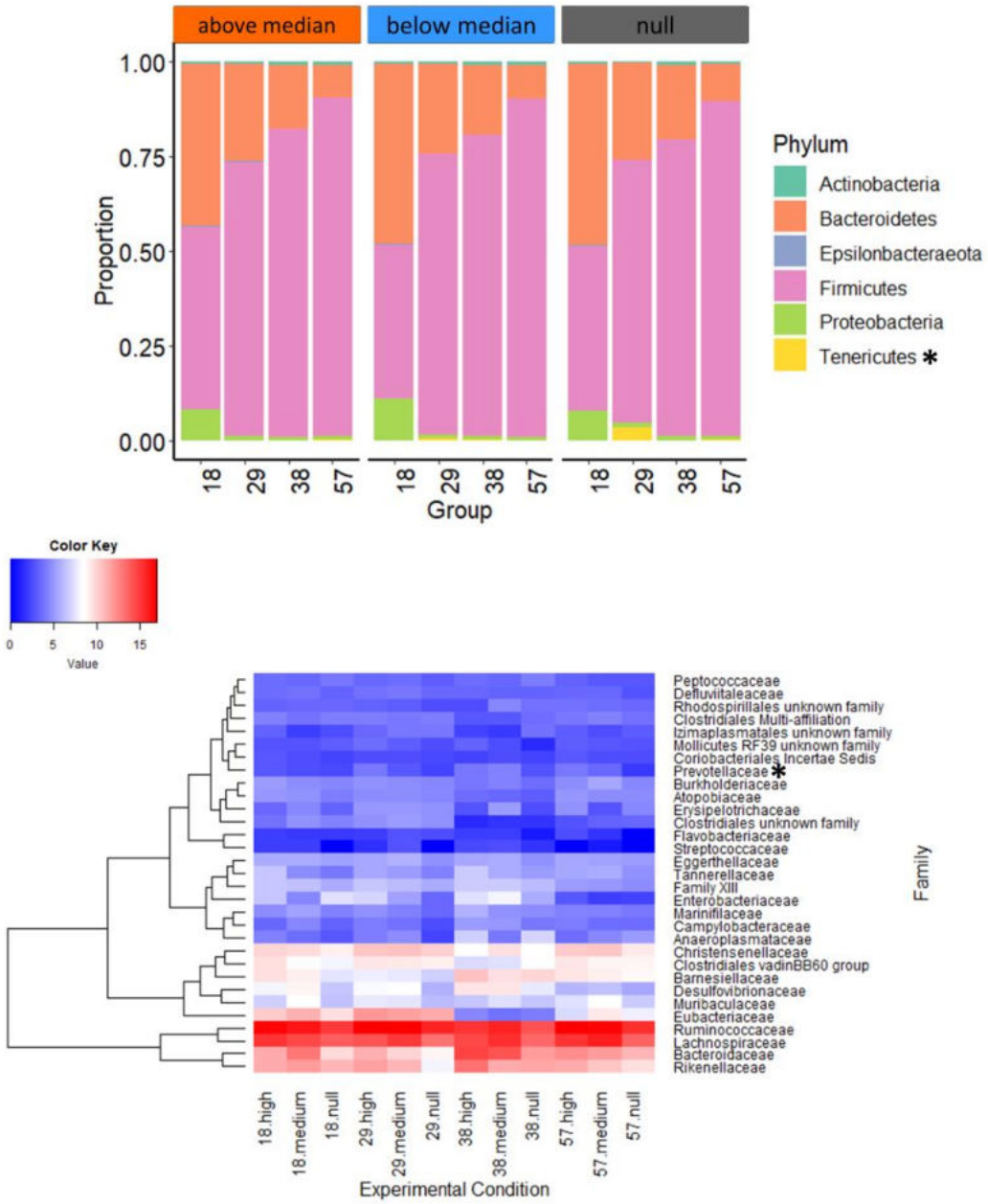


Figure 7: Phylum **(A)** and family **(B)** distributions according to early food intake level. The heatmap was built with rarefied counts data after fourth root transformation. Null group: no food intake corresponding to the ten CONTROL group litters, Below median group: with an intake under 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters) and Above median group: an intake over 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters).

3.5 Cecal activity and gut morphology

No differences were observed between prebiotics supplementation groups or early food ingestion intake level groups on cecal fermentative activity at 29, 38 and 57 days (Table 3). Gut characteristics, determined with cecum, cecal digesta, stomach and intestine weights, did not

vary according to prebiotics supplementation groups or early food ingestion intake levels groups (Supplementary Table S3)

Table 3| Influence of early dietary intervention and age on cecal fermentation characteristics. The additive composition of the starter food gels varied according to treatments (FOS: fructo-oligosaccharides, MOS: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided)

Age (days)	Experimental group	pH	NH3 mM	Total VFA mM	Acetate %	Propionate %	Butyrate %	Ratio C3/C4 [1]
29	AF_GEL	5.9	20.1	104	87.3	4.3	8.4	0.58
	FOS_GEL	5.9	17.1	107	86.0	4.2	9.8	0.51
	MOS_GEL	5.8	15.4	118	86.0	3.9	10.2	0.41
	CONTROL	5.9	20.0	104	85.9	5.6	8.8	1.10
38	AF_GEL	5.7	3.4	128	88.1	3.4	8.5	0.42
	FOS_GEL	5.7	3.7	134	88.2	3.7	8.2	0.48
	MOS_GEL	5.8	5.0	124	88.3	4.1	7.7	0.75
	CONTROL	5.8	4.3	126	87.9	3.7	8.5	0.47
57	AF_GEL	5.4	4.1	156	84.2	3.2	12.7	0.26
	FOS_GEL	5.5	2.8	152	85.9	3.0	11.1	0.28
	MOS_GEL	5.7	3.4	141	85.3	3.3	11.4	0.30
	CONTROL	5.6	3.4	146	83.6	3.2	13.2	0.25
P value								
SEM [2]		0.5	2.9	43	1.0	0.6	1.0	0.3
Age		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Group		0.139	0.304	0.327	0.517	0.790	0.556	0.972
Age * Group		0.221	0.502	0.244	0.191	0.791	0.108	0.248

[1]: Ratio C3/C4: ratio propionate/butyrate

[2]: SEM: Standard Error of the Mean

4. Discussion

The past decade has provided abundant data supporting the concept of mammalian-holobionts, meaning that the host forms a whole entity with its microbiota (Rosenberg and Zilber-Rosenberg 2018). In young mammals, progressive implantation of the digestive microbiota initiates this microbiota-host dialogue that conditions the development and stimulation of the immune system (Mage et al. 2006; Al Nabhani et al. 2019). This process is largely impacted by the substrate that arrives in the gut. The weaning transition, i.e. the dietary transition from a milk-based diet to a solid diet, shifts the microbial balance and contributes to digestive maturation (Bian et al. 2016; Forbes et al. 2018; Read et al. 2019). Managing this food transition is therefore crucial for the construction of health and its future preservation. The purposes of our study were in one hand to assess the effects of stimulation of early solid food intake on rabbit microbiota establishment, and on the other hand, to evaluate if two selected prebiotics can be relevant tools to manipulate the developing microbiota. We demonstrated that the quantity of food consumed in early life was a stronger driver of microbiota implantation than the nature of prebiotics supplementation.

Stimulation of early food intake: consequences on rabbit growth and health

In most mammals' organisms, the onset of a solid diet depends on their ability to exhibit food prehension motor, mastication and swallowing patterns (Bels, 2006). The beginning of solid food intake is variable between species: guinea pigs are for example able to process hard food from 1 day-old while feeding activities begin at 18 days in rat pups (German et al. 2006). In rabbit commercial husbandries, rabbits start to consume feed around 17-20 days, once they are mobile enough to leave the nest (Gidenne and Lebas 2006). However, it can be claimed that rabbits are able to ingest solid substrates earlier since wild rabbits were described to be consuming nest materials as early as 8 days after birth (Hudson et Distel, 1982). Furthermore, rabbits start to exhibit coprophagous behaviour within their first week of age (Combes et al.

2014). When pellets differing by size or hardness were provided directly in the nest in a situation of choice, pups consumed them from 8 days of age and expressed dietary preferences (Paës et al., 2019). Considering previous results on young rabbit feeding behavior, we designed a starter food in a gel form rich in moisture, adapted to the suckling rabbit physiological and physical constraints. It was supplemented with attractive vanilla flavor to take advantages of the fully-developed olfaction system of rabbit neonates (Coureaud et al., 2001; Schaal et al., 2003). This starter food gel was provided in the nest with an easy access in an attempt to mimic the food nibbling observed in natural conditions. We opted to include prebiotics in the experimental starter food based on their relevancy to modify rabbit microbiota implantation and activities (Volek et al. 2007; Bovera et al. 2010; Oso et al. 2013), and based on the presence of oligosaccharides in milk as essential driver of gastrointestinal microbiota composition (Borewicz et al., 2019). Wishing to promote rabbit microbiota maturation, we selected non-milk-derived oligosaccharides prebiotics. Therefore, we provided fructo-oligosaccharides (FOS) in one experimental condition, which are known to stimulate Bifidobacteria and Lactobacilli growth but can also target other species from Actinobacteria phylum or Olsenella genus for example as recently emphasized by Mao et al. (2015). In another group, we distributed mannan-oligosaccharides (MOS), which were found to block enteric pathogens colonization in numerous studies (Halas and Nochta 2012), in addition with β-glucans, that have immunomodulating effects (Kogan and Kocher 2007).

In good agreement with the early food intake kinetics previously described (Paës et al., 2019), food intake started as early as 7 days of age and increased exponentially with time. This study confirmed that birth weight was a determining factor of the early solid feed intake. Milk availability, however, was previously reported not to affect solid ingestion during early suckling period whether in the form of pellets (Paës et al 2019) or gel (Paës et al. 2020). Interestingly, the nature of gels provided affected the intake of solids in the nest, with higher ingestion of gels

containing FOS compared to MOS. Prebiotics are known to modify sensory food characteristics, and FOS additives bring a sweet taste similar to that of sucrose (Yun, 1996). Knowing that rabbits are attracted by bitter and sweet aromas (Gidenne, 2015), this taste differences must explain the highest attractiveness of FOS gels. The taste of MOS highly depends on the type of product (distillery, brewery by products or primary grown yeast). The MOS product used in this study was a yeast cell wall with a low protein content processed from primary fermentation, and with no specific flavor donation properties. Another hypothesis to explain ingestion level differences according to prebiotics additives may be rely on their effects on hormones production as described by Cani et al. (2009). These authors demonstrated that prebiotics supplementation in healthy human was associated with an increase of plasmatic gut peptides concentrations that reduced appetite sensation.

Effects of starter food intake on rabbits' growth and mortality were not visible which was not surprising considering the good sanitary conditions during the study. To our knowledge, this study is the first one to highlight variations in cecal IgA contents according to prebiotics supplementation in rabbits although well described in infant receiving formula with prebiotics (Scholtens et al., 2008). IgA are essential for gut homeostasis since they represent first line mucosal defenses by providing non-inflammatory immune protection (Pérez-Berezo et al. 2011). Before weaning, secretory IgA exclusively derived from milk in mice (Rogier et al., 2014) before being produced in the gut after suckling cessation (Shearman et al. 1972). Microbiota modulation induced by starter food could explain the effects on IgA contents observed after weaning since some bacteria can induce the development of isolated lymphoid follicles (Bouskra et al., 2008). Further experiments are now necessary to determine if the higher levels of IgA after FOS early intake are due to the prebiotics itself or the highest levels of solids ingested in this group. Molecular mechanisms of this IgA increase also need to be elucidated to conclude on positive effects of early food intake in rabbits gut health.

Attempts to modulate cecal microbiota with early nutritional interventions

When we tried to discriminate rabbits' microbiota composition according to their prebiotics supplementation before weaning, we obtained unsuccessful partitioning. Nevertheless, when the analysis was performed by considering the variations of starter food intake between litters rather than the nature of the prebiotics provided, better patterns were distinguished. Limited effects of the prebiotics used can be explained by the specificity of the suckling rabbit microbiota. Indeed, in the first two weeks of age, the bacteria density in the cecum and the diversity are low compared to older rabbits (Combes et al. 2011). Lactobacillus, a potential target of FOS, are scarce inhabitants of the digestive tract in rabbits and, even if their growth was stimulated, they poorly adhere to rabbit intestinal epithelial cells (Kovács et al., 2006 ; Yu and Tsen, 1993). Besides, we did not infect the animals with enteric pathogens during this study whose sanitary conditions were good, which could explain why MOS effects on the adhesion of enteropathogenic bacteria were not emphasized. Thus, the young rabbit gut may not be a relevant bacteria reservoir for the prebiotics used, which need to target specific indigenous microorganisms to be effective. What's more, it has to be pointed out that rabbit diets are naturally rich in fibrous ingredients, some of them having significant amounts of oligosaccharides (Falcão E Cunha et al., 2007) which could have hidden effects of prebiotics treatment.

Early life solid food consumption was associated with 219 specific OTUs at 18 days of age, which mainly belong to Lachnospiraceae and Ruminococcaceae families. Members of those families are efficient fermenters of complex plant materials such as cellulose that have been associated with gut health maintenance (Biddle et al., 2013). The role of some Lachnospiraceae strains in butyrate production was demonstrated in vivo, a function that can have subsequent health protective effects notably through colonic Treg induction (Narushima et al., 2014). We observed that high proportions of Paraprevotella genus were also associated with high

consumption of starter foods. Unfortunately, only two species have been described from this genus. One of those two species can breakdown xylans of plant cell walls to produce succinateand acetate (Morotomi et al., 2009). Taken together, those findings may indicate that the small amounts of food ingested at the onset of solid diet are sufficient to prepare the weaning transition by selecting bacteria able to ferment plant-based diets with end products such as butyrate, a well-known promoter of the epithelial barrier (Zheng et al., 2017).

Interestingly, early nutritional intervention had long-term consequences with differential microbiota structures up to 39 days afterwards. We may hypothesize that those subsequent modifications are related to the increase of pellet intake in the feeders during middle nursing period induced by greater starter food consumption. This phenomenon has been well described in pig productions (Pluske et al. 2018) where the suckling pigs offered starter food in a liquid or gruel form in addition with milk increased pellets intake later during nursing period. Since similar feature was observed in suckling rabbits (Paës et al. 2020) and knowing the impact of solid food on bacterial community structures (Koenig et al., 2011; De Rodas et al., 2018) this posterior effect of early food intake simulation on behaviour feeding appears interesting and should be further explored.

Despite some changes in cecal ecosystems induced by the amounts of starter food reaching the gut, it is worthwhile noting that no changes in cecal fermentation activity were observed. We can outline several reasons for this lack of functionality modifications such as the functional redundancy within microbiome (different bacteria populations within a community can perform same functions, Heintz-Buschart and Wilmes 2018). The fact that alpha and beta diversity were not modified by early food intake stimulation and that limited effects on taxonomic profiles were pointed out could also be possible explanations of the lack of cecum functional changes. It is likely than few effects were observed due to interactions with milk substrate, which is still predominant in rabbit's diet up to 25-30 days (Gidenne and al. 2010), with a lactation peak

estimated to be around 19 days of age (Casado et al., 2006). In our previous experiment, we estimated that a total pellet intake of 1.8 g of fresh matter in the nest from 8 to 17 days only amounted to 1.3% of the total milk intake over this period (Paës et al., 2019). Thus, high amounts of milk may have "diluted" the effects of solid supplementation since rabbit milk constrains bacterial community structures (Read et al., 2019). Indeed, mammals milk contains their own microbiota, prebiotics (oligosaccharides), immunoglobulins and other microbiota-shaping compounds such as antimicrobial casein-derived peptides or lipids (Baranyi et al. 2003; van den Elsen et al. 2019) that must induce a selective pressure. This dominant impact of milk consumption was shown in humans cohort studies where the duration of exclusive breastfeeding was a stronger driver for microbial diversity at 9 months of age than the time when solid food was introduced in infant's diet (Laursen et al., 2016). In accordance, previous attempts to modulate rabbit microbiota before weaning with diets change (Xiccato et al. 2003; Read et al. 2019) had moderate effects, possibly due to milk constraint. Another possible explanation for early dietary intervention limitations is the heterogeneity of the solid intake in the nest within litters. A competition might have occurred between rabbits as observed during the nursing (Coureaud et al., 2000) and similarly to pigs, whose variability in individual starter food intake was demonstrated with chromium III oxide marker (Bruininx et al., 2004). In our trial, rabbits were randomly sampled due to the absence of methodology to determine "good eaters" rabbits up to now.

5. Conclusion

Starter food provided in a gel form were accepted by suckling rabbit pups with intake differences according to the kind of gels offered. Gels preferably consumed in the nest were associated with increased solid food intake later in life. Supplementation of prebiotics in early life did not have notable effects on gut microbiota of suckling rabbits before and after weaning. When considering the amounts of starter food ingested instead of the nature of prebiotics

consumed, more pronounced effects on bacteria composition were highlighted. Increased quantities of food consumed in early age seemed to promote the development of microorganisms adapted to plant degradation, which could efficiently prepare the rabbits to weaning transition. Further studies are now necessary to identify optimal gut-shaping starter foods and to confirm subsequent effects on ecosystem functionalities and gut health.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This work was funded by the "Institut Carnot Sciences Animales" (ICSA, France, project eFeedIT-ICSA-2015).

Author Contributions

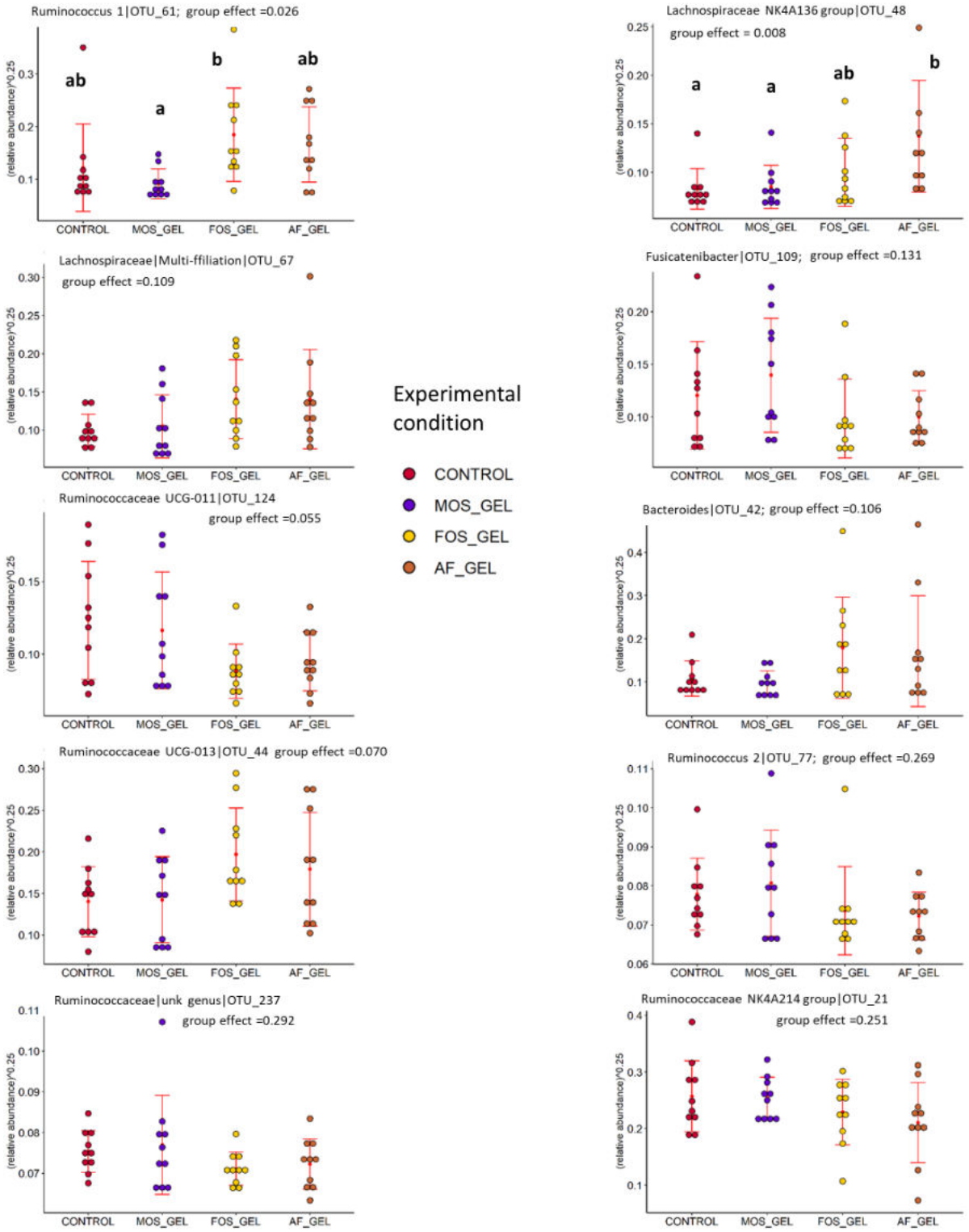
CP, TG, KB, JD, CG, EG, GR and SC conceived and designed the experiments. CP, OB, CB and PA carried out and planned the experiments. CP and SC analyzed the data. CP and SC wrote the manuscript.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge A-M. Debrusse, M. Moulis, and J-M. Bonnemere for their assistance at the rabbit experimental unit, as well as M. Segura and I. Ahn who contributed to sample preparation, C. Bannelier who performed the feed analysis and S. Levade who contributed to ELISA dosages. They also would like to thank M. Beaumont for his valuable remarks regarding data analysis and his careful proofreading. The authors are grateful to the Genotoul bioinformatics platform Toulouse Midi-Pyrenees and Sigenae group for providing

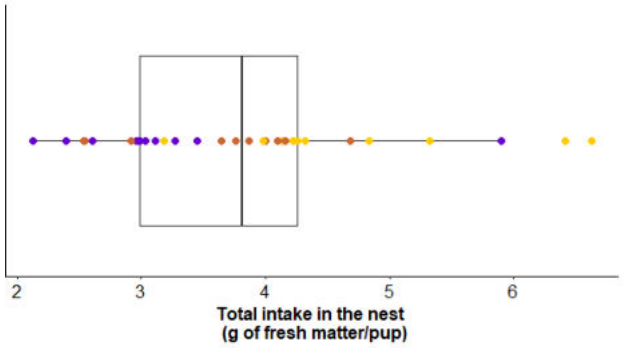
computing and storage resources thanks to Galaxy instance http://sigenae-workbench.toulouse.inra.fr.

Supplementary Figure S1: Relative abundance of the top 10 discriminant OTUs at 18 days of age according to early nutritional intervention. The additive composition of the gels varied according to treatments (FOS: fructo-oligosaccharides, MOS: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided). Mean ±Standard Deviation



Supplementary Figure S2: Repartition of the litters according to their total starter food gel intake and their early nutritional intervention **A.** Total intake in the nest of starter food gel (FOS_GEL: gel with fructo-oligosaccharides additive ; MOS_GEL gel with a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes ; AF_GEL: no additive in the starter food gel). **B.** Origin of the litters according to early nutritional intervention (row) and their repartition according to the new categorial variable base on the total starter food intake in the nest (Null group: no food intake corresponding to the ten CONTROL group litters, Below median group: with an intake under 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, n=15 litters and Above median group: an intake over 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, n=15 litters).

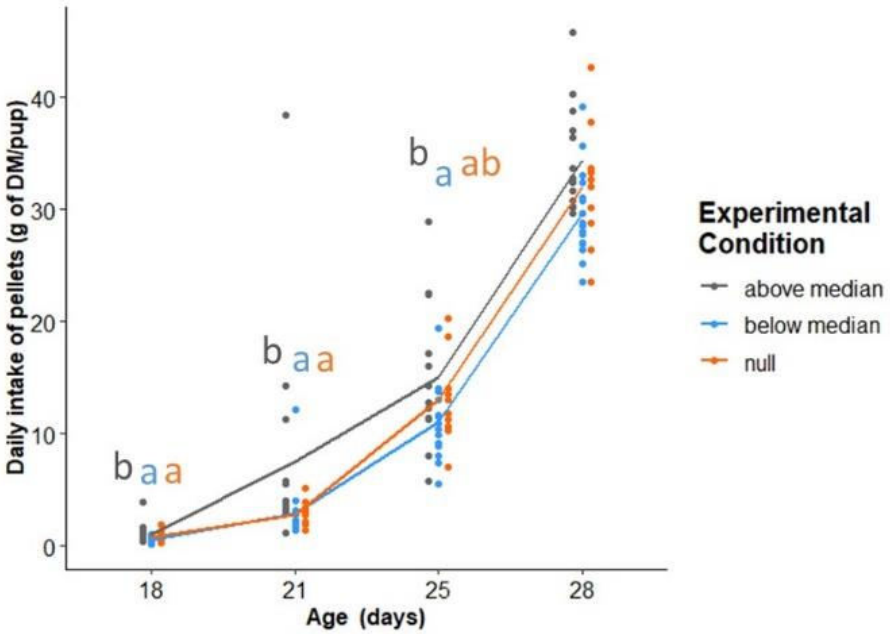
A.



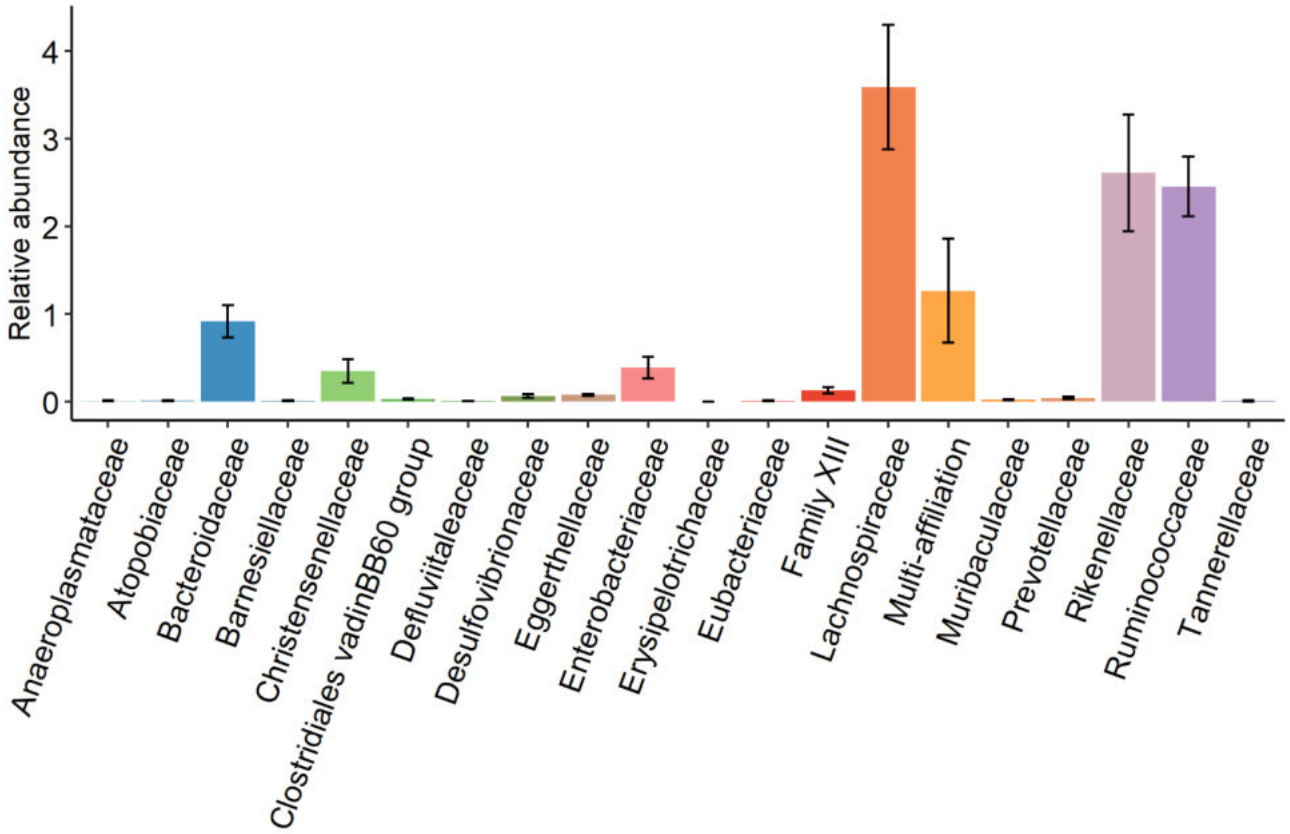
B.

	Above media	Below media	Null
Control	0/10	0/10	10/1
FOS_GEL	9/10	1/10	0/10
MOS_GE	1/10	9/10	0/10
AF_GEL	5/10	5/10	0/10

Supplementary Figure S3: Long-term effects of early intake levels on subsequent pellets intake before weaning. Null group: no food intake corresponding to the ten CONTROL group litters, Below median group: with an intake under 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters) and Above median group: an intake over 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters)). Significant differences between experimental groups found within ages are represented with different letters.

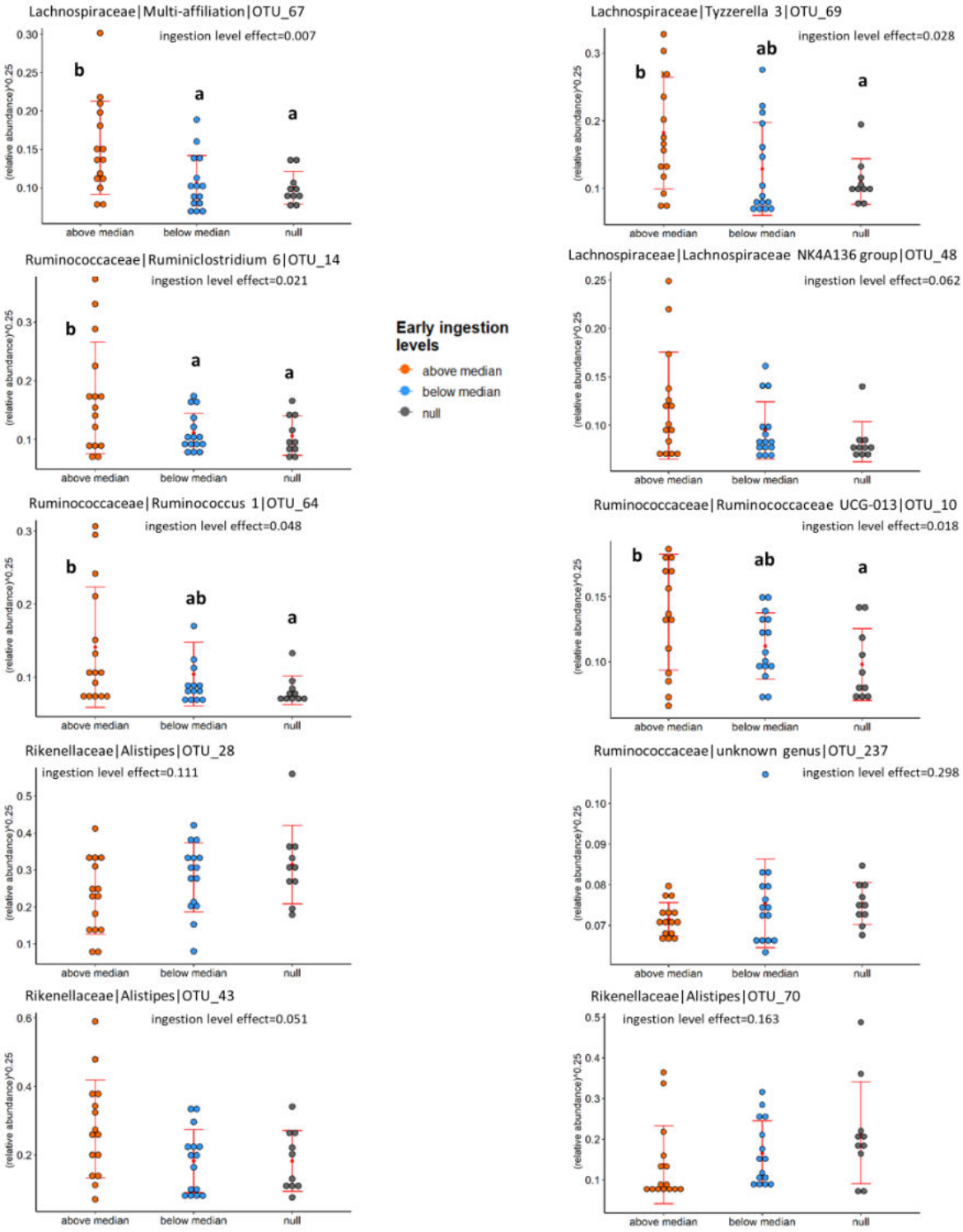


Supplementary Figure S4: Relative abundance of the 219 OTUs shared by at least 75% of the rabbits provided with early food gels in the nest



Supplementary Figure S5: Relative abundance of the top 10 discriminant OTUs at 18 days of age according to starter food gel ingestion level

Null group: no food intake corresponding to the ten CONTROL group litters, Below median group: with an intake under 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters) and Above median group: an intake over 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters).

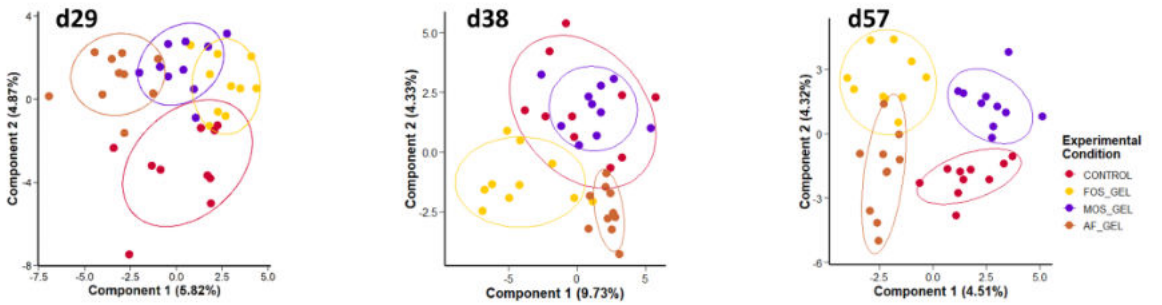


Supplementary Figure S6: Partial least square discriminant analysis at d29, d38 and d57 according to experimental groups **(A)** or based on early food intake levels **(B)**.

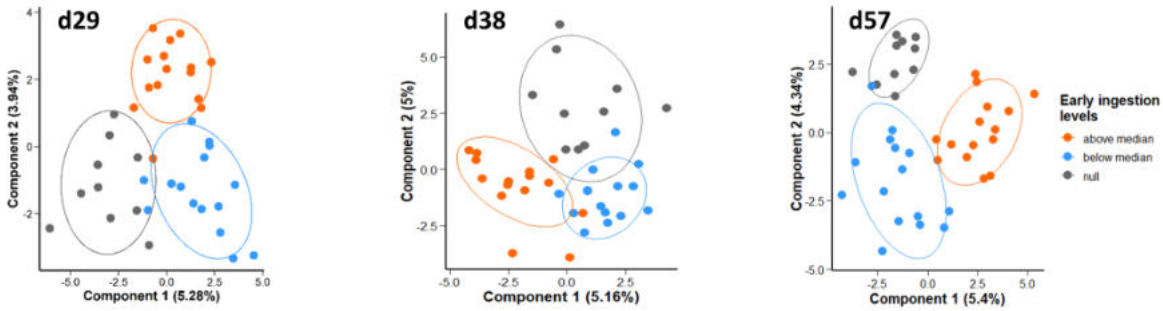
FOS_GEL: gel with fructo-oligosaccharides additive ; MOS_GEL gel with a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes ; AF_GEL: no additive in the starter food gel).

Null group: no food intake corresponding to the ten CONTROL group litters, Below median group: with an intake under 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters) and Above median group: an intake over 3.8 g of fresh gel consumed/rabbit, (n=15 litters)).

A.



B.



Supplementary Tables

Supplementary Table S1| Effects of early nutritional interventions on subsequent intake of pre-weaning pellets (mean ± standard deviation). Different letters stand for significant differences revealed after multiple paired comparisons with Bonferroni corrections. FOS: fructo-oligosaccharides, MOS: a mixture of mannan-oligosaccharides and β-glucanes, AF: no additive in the starter food gel, CONTROL: no starter food gel provided)

	CONTROL	FOS_GEL	MOS_GEL	AF_GEL
Food intake (g/pup/day)				
15-18 days	0.8 ± 0.5 [ab]	1.2 ± 1.0 [b]	0.6 ± 0.4 [a]	0.6 ± 0.3 [a]
18-21 days	2.6 ± 1.2 [a]	8.4 ± 11.1 [b]	4.3 ± 4.1 [a]	2.9 ± 1.1 [a]
21-25 days	12.8 ± 3.8	16.7 ± 6.3	10.9 ± 4.8	12.2 ± 2.2
25-28 days	31.8 ± 5.3	34.7 ± 5.4	30.4 ± 5.1	31.9 ± 4.0
28-32 days	46.0 ± 7.4	44.9 ± 4.7	43.2 ± 5.5	42.3 ± 8.5
32-35 days	51.5 ± 15.6	57.0 ± 17.1	55.4 ± 16.5	5.7 ± 15.8
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.059				
Age*Group effect: P=0.014				

Supplementary Table S2| Early nutritional interventions did not affect growth performances before and after weaning. Values are mean ± standard deviation

	CONTROL	FOS_GEL	MOS_GEL	AF_GEL
Weight before weaning (g/rabbit)				
3 days	98 ± 4	101 ± 8	95 ± 16	99 ± 10
14 days	293 ± 19	291 ± 32	303 ± 20	296 ± 21
21 days	411 ± 32	403 ± 60	437 ± 32	413 ± 46
28 days	698 ± 38	697 ± 65	707 ± 33	704 ± 44
35 days	1009 ± 104	993 ± 129	1028 ± 111	1027 ± 110
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.735				
*Age * Group effect: P=0.423*				
Weight after weaning (g/rabbit)				
50 days	1665 ± 150	1666 ± 208	1656 ± 215	1709 ± 111
64 days	2233 ± 173	2236 ± 290	2245 ± 273	2279 ± 131
Age effect: : P<0.001				
Group effect: P=0.666				
Sex effect: P=0.627				
*Age * Group effect: P=0.020*				
Average daily gain before weaning (g/day)				
3 – 21 days	17.4 ± 1.7	16.8 ± 3.3	19.0 ± 1.7	17.5 ± 2.5
Group effect: P=0.174				
21 – 35 days	42.9 ± 3.0	42.8 ± 3.5	42.3 ± 3.5	43.7 ± 3.1
Group effect: P=0.790				
Average daily gain after weaning (g/day)				
35 – 50 days	44.0 ± 6.9	44.6 ± 8.0	41.5 ± 11.4	45.1 ± 5.0
Group effect:P=0.248				
Sex effect: P=0.999				
35 – 64 days	43.6 ± 6.1	42.9 ± 7.5	44.1 ± 7.5	43.1 ± 5.4
Group effect:P=0.143				
Sex effect: P=0.808				

Supplementary Table S3| Early nutritional interventions did not modify the development of gastrointestinal tract (mean ± standard deviation).

	CONTROL	FOS_GEL	MOS_GEL	AF_GEL
Cecum weight (tissue + digesta, in grams)				
18 days	4.8 ± 1.2	4.8 ± 1.6	5.4 ± 1.2	5.7 ± 1.1
29 days	39.4 ± 9.4	35.2 ± 6.0	38.3 ± 7.6	37.8 ± 10.5
38 days	82.0 ± 5.3	84.5 ± 11.0	83.0 ± 15.3	80.4 ± 6.9
57 days	169.2 ± 24.1	156.8 ± 18.2	155.6 ± 26.4	174.4 ± 17.8
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.889				
*Age * Group effect: P=0.517*				
Cecum empty weight (g)				
18 days	3.2 ± 0.4	3.0 ± 0.5	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.3
29 days	4.8 ± 1.4	4.3 ± 1.2	4.7 ± 1.2	4.7 ± 1.2
38 days	18.4 ± 1.8	19.5 ± 1.7	18.8 ± 2.2	19.1 ± 2.6
57 days	31.5 ± 3.7	30.1 ± 3.0	31.2 ± 4.5	30.7 ± 2.3
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.859				
*Age * Group effect: P=0.486*				
Ratio cecum weight / body weight (%)				
18 days	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3
29 days	5.1 ± 1.3	4.4 ± 0.6	4.8 ± 0.8	4.9 ± 1.4
38 days	6.9 ± 0.5	7.1 ± 1.1	6.9 ± 0.9	6.7 ± 0.4
57 days	8.4 ± 1.2	8.2 ± 1.1	7.9 ± 0.9	8.8 ± 0.8
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.820				
*Age * Group effect: P=0.806*				
Stomach weight (tissue + digesta, in grams)				
18 days	11.7 ± 3.4	10.0 ± 3.6	11.5 ± 3.2	13.3 ± 1.3
29 days	9.0 ± 1.8	8.7 ± 1.0	9.8 ± 1.6	9.6 ± 0.8
38 days	7.2 ± 1.4	7.0 ± 1.4	6.8 ± 1.2	6.4 ± 0.7
57 days	7.9 ± 1.5	7.5 ± 0.9	7.7 ± 1.1	8.4 ± 1.2
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.286				
*Age * Group effect: P=0.318*				
Small intestine + colon weights (tissue + digesta, in grams)				
18 days	14.7 ± 2.2	15.3 ± 3.3	16.5 ± 2.0	15.4 ± 1.6
29 days	52.8 ± 8.6	52.2 ± 7.0	53.6 ± 5.9	50.1 ± 7.1
38 days	98.6 ± 11.2	99.4 ± 15.3	99.0 ± 18.6	96.2 ± 10.8
57 days	170.1 ± 21.2	164.8 ± 17.7	162.1 ± 27.9	170.9 ± 17.3
Age effect: P<0.001				
Group effect: P=0.921				
*Age * Group effect: P=0.741*				

References

Al Nabhani, Z., Dulauroy, S., Marques, R., Cousu, C., Al Bounny, S., Déjardin, F., et al. (2019). A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. Immunity 50, 1276-1288.e5. doi:10.1016/j.immuni.2019.02.014.

Argüello, H., Estellé, J., Zaldívar-López, S., Jiménez-Marín, Á., Carvajal, A., López-Bascón, M. A., et al. (2018). Early Salmonella Typhimurium infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. Sci Rep 8. doi:10.1038/s41598-018-26083-3.

Baranyi, M., Thomas, U., and Pellegrini, A. (2003). Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (Oryctolagus cuniculus) milk. Journal of Dairy Research 70, 189–197.

Bäuerl, C., Collado, M. C., Zúñiga, M., Blas, E., and Martínez, G. P. (2014). Changes in Cecal Microbiota and Mucosal Gene Expression Revealed New Aspects of Epizootic Rabbit Enteropathy. PLoS ONE 9. doi:10.1371/journal.pone.0105707.

Bels, V. L. (2006). Feeding in Domestic Vertebrates: From Structure to Behaviour. CABI.

Benson, A. K., Kelly, S. A., Legge, R., Ma, F., Low, S. J., Kim, J., 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. U.S.A. 107, 18933–18938. doi:10.1073/pnas.1007028107.

Bian, G., Ma, S., Zhu, Z., Su, Y., Zoetendal, E. G., Mackie, R., et al. (2016). Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. Environ. Microbiol. 18, 1566–1577. doi:10.1111/1462-2920.13272.

Biddle, A., Stewart, L., Blanchard, J., and Leschine, S. (2013). Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. Diversity 5, 627–640. doi:10.3390/d5030627.

Bode, L. (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. Glycobiology 22, 1147–1162. doi:10.1093/glycob/cws074.

Borewicz, K., Suarez-Diez, M., Hechler, C., Beijers, R., Weerth, C. de, Arts, I., et al. (2019). The effect of prebiotic fortified infant formulas on microbiota composition and dynamics in early life. Sci Rep 9, 1–13. doi:10.1038/s41598-018-38268-x.

Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., et al. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. Nature 456, 507–510. doi:10.1038/nature07450.

Bovera, F., Lestingi, A., Marono, S., Iannaccone, F., Nizza, S., Mallardo, K., et al. (2012). Effect of dietary mannan-oligosaccharides on in vivo performance, nutrient digestibility and caecal content characteristics of growing rabbits. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 96, 130–136.

Bovera, F., Nizza, S., Marono, S., Mallardo, K., Piccolo, G., Tudisco, R., et al. (2010). Effect of mannan oligosaccharides on rabbit performance, digestibility and rectal bacterial anaerobic populations during an episode of epizootic rabbit enteropathy. World Rabbit Science 18, 9–16.

Bruininx, E. M. a. M., Schellingerhout, A. B., Binnendijk, G. P., Peet-Schwering, C. M. C. van der, Schrama, J. W., Hartog, L. A. den, et al. (2004). Individually assessed creep food consumption by suckled piglets: influence on post-weaning food intake characteristics and indicators of gut structure and hind-gut fermentation. Animal Science 78, 67–75. doi:10.1017/S1357729800053856.

Cani, P. D., Lecourt, E., Dewulf, E. M., Sohet, F. M., Pachikian, B. D., Naslain, D., et al. (2009). Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. The American Journal of Clinical Nutrition 90, 1236–1243. doi:10.3945/ajcn.2009.28095.

Casado, C., Piquer, O., Cervera, C., and Pascual, J. J. (2006). Modelling the lactation curve of rabbit does: Towards a model including fit suitability and biological interpretation. Livestock Science 99, 39–49. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.05.019.

Choi, J. H., Wang, K., Zhang, D., Zhan, X., Wang, T., Bu, C.-H., et al. (2017). IgD class switching is initiated by microbiota and limited to mucosa-associated lymphoid tissue in mice. PNAS 114, E1196–E1204. doi:10.1073/pnas.1621258114.

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. Journal of Animal Science 92, 652–665. doi:10.2527/jas.2013-6394.

Combes, S., Michelland, R. J., Monteils, V., Cauquil, L., Soulie, V., Tran, N. U., et al. (2011). Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. Fems Microbiology Ecology 77, 680–9. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01148.x.

Coppa, G. V., Bruni, S., Morelli, L., Soldi, S., and Gabrielli, O. (2004). The first prebiotics in humans: human milk oligosaccharides. J. Clin. Gastroenterol. 38, S80-83. doi:10.1097/01.mcg.0000128926.14285.25.

Coureaud, G., Schaal, B., Coudert, P., Rideaud, P., Fortun-Lamothe, L., Hudson, R., et al. (2000). Immediate postnatal suckling in the rabbit: its influence on pup survival and growth. Reproduction Nutrition Development 40, 19–32.

Coureaud, G., Schaal, B., Langlois, D., and Perrier, G. (2001). Orientation response of newborn rabbits to odours of lactating females: relative effectiveness of surface and milk cues. Animal Behaviour 61, 153–162.

De Rodas, B., Youmans, B. P., Danzeisen, J. L., Tran, H., and Johnson, T. J. (2018). Microbiome profiling of commercial pigs from farrow to finish. J Anim Sci 96, 1778–1794. doi:10.1093/jas/sky109.

Donner, A., and Banting, D. (1989). Adjustment of Frequently Used Chi-square Procedures for the Effect of Site-to-Site Dependencies in the Analysis of Dental Data. J Dent Res 68, 1350–1354. doi:10.1177/00220345890680091201.

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics 34, 1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791.

Falcão E Cunha, L., Castro-Solla, L., Maertens, L., Marounek, M., Pinheiro, V., Freire, J., et al. (2007). Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: A review. World Rabbit Science 15, 127–140.

Filípek, J., and Dvořák, R. (2009). Determination of the Volatile Fatty Acid Content in the Rumen Liquid: Comparison of Gas Chromatography and Capillary Isotachophoresis. Acta Vet. Brno 78, 627–633. doi:10.2754/avb200978040627.

Forbes, J. D., Azad, M. B., Vehling, L., Tun, H. M., Konya, T. B., Guttman, D. S., et al. (2018). Association of Exposure to Formula in the Hospital and Subsequent Infant Feeding Practices With Gut Microbiota and Risk of Overweight in the First Year of Life. JAMA Pediatr 172, e181161–e181161. doi:10.1001/jamapediatrics.2018.1161.

Fortun-Lamothe, L., Gidenne, T., Lapanouse, A., and De Dapper, J. (2000). Technical note : An original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother - young relations. World Rabbit Science 8, 177–180.

German, R. Z., Crompton, A. W., and Thexton, A. J. (2006). "Ontogeny of feeding in mammals.," in Feeding in domestic vertebrates: from structure to behaviour, ed. V. Bels (Wallingford: CABI), 50–60. doi:10.1079/9781845930639.0050.

Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 14, 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75.

Gidenne, T. (2015). Le lapin. De la biologie à l'élevage. Quae éditions Available at: http://www.quae.com/fr/r4796-le-lapin.html.

Gidenne, T., Combes, S., and Fortun-Lamothe, L. (2012). Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. animal 6, 1407–1419. doi:10.1017/S1751731112000389.

Gidenne, T., and Lebas, F. (2006). "Feeding behaviour in rabbits.," in Feeding in domestic vertebrates: from structure to behaviour, ed. V. Bels (Wallingford: CABI), 179–194. doi:10.1079/9781845930639.0179.

Gidenne, T., Lebas, F., and Fortun-Lamothe, L. (2010). "Feeding behaviour of rabbits," in Nutrition of the rabbit, eds. C. De Blas and J. Wiseman (CABI; Wallingford; UK), 233–252. doi:10.1079/9781845936693.0233.

Halas, V., and Nochta, I. (2012). Mannan Oligosaccharides in Nursery Pig Nutrition and Their Potential Mode of Action. Animals (Basel) 2, 261–274. doi:10.3390/ani2020261.

Heintz-Buschart, A., and Wilmes, P. (2018). Human Gut Microbiome: Function Matters. Trends in Microbiology 26, 563–574. doi:10.1016/j.tim.2017.11.002.

Hooper, L. V., Littman, D. R., and Macpherson, A. J. (2012). Interactions Between the Microbiota and the Immune System. Science 336, 1268–1273. doi:10.1126/science.1223490.

Hudson, R., and Distel, H. (1982). The Pattern of Behaviour of Rabbit Pups in the Nest. Behaviour 79, 255–271.

Jin, D. X., Zou, H. W., Liu, S. Q., Wang, L. Z., Xue, B., Wu, D., et al. (2018). The underlying microbial mechanism of epizootic rabbit enteropathy triggered by a low fiber diet. Sci Rep 8, 1–15. doi:10.1038/s41598-018-30178-2.

Kacsala, L., Szendrő, Z., Gerencsér, Z., Radnai, I., Kovács, M., Kasza, R., et al. (2018). Early solid additional feeding of suckling rabbits from 3 to 15 days of age. Animal 12, 28–33. doi:10.1017/S1751731117001367.

Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., and Núñez, G. (2013). Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. Nat Immunol 14, 685–690. doi:10.1038/ni.2608.

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 Suppl 1, 4578–4585. doi:10.1073/pnas.1000081107.

Kogan, G., and Kocher, A. (2007). Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. Livestock Science 109, 161–165.

Kovács, M., Szendrõ, Zs., Milisits, G., Biro-Nemeth, E., Radnai, I., Posa, R., et al. (2006). Effect of nursing method and faeces consumption on the development of bacetroides,

lactobacillus and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. Reprod. Nutr. Dev. 46, 205–210.

Lanning, D. K., Rhee, K. J., and Knight, K. L. (2005). Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. Trends in Immunology 26, 419–425.

Lanning, D., Sethupathi, P., Rhee, K.-J., Zhai, S.-K., and Knight, K. L. (2000). Intestinal Microflora and Diversification of the Rabbit Antibody Repertoire. The Journal of Immunology 165, 2012–2019. doi:10.4049/jimmunol.165.4.2012.

Laursen, M. F., Andersen, L. B. B., Michaelsen, K. F., Mølgaard, C., Trolle, E., Bahl, M. I., et al. (2016). Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. mSphere 1. doi:10.1128/mSphere.00069-15.

Le Cao, K-A., Rohart, F., Gonzalez, I., Dejean, S. (2016). mixOmics: Omics Data Integration Project. R package version 6.1.1. https://CRAN.R-project.org/package=mixOmics

Mackie, R. I., Sghir, A., and Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 69, 1035S – 1045.

Maertens, L., Lebas, F., and Szendro, Z. S. (2010). Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. World Rabbit Science 14, 205–230.

Mage, R. G., Lanning, D., and Knight, K. L. (2006). B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissues. Developmental & Comparative Immunology 30, 137–153. doi:10.1016/j.dci.2005.06.017.

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, and Dunthorn, M. (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. PeerJ 2, e593. doi:10.7717/peerj.593.

Mao, B., Li, D., Zhao, J., Liu, X., Gu, Z., Chen, Y. Q., et al. (2015). Metagenomic Insights into the Effects of Fructo-oligosaccharides (FOS) on the Composition of Fecal Microbiota in Mice. J. Agric. Food Chem. 63, 856–863. doi:10.1021/jf505156h.

McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLOS ONE 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.

Morotomi, M., Nagai, F., Sakon, H., and Tanaka, R. (2009). Paraprevotella clara gen. nov., sp. nov. and Paraprevotella xylaniphila sp. nov., members of the family “Prevotellaceae” isolated from human faeces. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY 59, 1895–1900. doi:10.1099/ijs.0.008169-0.

Motta, V., Luise, D., Bosi, P., and Trevisi, P. (2019). Faecal microbiota shift during weaning transition in piglets and evaluation of AO blood types as shaping factor for the bacterial community profile. PLOS ONE 14, e0217001. doi:10.1371/journal.pone.0217001.

Narushima, S., Sugiura, Y., Oshima, K., Atarashi, K., Hattori, M., Suematsu, M., et al. (2014). Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. Gut Microbes 5, 333–339. doi:10.4161/gmic.28572.

Olszak, T., An, D., Zeissig, S., Vera, M. P., Richter, J., Franke, A., et al. (2012). Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. Science 336, 489–493. doi:10.1126/science.1219328.

Oso, A. O., Idowu, O. M. O., Haastrup, A. S., Ajibade, A. J., Olowonefa, K. O., Aluko, A. O., et al. (2013). Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. Livestock Science 157, 184–190. doi:10.1016/j.livsci.2013.06.017.

Padilha, M. T. S., Licois, D., Gidenne, T., and Carré, B. (1999). Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively milk-fed young rabbits. Reproduction Nutrition Development 39, 223–230.

Paës, C., Fortun-Lamothe, L., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guené-Grand, E., et al. (2019). Onset of feed intake of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. Animal Feed Science and Technology 255, 114223. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.114223.

Paës, C., Fortun-Lamothe, L., Coureaud, G., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., et al. (2020). Insights into suckling rabbit feeding behaviour: acceptability of different creep feed presentations and attractiveness for sensory feed additives.

Pérez-Berezo Teresa, Franch Angels, Ramos-Romero Sara, Castellote Cristina, Pérez-Cano Francisco J., and Castell Margarida (2011). Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. Molecular Nutrition & Food Research 55, S56–S66. doi:10.1002/mnfr.201000588.

Pluske, J. R., Turpin, D. L., and Kim, J.-C. (2018). Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. Animal Nutrition 4, 187–196. doi:10.1016/j.aninu.2017.12.004.

Princée, F. P. G. (2016). Exploring Studbooks for Wildlife Management and Conservation. Springer.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219.

Read, T., Fortun-Lamothe, L., Pascal, G., Le Boulch, M., Cauquil, L., Gabinaud, B., et al. (2019). Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. Front. Microbiol. 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00973.

Reed, J. F. (2004). Adjusted Chi-Square Statistics: Application to Clustered Binary Data in Primary Care. Ann Fam Med 2, 201–203. doi:10.1370/afm.41.

Respondek, F., Gerard, P., Bossis, M., Boschat, L., Bruneau, A., Rabot, S., et al. (2013). Short-chain fructo-oligosaccharides modulate intestinal microbiota and metabolic parameters of humanized gnotobiotic diet induced obesity mice. PLoS ONE 8, e71026. doi:10.1371/journal.pone.0071026.

Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., and Monteils, V. (2014). Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. Journal of Applied Microbiology 116, 245–257. doi:10.1111/jam.12405.

Rogier, E. W., Frantz, A. L., Bruno, M. E. C., Wedlund, L., Cohen, D. A., Stromberg, A. J., et al. (2014). Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 3074–3079. doi:10.1073/pnas.1315792111.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., and Mahé, F. (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ 4, e2584. doi:10.7717/peerj.2584.

Rosenberg, E., and Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. Microbiome 6. doi:10.1186/s40168-018-0457-9.

Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., and Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. Nature 424, 68–72. doi:10.1038/nature01739.

Scholtens, P. A. M. J., Alliet, P., Raes, M., Alles, M. S., Kroes, H., Boehm, G., et al. (2008). Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. J. Nutr. 138, 1141–1147. doi:10.1093/jn/138.6.1141.

Sekirov, I., and Finlay, B. B. (2009). The role of the intestinal microbiota in enteric infection. The Journal of Physiology 587, 4159–4167. doi:10.1113/jphysiol.2009.172742.

Shearman, D. J., Parkin, D. M., and McClelland, D. B. (1972). The demonstration and function of antibodies in the gastrointestinal tract. Gut 13, 483–499.

Torow, N., and Hornef, M. W. (2017). The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. The Journal of Immunology 198, 557–563. doi:10.4049/jimmunol.1601253.

van den Elsen, L. W. J., Garssen, J., Burcelin, R., and Verhasselt, V. (2019). Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gateway to Allergy Prevention? Front. Pediatr. 7. doi:10.3389/fped.2019.00047.

Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., and Dekkers, E. M. J. (1977). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. Water Res 12, 399–402.

Verkhnyatskaya, S., Ferrari, M., de Vos, P., and Walvoort, M. T. C. (2019). Shaping the Infant Microbiome With Non-digestible Carbohydrates. Front Microbiol 10, 343. doi:10.3389/fmicb.2019.00343.

Volek, Z., Marounek, M., and Skrivanova, V. (2007). Effect of a starter diet supplementation with mannan-oligosaccharide or inulin on health status, caecal metabolism, digestibility of nutrients and growth of early weaned rabbits. Animal 1, 523–530.

Wong, R. C. W., Favaloro, E. J., Pollock, W., Wilson, R. J., Hendle, M. J., Adelstein, S., et al. (2004). A multi-centre evaluation of the intra-assay and inter-assay variation of commercial and in-house anti-cardiolipin antibody assays. Pathology 36, 182–192. doi:10.1080/00313020410001672037.

Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 486, 222–227. doi:10.1038/nature11053.

Yu, B., and Tsen, H. Y. (1993). Lactobacillus cells in the rabbit digestive tract and factors affecting their distribution. J. Appl. Bact. 75, 269–275.

Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. Enzyme and Microbial Technology 19, 107–117. doi:10.1016/0141-0229(95)00188-3.

Zarrow, M. X., Denenberg, V. H., and Anderson, C. O. (1965). Rabbit: frequency of suckling in the pup. Science 150, 1835–1836. doi:10.1126/science.150.3705.1835.

Zheng, L., Kelly, C. J., Battista, K. D., Schaefer, R., Lanis, J. M., Alexeev, E. E., et al. (2017). Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. J. Immunol. 199, 2976–2984. doi:10.4049/jimmunol.1700105.

Discussion générale

Une action ciblée permettant de contrôler l'implantation du microbiote intestinal par voie nutritionnelle afin d'exploiter les services offerts à l'hôte représente une stratégie innovante de préservation de la santé du lapin. Dans mon travail de thèse nous avons posé l'hypothèse que la modulation du microbiote induite par des apports d'aliments solides à un stade précoce favoriserait son dialogue avec l'hôte, garantissant ainsi un développement et un apprentissage optimal du système immunitaire du lapereau. **Notre objectif de recherche était de mieux comprendre les déterminants de l'ingestion solide précoce du lapereau allaité pour la stimuler, de manière à promouvoir l'installation d'un microbiote digestif favorable à la santé de l'hôte.** Toutefois, l'offre actuelle en solutions nutritionnelles pour le jeune lapereau est limitée du fait d'une méconnaissance de ses préférences alimentaires d'une part et de ses besoins d'autre part.

Dans ce contexte, les travaux réalisés pendant cette thèse visaient à :

1) Développer un dispositif de mise à disposition précoce d'aliment qui se présenterait sous la forme d'un support nutritionnel permettant d'optimiser l'ingestion solide volontaire au début de la vie
2) Améliorer nos connaissances relatives aux besoins nutritionnels du lapereau pour sa croissance autour du sevrage
3) Évaluer les effets d'une ingestion précoce d'aliment solide sur la composition et le fonctionnement du microbiote digestif et sur la co-maturation du système immunitaire

L'investigation du comportement alimentaire du lapereau allaité via des mesures quantitatives d'ingestion volontaire a été réalisée pour la première fois au cours de cette thèse. Dans le cadre de ce travail, un dispositif de mise à disposition d'aliment solide dans le nid a été développé avec des propositions de présentations de l'aliment innovantes. En parallèle, nous avons pu étudier les facteurs affectant la motivation du lapereau à consommer un aliment au nid ainsi que la cinétique de son ingestion solide précoce. La force de nos études nutritionnelles (essais 5 et 6) a consisté à proposer des aliments expérimentaux ne différant que par deux composantes nutritionnelles (amidon et fibres digestibles) avec des mesures de digestibilité avant sevrage sur une période de temps explorée de façon inédite. Enfin le couplage de plusieurs

approches dans nos trois derniers essais a permis d'apporter une nouvelle lumière sur les conséquences physiologiques d'une alimentation précoce. Ainsi, en plus de l'analyse de données de performances en élevage (suivi de croissance jusqu'à la vente des animaux), ont été combinées l'étude du microbiote et métabolome intestinal, l'étude de l'expression de gènes de la muqueuse digestive de l'hôte ainsi que des mesures d'immunité humorale et de stress oxydatif.

Nous présenterons dans un premier temps une analyse de nos stratégies expérimentales et méthodologiques afin de discuter de leur pertinence et limites pour répondre à nos objectifs expérimentaux. Les clés identifiées pour stimuler l'ingestion d'aliment chez le lapereau seront ensuite discutées. Notre nouvelle compréhension des besoins nutritionnels du lapereau allaité sera examinée. Enfin nous discuterons des changements de profils taxonomiques induits par des interventions nutritionnelles précoces et des potentialités de ces changements pour améliorer la santé de l'hôte.

I/ Intérêts et limites de nos stratégies expérimentales et méthodologiques

A) Stratégies expérimentales suivant une démarche analytique et incrémentale

Afin de répondre à notre objectif final d'orientation précoce du microbiote, nos études se sont succédées de façon interdépendantes et chaque protocole s'est construit à partir des enseignements tirés des expérimentations antérieures selon une démarche analytique et incrémentale (Figure 29). Cette procédure nous a permis d'aboutir à un dispositif expérimental d'ingestion précoce optimisé et de mieux cibler les périodes critiques.

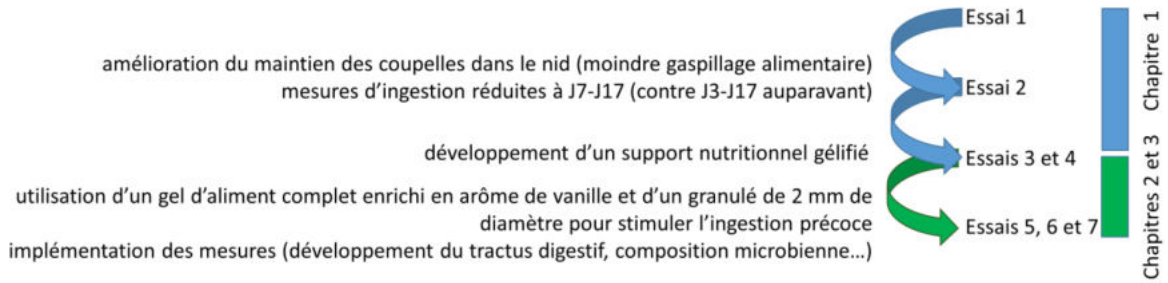
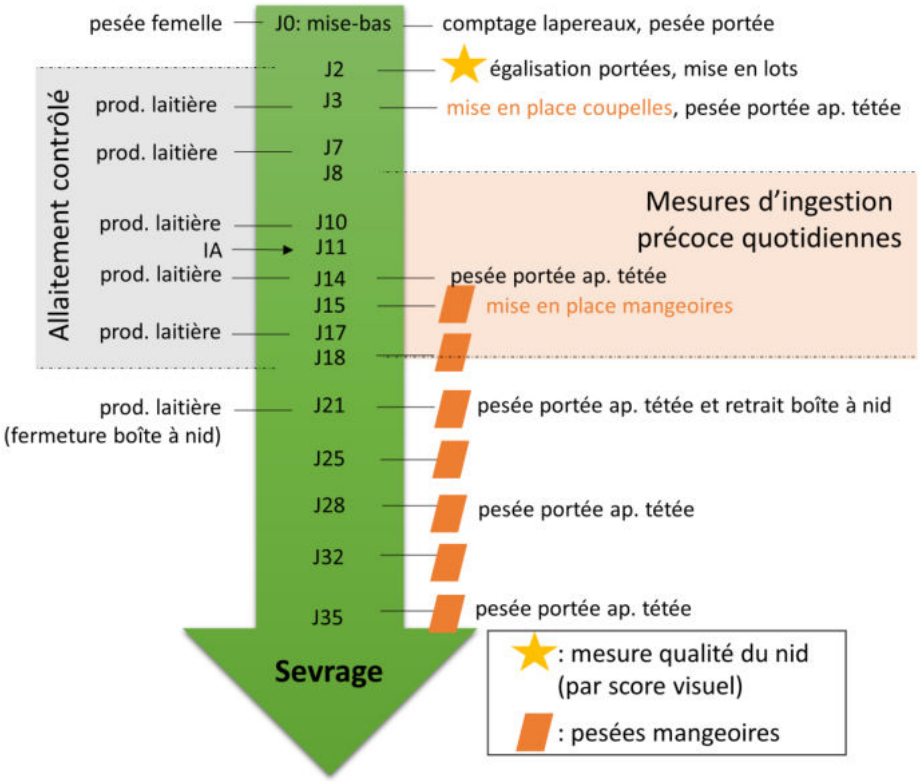


Figure 29 : Construction successive des protocoles expérimentaux suivant une démarche d'amélioration continue

L'application d'une conduite d'élevage similaire entre tous nos essais (rappel de la Figure 26) a été motivée par la possibilité de comparer les résultats entre eux sachant que seules les bandes d'animaux et les variables alimentaires étaient modulées inter-essais. Ainsi, nous

disposons d'un grand nombre de données de performances de croissance obtenues dans des conditions expérimentales similaires sur plusieurs cycles de production.



Rappel figure 26 : Mesures phénotypiques avant sevrage communes aux essais. « Prod. Laitière » réfère aux mesures de production de lait des lapines, qui équivaut à la consommation de lait des lapereaux, réalisées par pesée des femelles avant puis après tétée. « Pesée portée ap. tétée » réfère à la pesée des lapereaux après tétée et « IA » à insémination artificielle.

Un lot dit « contrôle », supposé se rapprocher de conditions d'élevage classique avec deux types d'aliments commerciaux distribués respectivement avant et après sevrage, a également été répété dans nos trois derniers essais (Figure 30). L'aliment commercial distribué avant sevrage correspondait à un aliment complet destiné aux lapines allaitantes et gestantes tandis que l'aliment distribué en engraissement était formulé pour répondre aux besoins du lapereau sevré. Ce lot contrôle fil conducteur avait été envisagé en cas de problèmes sanitaires globaux ou de problèmes liés à l'alimentation pour appréhender d'éventuels effets négatifs détectés dans nos lots expérimentaux. En outre, ce lot permet d'évaluer à la fois les variations liées aux conditions expérimentales, et à confronter les résultats des lots expérimentaux à ceux obtenus dans des conditions plus proches d'élevages commerciaux. Il faut toutefois noter que le plan d'alimentation du lot contrôle diffère légèrement des élevages cunicoles où l'aliment apporté avant sevrage est généralement maintenu quelques jours en engraissement. Enfin,

l'interprétation d'effets significatifs entre un lot expérimental et le lot contrôle s'avère délicate puisque plusieurs composés nutritionnels varient à la fois avant et après sevrage entre ces deux types de lots (annexe 2). Aussi il n'est pas possible de tirer des conclusions analytiques à partir du lot contrôle dans les essais 5 et 6, et les performances de ce lot sont ainsi présentées à part en annexes 3 et 4.

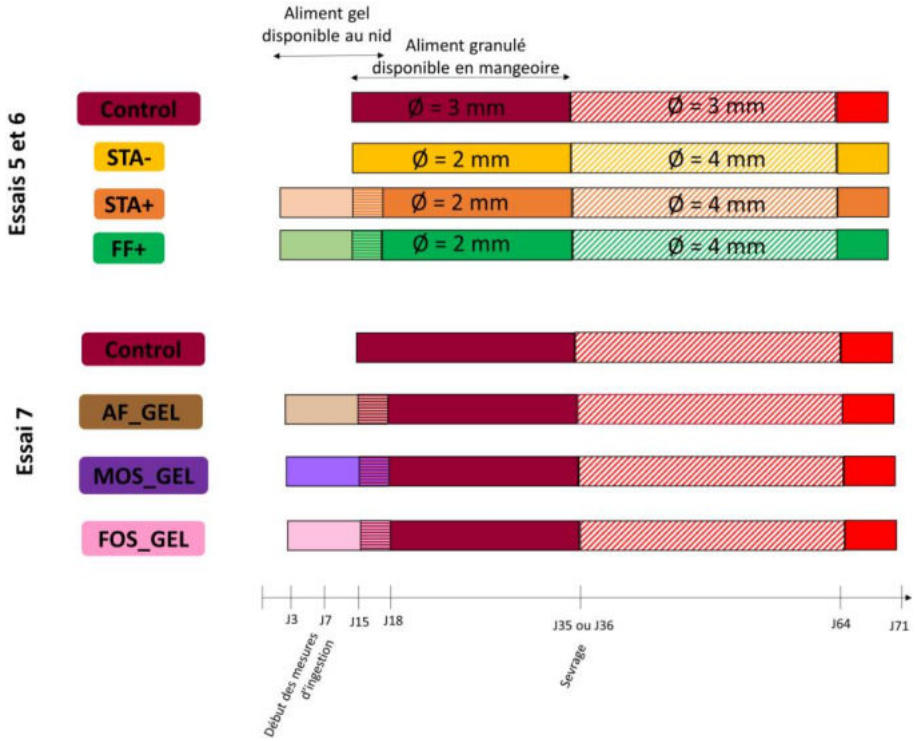


Figure 30 : Représentation des plans d'alimentation utilisés dans les essais des chapitres 2 et 3. Les hachures représentent une alimentation rationnée en début d'engraissement (entre 73 et 77% de rationnement selon les lots). Un lot contrôle pour lequel deux aliments commerciaux ont été utilisés respecitvemetn avant et après sevrage est répété entre les essais.

STA- : aliment riche en amidon tout au long de l'essai sans alimentation au nid, STA+ : aliment riche en amidon tout au long de l'essai avec une alimentation au nid, FF+ : aliment riche en fibres rapidement fermentescibles tout au long de l'essai et apporté dès le nid, AF_GEL : apport d'un gel de granulés sans additif puis conduite similaire au lot contrôle, MOS_GEL : apport d'un gel de granulés enrichi en MOS puis conduite similaire au lot contrôle, FOS_GEL : apport d'un gel de granulés enrichi en FOS puis conduite similaire au lot contrôle.

B) Evaluation de l'ingestion précoce : dispositif et préférences alimentaires

1) Dispositif de mise à disposition d'aliment solide dans le nid

Le dispositif développé au cours de cette thèse permet d'introduire une alimentation solide dans le régime du lapereau dès 7 jours d'âge, soit au moins une semaine plus tôt qu'en condition d'élevage classique. La contrainte majeure soulevée lors de la conception de ce dispositif de

mise à disposition d'aliment solide était que ce dernier devait être facilement accessible aux lapereaux tout en permettant une mesure fiable et précise de l'ingéré solide mesuré à l'échelle des portées. Les dispositifs d'alimentation précoce antérieurs à cette thèse consistaient à directement apporter l'aliment dans le nid avec une évaluation de l'ingestion par comptage de l'aliment restant ou observations visuelles (Gidenne et al., 2007a; Kacsala et al., 2018). Afin d'apporter une évaluation quantitative de l'ingestion au nid, un système utilisant des coupelles pesées quotidiennement a ainsi été développé. Pour évaluer séparément l'ingestion de la portée de celles des lapereaux, le dispositif d'alimentation mère-jeunes séparée de Fortun-Lamothe et al. (2000) a été retenu avec deux principaux aménagements. Le premier aménagement a concerné la modification de l'accès à la mangeoire pour les femelles. Dans le dispositif de l'équipe de Fortun-Lamothe, les femelles devaient pousser un poids avec leur museau pour accéder à l'aliment, ce poids interdisant sa consommation par les lapereaux. Toutefois avec ce dispositif, 10 % des femelles avaient des difficultés à s'alimenter, notamment après la mise-bas. Afin d'y remédier, cette mangeoire a été rehaussée pour n'être rendue accessible qu'à la femelle comme proposé par Mirabito et Bocquier (2005). Le suivi de l'ingestion et l'observation des femelles a permis de valider ce dispositif. Notre seconde adaptation du dispositif inital de Fortun-Lamothe et al. concerne l'espace des lapereaux, qui a été cloisonné en deux parties, accessibles pour ces derniers via deux petites portes (Figure 31). Les aliments déposés dans le nid étaient retirés au moment de l'allaitement pour éviter des interférences avec les femelles.

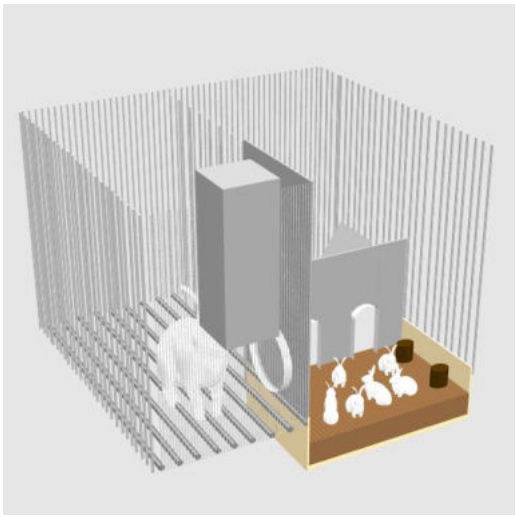


Figure 31 : Aménagements du dispositif d'alimentation mère-jeunes séparée de Fortun-Lamothe et al. (2000). Lors de l'allaitement contrôlé, la femelle n'avait accès au nid (en marron) qu'une fois pas jour. La mangeoire de la lapine (à gauche) était surélevée et l'espace contenant les mangeoires des lapereaux (à droite) était rendu inaccessible à la lapine lors de l'allaitement par une cloison contenant deux ouvertures pour les déplacements de la portée.

Les valeurs d'ingestion obtenues au cours de nos 7 essais expérimentaux sont globalement similaires, démontrant la fiabilité du système conçu (Figure 32). Seule la première expérimentation se détache avec une courbe d'ingestion plus anarchique, en lien avec un gaspillage important observé visuellement. L'amélioration du dispositif (coupelles mieux maintenues dans le nid par un système d'élastiques) dès le deuxième essai a permis de réduire considérablement ce gaspillage. Enfin, le choix d'apports nutritionnels sous la forme d'un support gélifié à partir de l'essai 3 a notablement réduit les risques de gaspillage (coupelles fixées au nid et gel plus difficile à disperser que des granulés). Ainsi nos premières études ont permis d'aboutir à un dispositif innovant de mise à disposition d'aliment solide dans le nid conciliant attractivité et nécessité expérimentale de précision du suivi des quantités ingérées.

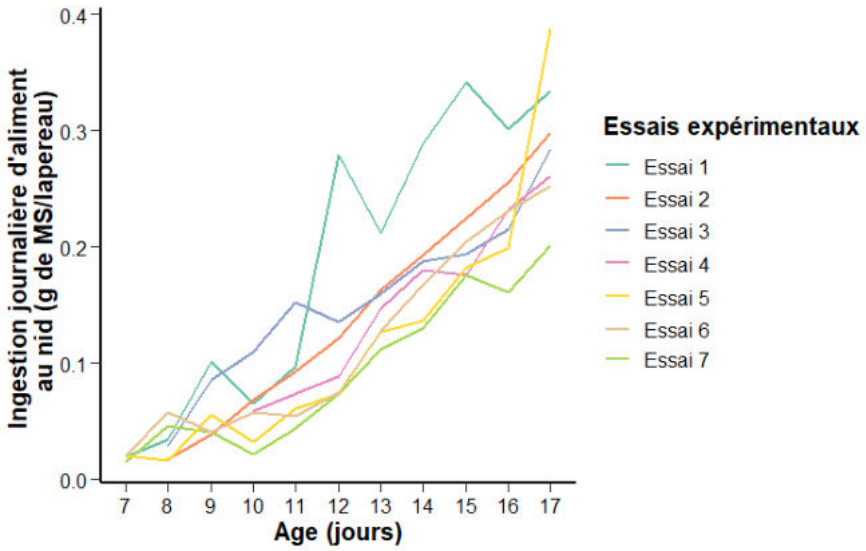


Figure 32 : Cinétique d'ingestion précoce d'aliment (granulés ou gels), corrigée pour les éventuelles pertes en eau. Les données sont présentées brutes, sans correction pour les valeurs aberrantes.

La réalisation de mesures à l'échelle de la portée plutôt que de l'individu constitue la limite principale de nos mesures d'ingestion. En effet une hiérarchie existe au sein des groupes d'animaux, compétition démontrée chez les lapereaux pour l'accès au lait (Coureaud et al., 2000 ; Drummond et al., 2000). Combinée aux préférences innées propres à l'individu, cette hiérarchie induit une variabilité de l'ingestion bien montrée chez le porc (Torrallardona et Roura, 2009; Clouard et al., 2012; Pluske et al., 2018). Chez cette espèce, des techniques de coloration de l'aliment permettent de déterminer par analyse de fèces les animaux qui consomment un aliment précocément (entre 45 et 65% des individus ; Bruininx et al., 2004; Pluske et al., 2018b). Une étude préliminaire du comportement alimentaire des lapereaux au nid (article 5, p°181) a permis de montrer que certains lapereaux visitaient plus souvent les

coupelles renfermant l'aliment démarrage (jusqu'à deux fois plus), suggérant des différentiels d'ingestion précoce au sein des portées. Cette étude n'a été réalisée que sur deux portées en raison de l'aspect chronophage des analyses vidéos, mais pourrait être poursuivie pour mieux définir ces écarts d'ingestion. Puisque nous avons démontré que la quantité d'aliment précoce ingérée mesurée à l'echelle de la portée était un facteur structurant du microbiote, une meilleure estimation de cette variabilité apparaît en effet essentielle (article 6).

Enfin, l'impact éventuel d'une manipulation post-natale répétée induite par notre dispositif expérimental ne peut être ignoré, d'autant qu'en dehors de la lactation, le nid est un environnement peu dynamique avant deux semaines d'âge (Broekhuizen et al., 1986). En effet, notre dispositif implique des manipulations quotidiennes du nid pour le changement des coupelles voire pour la recherche d'aliment gaspillé. De plus, 7 pesées étaient réalisées sur chaque portée avant sevrage, pesées qui impliquent de sortir les lapereaux de leur nid de façon temporaire. Toutefois une étude comportementale menée par Verwer et al. (2009) infirme cette hypothèse. Ces auteurs se sont en effet intéressés aux effets physiologiques de telles manipulations sur les lapereaux en pesant un à un ces derniers à six reprises entre la première semaine d'âge et le sevrage à 3 semaines. Cette procédure n'affectait pas le poids et la croissance des lapereaux et réduisait même leur peur de l'homme ou de nouveaux objets, phénomène d'habituation progressive bien connu (Pongrácz et al., 2001).

2) *Méthodologies employées pour l'évaluation des préférences alimentaires* *(chapitre 1)*

L'évaluation des préférences alimentaires des monogastriques est généralement réalisée par des tests en double ou multiple choix où l'animal (ou un groupe d'animaux) reçoit plusieurs aliments de façon simultanée pour lesquels les niveaux d'ingestion relatifs sont comparés (Torrallardona et Roura, 2009). Cette approche est valide pour hiérarchiser l'appétence de différents aliments mais une interprétation élargie s'avère délicate. En effet, en pratique, un seul aliment est apporté aux animaux et il est courant d'observer des écarts entre valeurs d'ingestion volontaire dans des situations où l'animal ne reçoit qu'un type d'aliment et préférences alimentaires préalablement déterminées (Torrallardona et Roura, 2009). Si la consommation d'un aliment offert sans autre alternative ne peut être inférée par des tests en double-choix, ces derniers renseignent sur la réelle valeur hédonique des aliments avec des écarts d'ingestion qui ne pourraient être mesurés en situation de non-choix, où l'ingéré peut être régulé par les besoins nutritionnels (Larson, 1995). Ce phénomène a déjà été démontré chez le lapin (Gidenne et al., 2010b) pour lequel il est supposé que la valeur nutritionnelle de l'aliment soit un déterminant

de l'ingestion plus fort que l'expérience sensorielle qui résulte de sa consommation, sauf dans les cas d'aversion marquée pour l'aliment (Lebas, 2011). Ainsi l'apport d'un seul type d'aliment par groupe expérimental ne permet pas de mesurer les préférences des aliments mais leur acceptabilité. Pour investiguer le comportement alimentaire précoce du lapereau, nous avons donc combiné ces deux approches avec trois tests en double-choix et un test d'acceptabilité. Grâce à ces études, nous avons pu déterminer les qualités sensorielles qui participent à augmenter la consommation d'aliment démarrage d'une part (ceci sans biais induits par la sensation de faim) et son attractivité d'autre part.

C) Mesures de digestibilité fécale apparente sous la mère (chapitre 2)

L'évaluation de la digestibilité d'aliments solides chez des lapereaux allaités n'a été réalisée que dans trois études à notre connaissance (Debray et al., 2003; Gidenne et al., 2007b; Gallois et al., 2008a). En effet, outre l'utilisation d'un système d'alimentation solide mère-jeunes séparée, ce type d'étude nécessite un aménagement des cages pour récolter les fèces des lapereaux séparément de ceux de leur mère. L'ajout d'une grille de récolte de fèces sous l'espace des lapereaux combiné au maintien de l'allaitement contrôlé nous a permis de répondre à cette problématique, sans changer les lapines ou portées de cage comme dans les précédentes études menées. Les femelles ne se rendaient qu'une fois par jour dans l'espace des lapereaux lors de l'allaitement et les fèces éventuellement déposées étaient facilement détectées et enlevées avec ce système.

L'analyse biochimique des fèces (analyse des MS, protéines, énergie et fibres) requiert au moins 25 grammes d'échantillons. Pour cette raison, la digestibilité fécale de l'aliment n'a été évaluée qu'à partir de 21 jours, après l'introduction d'aliment dans le nid, car avant cette date l'excrétion fécale est faible. En lien avec cette contrainte de quantité, les fèces ont été poolés sur 2, 3 ou 4 jours successifs permettant d'obtenir des valeurs de digestibilité sur 5 périodes avant sevrage, enrichissant ainsi les précédentes analyses de Debray et al. (2003) et (Gidenne et al., 2007b) réalisées sur deux périodes à J25-J27 et J28-J31 ou encore de Gallois et al. (2008a) réalisées entre 24 et 28 jours. Bien que l'amidon faisait partie des composants d'intérêt de nos études nutritionnelles, ce composant n'a pas été dosé dans les fèces en lien avec l'absence d'une méthode de dosage satisfaisante. En effet certaines molécules présentes dans les fèces interagissent avec les enzymes que nous utilisons couramment au laboratoire pour le dosage d'amidon alimentaire (Kozlowski, 1994). Nous avons testé un kit afin de doser l'amidon dans

les fèces sur plaque pour un gain de temps (Kit EnzyChrom™ Starch Assay Kit, BioAssay system) mais les résultats obtenus n'ont pas été concluants.

Des corrections ont été appliquées aux coefficients de digestibilité pour intégrer au mieux les particularités physiologiques du lapereau en développement. L'évolution rapide du tractus digestif avant sevrage (Laplace et Lebas, 1972) aboutit à un accroissement de digesta induisant un différentiel qui, s'il n'est pas pris en compte dans le calcul de digestibilité, aboutit à une surestimation de cette dernière. Une partie des animaux suivis pour les mesures de digestibilité a ainsi été sacrifiée avec 4 prélèvements avant sevrage afin d'estimer ces variations de volumes de contenus digestifs. En plus du suivi régulier de l'ingestion solide (6 mesures en 14 jours), la consommation de lait des portées était mesurée à 4 reprises pour intégrer cette composante au calcul de digestibilité fécale apparente.

D) Méthodes d'analyse physiologique

Les conséquences sous-jacentes de l'arrivée précoce de substrat solide dans le tractus digestif du lapereau sur le microbiote digestif et la santé ont été analysées via une approche multidisciplinaire. Connaissant le rôle clé du microbiote dans l'occurrence des maladies et la construction de l'immunité, plusieurs paramètres de santé de la réponse humorale, digestive et systémique ont été analysés. En particulier, un nombre important de données transcriptomiques a été produit pour construire une image plus complète des mécanismes sous-jacents aux interventions nutritionnelles réalisées. Enfin la collecte de données de performances entreprise de façon systématique nous a apporté des éléments de réponse concernant la manifestation phénotypique des effets détectés aux échelles du métagénome et de la cellule.

1) Investigation de l'implantation du microbiote et de son activité (chapitres 2 et 3)

La mise au point de techniques de séquençage d'ADN haut débit dans les années 2000 a permis le développement de la métagénomique, méthode qui permet l'étude du contenu en micro-organismes d'un écosystème par séquençage et analyse d'ADN en s'affranchissant des méthodes de culture. Le gène codant pour l'ARNr 16S est le plus utilisé pour cibler les micro-organismes procaryotes car il est ubiquitaire, contient des régions conservées et variables, est

peu soumis aux transferts horizontaux (Falentin et al., 2019). Pour ces raisons, l'analyse de ce gène en région V3-V4 a été retenue pour nos études.

Afin d'éviter de confondre les effets des traitements expérimentaux avec un effet environnement lié au logement lors de l'évaluation de l'implantation du microbiote, effet démontré sur le microbiote murin (Campbell et al., 2012), un lapereau par portée était échantillonné à chaque prélèvement. Les prélèvements ont été positionnés pendant des périodes clés du développement de l'écosystème digestif bactérien (Combes et al., 2011), à savoir pour les essais 6 et 7 :

- lapereaux allaités au moment de l'arrêt de la supplémentation en aliment gélifié (J18)
- lapereaux allaités démarrant l'ingestion de granulés (J25)
- lapereaux allaités ingérant majoritairement un aliment solide (J29 ou J30)
- lapereaux en alimentation solide stabilisée mais sensibles aux maladies digestives (J38)
- lapins en engraissement avec un statut sanitaire stable (J57 ou J58)

L'estimation du nombre d'animaux nécessaires pour évaluer les dynamiques d'implantation du microbiote s'est fondée sur des données de Combes et al., (2017). L'écart-type σ observé pour l'abondance relative des familles bactériennes majoritaires chez le lapin (Ruminococcaceae et Lachnospiraceae) était d'environ 8 unités d'abondance relative dans cette étude. Dans nos expérimentations, nous considérons qu'une modification de 10 unités d'abondance relative des familles majoritaires du microbiote indiquerait un effet biologique. La taille d'effet d est donc de $d = (\mu 1 - \mu 0) / \sigma = 10 / 8 = 1,25$. En considérant un risque α de 5% et un risque β de 80%, l'effectif n nécessaire pour observer une différence significative lors d'un test bilatéral est de $n = (Z\alpha + Z\beta)2 / d2 = 16 / 1,56 = 10,2$. Ainsi chaque condition expérimentale a été testée sur les prélèvements de contenus caecaux de 10 animaux.

Une difficulté majeure de l'analyse du microbiote est la transposition de la description de profils bactériens en données fonctionnelles. Ces données sont essentielles étant donné le phénomène de redondance fonctionnelle (différentes populations bactériennes d'une communauté peuvent présenter les mêmes fonctions ; Heintz-Buschart et Wilmes, 2018) et l'adaptabilité des réponses bactériennes à l'environnement (Delzenne et Bindels, 2020). Certains outils tels que PiCRUST (Langille et al., 2013) ou certaines bases de données telles que MACADAM (Le Boulch et al., 2019) proposent une analyse fonctionnelle des écosystèmes à partir de données metabarcoding ou de taxonomies déjà identifiées. Toutefois ces outils

n'apportent qu'une lumière partielle sur le potentiel fonctionnel des écosystèmes étudiés en lien avec des annotations fonctionnelles peu renseignées. Pour ces raisons, l'activité métabolomique du microbiote a été évaluée de façon complète dans notre cinquième article par analyse RMN et les paramètres fermentaires du caecum (pH, AGV majeurs, ammoniac) ont été dosés de façon systématique dans les essais de nos chapitres 2 et 3.

2) Analyse de la santé de l'hôte (chapitres 2 et 3)

Ayant connaissance du rôle clé du microbiote dans la préservation de la santé digestive ainsi que de la sensibilité du jeune lapereau aux maladies entériques, nous avons choisi de nous intéresser plus spécifiquement à la description de paramètres de santé à l'échelle du tissu digestif.

La croissance des compartiments digestifs a ainsi été évaluée dans tous les essais par pesées (+ pesée de l'organe lymphoïde appendice vermiforme dans l'essai 6). Les IgA sécrétoires constituant une première ligne de défense de la muqueuse digestive (Pérez-Berezo et al., 2011), nous avons ainsi fait le choix de mesurer les sIgA présentes dans le contenu caecal pour évaluer ces effets de façon directe. Ces sIgA, possiblement d'origine maternelle et endogène, ont pu être mesurées par technique ELISA, une technique peu coûteuse et couramment utilisée par la communauté scientifique.

L'étude de l'expression de gènes impliqués dans la santé et les fonctions digestives nous a permis de mesurer en temps réel la réponse immunitaire adaptative et innée de l'hôte au sein du tissu digestif (article 5). Ces réponses ont été évaluées dans la muqueuse caecale, pour faire le lien avec le microbiote caecal préalablement déterminé (Figure 33), ainsi que dans la muqueuse iléale de l'intestin grêle, compartiment clé de l'homéostasie intestinale (voir chapitre bibliographique III). Treize primers de gènes codant pour des transporteurs membranaires déjà validés dans le tissu iléal ont été utilisés dans notre étude. En complément, une soixantaine de primers ont été designés en veillant à choisir des paires de primers remplissant plusieurs critères déterminés *in silico* (taille du produit, contenu en nucléotides G-C, température de fusion, spécificité…). Les gènes pour lesquels ces primers ont été conçus codent pour des fonctions variées de l'immunité (gènes impliqués dans les voies de signalisation cellulaires, production de mucines, cytokines et molécules antimicrobiennes, transport d'anticorps) ou sont associés à l'intégrité de la muqueuse (marqueurs de prolifération cellulaire). La technologie de qPCR en temps réel à haut débit du système microfluidique Biomark permet d'analyser jusqu'à 95

transcrits différents pour 80 échantillons et l'utilisation de cette technologie nous a ainsi permis d'obtenir l'expression d'un nombre élevé de gènes de manière standardisée, fiable et rapide.

Afin d'obtenir une image globale des effets de nos interventions nutritionnelles sur la santé du jeune lapin, l'immunoglobuline G du plasma (anticorps majoritaire du sang) et les espèces réactives de l'oxygène dans le sérum (hydroperoxydes) ont été dosées par des méthodes standardisées, respectivement par ELISA ou via un test commercial. La mesure des métabolites réactifs de l'oxygène est un indicateur du statut oxydatif du plasma qu'il aurait été intéressant de compléter par une évaluation du statut antioxydant pour quantifier la balance antioxydants/pro-oxydants qui est déterminante pour la santé de l'hôte (Hildeman et al., 2003; Delosière et al., 2013).

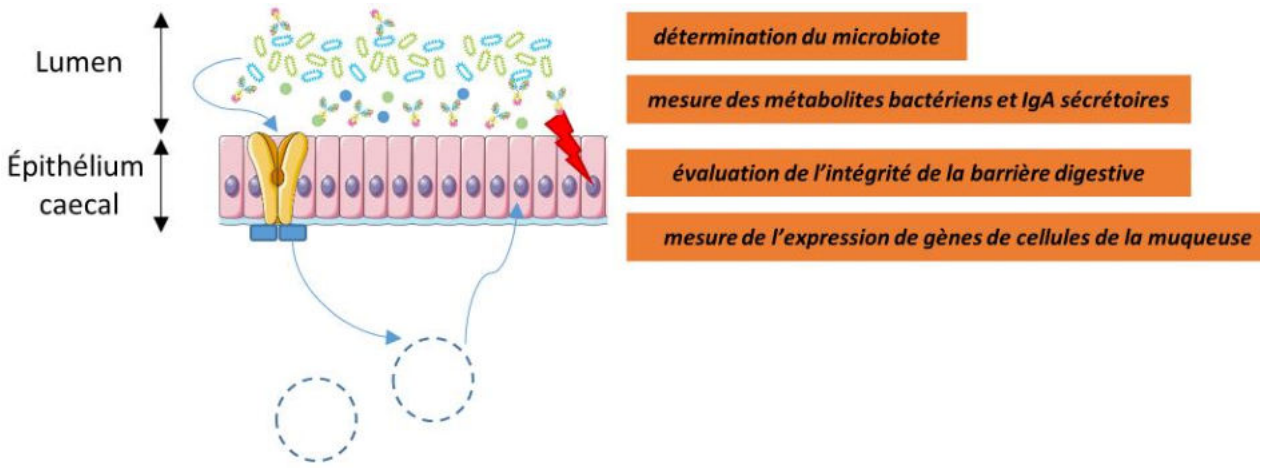


Figure 33 : Analyse de la santé par l'étude du dialogue microbiote-hôte au niveau du tissu caecal.

Enfin, notre dispositif expérimental ne nous a pas permis d'évaluer la santé directement par la comparaison des taux de mortalité puisqu'en l'absence de challenges sanitaires, il a été montré que pour détecter une différence de 5% de taux de mortalités, plus de 300 animaux sont nécessaires par groupe (Gidenne et al., 2010a). La description de ces taux de mortalité a donc été réalisée à titre indicatif et complète l'analyse des performances zootechniques en tant qu'indicateurs généraux de la santé des troupeaux suivis.

Ce travail de thèse a permis de développer un système de mise à disposition d'aliment précoce permettant de quantifier de façon fiable l'ingestion d'aliment au nid, mais ceci à l'échelle des portées. Les mesures de digestibilité réalisées sur des lapereaux allaités pour une période de 15 jours viennent enrichir la compréhension du développement digestif du jeune lapin, avec l'apport de données inédites. Enfin, les conséquences de la consommation d'aliment solide ont été analysées à différentes échelles pour enrichir nos connaissances du dialogue microbiote-hôte dans le cadre d'une stimulation précoce de l'ingéré d'aliment solide. Toutefois les effectifs utilisés au cours de nos études ne permettent pas d'analyser les variables de mortalité et morbidité.

II/ Déterminants de l'ingestion précoce

A) Caractéristiques de l'aliment susceptibles d'influencer l'ingestion avant sevrage

Nos études ont permis de montrer que les lapereaux sont capables de s'orienter spécifiquement vers certaines sources alimentaires dès 7 jours d'âge, alors même qu'ils sont aveugles et partiellement mobiles. La présentation de l'aliment, sa composition en eau et nutriments ainsi que les signaux olfactifs émis semblent jouer un rôle important dans cette sélection alimentaire.

1) Présentation des granulés

Les aliments granulés utilisés lors de nos évaluations des préférences alimentaires du lapereau (articles 1 et 2) ont été produits dans une installation pilote permettant le contrôle de la ligne de granulation (presse, température, pression de vapeur, longueur des granulés et débit standardisés). De plus, des fabrications préliminaires avaient été réalisées afin de sélectionner les granulés qui rempliraient au mieux notre cahier des charges, à savoir : des granulés variant par leur diamètre mais à dureté constante ou des granulés de diamètre constant variant par leur dureté. Les contraintes techniques de l'aliment lapin (nombre de filières disponible limité) associées à la variabilité de la matière brute utilisée lors de la granulation (mélange d'ingrédients sous forme de farine), ainsi qu'à la complexité de ce processus de fabrication (Thomas et Van der Poel, 1996) ne nous ont toutefois pas permis d'obtenir des granulés de propriétés physiques parfaitement satisfaisantes. Ainsi malgré la standardisation de la

production, l'un des granulés expérimentaux produit se distinguait par une faible durabilité (faible résistance mécanique), et les différences de dureté obtenues n'étaient pas aussi marquées que celles souhaitées.

La comparaison des granulés différant par leur diamètre mais de dureté proche a toutefois permis de mettre en évidence une préférence des lapereaux âges de 15 à 35 jours pour des granulés de faibles diamètres (2 mm) à une longueur constante (9 mm), sans doute plus adaptés à la préhension et la mastication du lapereau. Langenbach et al., (2001) avait pareillement observé une préférence des lapereaux pour des cylindres de carottes de petit diamètre (1 mm) comparé à des cylindres plus larges (3 mm). Toutefois dans notre second essai, l'utilisation de granulés de 2,5 mm de diamètre en simple choix comparée à des granulés de 4 mm différant par leur taux de compression tendait seulement à augmenter les niveaux d'ingestion entre 21 et 27 jours d'âge. De même l'apport de granulés de 2 mm dans les essais 5 et 6 ne favorisait pas une hausse de l'ingestion par rapport à un granulé commercial de 3 mm, bien que ces résultats soient à nuancer par les différences de compositions nutritionnelles entre ces granulés. Enfin, si des granulés de diamètres plus fins semblent souhaitables, une réduction trop importante de la surface de l'aliment apporté aux lapereaux semble entraîner son rejet, comme observé lors de l'apport de miettes de granulés dans le nid (article 3).

Compte tenu des caractéristiques physiques des granulés expérimentaux produits, les préférences du lapin en termes de dureté des granulés n'ont pu être pleinement élucidées. Toutefois certains éléments indiquent une orientation préférentielle du lapereau vers des supports nutritionnels plus tendres. Ainsi dans notre troisième article les miettes issues de granulés commerciaux étaient plus consommées que les miettes issues de bouchons de pulpes de betterave, ces bouchons étant 5 fois plus durs que les granulés de l'aliment commercial. Dans cette même étude, le gel de betterave était plus attractif que la betterave crue dont il était issu, bien que ces deux aliments aient des teneurs en eau proches et des saveurs vraisemblablement comparables. Cette différences d'appétence s'explique probablement par la texture plus molle du gel. De façon similaire, Gidenne et al., (2007) et Travel et al. (2009) ont observé une préférence des lapins non sevrés pour les granulés les plus tendres, avec toutefois la possibilité d'effets confondus avec des diamètres et compositions différentes.

2) *Teneur en eau de l'aliment*

Deux indices témoignent de l'importance de la teneur en eau de l'aliment proposé précocément au lapereau. En effet, l'aliment gélifié était l'aliment le plus riche en eau

(MS=20%) mais était également celui avec les plus forts niveaux d'ingestion en matières fraîche et sèche. De plus, nous avons détecté au cours de nos essais une cinétique d'ingestion particulière des blocs de betteraves crus apportés dans cet essai. Ces derniers étaient plus consommés le premier jour de leur mise à disposition et une diminution de leur consommation était observée le jour suivant lorsqu'ils s'asséchaient (p°123). De précédentes études confirment cet intérêt du très jeune lapereau pour des aliments hydratés tels que la chicorée (Castellini et al., 2007) ou des jeunes pousses d'herbe (Langenbach et al., 2001). Cet attrait pour un aliment hydraté est partagé par d'autres jeunes animaux de rente. En élevage porcin, l'apport d'un aliment liquide type « porridge » (une portion de céréales pour deux portions de liquide) aux porcelets sous la mère permettrait ainsi d'améliorer la transition du sevrage (Pluske et al., 2005). Humidifer les concentrés ou fourrages apportés aux jeunes veaux laitiers stimulerait également leur ingestion sèche d'aliment (Xiao et al., 2020). Cette appétence des aliments hydratés chez les jeunes mammifères pourrait s'expliquer par 1) un contenu en matière sèche réduit, se rapprochant ainsi de la composition du lait, par 2) la capacité de ce type d'aliment à contourner l'apprentissage de l'ingestion de solide et 3) permettrait de satisfaire conjointement des besoins en eau et nutriments (Brooks et Tsourgiannis, 2003). Chez le lapin allaité, l'utilisation d'un aliment tendre pauvre en matières sèches pourrait constituer une présentation alternative adaptée puisque la construction de ses capacités masticatrices ne prend fin que vers la troisième semaine d'âge (Langenbach et al., 2001; Yardin, 2009). En outre, le lapereau ne dispose que du lait pour s'hydrater jusqu'à 15-16 jours d'âge, date à partir de laquelle il peut sortir du nid et disposer de biberons d'eau, pour peu qu'ils soient accessibles. L'ingestion d'eau est donc limitée au démarrage de l'ingestion solide dans le nid et est possiblement variable entre individus due à la compétition pour l'accès au lait qui existe au sein des portées (Drummond et al., 2000). Sachant que chez des lapins adultes, la consommation d'eau doit au moins atteindre 55% de l'ingéré total (eau+solide ; Cooke, 1982), l'accès à l'eau peut constituer une réelle problématique. Toutefois dans le cadre de notre troisième étude, les niveaux d'ingestions secs de granulés et de gels étaient équivalents dans le nid, ce qui suggère que la consommation d'eau n'était pas limitante pour l'ingestion solide avant 17 jours, période de pic de lactation. Pour explorer cette question de l'accès à l'eau, l'apport d'un gel contenant uniquement de l'eau dans le nid pourrait contribuer à déterminer le niveau de « soif » du lapin nouveau-né.

Finalement, bien qu'un granulé classique présente des niveaux d'ingestion au nid satisfaisants, l'attrait observé pour les aliments frais riches en eau, la consommation plus précoce de gels, le faible gaspillage observé avec ce support, et la facilité d'incorporation de composants dans une telle matrice, ont favorisé le choix de conserver ce support nutritionnel hydraté pour la suite des études plutôt que les granulés.

3) *Caractéristiques olfactives et sensorielles*

L'olfaction développée des lagomorphes et rongeurs est essentielle pour leur survie, en leur permettant de discriminer à distance les végétaux comestibles des plantes potentiellement toxiques (Slotnick, 2001). Aussi, l'identification d'odeurs attractives est une piste de recherche pertinente pour favoriser l'ingestion d'aliment. Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence une légère préférence des portées pour l'arôme de vanille comparativement aux arômes de fruits rouges et banane aux concentrations testées, ou par rapport à une matrice non odorante (article 3). Cet attrait pour l'arôme de vanille implique deux stimuli chemosensoriels : l'odeur, quand les gels sont à distance, et les flaveurs en bouche qui résultent du goût et d'une stimulation olfactive rétro-nasale (Pierce et Halpern, 1996). Cette préférence pourrait être associée aux flaveurs sucrées de la vanille, sachant que le lapereau montre une attirance pour le goût du sucrose dès deux semaines d'âge (Ganchrow et Matzner, 1979). Une composante génétique pourrait expliquer cette attirance, comme pour les espèces omnivores qui ont développé des préférences congénitales pour les saveurs sucrées (Bolhuis et al, 2009). Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant de tester une gamme plus large d'arômes. L'utilisation de dispositifs d'arènes permettant d'analyser les réponses d'animaux soumis à un ou plusieurs stimuli apparaît intéressante pour discriminer rapidement les molécules d'intérêt et évaluer ces réponses à l'échelle de l'individu.

La sensibilité des lapereaux à certains arômes dépend également d'un apprentissage, et en particulier d'une transmission verticale de la mère aux lapereaux. Le cerveau du fœtus est capable d'enregistrer les stimulus olfactifs rencontrés dans l'utérus, favorisant ainsi une orientation positive de l'individu envers ce même stimulus rencontré de nouveau dans l'environnement post-natal (Schaal et al., 1998). L'ajout de cumin pur dans le régime des lapines gestantes favorise ainsi l'orientation des nouveau-nés vers cette épice (pure ou intégrée dans un mélange aromatique complexe) dans le cadre de tests en double-choix, tandis que des lapereaux de femelles recevant un aliment standard rejetait au contraire cet additif (Coureaud

et al., 2002). Cette reconnaissance olfactive dès la naissance illustre également une continuité chimiosensorielle transnatale entre milieu intra (placenta) et extra-uterin (colostrum et lait) qui permet de maintenir l'orientation du nouveau-né pour certain stimuli olfactif durant la lactation (Schaal et al., 1998; Coureaud et al., 2002). En outre, l'apprentissage des odeurs présentes sur les tétines des lapines est favorisé grâce à la phéromone mammaire du lait de lapine (Coureaud et al., 2010; Jouhanneau et al., 2016). Outre l'expérience prénatale *in utero* et les contacts qui surviennent pendant l'allaitement, les pelotes fécales déposées par la femelle dans le nid participent également à l'acquisition de préférences chez le lapereau en direction de l'aliment consommé par la mère (Bilkó et al., 1994). Le régime maternel influence de ce fait le comportement alimentaire de ses portées même après le sevrage (Bilkó et al., 1994; Altbäcker et al., 1995). Dans le cadre de nos essais, l'aliment destiné aux femelles n'était pas enrichi en composants odorants pour éviter de biaiser les essais menés. Dans une perspective de stimulation de l'ingestion solide précoce, ce transfert d'informations vertical devrait toutefois être exploité. Pour ce faire, un arôme pourrait être apporté dans l'aliment des femelles tout au long de leur vie, et être incorporé dans l'aliment de leur descendance pour faciliter l'adaptation à un aliment solide. Des études préliminaires ont ainsi montré que cette stratégie réduisait la néophobie alimentaire et le stress du porcelet au sevrage (Bolhuis et al., 2009).

Enfin les lapereaux ont démontré une sensibilité aux ingrédients composant les gels apportés, même lorsque seul un additif était modulé avec des niveaux d'incorporation inférieurs à 5% de matière sèche. En effet, l'acceptabilité des gels contenant un mélange de mannan-oligosaccharides et β-glucanes était inférieure à celle des gels enrichis en fructo-oligosaccharides, possiblement en lien avec les saveurs sucrées de ce dernier (Yun, 1996) (article 6). Dans nos articles 4 et 5, l'ingestion des gels composés d'une farine d'aliment riche en fibres rapidement fermentescibles était supérieure à celle de gels disposant d'un ratio en fibres digestibles/amidon plus faible. L'ingestion d'eau étant stimulée lors d'apports d'aliments fibreux (persil ou foin) chez le lapin (Tschudin et al., 2011), les niveaux de consommation supérieurs du gel riche en pectines et hémicelluloses pourraient s'expliquer par un besoin en eau plus élevé. En revanche, l'ingestion de granulés entre 15 jours d'âge et le sevrage était stimulée par la diminution du ratio en fibres digestibles/amidon dans l'essai 5 (voir annexe 3) mais pas dans l'essai 6 (voir annexe 4), alors que les conditions expérimentales étaient similaires. Nous ne disposons donc pas d'éléments suffisants pour valider l'hypothèse que l'amidon stimulerait la consommation d'aliment comme précédemment proposé (Debray et al.,

2002; Xiccato et al., 2003; Gidenne et al., 2007b). Certains mécanismes de régulation de l'ingéré du lapereau allaité reste donc à élucider pour mieux prévoir sa consommation.

B) Facteurs intrinsèques à l'animal et à la portée pouvant moduler l'ingestion au nid

Entre les portées, de fortes variations du démarrage de l'ingestion d'aliment au nid (entre 7 et 14 jours d'âge) et des quantités consommées (en moyenne 1,2 ± 0,3 g de MS ingérées par lapereau avec un aliment démarrage granulé ou gélifié, CV=25%) étaient observées. L'étude des caractéristiques relatives aux portées et à leur environnement nous a permis de distinguer des facteurs discriminants déterminants pour l'ingestion précoce à l'échelle de groupe de lapereaux.

1) Influence du poids des animaux après égalisation sur leur consommation d'aliment ultérieure

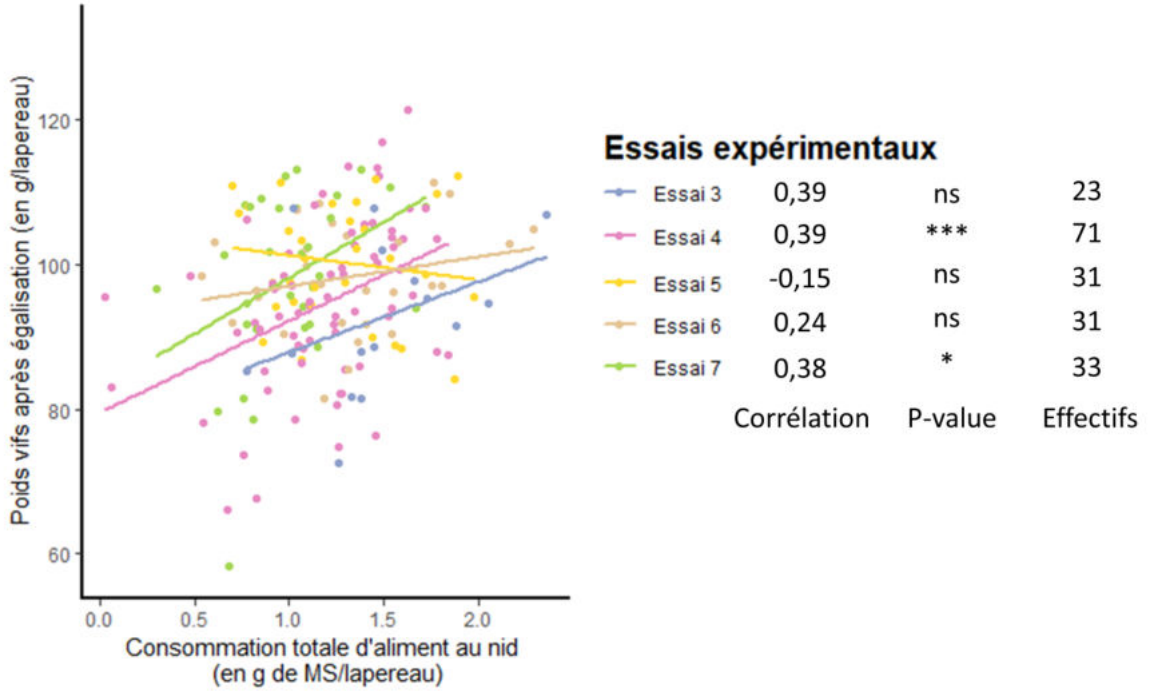


Figure 34 : Etude de la relation linéaire entre poids vifs après égalisation (J3 ou J4) mesurée à l'échelle des portées et ingestion totale au nid (de J7 à J17) de chaque portée pour une bande donnée. Des tests de corrélation de Pearson ont été réalisés. Les essais 1 et 2 ont été retirés de l'analyse car le nombre de données manquantes ne permettait pas le calcul d'un nombre suffisant de consommations totales au nid.

Une relation linéaire positive significative a pu être mise en évidence au sein des essais 4 et 7 entre consommation d'aliment au nid et poids des lapereaux au démarrage (Figure 34). De même, l'analyse journalière des consommations de l'essai 2 permettant de s'affranchir des données manquantes nous a permis de montrer que le poids des animaux après égalisation affectait significativement leur ingestion, les portées les plus lourdes étant celles ayant des

niveaux de consommations précoce plus élevés (article 1). En termes de cinétique d'ingestion, l'exploration des consommations au nid dans l'essai 4 a également permis de montrer que les portées les plus lourdes (troisième quartile) démarraient la consommation de gel un jour plus tôt que les portées les plus légères (premier quartile). Finalement, les résultats combinés de nos cinq derniers essais confirment la corrélation entre ingestion précoce et poids des lapereaux à 3 ou 4 jours d'âge (r=0,25, P < 0,001, Figure 35). Toutefois cette relation n'était pas toujours validée intra-essais (Figure 34), possiblement en lien avec des effectifs faibles (n=23 portées dans l'essai 3) ou une faible variabilité de poids de portée induite par l'égalisation de ces dernières, manipulation qui visait à égaliser le nombre de lapereaux entre portées mais également à homogénéiser les poids de portées. Sans cette égalisation, on peut donc s'attendre à des effets plus marqués des poids de portée sur l'ingestion.

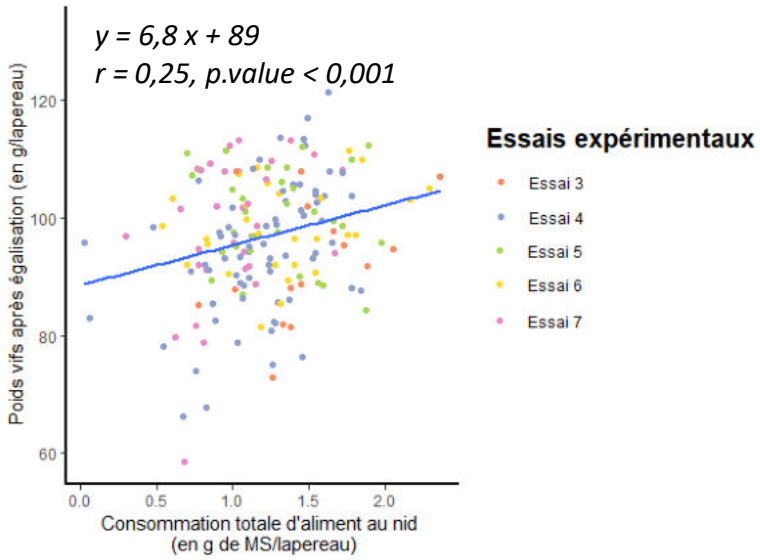


Figure 35 : Corrélation globale entre ingestion précoce d'aliment solide et poids de portée au démarrage des essais 3 à 7.

L'ingestion de lait suit un schéma similaire avec des consommations plus élevées observées chez les lapereaux les plus lourds (Drummond et al., 2000; Szendrő et al., 2019). Les premières prises d'aliments lactés sont tout particulièrement conditionnées par le poids des lapereaux (Argente et al., 1999; Coureaud et al., 2000). Conformément à nos études, il a été montré qu'un poids élevé à la naissance conférait un avantage aux porcelets pour l'accès à l'aliment démarrage (Pajor et al., 1991; Appleby et al., 1991). Les niveaux élevés d'aliments consommés par les lapereaux les plus lourds pourraient s'expliquer par une mobilité accrue et une plus grande maturité physiologique (de Passillé *et al.*, 1989) combinée à une compétition au sein de la portée comme observée lors de l'allaitement (Drummond et al., 2000).

2) *Absence de corrélation entre ingestion de lait et d'aliment solide en début de vie*

Les essais de notre première étude ont permis de démontrer l'absence de relation significative entre consommation d'aliment solide au nid et de lait. Cela signifie que les portées avec les plus faibles apports en lait ne consommaient pas plus d'aliment au nid que les autres portées, et réciproquement. De plus, dans l'ensemble des essais réalisés, les productions laitières des femelles jusqu'à 21 jours étaient similaires entre groupes qu'un aliment pour lapereau au nid ait été proposé ou non. En accord avec nos analyses, l'étude préliminaire de Combes et al. (2017a) mettant à disposition des granulés dans le nid dès 8 jours d'âge ainsi que l'essai de Mattioli et al. (2019) apportant de la luzerne en bloc ou de l'herbe fraîche dès 15 jours d'âge dans le nid, n'ont pas montré d'effet d'une supplémentation alimentaire précoce sur l'ingestion de lait des lapereaux. Ceci suggère que les aliments que nous avons proposés précocement ne peuvent jouer le rôle de substitut du lait et que leur consommation relève plus d'un « grignotage », plus ou moins stimulé par l'attractivité du support apporté. En effet, la stimulation d'ingestion solide reste quantitativement modérée par rapport à l'ingestion de lait : ainsi la contribution des aliments précoces à l'ingéré sec total à l'âge de 17 jours correspondait en moyenne à 9-10%. Au vu des résultats collectés, nous réfutons donc l'hypothèse qu'un aliment proposé précocément dans le nid permettrait de diminuer la sollicitation des femelles au cours de la lactation. Ces dernières étant en déficit énergétique dès le 7ème jour de lactation (Xiccato et Trocino, 2010), d'autres pistes de recherches en direction de la femelle ou des lapereaux doivent être explorées afin d'identifier des leviers d'action permettant de limiter la mobilisation des réserves corporelles des lapines pendant la lactation.

L'indépendance entre ingestion d'aliment solide et consommation de lait en début de vie peut paraître surprenante étant donné le lien étroit entre ces deux variables en milieu de lactation (voir chapitre bibliographique IV, partie II). Ce résultat s'explique en réalité par une évolution rapide de la motivation du lapereau à se diriger vers l'aliment pendant la lactation. L'appétit des lapereaux pour le lait est particulièrement marqué en début de vie, comme observé par Langenbach et al., (2001) lors de l'apport de lait par biberon combiné à l'introduction d'aliment solide. Aussi, lorsque des lapereaux ayant déjà allaité dans la journée sont placés avec une seconde lapine 8 ou 12 heures après la première tétée, ces derniers tètent à nouveau et consomment en tout 89% de lait supplémentaire jusqu'à 23 jours d'âge comparé aux animaux allaités quotidiennement (Gyarmati et al., 2000). Cet appétit des lapereaux pour le lait en début de vie expliquerait donc l'absence de relation entre ingestion d'aliment solide et ingestion lactée

observée dans les premiers jours suivants la naissance. Par la suite, il semblerait que les besoins nutritionnels du lapereau de trois semaines d'âge ne soient plus satisfaits par le lait (Kacsala et al., 2015). En outre il a été montré que si les signaux odorants présents au niveau de l'abdomen des lapines étaient très attractifs chez des lapereaux de 2 jours d'âge, cette attractivité était réduite à 23 jours d'âge (Coureaud et al., 2001). L'induction du comportement typique de recherche et de saisie des tétines par les lapereaux durant l'allaitement s'amenuise également avec l'avancée de la lactation dans le temps (Distel et Hudson, 1984). Une sensation de « faim » combinée à une baisse d'attractivité de la femelle allaitante, et donc du lait, participerait à réduire l'attractivié du lait en milieu de lactation et expliquerait la relation négative entre consommation d'aliment solide et lactée observée sur cette période (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2000; Kovács et al., 2012).

Comme l'ingestion d'aliment solide en début de vie apparaît intrinsèquement réduite du fait de l'appétit des lapereaux dirigés vers le lait, la réalisation d'un sevrage intermittent comme précédemment testé sur un modèle porcin (Turpin et al., 2017) pourrait se révéler pertinente pour stimuler l'ingestion d'aliment solide précoce. Un tel dispositif pourrait consister à un allaitement des lapereaux un jour sur deux, en ne faisant allaiter à chaque fois qu'une partie des lapereaux pour respecter un allaitement journalier conformément au comportement des femelles (Lincoln, 1974).

3) *L'environnement post-natal (nid) n'influence pas l'ingestion précoce d'aliment*

Les lapereaux nouveau-nés naissent sans poils et dépendent de leur tissu adipeux brun et des éléments composant le nid (tels que les poils déposés par la lapine) pour maintenir leur température corporelle (Hudson et Hull, 1975). Les signaux thermiques émanant du nid orientent ainsi de façon marquée les mouvements des lapereaux d'une semaine d'âge au sein du nid (Hudson et Distel, 1982), au détriment d'autres indices olfactifs (Serra et Nowak, 2008). Dans nos expérimentations, l'aliment démarrage était déposé en surface des copeaux du nid, une zone thermiquement plus froide que le cœur du nid (Photo 4), ce qui a pu contribuer à la faible attractivité de l'aliment avant une semaine d'âge. Aussi quelle que soit la qualité thermique du nid après égalisation, évaluée de façon visuelle (voir méthodologie p° 101), celle-ci n'influençait pas l'ingestion des lapereaux dans tous nos essais.

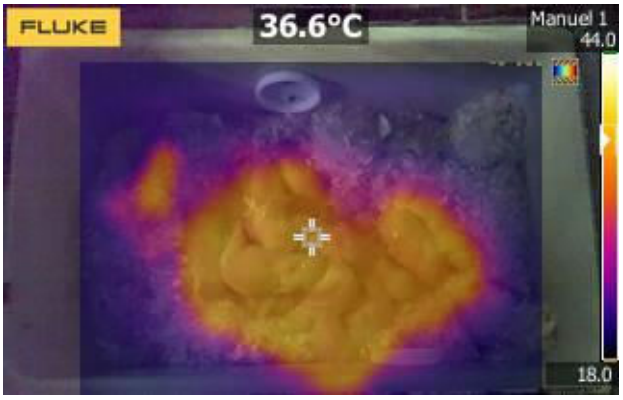


Photo 4 : Image thermique d'un nid vu depuis le dessus. La majorité des lapereaux sont regroupés au centre (excepté un lapereau dans le coin supérieur gauche). En l'absence de poils recouvrant les lapereaux, leur chaleur interne est dissipée (centre de l'image). Les coupelles sont situées dans une zone plus froide (environ 19°C).

Afin d'initier plus tôt l'ingestion d'aliment solide, une stratégie pourrait consister à apporter l'aliment directement à l'intérieur du nid ou bien, afin de poursuivre notre démarche biomimétique, d'opter pour une litière plus nutritive que les copeaux de bois couramment utilisés. En effet en conditions naturelles, les lapines apportent de l'herbe séchée ou d'autres plantes issues de l'environnement pour composer le nid, en plus de leurs poils (Hudson et al., 2000). En outre, cette stratégie permettrait de rendre l'aliment accessible à tous les lapereaux, sans limitation due au nombre de postes d'alimentation comme observée chez les porcelets (Appleby et al., 1991).

Nos études ont permis d'identifier certains facteurs (nutritionnels, environnementaux et propres aux individus) susceptibles de moduler l'ingestion précoce d'aliment, résumés en Figure 36. Les essais réalisés dans le cadre de notre première étude permettent de recommander l'utilisation de granulés avec un dispositif d'abreuvement précoce ou d'un aliment tendre riche en eau à destination des lapereaux. Du fait de l'attractivité de l'arôme de vanille, celui-ci pourrait être incorporé dans l'aliment fourni dans le nid afin de stimuler l'ingestion d'aliment solide en début de vie, voire être incorporé en amont dans l'aliment destiné aux femelles. La consommation d'aliment solide précoce était favorisée chez les lapereaux les plus lourds. Une limite ontogénique naturelle à l'ingestion d'aliment solide en début de vie semble exister, du fait de l'appétit des lapereaux vers le lait maternel et leur faible exploration du nid avant 7 jours d'âge.

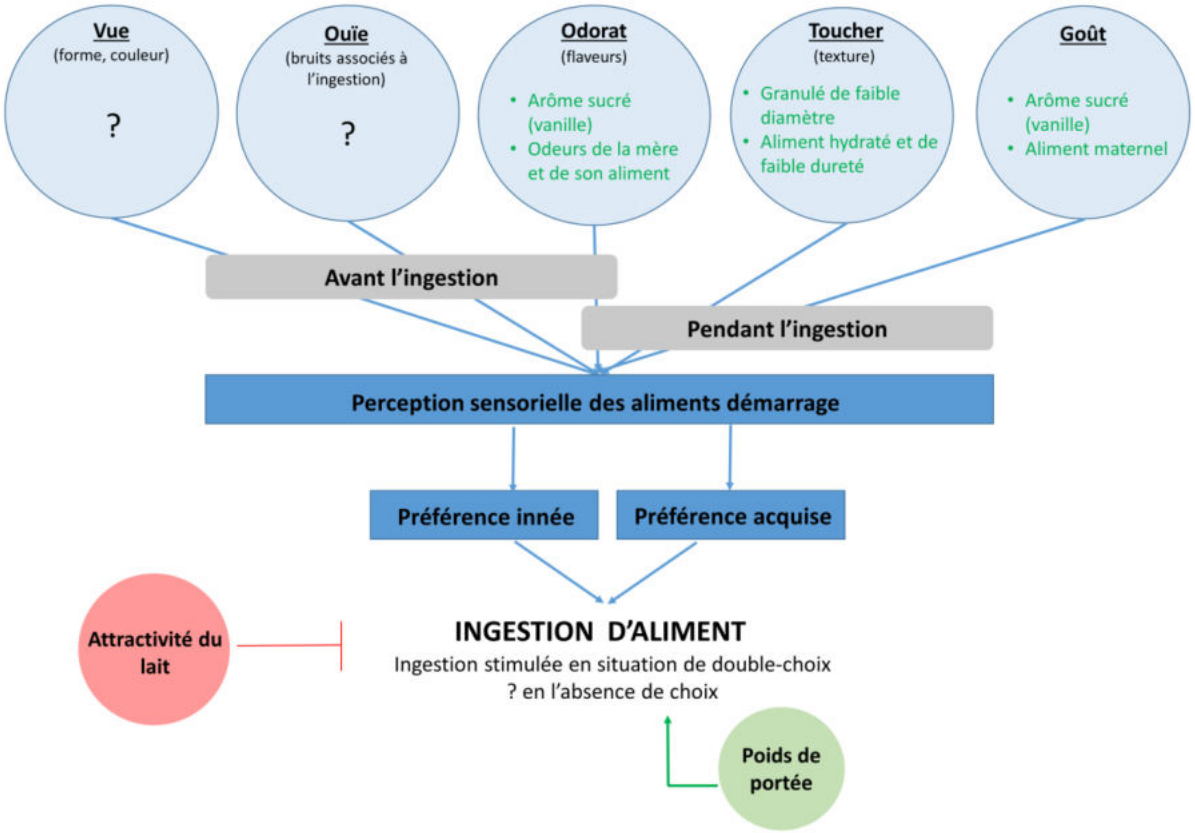


Figure 36 : Déterminants de l'ingestion d'aliment solide chez le lapereau allaité. L'odeur de l'aliment, sa texture et son goût sont susceptibles d'affecter les préférences alimentaires du lapereau. Ces caractéristiques attractives (indiquées en haut à droite en vert) favorisent l'ingestion en situation de double-choix, mais la transposition de ces préférences en ingestion en absence de choix demeure complexe. L'ingestion précoce serait enfin favorisée chez les portées les plus lourdes mais naturellement limitée par la disponibilité en lait.

III/ Besoins nutritionnels du lapereau

L'ingestion moyenne de granulés avant sevrage atteignait environ 400 grammes par lapereau dans nos études, ce qui correspond à près de 4 kilos d'aliments consommés par portée. A l'échelle d'un élevage, la consommation d'aliment des lapereaux n'est donc pas négligeable et définir la digestibilité de ces aliments ainsi que leurs effets sur la croissance des lapereaux apparaît essentielle, d'autant que les données actuellement disponibles sont en nombre limitée (voir chapitre IV bibliographique, partie II).

A) Efficience de la digestion d'aliment solide du lapereau allaité

Le résultat le plus surprenant de notre analyse de la digestion de l'aliment par le lapereau est l'évolution rapide des coefficients de digestibilité fécale observée pour la première fois à

partir de 21 jours (article 4 et annexe 3, figure 2). Malgré les faibles capacités d'hydrolyse enzymatique de la muqueuse intestinale du lapereau de 21 (Gallois et al., 2008b) et 25 jours (Debray et al., 2003) et l'activité fibrolytique limitée dans le caecum trois semaines après la naissance (Gidenne et al., 2007b), la digestibilité apparente des portées était maximale entre 21 et 24 jours ($\geq$70% pour l'énergie et les protéines et >40% pour les fibres). Cette efficience digestive au démarrage de l'ingestion de granulés est sans doute en lien avec l'arrivée de substrats alimentaires dont la quantité correspond à la capacité digestive du lapin (10 g d'aliments ingérés par jour). Par la suite entre 25 et 27 jours, la digestibilité fécale était significativement réduite, phénomène observé pour tous les composants nutritionnels et tous les lots (au minimum -12% de baisse), avant d'augmenter de nouveau et de se maintenir à des niveaux intermédiaires entre 28 jours et le sevrage. De façon similaire, les études menées par les équipes de Debray et Gidenne ont mis en évidence l'existence d'une période de plus faible efficience alimentaire avant sevrage, située entre 25 et 31 jours selon les études. Cette chute de digestibilité correspondait dans notre essai à l'inversion des parts d'aliments solide et lacté dans le régime du lapereau. Aussi, cette chute s'expliquerait vraisemblablement par l'incapacité transitoire du système digestif du lapin à faire face à un tel afflux de nutriments. L'augmentation des coefficients digestifs à partir de 28 jours correspondrait quant à elle à l'adaptation du système enzymatique du lapin à un régime plus riche en glucides végétaux, via une hausse des activités maltase et amylase comme observée dans le contenu intestinal de lapereaux de 32 jours (Debray et al., 2003) et une augmentation de l'activité microbienne (augmentation des teneurs en AGV dans notre étude comme couramment observée avant sevrage ; voir Padilha et al., 1995; Fortun-Lamothe et Gidenne, 2003). Cette connaissance plus précise de la cinétique de digestion ; et plus particulièrement l'identification de cette chute de digestibilité, soulève de nouvelles interrogations sur la gestion du plan d'alimentation du lapereau allaité : faudrait-il apporter un aliment spécifique sur cette période ou limiter l'ingestion des lapereaux autour de 25 jours pour que leur système digestif dispose d'un temps d'adaptation ?

L'ingestion d'un aliment dès 7 jours d'âge ne permettait pas de moduler la cinétique de digestibilité. Ce résultat confirme l'importance d'une programmation ontogénique dans l'établissement des fonctions digestives comme précédemment montré en modulant les apports énergétiques de l'aliment péri-sevrage (Debray et al., 2003) ou en modulant la taille de portées (Scapinello et al., 1999). Toutefois, des facteurs nutritionnels peuvent affecter l'efficience digestive du jeune lapin , comme l'indique la meilleure dégradation de l'amidon et des fibres observée lors de sevrages précoces (Gutiérrez et al., 2002; Gallois et al., 2008a). Conformément

à ces observations, les deux aliments différant par leur ratio fibres digestibles/amidon testés induisaient des changements d'efficience alimentaire avec une meilleure digestion des fibres (solubles comme insolubles) lorsque ce ratio était égal à 5,5 et une meilleure digestion de protéines brutes et d'énergie sur certaines périodes lorsque ce ratio était égal à 1,7. Des effets similaires ont été observés par Gidenne et Perez (2000) ainsi que Xiccato et al. (2008) et ces écarts de digestibilité s'expliquent probablement par différentes proportions d'ingrédients de nature plus ou moins digestibles (pulpe de betterave et tourteau de tournesol notamment) entre nos formules d'aliments expérimentaux. Enfin les valeurs de digestibilité observées avec l'aliment commercial (annexe 3, figure 2) se sont révélées plus élevées que pour les aliments des lots expérimentaux. Ce résultat est peu surprenant puisque cet aliment était riche en amidon et protéines et pauvre en fibres (les fractions ADF et ADL notamment) relativement aux formules des aliments expérimentaux. Cet aliment commercial ne remplit pas les critères nutritionnels recommandés dans le tableau 2 (voir chapitre bibliographique II) en termes de lignine et cellulose, le rendant certes plus digestible mais moins sécurisant d'un point de vue sanitaire.

B) Stratégies nutritionnelles avant sevrage et conséquences sur les performances zootechniques

L'accès à un aliment précocement au nid n'a pas eu d'incidence sur les performances zootechniques des lapereaux. Au vu des apports nutritionnels quantitativement limités de cet apport solide relativement au lait et de son absence d'effet sur l'efficience alimentaire, ces résultats étaient attendus. Des conclusions similaires avaient par ailleurs été montrées lors de l'apport de granulés dans le nid à partir de 8 jours d'âge (Combes et al., 2017a) ou de l'introduction de végétaux à partir de 15 jours post-partum (Mattioli et al., 2019). Les conséquences de l'apport d'un aliment porcelet sous la mère sur les performances de croissance des portées sont quant à elles équivoques (Pluske et al., 2005).

La modulation du ratio fibres digestibles/amidon avant et après sevrage n'avait également pas d'effet sur la croissance des animaux. En effet, les deux aliments expérimentaux ont été formulé de manière à obtenir une teneur en énergie digestible équivalente et estimée à 9,3 MJ/kg. De la même façon, l'altération du ratio fibres digestibles/amidon à travers 4 régimes alimentaires iso-énergétiques n'affectait pas le taux de croissance des animaux en engraisseement dans le cadre d'un essai réalisé avec des effectifs importants (n=582 animaux par régime ; Gidenne et Perez, 2000). Dans l'étude de Debray et al. (2002b) les lapereaux ayant

reçu un aliment avec un ratio amidon/fibres totales élevé (0,98) étaient plus lourds au sevrage que ceux ayant disposé d'un aliment avec un ratio plus faible (0,68). Toutefois dans cette étude, ces aliments n'étaient pas isoénergétique et étaient distribués aux femelles allaitantes et à leurs lapereaux. Les effets observés pouvaient donc être confondus avec l'altération de la production laitière lors de l'abaissement des apports en amidon ainsi qu'avec des différences de teneurs énergétiques des aliments. Les animaux du lot contrôle avaient en revanche une meilleure croissance que les animaux des lots expérimentaux, avec un poids au sevrage de 55 grammes supérieur aux autres lots expérimentaux. Ceci s'explique par des concentrations supérieures en amidon (entre +1,2% et +8,3%) et en protéines (+1,6 %) au détriment des apports en fibres (-5,1%).

Notre investigation de la digestion de l'aliment par le lapereau allaité a permis de montrer une évolution non linéaire de ses capacités digestives. Ainsi autour de 25 jours d'âge, les valeurs de digestibilité de tous les nutriments chutent, coïncidant avec le moment où l'aliment solide devient majoritaire dans le régime du jeune lapin. Ces valeurs augmentent à nouveau signalant une adaptation du système enzymatique du lapin à un régime plus riche en glucides végétaux de façon concomitante à l'augmentation de l'activité microbienne.

La réduction des apports d'amidon au profit des fibres rapidement fermentescibles permet d'améliorer la digestibilité de différentes fractions de fibres sans effet préjudiciable sur la croissance des lapereaux. L'apport précoce de substrat nutritionnel au nid n'influençait ni l'efficacité digestive ni les performances zootechniques des lapereaux. Toutefois, le dispositif d'alimentation précoce développé visait avant tout à une préservation de la santé par la modulation de l'implantation du microbiote, effets qui seront développés dans la prochaine section.

IV/ Tryptique alimentation solide – hôte – microbiote : effets de stratégies d'alimentation du jeune lapereau sur le microbiote et la santé

A) Modulation du microbiote caecal et de son activité fermentaire

1) Manipulation post-natale du microbiote par l'apport précoce d'aliment solide

Les effets de l'apport précoce d'aliment au nid ont été étudiés dans les essais 6 et 7 par la comparaison de lots ne différant que par la stratégie alimentaire employée en début de vie (Figure 37). La supplémentation au nid d'un aliment démarrage module le microbiote selon les 3 modalités décrites en p°59 à savoir une modulation de la composition initiale du microbiote (modification des espèces bactériennes colonisatrices secondaires, qui se développent après l'apparition des espèces pionnières), une modulation de la succession écologique des espèces ainsi que du temps nécessaire pour l'installation d'un microbiote stable. Ces effets d'une supplémentation précoce d'aliment solide étaient d'autant plus marqués que l'ingestion était élevée (essai 7). L'intégration de la variabilité de la consommation d'aliment est donc essentielle pour l'analyse des profils microbiens comme précédemment montré par Holmes et al. (2017) lors d'une analyse détaillée des ingérés nutritionnels. Afin de réduire cette variabilité, les animaux prélevés lors de l'essai 6 avait été sélectionnés de façon à prélever les lapereaux les plus consommateurs de gels.

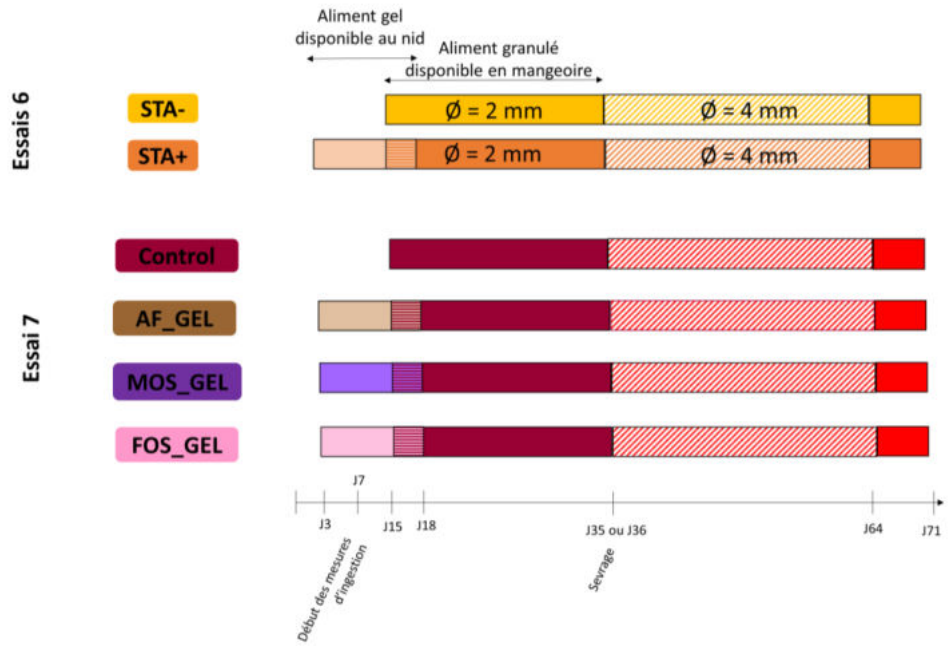


Figure 37: Lots expérimentaux permettant l'analyse des effets induits par l'apport précoce d'aliment solide.

L'introduction précoce d'aliment solide contribuait à un ensemencement dirigé des écosystèmes digestifs. Ainsi quel que soit sa nature, la mise à disposition d'un aliment au nid favorisait le développement de familles de bactéries spécialisées dans la dégradation de composés fibreux complexes dès 18 jours d'âge. Ces changements correspondent à une stimulation de la croissance des Ruminococcaceae (analyse d'abondance relative, article 5) et le développement de souches spécifiques de Lachnospiraceae et Ruminococcaceae (analyse des OTUs propres aux animaux ayant reçu un aliment gélifié, article 6).

Des effets à long terme de l'apport d'un aliment au nid sur les trajectoires empruntées par le microbiote étaient également observés dans les essais 6 et 7 avec la proportion de certains OTUs affectée jusqu'à 58 jours d'âge, soit 40 jours après la fin de l'intervention nutritionnelle précoce. Deux hypothèses peuvent être formulées concernant les mécanismes de ces effets visibles même au-delà du sevrage. Tout d'abord, les espèces bactériennes colonisatrices secondaires auraient induit des conditions favorables au développement ultérieur de certaines bactéries via l'apport de substrats favorisant leur croissance, phénomène normalement observé lors de la construction du microbiote du jeune (Houghteling et Walker, 2015). Ainsi des changements de biotopes digestifs étaient visibles avec différentes teneurs en métabolites observées dans le lumen des lapereaux, parmi lesquels neuf métabolites présents en plus grande quantité dans le digesta des lapereaux de 18 jours d'âge ayant disposé de gels alimentaires (article 5). Enfin, l'augmentation de l'ingestion de granulés aux mangeoires suite à l'apport d'un gel appétent au nid était observée dans nos essais 3 et 7 et cette modification de comportement alimentaire pourrait également expliquer les conséquences à long terme d'une intervention nutritionnelle précoce sur la colonisation microbienne. Cette stimulation ultérieure de l'ingéré solide grâce à la mise à disposition d'aliments en début de vie est très bien caractérisée en élevage porcin (voir revues de Pluske et al., 2005, 2018) puisqu'elle permettrait de réduire les problèmes de néophobie alimentaire rencontrés lors de l'engraissement.

Plusieurs résultats issus de notre sixième essai suggèrent que la consommation d'aliment au nid des lapereaux allaités permet d'accélérer la maturation du microbiote digestif (article 5). Atteindre plus rapidement un microbiote mature apparaît désirable du fait de l'établissement d'un état microbien stable (« climax ») avec l'âge (Mackie et al., 1999). Ainsi, la diversification en espèces de l'écosystème digestif des lapereaux augmentait avec l'âge mais également avec la consommation de gel (effets sur les indices de diversité de Shannon et d'Inverse de Simpson visibles une semaine avant le sevrage). Cette diversité accrue permettrait en outre d'améliorer la résilience des écosystèmes microbiens et serait un gage de meilleure santé (Larsen et

Claassen, 2018). La comparaison des matrices de similitude incorporant l'abondance et les distances phylogénétiques entre organismes bactériens (distances de Wunifrac) a permis de montrer que le microbiote caecal de lapereaux ayant consommé précocément un aliment se rapprochait d'un microbiote plus mature dès 18 jours d'âge avec un maintien de cette avance au cours du temps. Plus spécifiquement, la croissance des bactéries de la famille des Ruminococcaceae était stimulée tandis que la proportion de Bacteroidaceae était réduite avec une supplémentation solide précoce, un schéma de succession écologique qui est classiquement observé autour du sevrage (Combes et al., 2011; Read et al., 2019) et qui correspond à l'évolution d'un microbiote vers des fonctions de fibrolyse (Biddle et al., 2013).

Un résultat qu'il paraît important de souligner est la hausse des teneurs caecales en butyrate observée à 18 jours d'âge suite à l'apport précoce d'aliment solide. Ce résultat est particulièrement intéressant car cet acide gras volatil, très bien absorbé par les cellules épithéliales, est susceptible de déclencher des cascades trophiques locales (Nicholson et al., 2012) et notamment de favoriser le renouvellement et la réparation du tissu digestif (Brouns et al., 2002; Zheng et al., 2017). Ce bénéfice potentiel induit par l'ingestion précoce d'aliment pourrait être en lien avec sa composition riche en céréales. En effet, la présence de glucose dans le lumen caecal lors de l'enrichissement de l'aliment en amidon pourrait suggérer qu'une partie de cet amidon ait échappée à une digestion enzymatique dans le tractus digestif supérieur et ait été dégradé dans le caecum comme observé lors de l'enrichissement d'un aliment en amidon résistant chez le porc (Jonathan et al., 2013). Le terme d'amidon résistant fait référence à cet amidon (ou les produits de sa dégradation) qui ne sont pas absorbés dans le segment gastro-intestinal supérieur (Asp et Björck, 1992). Lors de la fermentation de ce polysaccharide résistant, des produits intermédaires sont libérés (acétate, lactate ou petits oligosaccharides) puis sont fermentés et aboutissent à une production de butyrate (Brouns et al., 2002; Baxter et al., 2019, Figure 38).

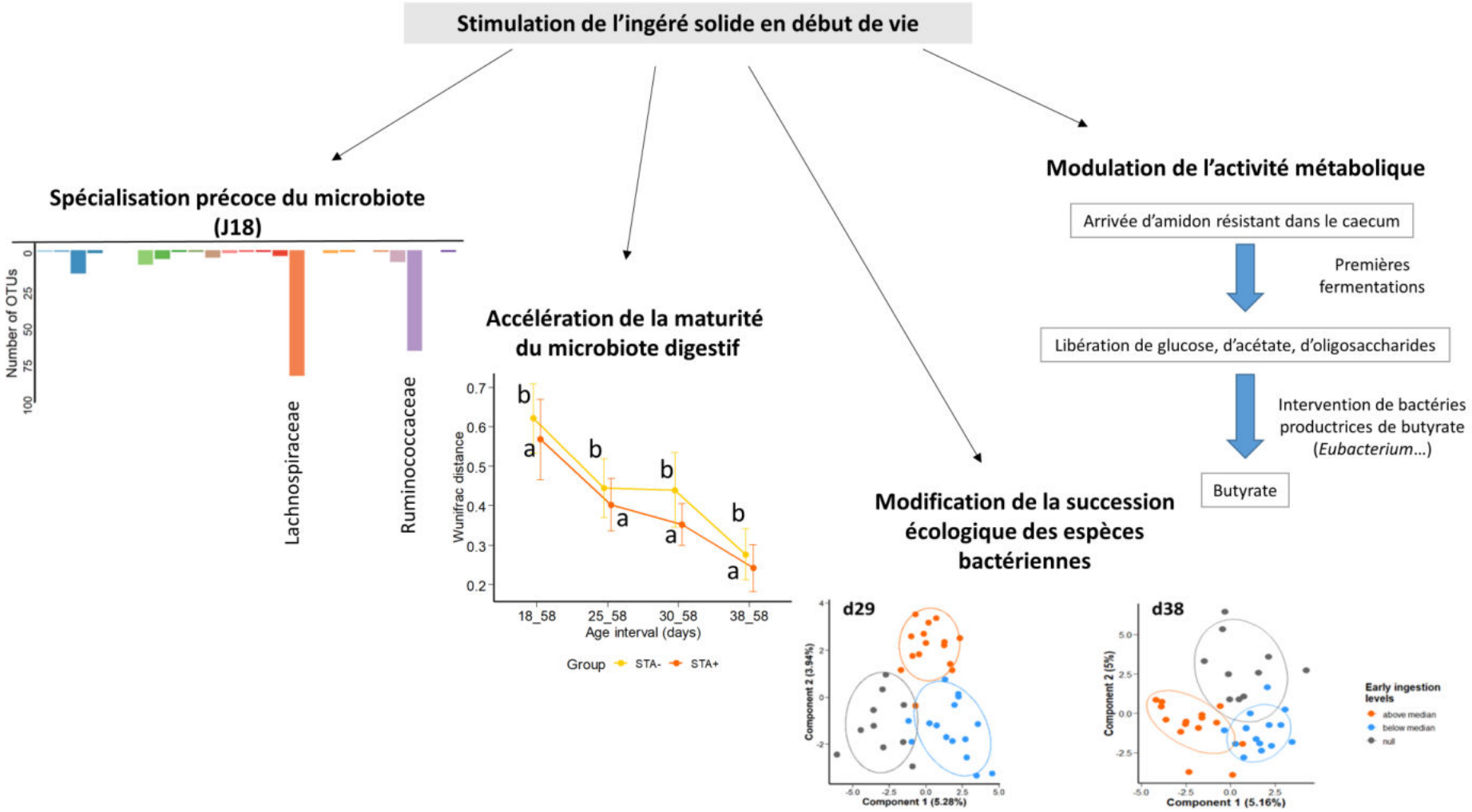


Figure 38 : Synthèse des effets principaux de la stimulation précoce d'aliment solide sur la colonisation bactérienne du caecum et son activité métabolique. Le mécanisme de production de butyrate proposé suite à l'arrivée d'amidon est issu du travail de Baxter et al., 2019.

2) *Manipulation post-natale du microbiote en modulant la composition de l'aliment pré-sevrage*

L'apport d'ingrédients fonctionnels intégrés dans l'aliment est une stratégie prometteuse pour ensemencer de façon dirigée le microbiote en développement, comme démontré chez l'agneau via des apports précoces de levures vivantes (Chaucheyras-Durand et al., 2019) ou chez l'homme avec l'incorporation de prébiotiques dans certaines préparations pour nourrissons (McKeen et al., 2019). Toutefois dans le cadre de notre étude, l'apport en oligo-saccharides commerciaux affectait de façon limitée la composition du microbiote. Outre les niveaux d'ingestion limités en début de vie, ceci pourrait s'expliquer par le choix des prébiotiques utilisés, initialement motivé par leur utilisation courante durant la période d'engraissement du lapin ou du porc. En effet les prébiotiques sont par définition destinés à cibler des populations bactériennes de façon sélective (Slavin, 2013) et le microbiote digestif des lapereaux est spécifique de par l'espèce du lapin, le contexte sanitaire et l'âge des lapereaux. Ainsi très peu de Lactobacilles évoluent dans le tractus digestif du lapin (Yu et Tsen, 1993; Read et al., 2019), une cible majeure des fructo-oligosaccharides (Mao et al., 2015). De plus, aucune bactérie pathogène n'a été inoculée de façon volontaire dans notre essai. Or les mannan-oligosaccharides se fixent sur les bactéries entériques pathogènes (Halas et Nochta, 2012) permettant de réduire les contaminations aux Salmonelles en volaille par exemple (Oyofo et al., 1989). Enfin la faible diversité du microbiote du jeune lapereau tant en terme de nombre et type d'espèces présentes (Combes et al., 2011) pourrait avoir limité le spectre d'action des prébiotiques utilisés.

La modulation du ratio fibres digestibles/amidon de l'aliment induisait des changements notables de l'implantation du microbiote. La majorité de ces effets survenaient toutefois plusieurs jours après la supplémentation en gel et il n'était pas possible de différencier les effets de la composition de l'aliment gélifié de ceux de l'aliment granulé apporté compte tenu de notre design expérimental. En effet, dès 15 jours d'âge les lapereaux disposaient de deux types de substrats nutritionnels (gels et granulés). L'ajout de prélèvements sur des lapereaux âgés de 15 jours permettrait de déterminer la capacité de l'aliment gélifié à promouvoir les modifications de composition ou de fonctionnement du microbiote.

Globalement, l'augmentation relative des apports en fibres digestives était associée à une réduction de la richesse du microbiote caecal avec une dominance de certaines espèces bactériennes plus marquée comparativement aux microbiotes de lapereaux ayant bénéficié de

quantités plus importantes d'amidon alimentaire. L'amidon est fortement digéré par le lapin et seulement 5% des apports nutritionnels parviendraient au caecum de lapereaux de 28 jours (Gallois et al., 2008a). Bien qu'en faible quantité, cet amidon résiduel dit résistant est susceptible d'induire des changements taxonomiques notables suite à sa fermentation (Brouns et al., 2002; Zhang et al., 2019). L'amidon résistant représente ainsi un prébiotique potentiel (Zaman et Sarbini, 2016). Dans nos essais, la réduction du ratio fibres digestibles/amidon induisait des modifications à l'échelle des phyla et des familles bactériennes avec notamment une hausse des ratios Firmicutes/Bacteroidetes et Ruminococcaceae/Lachinospiraceae, marqueurs de maturité (Mariat et al., 2009; Combes et al., 2014; Read et al., 2019). Le développement des Lachnospiraceae au détriment des Ruminococcaceae lors de l'enrichissement de l'aliment en pectines et hémicelluloses trouve sans doute son origine dans la présence de nombreux gènes codant pour des enzymes capable de cliver des chaînes pectiques chez les Lachnospiraceae (Biddle et al., 2013).

Ces modifications taxonomiques étaient associées à des différences de teneurs en certains métabolites dans le lumen, avec en particulier les teneurs en acétate augmentées lors d'apports élevés en pulpe de betterave comme précédemment observé par Trocino et al. (2010). De façon surprenante, alors que les hémicelluloses et pectines représentent des fractions facilement dégradables par le microbiote, l'augmentation des apports en fibres digestibles ne semblaient pas induire de stimulation de l'activité microbienne comme observé par Jacquier et al. (2014) avec des teneurs en AGV totaux (annexe 4, figure 3).et des mesures de pH identiques entre les quatre lots.

3) Hiérarchisation des facteurs modulant la colonisation du microbiote du jeune lapin

Tableau 6 : Analyse PERMANOVA sur les distances de Wunifrac calculées à partir des communautés bactériennes caecales des animaux des lots expérimentaux avant sevrage.

	Essai 6		**Essai 7**	
	P-value	R2	P-value	R2
	Lots STA- et STA+		Lots CONTROL et AF_GEL	
Effet précocité	0,015	1,7%	0,112	1,1%
	Lots STA+ et FF+		Lots AF_GEL, FOS_GEL et MOS_GEL	
Effet composition	0,003	2,1%	0,350	0,7%
Effet âge	0,001	**66,6%**	0.001	**41,2%**

L'âge (confondu avec le phénomène de transition alimentaire) des lapins demeure le principal facteur structurant la composition et l'activité du microbiote avant sevrage avec par exemple plus de 40% de variabilité des matrices de similarité expliquée par ce facteur avant sevrage (Tableau 6). Les changements taxonomiques les plus marqués étaient observés entre 18 et 25 jours (article 5) ou entre 18 et 29 jours d'âge (article 6), et non autour du sevrage. Ces périodes correspondent à la fois à l'accroissement de l'ingestion d'aliment solide et à la réduction de l'ingestion de lait. Cette portion lactée contraindrait la structure et la composition du microbiote du lapin (Read et al., 2019) en lien avec sa richesse en molécules à effets prébiotiques (oligosaccharides), probiotiques (microbiote maternel) ou antimicrobiens (Gallois et al., 2007; Skrivanova et al., 2009; Houghteling et Walker, 2015). En outre, les lapins recevant un régime exclusivement lacté jusqu'au sevrage montraient des indices de diversité microbiens inférieurs (Combes et al., 2008) avec un retard de colonisation des bactéries cellulolytiques sans influence sur les populations de *E.Coli* (Padilha et al., 1999). Cette pression selective induite par le lait expliquerait une limite naturelle des effets d'une alimentation solide précoce. Il serait ainsi intéressant d'ajouter des évaluations individuelles de la consommation de lait des lapereaux et de la qualité du lait ingéré pour mieux contrôler ces facteurs dans nos modèles. La pesée avant puis après tétée de chaque animal échantillonné permettrait de collecter les quantités individuelles d'ingéré lacté bien que la mesure de l'ingéré solide ne soit actuellement possible qu'à l'échelle de la portée ou de la cage avant sevrage.

D'autres facteurs (génétique, lapine nourricière, coprophagie…) contribuent également à l'implantation du microbiote, expliquant que seulement 17% d'OTU soient acquis via l'alimentation solide (Read et al., 2019). Ces changements du microbiote pourraient toutefois être suffisants pour optimiser la santé, en agissant sur des espèces taxonomiques clés, les « keystone groups » (Laforest-Lapointe et Arrieta, 2017) qui sont essentielles pour le développement de l'immunité.

Bien que l'ingestion d'aliment solide au nid soit quantitativement faible, la stimulation de ce comportement alimentaire démontre des effets à long terme sur la composition, la maturité et l'activité du microbiote et suggère la possibilité d'une programmation précoce de la santé. La modificaiton de substrats parvenant au caecum via des changements de formulation de l'aliment constitue également un levier de modulation du microbiote. Outre des effets ontogénique (purement liés à l'âge), l'ingestion de lait maternel en parallèle du démarrage de l'ingestion d'aliment solide pourrait naturellement limiter l'amplitude des effets d'une alimentation précoce au nid.

B) Conséquences physiologiques de la conduite alimentaire du lapin avant le sevrage

1) Conséquences de stratégies alimentaires employées avant le sevrage sur la muqueuse caecale

Conséquences d'une introduction précoce d'aliment solide

L'expression du gène *Tnfsf13b* (TNF Superfamily Member 13b) était significativement réduite dans le tissu caecal à l'âge de 18 jours suite à l'introduction précoce d'aliment gélifié (essai 6). Ce gène code pour la cytokine BAFF (B-cell activating factor) susceptible de stimuler l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'IgA (OMIM banque de données, 2019). L'expression de ce gène est stimulée par le microbiote commensal (Kamada et al., 2013b) et son niveau d'expression augmentait avec l'âge chez nos animaux, indiquant qu'une sur-expression de ce gène *Tnfsf13b* serait gage de maturité intestinale. A l'échelle post-transcriptionnelle, l'immunité humorale de ces mêmes lapereaux (concentration d'IgA caecale au cours du temps) n'était pas affectée par l'intervention nutritionnelle en début de vie. Le rôle de la cytokine BAFF pourrait être limité à 18 jours d'âge, période où l'immunité passive domine l'immunité propre du lapereau (voir 2)), expliquant l'absence de conséquences biologiques des différentiels d'expression observés. En revanche une consommation importante d'aliment précoce, confondue avec l'apport de fructo-oligosaccharides, était associée à une augmentation de l'immunité humorale locale à 29 et 57 jours, lors de la construction de l'immunité endogène au lapereau. Cette hausse pourrait être en lien avec des modifications de profils microbiens, certaines bactéries pouvant stimuler la production de sIgA (Mantis et al., 2011; Breedveld et van Egmond, 2019). Une analyse de corrélation permettrait de valider cette relation.

L'apport précoce d'aliment solide modulait l'activité de la muqueuse caecale sur le long terme avec notamment une production augmentée de transcrits *Mct1* (Monocarboxylate Transport 1), gène codant pour une protéine permettant le transport de nombreux monocarboxylates parmi lesquels le butyrate, qui stimulerait en retour l'expression de *Mct1* (Borthakur et al., 2008). Aussi, nous supposons que l'augmentation de butyrate observée en début de vie suite à l'ingestion de gels pourrait expliquer cette modulation du transcriptome visible bien après la supplémentation. L'expression du gène *CD14* (Monocyte Differentiation antigen CD14) codant pour un récepteur de lipopolysaccharide intégré aux membranes de monocytes et macrophages (Haziot et al., 1988) était également réduite 41 jours après la fin des apports en gels chez les animaux ayant disposé d'un aliment au nid. L'activation en cascade de

ce récepteur joue un rôle essentiel dans la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (Ebong et al., 2001), démontrant ainsi les conséquences d'une alimentation solide post-natale sur certains paramètres de l'immunité innée.

Conséquences des changements de composition des gels apportés au nid

Enfin la composition nutritionnelle de l'aliment apporté en début de vie constitue également un levier de contrôle de la santé. En effet, une diminution du ratio fibres digestibles/amidon de l'aliment induisait une diminution de l'expression des gènes *Tnfsf13b, Gpx2* (glutathione peroxidase 2) et *pigR* (polymeric immunoglobulin receptor) à 18 jours d'âge. Ces deux derniers gènes codent respectivement pour la production d'une enzyme antioxydante et du récepteur polymérique transmembranaire dont la partie sécrétoire est nécessaire au transport d'IgA du milieu intérieur tissulaire au lumen (Breedveld et van Egmond, 2019). Ces résultats indiqueraient une maturité de la muqueuse caecale accrue suite à l'enrichissement de l'aliment en fibres digestibles, résultat surprenant étant donné le développement du microbiote qui apparaît ralenti avec un tel enrichissement. Pour confirmer ces observations, des analyses exploratoires multivariées du transcriptome peuvent être envisagées. En outre, des régulations post-transcriptomiques peuvent survenir dans les cellules et une analyse protéomique permettrait d'étayer les données obtenues via le dosage de protéines en temps réel, dosage qui reste complexe chez le lapin étant donné la faible disponibilité en anticorps commerciaux.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'arrivée de substrats solides de façon précoce dans le lumen affecterait l'immunité humorale et innée conjointement au développement de bactéries et à la production de métabolites spécifiques. Cette manipulation post-natale modifie l'activité de la muqueuse caecale au-delà de la période de supplémentation au nid.

2) Conséquences de stratégies alimentaires avant le sevrage sur l'immunité systémique

Nos différentes études ont permis de définir pour la première fois la cinétique de construction de l'immunité systémique du jeune lapin avec le suivi des concentrations en IgG (Figure 39). Jusqu'à 21 jours d'âge, période correspondant au pic de lactation, les teneurs en IgG plasmatiques sont particulièrement élevées. Cela s'explique très propablement par un transfert d'immunité puisque le lait des lapines est particulièrement riche en IgG (elles représentent 95% des immunoglobulines totales du colostrum et 98% de celles du lait ; Maertens et al., 2006). Autour du sevrage, les défenses conférées par les IgG sont au plus bas, ce qui pourrait justifier la susceptibilité de lapereaux autour du sevrage. Le développement de

l'immunité propre de la souris est observé une semaine après sevrage (Rogier et al., 2014), et un développement similaire chez le lapin expliquerait l'augmentation des teneurs en IgG observée à 58 jours d'âge. Cette cinétique est en outre similaire à celle observée chez d'autres petits mammifères (Peterson et Kutzler, 2010). Cette trajectoire était légèrement modifiée suite à nos interventions nutritionnelles. Ainsi, l'apport d'aliment solide de manière précoce était associé à des niveaux plus faibles d'anticorps circulants à 30 jours d'âge (article 5), pouvant traduire une plus forte mobilisation des anticorps maternels. Au même âge, les teneurs en espèces réactives de l'oxygène (molécules pro-oxydantes) dans le sérum tendaient à être réduites suite à l'ingestion de gels. Ces résultats pourraient suggérer le développement des défenses de l'hôte suite à la consommation précoce d'aliment. Toutefois ces modulations de l'immunité humorale systémique induite par la stimulation de l'ingestion post-natale n'étaient pas retrouvées à travers l'étude 7 (article 6) et ces résultats restent délicats à interpréter en l'absence de données immunologiques supplémentaires.

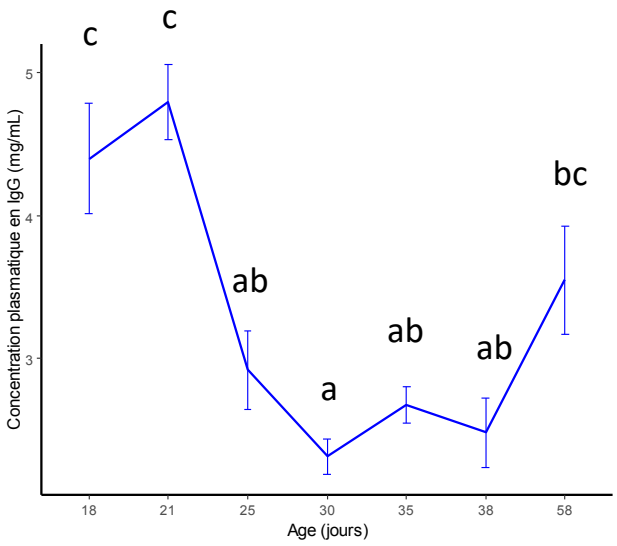


Figure 39 : Evolution des teneurs plasmatiques en IgG au cours de la croissance. Les valeurs combinées des essais 5, 6 et 7 sont présentées sachant que les jours proches (29 et 30 jours et 57 et 58 jours) ont été regroupés.

3) Conséquences de stratégies alimentaires avant le sevrage à l'échelle macroscopique

L'apport d'un support nutritionnel au nid combiné à un enrichissement de l'aliment en amidon a eu pour conséquence une accélération de la maturité du microbiote (évaluée selon plusieurs critères : distances métriques au point final, proportion de Firmicutes et ratio Ruminococcaceae/Lachnospiraceae) associée à une production accrue d'acétate et butyrate, possiblement bénéfique pour l'hôte. Toutefois les marqueurs de santé de l'immunité locale ou

systémique ne permettent pas de conclure sur la capacité d'un tel régime alimentaire à préserver la santé. Les taux de mortalité établis au cours de nos 7 essais expérimentaux étaient faibles (inférieurs à 4% entre 7 et 35 jours d'âge et inférieurs à 3% en engraissement) et étaient équivalents entre lots intra-essais. Les performances de croissance suite à l'apport d'aliment au nid étaient maintenues, montrant *a minima* qu'une stratégie de stimulation de l'ingéré solide post-natal ne porte pas atteinte à la croissance des animaux.

De précédentes études s'intéressant au ratio fibres digestibles/amidon ont montré que la mortalité augmentait significativement en engraissement lorsque les apports en amidon étaient doublés et les quantités en fibres rapidement fermentescibles réduites avec des apports en cellulose et lignine équivalents, en conditions d'élevage classique (Perez et al., 2000), ou suite à l'émergence de l'ERE (Xiccato et al., 2008). Ces troubles majoritairement d'ordre digestif étaient associés à une réduction de la production d'AGV *in vivo* (Jehl et Gidenne, 1996) et *in vitro* (Xiccato et al., 2008), phénomène non observé dans nos expérimentations. Toutefois les régimes extrêmes utilisés dans ces études utilisaient des concentrations élevées en amidon (19% -24% dans les régimes les plus extrêmes) tandis que les formules utilisées dans notre étude étaient conçues de façon à satisfaire les besoins du lapereau allaité ou en engraissement avec des teneurs en amidon beaucoup plus faibles (entre 5 et 12%), expliquant l'absence d'effets délétères observés. En outre dans nos essais, le ratio fibres digestibles/amidon était toujours supérieur à 1 (1,7 au minimum), pré-requis nécessaire au maintien de la santé (Xiccato et al., 2008).

Par conséquent, les faibles activités amylasiques pancréatiques observées jusqu'à 42 jours d'âge (Debray et al., 2003) pourraient être exploitées pour favoriser l'arrivée d'amidon résistant dans le caecum, constituant qui remplit tous les critères du prébiotique chez l'homme (Slavin, 2013). Toutefois, il semble que ce flux doit être maitrisé afin que des apports minimaux en fibres rapidement fermentescibles soient maintenus pour préserver la santé digestive

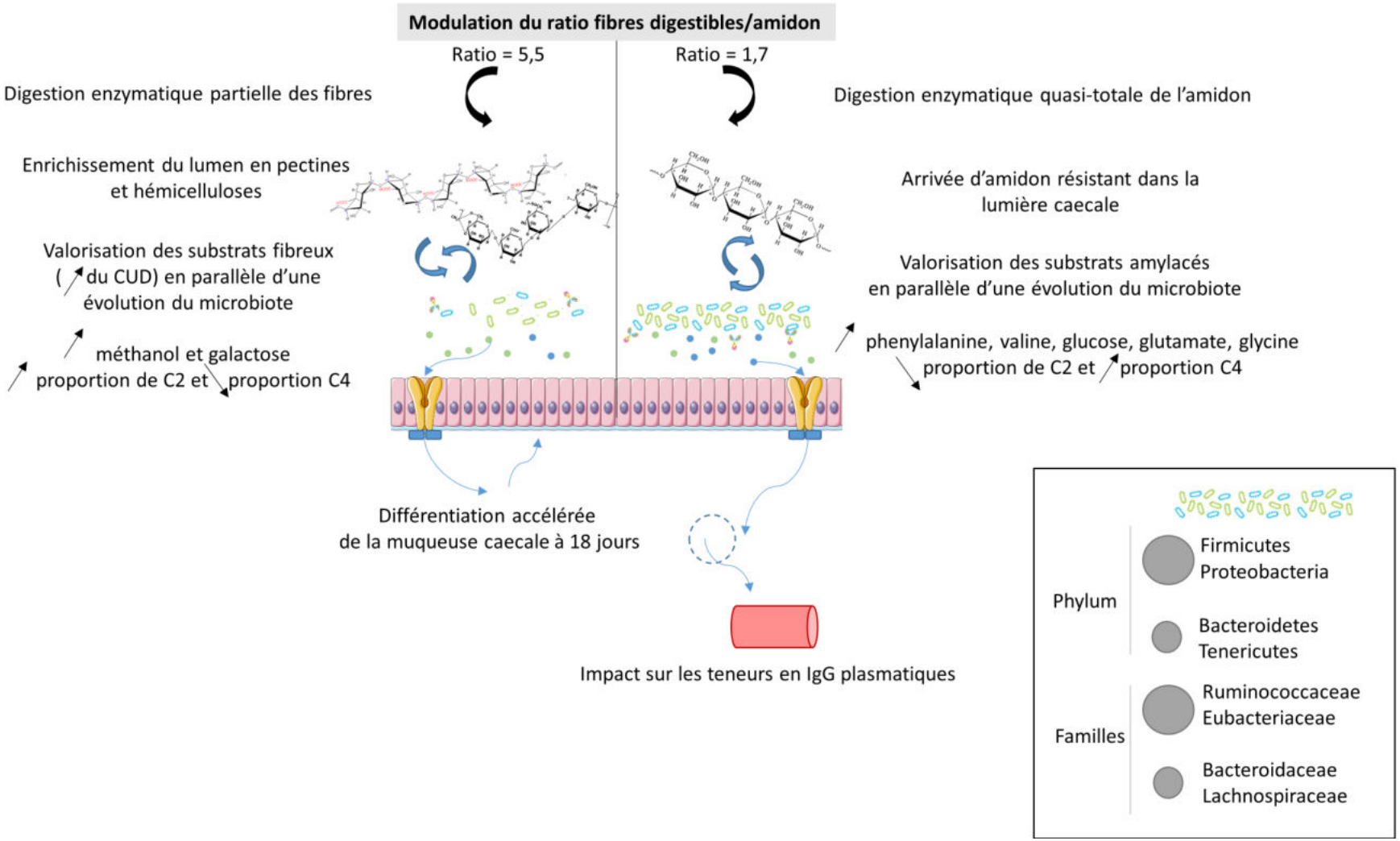


Figure 40 : Conséquences biologiques d'une modulation du ratio fibres digestibles/amidon de l'aliment distribué avant sevrage (synthèse article 5). Des modifications de diversité du microbiote, de sa taxonomie et de son activité métabolique étaient observées. L'encadré présente le microbiote digestif dans le cas d'un ratio fibres digestibles/amidon égal à 1,7 (les ronds les plus larges présentent les taxa dont l'abondance était augmentée par l'enrichissement de l'aliment en amidon et inversement). Ces changements de l'interface intestinale étaient associés à des changements d'expression génique à 18 jours d'âge.

Finalement, les effets des différentes stratégies alimentaires testées sur le microbiote et la santé sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Synthèse des effets des stratégies alimentaires testées dans l'essai 6 (article 5) sur les différentes variables mesurées. Les signes employés représentent l'amplitude des effets observés : NS pour non significatif, +/- pour des tendances statistiques, + ou ++ pour des effets significatifs.

	Stratégie alimentaire avant sevrage	
	Alimentation précoce	Modulation de la composition en fibres digestibles et amidon
Mortalité/Morbidité	NS	NS
Performances zootechniques	NS	+/-
Teneurs en IgG plasmatiques	+	+
Concentrations en hydroperoxydes (mesure du stress oxydatif)	+/-	NS
Teneurs en IgA caecales	+	NS
Microbiote caecal	++	++
Métabolites présents dans le caecum	++	++
Transcriptome iléal	NS	NS
Transcriptome caecal	+	++

La stimulation précoce de l'ingéré solide et la modulation des apports nutritionnels avant sevrage affectent l'expression de gènes impliqués dans l'immunité locale modifiant ainsi le dialogue hôte-microbiote à l'interface lumen-épithélium. Une opposition était observée entre l'accélération de la maturité du microbiote digestif induite par l'enrichissement de l'aliment en amidon, et la promotion de la maturité intestinale (maturité de l'hôte) par des apports élevés en fibres digestibles (Figure 40). Les niveaux d'anticorps IgA ou IgG pouvaient être affectés par les stratégies nutritionnelles employées, mais les résultats obtenus n'étaient pas répétés inter-essais, possiblement en lien avec des variabilités d'ingestion précoce d'aliment. Des bénéfices santé n'ont pu être mis en évidence à l'échelle phénotypique étant donné le contexte sanitaire favorable de nos études. Toutefois, nous pouvons conclure que l'apport précoce d'aliment ne perturbait pas la croissance des animaux, et l'enrichissement raisonné de l'aliment en amidon n'induisait pas d'effets zootechniques délétères.

Conclusion

La première phase de cette thèse visait à mettre en place un dispositif d'alimentation optimisant l'ingéré solide précoce du lapereau allaité, comme observé dans des conditions naturelles. La mise au point d'un tel dispositif a permis de comprendre les déterminants de l'ingestion en testant notamment l'appétence de supports nutritionnels innovants proposés au lapereau avant sevrage. Nos résultats ont mis en évidence la capacité du lapereau à différencier dès sa deuxième semaine de vie les aliments qui lui étaient proposés selon leurs caractéristiques technologiques. L'apport d'un aliment hydraté gélifié au nid supplémenté en arômes de vanille, conjugué à l'introduction ultérieure de granulés de faible diamètre, a été identifié comme une stratégie optimale de présentation de l'aliment avant sevrage. Nous avons également pu montrer dans cette première phase que l'ingestion précoce d'aliment solide ne modulait pas l'ingestion de lait, infirmant ainsi l'hypothèse d'une moindre sollicitation des lapines grâce à un aliment démarrage. A l'inverse, le poids à la naissance semble être un déterminant majeur du démarrage de l'ingestion solide précoce.

Une étude nutritionnelle contrôlant les apports en fibres digestibles et amidon a ensuite été réalisée avec notre dispositif d'alimentation précoce optimisé afin d'enrichir nos connaissances des besoins nutritionnels du lapereau allaité. La stimulation de l'ingéré solide en début de vie ne modifiait pas les capacités digestives du lapin non sevré. En revanche cette étude a permis de mettre en évidence une chute de digestibilité au moment où l'aliment solide devenait majoritaire dans le régime du lapereau, et ceci pour tous les régimes testés. Ces données soulignent l'attention qui doit être portée à la formulation de l'aliment péri-sevrage pour s'adapter à la transition alimentaire.

Enfin, forts des acquis précédents, les effets de la stimulation de l'ingéré solide précoce sur la composition et le fonctionnement du microbiote digestif ont été étudiés. Malgré la variabilité de l'ingestion solide au nid, nous avons pu démontrer la pertinence d'un aliment solide introduit précocément pour piloter l'implantation microbienne. La nature des glucides et des fibres composant l'aliment démarrage est également susceptible de moduler le microbiote dans le lumen caecal ainsi que son dialogue réciproque avec l'hôte au niveau de la muqueuse. L'enrichissement de l'aliment en amidon au détriment des fibres digestibles favorisait plus particulièrement l'acquisition d'un microbiote mature. Les conséquences de la modulation de la succession écologique des espèces bactériennes, qui évoluent en interaction avec le système

immunitaire de l'hôte, sur la résistance du lapin aux maladies digestives restent à élucider. Dans cette perspective, des environnements expérimentaux plus « challengeants » pour les animaux avec des dispositifs d'alimentation précoce pourraient être envisagés.

Finalement, nos résultats ont montré qu'il était possible de stimuler l'ingestion volontaire solide du lapereau allaité afin d'orienter l'implantation du microbiote digestif. Ce travail permet de conforter les résultats de précédentes études démontrant les conséquences durables de l'environnement néonatal du jeune sur la construction et l'avenir de son microbiote digestif. Nous avons par ailleurs enrichi les connaissances relatives au comportement alimentaire du lapereau, à son efficacité digestive, à la construction de sa santé et aux dynamiques d'implantation du microbiote. Le rôle joué par la quantité et la qualité du lait maternel dans la construction du microbiote et le renforcement de la santé du lapin constitue une piste de recherche parallèle à ce travail qu'il reste à explorer pour mieux comprendre les interactions entre aliments, hôte et microbiote.

Perspectives

Si l'apport précoce d'aliment solide au lapereau allaité module certains paramètres physiologiques, l'interprétation de ces données en termes de bénéfice santé demeure complexe. Afin d'explorer de manière plus approfondie l'influence d'une modification de la séquence d'implantation du microbiote digestif sur la santé du jeune lapin, des approches additionnelles à celles employées pourraient être envisagées, à savoir :

- Solliciter les défenses immunitaires des lapins lors de challenges

L'utilisation de conditions challengeantes en élevage permettrait de valider l'impact d'une alimentation solide précoce sur la santé via l'utilisation de modèles biologiques plus contrastés. Le challenge adopté dépendrait de la composante de santé à investiguer (immunité innée ou acquise). Parmi les sources de stress qui peuvent être utilisées, nous pouvons citer l'utilisation d'un régime pauvre en fibres lignocellulosiques (Perez et al., 1994), des changements de température importants (induction d'un stress thermique à 35°C par exemple, Liu et al., 2011), la réalisation d'un sevrage précoce (Gallois et al., 2005a) ou l'allongement de l'intervalle entre deux têtées, ou encore encore l'inoculation de souches potentiellement pathogènes (Gallois et al., 2007; Martignon et al., 2011) ou de lipopolysaccharides (Knudsen et al., 2016) ou enfin une détérioration de l'hygiène du logement (Floc'h et al., 2010; Combes et al., 2017b).

- Ajout de mesures pour caractériser la santé digestive *in vivo*

Deux hypothèses de travail concernant les impacts d'un démarrage précoce d'ingestion d'aliment solide sur la santé pourraient être explorées. Il est supposé que l'arrivée précoce de substrats solides dans le tractus digestif altèrerait l'intégrité de la muqueuse digestive par effet abrasif, bien que les données actuelles ne soient pas unanimes à ce sujet (Gutiérrez et al., 2002 ; Gallois et al., 2005). Des premières lames histologiques ont été réalisées afin d'éclaircir cette hypothèse, mais la qualité des lames obtenues ne permettait pas de réaliser suffisamment de mesures de villosités, probablement en lien avec des prélèvements non optimaux (Annexe 5). Cette hypothèse reste donc à investiguer. Enfin, la construction du répertoire d'anticorps primaire étant dépendante de l'implantation du microbiote digestif (Mage et al., 2006), il serait intéressant d'étudier les effets de la modulation du microbiote induite par l'introduction précoce d'aliment solide sur la diversification du répertoire d'anticorps dans les tissus lymphoïdes digestifs.

- Développement de modèles *in vitro*

Afin de passer de la mise en évidence d'**associations** entre des profils bactériens et la santé à des réelles **causalités**, l'utilisation de modèles *in vitro* apparaît essentielle. Actuellement développée au sein de notre laboratoire, l'utilisation d'organoïdes d'intestin (structures multicellulaires tridimensionnelles qui reproduisent *in vitro* la micro-anatomie d'un organe) se révèle pertinente pour tester les effets de métabolites sur la barrière intestinale. L'usage de fermenteurs artificiels inoculés avec des digestas ou substrats alimentaires spécifiques permettrait notamment d'évaluer la cinétique de production des AGV dans des conditions contrôlées (lapin: Adjiri et al., 1992 ou porc par exemple: Gresse et al., 2017).

En l'absence d'effets zootechniques marqués, les conséquences de ce travail de thèse sur la filière cunicole demeurent difficiles à estimer. Néanmoins, si la potentialité d'une alimentation précoce sur la préservation de la santé est confirmée via les approches présentées ci-dessus, la stratégie de stimulation de l'ingéré solide se révèlera intéressante pour les éleveurs puisque l'ensemencement du microbiote en début de vie ne requiert que de faibles quantités d'aliments. La réalisation quotidienne d'aliments gélifiés est chronophage et devra donc être adaptée à une utilisation routinière en élevage. Un aliment démarrage appétant facile à distribuer et impliquant un minimum d'aménagements du logement devra ainsi être développé avec les acteurs de la filière cunicole pour une utilisation finale simplifiée en élevage. D'un point de vue expérimental, le dispositif d'aliment gel se révèle également intéressant pour tester facilement l'incorporation d'un additif spécifique et ses effets sur le comportement alimentaire et la santé de jeunes animaux. Avec ce travail, nous avons montré que l'utilisation de deux prébiotiques couramment employés en nutrition animale ne trouvait pas d'application pour moduler l'implantation du microbiote digestif chez le lapereau allaité.

Les premiers jours de vie représentent une fenêtre d'action étroite permettant d'optimiser l'efficacité d'interventions ciblant le développement de la santé. Pour optimiser l'intervention nutritionnelle en début de vie, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur les effets du lait de lapine sur la maturité du microbiote pour mieux comprendre l'antagonisme entre lait et aliment solide sur le développement bactérien. Il serait intéressant d'évaluer en particulier si des changements d'aliments maternels permettraient d'optimiser le développement du microbiote des lapereaux via des changements de composition du lait de lapine, comme observé chez l'humain (Padilha et al., 2019), la souris (Thum et al., 2016) ou le porc (Le Bourgot et al., 2014).

Références

Abecia L, Fondevila M, Balcells J, Edwards JE, Newbold CJ and McEwan NR 2007a. Effect of antibiotics on the bacterial population of the rabbit caecum. FEMS Microbiology Letters 272, 144–153.

Abecia L, Fondevila M, Balcells J and McEwan NR 2007b. The effect of lactating rabbit does on the development of the caecal microbial community in the pups they nurture. Journal of Applied Microbiology 103, 567–564.

Abrantes J, van der Loo W, Le Pendu J and Esteves PJ 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review. Veterinary Research 43, 12.

Abt MC and Pamer EG 2014. Commensal bacteria mediated defenses against pathogens. Current opinion in immunology 0, 16–22.

Achard CS, Dupouy V, Siviglia S, Arpaillange N, Cauquil L, Bousquet-Mélou A and Zemb O 2019. Variability of the Ability of Complex Microbial Communities to Exclude Microbes Carrying Antibiotic Resistance Genes in Rabbits. Frontiers in Microbiology 10.

Adjiri D, Bouillier Oudot M, Lebas F and Candau M 1992. Simulation in vitro des fermentations caecales du lapin en fermenteur à flux semi-continu. 1) Rôle du prétraitement du substrat alimentaire. Reproduction Nutrition Development, 32, 351-360.

Al Nabhani Z, Dulauroy S, Marques R, Cousu C, Al Bounny S, Déjardin F, Sparwasser T, Bérard M, Cerf-Bensussan N and Eberl G 2019. A Weaning Reaction to Microbiota Is Required for Resistance to Immunopathologies in the Adult. Immunity 50, 1276-1288.e5.

Altbäcker V, Hudson R and Bilkó Á 1995. Rabbit-mothers' Diet Influences Pups' Later Food Choice. Ethology 99, 107–116.

Appleby MC, Pajor EA and Fraser D 1991. Effects of management options on creep feeding by piglets. Animal Science 53, 361–366.

Arango Duque G and Descoteaux A 2014. Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. Frontiers in Immunology 5.

Argente MJ, Santacreu MA, Climent A and Blasco A 1999. Phenotypic and genetic parameters of birth weight and weaning weight of rabbits born from unilaterally ovariectomized and intact does. Livestock Production Science 57, 159–167.

Asp N-G and Björck I 1992. Resistant starch. Trends in Food Science & Technology 3, 111–114.

Assan N 2018. Factors influencing post-weaning growth and mortality in rabbits. Scientific Journal of Animal Science 7, 486–492.

Baranyi M, Thomas U and Pellegrini A 2003. Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (Oryctolagus cuniculus) milk. Journal of Dairy Research 70, 189–197.

Bäuerl C, Collado MC, Zúñiga M, Blas E and Martínez GP 2014. Changes in Cecal Microbiota and Mucosal Gene Expression Revealed New Aspects of Epizootic Rabbit Enteropathy. PLoS ONE 9.

Baxter NT, Schmidt AW, Venkataraman A, Kim KS, Waldron C and Schmidt TM 2019. Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions with Three Fermentable Fibers. mBio 10.

Beaumont M, Paës C, Cauquil L, Aymard P, Barilly C, Bouchez O, Canlet C and Combes S 2019. Su1998 – Early Life Solid Food Ingestion Remodels the Gut Microbiota Compostion and Increases the Production of Protective Bacterial Metabolites. Gastroenterology 156, S-685-S-686.

Beaumont M, Paës C, Mussard E, Cauquil L, Aymard P, Barilly C, Béatrice G, Sandra F, Roselyne G, Cécile C and Combes C Submitted. Gut microbiota derived metabolites contribute to the gut barrier maturation at the suckling-to-weaning transition. Gut microbes.

Bell AC and Watson S 1993. Preferential grazing of five varieties of spring barley by wild rabbits (Oryctolagus cuniculus). 122, 637–641.

Bennegadi N, Fonty G, Millet L, Gidenne T and Licois D 2003. Effects of Age and Dietary Fibre Level on Caecal Microbial Communities of Conventional and Specific Pathogen-Free Rabbits. Microbial Ecology in Health and Disease 15, 23–32.

Bernadac A, Moreau H and Verger R 1991. Gastric lipase and pepsinogen during the ontogenesis of rabbit gastric glands. European Journal of Cell Biology 55, 149–157.

Bezille P, Gallouin F and Lebars H 1973. Réalisation d'anus artificiels chez le lapin : mise en évidence du déterminisme et étude du rythme nycthéméral de la caecotrophie. Ann. Biol. Anim. Biochim Biophys, 13, 710-711.

Bhadresa R 1977. Food Preferences of Rabbits Oryctolagus cuniculus L. at Holkham Sand Dunes, Norfolk. Journal of Applied Ecology 14, 287–291.

Bian G, Ma S, Zhu Z, Su Y, Zoetendal EG, Mackie R, Liu J, Mu C, Huang R, Smidt H and Zhu W 2016. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model. Environmental Microbiology 18, 1566–1577.

Biddle A, Stewart L, Blanchard J and Leschine S 2013. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. Diversity 5, 627–640.

Bilkó Á, Altbäcker V and Hudson R 1994. Transmission of food preference in the rabbit: The means of information transfer. Physiology & Behavior 56, 907–912.

Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD and Walter J 2015. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology 12, 303–310.

Bode L, McGuire M, Rodriguez JM, Geddes DT, Hassiotou F, Hartmann PE and McGuire MK 2014. It's Alive: Microbes and Cells in Human Milk and Their Potential Benefits to Mother and Infant. Advances in Nutrition 5, 571–573.

Bolhuis, J. E., Oostindjer, M., van den Brand, H., Gerrits, W. J. J., & Kemp, B. (2009). Voluntary feed intake in piglets: potential impact of early experience with flavours derived from the maternal diet. In D. Torrallardona, & E. Roura (Eds.), *Voluntary feed intake in pigs* (pp. 37-60). Wageningen: Wageningen Academic Publishers.

Borthakur A, Saksena S, Gill RK, Alrefai WA, Ramaswamy K and Dudeja PK 2008. Regulation of Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1) Promoter by Butyrate in Human Intestinal Epithelial Cells: Involvement of NF-κB Pathway. Journal of cellular biochemistry 103, 1452–1463.

Bouladoux N, Hand TW, Naik S and Belkaid Y 2013. Microbiote et lymphocytes T: les meilleurs ennemis. Medecine sciences : M/S 29.

Boulahrouf A, Fonty G and Gouet P 1991. Establishment, counts and identification of the fibrolytic bacteria in the digestive tract of rabbit. Influence of feed cellulose content. Current microbiology 22, 1–25.

Breedveld A and van Egmond M 2019. IgA and FcαRI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. Frontiers in Immunology 10.

Broekhuizen S, Bouman E and Went W 1986. Variation in timing of nursing in the Brown Hare (Lepus europaeus) and the European Rabbit (Oryctolagus cuniculus). Mammal Review 16, 139–144.

Brooks P and Tsourgiannis C 2003. Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig. In Weaning the Pig, Concepts and Consequences, pp. 81–116. Pluske JR, Le Dividich J, Verstegen MWA.

Brouns F, Kettlitz B and Arrigoni E 2002. Resistant starch and “the butyrate revolution”. Trends in Food Science & Technology 13, 251–261.

Bruininx EM a. M, Schellingerhout AB, Binnendijk GP, Peet-Schwering CMC van der, Schrama JW, Hartog LA den, Everts H and Beynen AC 2004. Individually assessed creep food consumption by suckled piglets: influence on post-weaning food intake characteristics and indicators of gut structure and hind-gut fermentation. Animal Science 78, 67–75.

Bryant DM and Mostov KE 2008. From cells to organs: building polarized tissue. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9, 887–901.

Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E and Mira A 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. The American Journal of Clinical Nutrition 96, 544–551.

Cadudal F 2018. Démédication dans la filière lapin française : des avancées significatives dans un contexte sanitaire difficile. Cuniculture Magazine 45.

Camara V and Prieur DJ 1984. Secretion of colonic isozyme of lysozyme in association with caecotrophy of rabbits. Am J. Physiol, 247, 19-23.

Campbell JH, Foster CM, Vishnivetskaya T, Campbell AG, Yang ZK, Wymore A, Palumbo AV, Chesler EJ and Podar M 2012. Host genetic and environmental effects on mouse intestinal microbiota. The ISME journal 6, 2033–2044.

Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Abarca-Rojano E, Pacheco-Yépez J, Reyna-Garfias H, Barbosa-Cabrera RE and Drago-Serrano ME 2013. Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A. Frontiers in Integrative Neuroscience 7.

Carabaño R, Garcia AI, Blas E, Falcao E Cunha L, Gidenne T and Pinheiro V 2000. Collaborative studies on caecotrophy in adult rabbits: effect of feed intake and methodology. In (ed. A. Blasco), pp. 153–159. University of Valence.

Carabaño R, Piquer J, Menoyo D and Badiola I 2010. The digestive system of the rabbit. In Nutrition of the rabbit (eds. C. De Blas and J. Wiseman), pp. 1–18. CABI; Wallingford; UK.

Casado C, Piquer O, Cervera C and Pascual JJ 2006. Modelling the lactation curve of rabbit does: Towards a model including fit suitability and biological interpretation. Livestock Science 99, 39–49.

Castellini C, Cardinali R, Rebollar PG, Dal Bosco A, Jimeno V and Cossu ME 2007. Feeding fresh chicory (Chicoria intybus) to young rabbits: Performance, development of gastro-intestinal tract and immune functions of appendix and Peyer's patch. Animal Feed Science and Technology 134, 56–65.

Cerovic V, Bain CC, Mowat AM and Milling SWF 2014. Intestinal macrophages and dendritic cells: what's the difference? Trends in Immunology 35, 270–277.

Charbonneau MR, Blanton LV, DiGiulio DB, Relman DA, Lebrilla CB, Mills DA and Gordon JI 2016. Human developmental biology viewed from a microbial perspective. Nature 535, 48–55.

Charles A Janeway J, Travers P, Walport M and Shlomchik MJ 2001a. Principles of innate and adaptive immunity. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.

Charles A Janeway J, Travers P, Walport M and Shlomchik MJ 2001b. The generation of diversity in immunoglobulins. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition.

Chaucheyras-Durand F, Ameilbonne A, Auffret P, Bernard M, Mialon M-M, Dunière L and Forano E 2019. Supplementation of live yeast based feed additive in early life promotes rumen microbial colonization and fibrolytic potential in lambs. Scientific Reports 9, 1–16.

Cheng W, Lu J, Li B, Lin W, Zhang Z, Wei X, Sun C, Chi M, Bi W, Yang B, Jiang A and Yuan J 2017. Effect of Functional Oligosaccharides and Ordinary Dietary Fiber on Intestinal Microbiota Diversity. Frontiers in Microbiology 8.

Cheng H-Y, Ning M-X, Chen D-K and Ma W-T 2019. Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens. Frontiers in Immunology 10.

Cizek LJ 1961. Relationship between food and water ingestion in the rabbit. Am. J. Physiol., 201(3), 557-566., TAP-FL : 0000.

Clouard C, Meunier-Salaün M-C and Val-Laillet D 2012. The effects of sensory functional ingredients on food preferences, intake and weight gain in juvenile pigs. Applied Animal Behaviour Science 138, 36–46.

Combes S, Cauquil L and Gidenne T 2008. Impact of an exclusive milk vs milk and dry feed intake till weaning on intake, growth, and on the caecal biodiversity and fibrolytic activity of the young rabbit. In (ed. A.T. G. Xiccato S.D. Lukefahr), pp. 607-711 + http://world-rabbit-science.org/. Fond. Ini. Zooprofilattiche E Zoot. publ. Brescia Italy.

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, Boucher S, Fortun-Lamothe L, Bolet G and Coureaud G 2018. Pour des lapereaux plus robustes au sevrage : des bases biologiques aux leviers d'action en élevage. INRA Productions Animales 31, 105–116.

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. Journal of Animal Science 92, 652–665.

Combes S, Ikken S, Gidenne T, Balmisse E, Aymard P and Travel A 2017a. Effect of solid intake stimulation of suckling rabbit in the nest on survival and growth performance. In (ed. EAAP), p. 333. Wageningen Press.

Combes S, Massip K, Martin O, Furbeyre H, Cauquil L, Pascal G, Bouchez O, Le Floc'h N, Zemb O, Oswald IP and Gidenne T 2017b. Impact of feed restriction and housing hygiene

conditions on specific and inflammatory immune response, the cecal bacterial community and the survival of young rabbits. Animal 11, 854–863.

Combes S, Michelland RJ, Monteils V, Cauquil L, Soulie V, Tran NU, Gidenne T and Fortun-Lamothe L 2011. Postnatal development of the rabbit caecal microbiota composition and activity. FEMS Microbiology Ecology 77, 680–9.

Cooke BD 1982. Reduction of Food Intake and Other Physiological Responses to a Restriction of Drinking Water in Captive Wild Rabbits, Oryctolagus Cuniculus (L.). Wildlife Research 9, 247–252.

Corring T, Lebas F and Courtot D 1972. Contrôle de l'évolution de l'équipement enzymatique du pancréas exocrine du lapin de la naissance à 6 semaines. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 12, 221–231.

Corthésy B 2007. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 178, 27–32.

Coureaud G, Charra R, Datiche F, Sinding C, Thomas-Danguin T, Languille S, Hars B and Schaal B 2010. A pheromone to behave, a pheromone to learn: the rabbit mammary pheromone. Journal of Comparative Physiology A 196, 779–790.

Coureaud G, Fortun-Lamothe L and Rödel HG 2008a. Development of social and feeding behaviour in young rabbits. ResearchGate.

Coureaud G, Fortun-Lamothe L, Roedel HG, Monclus R and Schaal B 2008b. The developing rabbit: some data related to the behaviour, feeding and sensory capacities between birth and weaning. Productions Animales 21, 231–237.

Coureaud G, Schaal B, Coudert P, Rideaud P, Fortun-Lamothe L, Hudson R and Orgeur P 2000. Immediate postnatal suckling in the rabbit: its influence on pup survival and growth. Reproduction Nutrition Development 40, 19–32.

Coureaud G, Schaal B, Hudson R, Orgeur P and Coudert P 2002. Transnatal olfactory continuity in the rabbit: Behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. Developmental Psychobiology 40, 372–390.

Coureaud G, Schaal B, Langlois D and Perrier G 2001. Orientation response of newborn rabbits to odours of lactating females: relative effectiveness of surface and milk cues. Animal Behaviour 61, 153–162.

Courtot D, Corring T and Laviolette P 1970. Détection des proenzymes protéolytiques du pancréas de lapin par immuno-fluorescence (embryon, nouveau-né, adulte). Annales de biologie animale, biochimie, biophysique 10, 291–299.

Curtis TP and Sloan WT 2004. Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. Current Opinion in Microbiology 7, 221–226.

Davies RR and Davies JAE 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. Vet. Clin. Exot. Anim. 6, 139–153.

Davies JS, Widdowson EM and Mc Cance RA 1964. The intake of milk and the retention of its constituents while the newborn rabbit doubles its weight. British Journal of Nutrition 18, 385–392.

Debray L 2002. Nutrition du lapereau en periode de sevrage ; interaction avec les besoins nutritionnels de la femelle. Thèse de doctorat Thesis. Inst. Nat. Polytech. Toulouse, Toulouse, 125pp.

Debray L, Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2002. Influence of low dietary starch/fibre ratio around weaning on intake behaviour, performance and health status of young and rabbit does. Animal Research 51, 63–75.

Debray L, Fortun-Lamothe L, Gidenne T and Arveux P 2001. Efficacité digestive des lapereaux avant et après sevrage en fonction de la source énergétique. In (ed. INRA-ITAVI), pp. 191–194. ITAVI.

Debray L, Le Huerou-Luron I, Gidenne T and Fortun-Lamothe L 2003. Digestive tract development in rabbit according to the dietary energetic source: correlation between whole tract digestion, pancreatic and intestinal enzymatic activities. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 135, 443–455.

Delgado B, Bach A, Guasch I, González C, Elcoso G, Pryce JE and Gonzalez-Recio O 2019. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. Scientific Reports 9.

Delosière M, Damon M and Durand D 2013. Oxidative stress in farm animals: general aspects. Cahiers de Nutrition et de Diététique 48, 218–224.

Delzenne NM and Bindels LB 2020. Food for thought about manipulating gut bacteria. Nature 577, 32–34.

Di Meo C, Stanco G, Piccolo G, Taranto S, Gazaneo MP and Nizza A 2003. Productive performance of rabbits according to pre-weaning solid feed and milk intake. Italian Journal of Animal Science 2, 51–58.

Distel H and Hudson R 1984. Nipple-search performance by rabbit pups: Changes with age and time of day. Animal Behaviour 32, 501–507.

Drummond H, Vázquez E, Sánchez-Colón S, Martinez-Gómez M and Hudson R 2000. Competition for Milk in the Domestic Rabbit: Survivors Benefit from Littermate Deaths. Ethology 106, 511–526.

Ebong SJ, Goyert SM, Nemzek JA, Kim J, Bolgos GL and Remick DG 2001. Critical Role of CD14 for Production of Proinflammatory Cytokines and Cytokine Inhibitors during Sepsis with Failure To Alter Morbidity or Mortality. Infection and Immunity 69, 2099–2106.

EGRAN 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. World Rabbit Science 9, 57–64.

Elderman M, Sovran B, Hugenholtz F, Graversen K, Huijskes M, Houtsma E, Belzer C, Boekschoten M, de Vos P, Dekker J, Wells J and Faas M 2017. The effect of age on the intestinal mucus thickness, microbiota composition and immunity in relation to sex in mice. PLoS ONE 12.

van den Elsen LWJ, Garssen J, Burcelin R and Verhasselt V 2019. Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gateway to Allergy Prevention? Frontiers in Pediatrics 7.

Escobar C, Hudson R, Martínez-Gómez M and Aguilar-Roblero R 2000. Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. Journal of Comparative Physiology A 186, 33–38.

Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, Maman S, Hernandez-Raquet G, Combes S and Pascal G 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. Bioinformatics (Oxford, England) 34, 1287–1294.

Falentin H, Auer L, Mariadassou M, Pascal G, Rué O, Dugat-Bony E, Delbes C, Nicolas A, Rifa E, Mondy S, Le Boulch M, Cauquil L, Hernandez Raquet G, Terrat S and Abraham A-L 2019. Guide pratique à destination des biologistes, bioinformaticiens et statisticiens qui souhaitent s'initier aux analyses métabarcoding. Cahiers des Techniques de l'INRA 2019, 1–23.

FAO/OMS 2002. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization. London Ontario, Canada.

Feugier A, Smit M, Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2005. Interaction between starter diets and weaning age in the young rabbit. In (ed. G. Bolet). ITAVI.

Fink LN, Metzdorff SB, Zeuthen LH, Nellemann C, Kristensen MB, Licht TR and Frøkiær H 2012. Establishment of tolerance to commensal bacteria requires a complex microbiota and is accompanied by decreased intestinal chemokine expression. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 302, G55–G65.

Floc'h NL, Matte JJ, Melchior D, Milgen J van and Sève B 2010. A moderate inflammation caused by the deterioration of housing conditions modifies Trp metabolism but not Trp requirement for growth of post-weaned piglets. animal 4, 1891–1898.

Fonty G, Gouet P and Riou Y 1979. Effect of milk composition on the gastrointestinal microflora of the rabbit. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys, 19, 567-571.

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. Livestock Science 107, 1–18.

Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2000. The effects of size of suckled litter on intake behaviour, performance and health status of young and reproducing rabbits. Annales de Zootechnie 49, 517–529.

Fortun-Lamothe L and Gidenne T 2003. Besoins nutritionnels du lapereau et stratégies d'alimentation autour du sevrage. INRA Production Animale 16, 39–47.

Fortun-Lamothe L, Gidenne T, Lapanouse A and De Dapper J 2000. Technical note : An original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother - young relations. World Rabbit Science 8, 177–180.

Gallois M, Boullier S, Milon A and Gidenne T 2005a. Weaning age and sensitivity to an experimental infection by an E. coli O103 strain. In: 11ème J. Rech. Cunicole, G. Bolet (Ed). Paris, France, 249-252.

Gallois M, Fortun-Lamothe L, Michelan A and Gidenne T 2008a. Adaptability of the digestive function according to age at weaning in the rabbit: II. Effect on nutrient digestion in the small intestine and in the whole digestive tract. Animal 2, 536–547.

Gallois M, Gidenne T, Fortun-Lamothe L and Le Huerou-Luron I 2005b. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. Reproduction Nutrition Development 45, 109–122.

Gallois M, Gidenne T, Tasca C, Caubet C, Coudert C, Milon A and Boullier S 2007. Maternal milk contains antimicrobial factors that protect young rabbits from enteropathogenic Escherichia coli infection. Clinical and Vaccine Immunology 14, 585–592.

Gallois M, Le Huërou-Luron I, Fortun-Lamothe L, Lallès JP and Gidenne T 2008b. Adaptability of the digestive function according to age at weaning in the rabbit: I. Effect on feed intake and digestive functionality. Animal 2, 525–535.

Ganchrow JR and Matzner H 1979. Development of sucrose preference in rabbit pups. Chemical Senses 4, 241–248.

García GR, Dogi CA, Ashworth GE, Berardo D, Godoy G, Cavaglieri LR, de Moreno de LeBlanc A and Greco CR 2016. Effect of breast feeding time on physiological, immunological and microbial parameters of weaned piglets in an intensive breeding farm. Veterinary Immunology and Immunopathology 176, 44–49.

Garreau H, Ruesche J, Gilbert H, Balmisse E, Benitez F, Richard F, David I, Drouilhet L and Zemb O 2019. Estimating direct genetic and maternal effects affecting rabbit growth and feed efficiency with a factorial design. Journal of Animal Breeding and Genetics = Zeitschrift Fur Tierzuchtung Und Zuchtungsbiologie 136, 168–173.

German RZ, Crompton AW and Thexton AJ 2006. Ontogeny of feeding in mammals. In Feeding in domestic vertebrates: from structure to behaviour (ed. V. Bels), pp. 50–60. CABI, Wallingford.

Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K and Reid G 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology 14, 491–502.

Gidenne T 1992. Effect of fibre level, particle size and adaptation period on digestibility and rate of passage as measured at the ileum and in the faeces in the adult rabbit. British Journal of Nutrition 67, 133–146.

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 2000. Recent advances and perspectives in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. World Rabbit Science 8, 23–32.

Gidenne T 2015a. Le lapin. De la biologie à l'élevage. Quae éditions.

Gidenne T 2015b. Dietary fibres in the nutrition of the growing rabbit and recommendations to preserve digestive health: a review. Animal 9, 227–242.

Gidenne TN, Bannelier C, Gallois M, Segura M and Lambrecht V 2018. Milk digestion in the young rabbit: methodology and first results. World Rabbit Science 26, 269.

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

Gidenne T, Combes S, Licois D, Carabaño R, Badiola I and Garcia J 2008. Ecosystème caecal et nutrition du lapin: interactions avec la santé digestive. INRA Prod. Anim 21, 239–250.

Gidenne T, De Dapper J, Lapanouse A and Aymard P 2007a. Adaptation du lapereau à un aliment fibreux distribué avant sevrage. 2007.

Gidenne T, Debray L, Fortun-Lamothe L and Le Huerou-Luron I 2007b. Maturation of the intestinal digestion and of microbial activity in the young rabbit: Impact of the dietary fibre:starch ratio. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 148, 834–844.

Gidenne T, Feugier A and Lacroix S 2005a. Digestive efficiency of the early weaned young rabbit: method of measurement and effect of the ratio protein/energy in the diet. In (ed. G. Bolet), pp. 141–144. ITAVI.

Gidenne T and Fortun-Lamothe L 2002. Feeding strategy for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. Animal Science 75, 169–184.

Gidenne T, Fortun-Lamothe L, Lapanouse A, Aymard P and De Dapper J 2002. Feeding behaviour in the early weaned rabbit: effect of drinking system. In (eds. C. Boiti, T. Gidenne and E. Sabbiani), p. p32. JRC Ispra.

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

Gidenne T, Jehl N, Perez JM, Arveux P, Bourdillon A, Mousset JL, Duperray J, Stephan S and Lamboley B 2005b. Effect of cereal sources and processing in diets for the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by enteropathy. Animal Research 54, 65–72.

Gidenne T and Lebas F 1987. Estimation quantitative de la caecotrophie chez le lapin en croissance : variations en fonctions de l'âge. Annales de Zootechnie 36, 225–236.

Gidenne T, Lebas F and Fortun-Lamothe L 2010b. Feeding behaviour of rabbits. In Nutrition of the rabbit (eds. C. De Blas and J. Wiseman), pp. 233–252. CABI; Wallingford; UK.

Gidenne T, Lebas F, Savietto D, Dorchies P, Duperray J, Davoust C and Fortun-Lamothe L 2015. Nutrition et alimentation. In Le lapin. De la biologie à l'élevage (ed. T. Gidenne), Savoir Faire, pp. 152–196. Quae éditions.

Gidenne T, Mirabito L, Jehl N, Perez JM, Arveux P, Bourdillon A, Briens C, Duperray J and Corrent E 2004. Impact of replacing starch by digestible fibre, at two levels of lignocellulose, on digestion, growth and digestive health of the rabbit. Animal Science 78, 389–398.

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

Gjörstrup P 1980. Taste and chewing as stimuli for the secretion of amylase from the parotid gland of the rabbit. Acta Physiologica Scandinavica 110, 295–301.

Gomez-Conde MS, Garcia J, Chamorro S, Eiras P, Rebollar PG, de Rozas AP, Badiola I, de Blas C and Carabano R 2007. Neutral detergent-soluble fiber improves gut barrier function in twenty-five-day-old weaned rabbits. Journal of Animal Science 85, 3313–3321.

Gottlieb G 1971. Ontogenesis of sensory function in birds and mammals. In The biopsychology of development, pp. 67–128. New York Academic Press.

Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury MA, Van de Wiele T, Forano E and Blanquet-Diot S 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. Trends in Microbiology 25, 851–873.

Gutiérrez I, Espinosa A, Garcia J, Carabano R and De Blas JC 2002. Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. Journal of Animal Science 80, 1029–1037.

Halas V and Nochta I 2012. Mannan Oligosaccharides in Nursery Pig Nutrition and Their Potential Mode of Action. Animals : an Open Access Journal from MDPI 2, 261–274.

Haley PJ 2003. Species differences in the structure and function of the immune system. Toxicology 188, 49–71.

Hampson DJ and Kidder DE 1986. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. Research in Veterinary Science 40, 24–31.

Harcourt-Brown F 2008. Textbook of rabbit medicine. Butterworth-Heinemann, Edinburgh.

Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R and Goyert SM 1988. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 141, 547–552.

Heintz-Buschart A and Wilmes P 2018. Human Gut Microbiome: Function Matters. Trends in Microbiology 26, 563–574.

Henschel MJ 1973. Comparison of the development of proteolytic activity in the abomasum of the preruminant calf with that in the stomach of the young rabbit and guinea-pig. British Journal of Nutrition 30.

Hildeman DA, Mitchell T, Kappler J and Marrack P 2003. T cell apoptosis and reactive oxygen species. Journal of Clinical Investigation 111, 575–581.

Hollister AG, Cheeke PR, Robinson KL and Patton NM 1990. Effects of dietary probiotics and acidifiers on performance of weanling rabbits. J. Appl. Rabbit res. 13, 6–9.

Holmes AJ, Chew YV, Colakoglu F, Cliff JB, Klaassens E, Read MN, Solon-Biet SM, McMahon AC, Cogger VC, Ruohonen K, Raubenheimer D, Le Couteur DG and Simpson SJ 2017. Diet-Microbiome Interactions in Health Are Controlled by Intestinal Nitrogen Source Constraints. Cell Metabolism 25, 140–151.

Hooper LV, Littman DR and Macpherson AJ 2012. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. Science 336, 1268–1273.

Hörnicke H and Batsch F 1977. Caecotrophy in rabbits - a circadian function. J. Mammalogy 58, 240–242.

Houghteling PD and Walker WA 2015. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and child's health? Journal of pediatric gastroenterology and nutrition 60, 294–307.

Hudson R and Distel H 1982. The Pattern of Behaviour of Rabbit Pups in the Nest. Behaviour 79, 255–271.

Hudson DG and Hull D 1975. Growth of Adipose Tissue in the Fetal Rabbit. Neonatology 27, 71–79.

Hudson R, Schaal B, Martinez-Gomez M and Distel H 2000. Mother-Young relations in the European rabbit : physiological and behavioral locks and keys. World Rabbit Science 8, 85–90.

Hull D 1965. Oxygen consumption and body temperature of new-born rabbits and kittens exposed to cold. The Journal of Physiology 177, 192–202.

Hurand J 2016. L'élevage de lapins de chair en France. Résultats technico-économiques 2015. ITAVI.

ITAVI 2017. Structure et organisation des filières cunicoles en Europe. Analyse comparée des filières espagnole, italienne, hongroise, belge et néerlandaise.

Jacquier V, Combes S, Oswald IP, Rogel-Gaillard C and Gidenne T 2014. Early modulation of the cecal microbial activity in the young rabbit with rapidly fermentable fiber: Impact on health and growth. Journal of Animal Science 92, 5551–5559.

Jamilloux Y and Henry T 2013. Les inflammasomes - Plates-formes de l'immunité innée. médecine/sciences 29, 975–984.

Jehl N and Gidenne T 1996. Replacement of starch by digestible fibre in the feed for the growing rabbit. 2. Consequences for microbial activity in the caecum and on incidence of digestive disorders. Animal Feed Science and Technology 61, 193–204.

Jin DX, Zou HW, Liu SQ, Wang LZ, Xue B, Wu D, Tian G, Cai J, Yan TH, Wang ZS and Peng QH 2018. The underlying microbial mechanism of epizootic rabbit enteropathy triggered by a low fiber diet. Scientific Reports 8, 1–15.

Jonathan MC, Haenen D, Souza da Silva C, Bosch G, Schols HA and Gruppen H 2013. Influence of a diet rich in resistant starch on the degradation of non-starch polysaccharides in the large intestine of pigs. Carbohydrate Polymers 93, 232–239.

Jouhanneau M, Schaal B and Coureaud G 2016. Mammary pheromone-induced odour learning influences sucking behaviour and milk intake in the newborn rabbit. Animal Behaviour 111, 1–11.

Kacsala L, Matics Z, Kasza R, Gerencsér Z and Szendrő Z 2015. Milk supply of rabbit kits. POLJOPRIVREDA 21, 90–92.

Kacsala L, Szendrő Z, Gerencsér Z, Radnai I, Kovács M, Kasza R, Nagy I, Odermatt M, Atkári T and Matics Z 2018. Early solid additional feeding of suckling rabbits from 3 to 15 days of age. Animal: An International Journal of Animal Bioscience 12, 28–33.

Kamada N, Chen GY, Inohara N and Núñez G 2013a. Control of Pathogens and Pathobionts by the Gut Microbiota. Nature immunology 14, 685–690.

Kamada N, Seo S-U, Chen GY and Núñez G 2013b. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. Nature Reviews. Immunology 13, 321–335.

Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glove LE, Kominsky DJ, Magnuson A, Weir TL, Ehrentraut SF, Pickel C, Kuhn KA, Lanis JM, Nguyen V, Taylor CT and Colgan SP 2015. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. Cell host & microbe 17, 662–671.

Kennedy DE, Witte PL and Knight KL 2016. Bone marrow fat and the decline of B lymphopoiesis in rabbits. Developmental and comparative immunology 58, 30–39.

Knudsen C 2014. Stratégies de limitation de l'ingestion : optimisation des performances zootechniques, impacts physiologiques et conséquences sur la santé digestive. thesis Thesis. Toulouse, INPT.

Knudsen C, Combes S, Mousavikhorshidi H, Oswald I and Gidenne T 2016. An lps-based method to stimulate the inflammatory response in growing rabbits. World Rabbit Science 24, 55–65.

Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT and Ley RE 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 Suppl 1, 4578–4585.

Kovács M, Bonai A, Szendro Z, Milisits G, Lukacs H, Szabo-Fodor J, Tornyos G, Matics Z, Kovacs 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.

Kovács M, Szendrõ Zs, Milisits G, Biro-Nemeth E, Radnai I, Posa R, Bonai A, Kovacs F and Horn P 2006. Effect of nursing method and faeces consumption on the development of bacetroides, lactobacillus and coliform flora in the caecum of the newborn rabbits. Reprod. Nutr. Dev. 46, 205–210.

Kozlowski F 1994. L'amidon, quel dosage pour quel échantillon. Cah. Techn. I.N.R.A. 35, 5–22.

Laforest-Lapointe I and Arrieta M-C 2017. Patterns of Early-Life Gut Microbial Colonization during Human Immune Development: An Ecological Perspective. Frontiers in Immunology 8.

Laitinen K, Mokkala K and Kalliomaki M 2017. Chapter 8 - Impact of Early Nutrition on Intestinal Microbiome: Effects on Immunity and Long-Term Health. In Early Nutrition and Long-Term Health (eds. J.M. Saavedra and A.M. Dattilo), Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 203–228. Woodhead Publishing.

Langenbach GE, Weijs WA, Brugman P and van Eijden TM 2001. A longitudinal electromyographic study of the postnatal maturation of mastication in the rabbit. Archives of Oral Biology 46, 811–820.

Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG and Huttenhower C 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. Nature Biotechnology 31, 814–821.

Lanning D, Sethupathi P, Rhee K-J, Zhai S-K and Knight KL 2000. Intestinal Microflora and Diversification of the Rabbit Antibody Repertoire. The Journal of Immunology 165, 2012–2019.

Laplace JP 1978. Le transit digestif chez les monogastriques 3) Comportement (prise de nourriture, caecotrophie), motricité et transit digestif et pathogénie des diarrhées chez le lapin. Annales de Zootechnie 27, 225–265.

Laplace JP and Lebas F 1972. Mensurations viscérales chez le lapin. II. Principaux facteurs déterminants des variations relatives de la croissance du foie, des reins et des segments intestinaux entre 3 et 11 semaines d'âge. Ann. Zootech. 21, 505–524.

Larsen OFA and Claassen E 2018. The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. Scientific Reports 8, 2183.

Larson DA 1995. Dietary preference and its relationship to feed intake.

Le Boulch M, Déhais P, Combes S and Pascal G 2019. The MACADAM database: a MetAboliC pAthways DAtabase for Microbial taxonomic groups for mining potential metabolic capacities of archaeal and bacterial taxonomic groups. Database 2019.

Le Bourgot C, Ferret-Bernard S, Le Normand L, Savary G, Menendez-Aparicio E, Blat S, Appert-Bossard E, Respondek F and Le Huërou-Luron I 2014. Maternal short-chain fructooligosaccharide supplementation influences intestinal immune system maturation in piglets. PloS One 9, e107508.

Lebas F 1968. Mesure quantitative de la production laitière chez la lapine. Annales de Zootechnie 17, 169–182.

Lebas F 2003. La biologie du lapin.

Lebas F 2011. Incidence de la présence accidentelle de formol dans l'alimentation sur le comportement alimentaire et les perf ormances de croissance du Lapin.

Lebas F 2018. Performances moyennes des élevages cunicoles en France pour l'année 2017. Cuniculture Magazine 45 : 22-26 (résultats RENACEB). Retrieved on 19 February 2019, from *http://www.cuniculture.info/Docs/Magazine/Magazine2018/mag45-22-Renaceb.html*.

Lebas F, Corring T, Courtot D, Gueugneau A-M, Sardi G and Cotta Y 1971. Equipement enzymatique du pancréas exocrine chez le lapin, mise en place et évolution de la naissance au sevrage. relation avec la composition du régime alimentaire. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique 11, 399–413.

Lebas F and Laplace JP 1972. Mensurations viscérales chez le lapin. 1) Croissance du foie, des reins et des divers segments intestinaux entre 3 et 11 semaines d'âge. Annales de Zootechnie 21, 37–47.

Lederberg J 2001. 'Ome Sweet 'Omics-- A Genealogical Treasury of Words. The Scientist Magazine®. Retrieved on 27 November 2019, from *https://www.the-scientist.com/commentary/ome-sweet-omics---a-genealogical-treasury-of-words-54889*.

Legendre H, Goby J-P, Duprat A, Gidenne T and Martin G 2019. Herbage intake and growth of rabbits under different pasture type, herbage allowance and quality conditions in organic production. animal 13, 495–501.

Licois D and Marlier D 2008. Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. INRA Prod. Anim. 21, 257–268.

Liu HW, Dong XF, Tong JM and Zhang Q 2011. A comparative study of growth performance and antioxidant status of rabbits when fed with or without chestnut tannins under high ambient temperature. Animal Feed Science and Technology 164, 89–95.

Mackie RI 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution. Integrative and Comparative Biology 42, 319–326.

Mackie RI, Sghir A and Gaskins HR 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 69, 1035S – 1045.

Maertens L 1994. Infuence du diamètre du granulé sur les performances des lapereaux avant sevrage. pp. 325–332. Itavi, publ. Paris, France.

Maertens L 2010. Feeding systems for intensive production. In Nutrition of the rabbit (eds. C. De Blas and J. Wiseman), pp. 253–266. CABI; Wallingford; UK.

Maertens L, Aerts JM and De Boever J 2004. Degradation of dietary oligofructose and inulin in the gastro-intestinal tract of the rabbit and the effects on caecal pH and volatile fatty acids. World Rabbit Science 12, 235–246.

Maertens L and Groote G de 1990. Feed intake of rabbit kits before weaning and attempts to increase it. Journal of Applied Rabbit Research 13, 151–158.

Maertens L., Van Renterghem R. and De Groote G. 2010. Effects of dietary inclusion of paciflor® (bacillus cip 5832)on the milk composition and performances of does and on caecal and growth parameters of their weanlings. World Rabbit Science 2, 67–73.

Maertens L, Lebas F and Szendrö Z 2006. Rabbit milk: a review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. World Rabbit Science 14, 205–203.

Maertens L, Lebas F and Szendro ZS 2010. Rabbit milk: A review of quantity, quality and non-dietary affecting factors. World Rabbit Science 14, 205–230.

Mage RG, Lanning D and Knight KL 2006. B cell and antibody repertoire development in rabbits: The requirement of gut-associated lymphoid tissues. Developmental & Comparative Immunology 30, 137–153.

Mantis NJ, Rol N and Corthésy B 2011. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunology 4, 603–611.

Mao B, Li D, Zhao J, Liu X, Gu Z, Chen YQ, Zhang H and Chen W 2015. Metagenomic Insights into the Effects of Fructo-oligosaccharides (FOS) on the Composition of Fecal Microbiota in Mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 63, 856–863.

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães V, Sokol H, Doré J, Corthier G and Furet J-P 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. BMC Microbiology 9, 123.

Marlier D, Dewree R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A and Vindevogel H 2003a. A review of the major causes of digestive disorders in the European rabbit. Annales de Medecine Veterinaire 147, 385–392.

Marlier D, Dewrée R, Delleur V, Licois D, Lassence C, Poulipoulis A and Vindevogel H 2003b. Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (Oryctolagus cuniculus). .

Marounek M, Vovk SJ and Skrivanova V 1995. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. Br J. Nutr. 73, 463–469.

Marques RM, Teixeira L, Águas AP, Ribeiro JC, Costa-e-Silva A and Ferreira PG 2014. Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD). Veterinary Research 45, 14.

Martignon MH, Licois D, Cauquil L, Amelot M, Combes S, Reperant E, Postollec G, Gidenne T and Valat C 2011. Digestive response of young rabbit to an experimental inoculation of E. coli (O128:C6) according to feed intake level. In (ed. G. Bolet), pp. 161–164. ITAVI, Paris.

Mattioli S, Dal Bosco A, Combes S, Moscati L, Crotti S, Cartoni Mancinelli A, Cotozzolo E and Castellini C 2019. Dehydrated Alfalfa and Fresh Grass Supply in Young Rabbits: Effect on Performance and Caecal Microbiota Biodiversity. Animals 9, 341.

McKeen S, Young W, Mullaney J, Fraser K, McNabb WC and Roy NC 2019. Infant Complementary Feeding of Prebiotics for the Microbiome and Immunity. Nutrients 11, 364.

McKenney ES and Kendall MM 2016. Microbiota and pathogen ‘pas de deux’: setting up and breaking down barriers to intestinal infection. Pathogens and Disease 74.

Meo CD, Gazaneo MP, Racca C, Bovera F, Piccolo G and Nizza A 2004. Effect of Birth Weight and Litter Size on Productive Performance of Rabbits, Effect of Birth Weight and Litter Size on Productive Performance of Rabbits. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 17, 1158–1161.

Mi L, Yang B, Hu X, Luo Y, Liu J, Yu Z and Wang J 2018. Comparative Analysis of the Microbiota Between Sheep Rumen and Rabbit Cecum Provides New Insight Into Their Differential Methane Production. Frontiers in Microbiology 9.

Michelland R, Combes S, Monteils V, Bayourthe C, Cauquil L, Enjalbert F, Julien C, Kimse M, Troegeler-Meynadier A, Zened A, Gidenne T and Fortun-Lamothe L 2012. Analyse comparee des ecosystemes digestifs du rumen de la vache et du caecum du lapin. INRA Productions Animales 25, 395–405.

Mirabito L and Bocquier M 2005. Développement d’un système d’alimentation séparée des mères et des jeunes avant sevrage. .

Miro-Blanch J and Yanes O 2019. Epigenetic Regulation at the Interplay Between Gut Microbiota and Host Metabolism. Frontiers in Genetics 10.

Monteils V, Cauquil L, Combes S, Godon JJ and Gidenne T 2008. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum. FEMS Microbiology Ecology 66, 620–629.

Montigny D, Coureaud G and Schaal B 2006. Rabbit pup response to the mammary pheromone: From automatism to prandial control. Physiology & Behavior 89, 742–749.

Moreau H, Bernadac A, Trétout N, Gargouri Y, Ferrato F and Verger R 1990. Immunocytochemical localization of rabbit gastric lipase and pepsinogen. European Journal of Cell Biology 51, 165–172.

Morisse JP 1988. Essai de mise au point d'un aliment adapté au sevrage. L'éleveur de lapins 22, 29–31.

Motta V, Luise D, Bosi P and Trevisi P 2019. Faecal microbiota shift during weaning transition in piglets and evaluation of AO blood types as shaping factor for the bacterial community profile. PLOS ONE 14, e0217001.

Mowat AM 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nature Reviews Immunology 3, 331–341.

Muniz LR, Knosp C and Yeretssian G 2012. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. Frontiers in Immunology 3, 310.

Nagpal R, Mainali R, Ahmadi S, Wang S, Singh R, Kavanagh K, Kitzman DW, Kushugulova A, Marotta F and Yadav H 2018. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. Nutrition and Healthy Aging 4, 267–285.

Nakamura Y, Kimura S and Hase K 2018. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. Inflammation and Regeneration 38.

Neave MJ, Hall RN, Huang N, McColl KA, Kerr P, Hoehn M, Taylor J and Strive T 2018. Robust Innate Immunity of Young Rabbits Mediates Resistance to Rabbit Hemorrhagic Disease Caused by Lagovirus Europaeus GI.1 But Not GI.2. Viruses 10.

Nichols BL, Diaz-Sotomayor M, Avery SE, Chacko SK, Hadsell DL, Baker SS, Hamaker BR, Yan LK, Lin HM and Quezada-Calvillo R 2016. Milk glucosidase activity enables suckled pup starch digestion. Molecular and Cellular Pediatrics 3.

Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W and Pettersson S 2012. Host-gut microbiota metabolic interactions. Science (New York, N.Y.) 336, 1262–1267.

Olszak T, An D, Zeissig S, Vera MP, Richter J, Franke A, Glickman JN, Siebert R, Baron RM, Kasper DL and Blumberg RS 2012. Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function. Science 336, 489–493.

Orengo J and Gidenne T 2007. Feeding behaviour and caecotrophy in the young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. Applied Animal Behaviour Science 102, 106–118.

Oso AO, Idowu OMO, Haastrup AS, Ajibade AJ, Olowonefa KO, Aluko AO, Ogunade IM, Osho SO and Bamgbose AM 2013. Growth performance, apparent nutrient digestibility, caecal fermentation, ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. Livestock Science 157, 184–190.

Oyofo BA, DeLoach JR, Corrier DE, Norman JO, Ziprin RL and Mollenhauer HH 1989. Prevention of Salmonella typhimurium colonization of broilers with D-mannose. Poultry Science 68, 1357–1360.

Padilha M, Danneskiold-Samsøe NB, Brejnrod A, Hoffmann C, Cabral VP, Iaucci J de M, Sales CH, Fisberg RM, Cortez RV, Brix S, Taddei CR, Kristiansen K and Saad SMI 2019. The Human Milk Microbiota is Modulated by Maternal Diet. Microorganisms 7.

Padilha MTS, Licois D, Gidenne T and Carré B 1999. Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively milk-fed young rabbits. Reproduction Nutrition Development 39, 223–230.

Padilha MTS, Licois D, Gidenne T, Carré B, Coudert P and Lebas F 1996. Caecal microflora and fermentation pattern in exclusively milk-fed young rabbits. In (ed. F. Lebas), pp. 247–251. Ass. Fr. Cuniculture, Lempdes, France.

Padilha MTS, Licois D, Gidenne T, Carré B and Fonty G 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. Reproduction Nutrition Development 35, 375–386.

Paës C, Fortun-Lamothe L, Bébin K, Duperray J, Gohier C, Guené-Grand E, Rebours G, Aymard P, Bannelier C, Debrusse A-M, Gidenne T and Combes S 2019. Onset of feed intake

of the suckling rabbit and evidence of dietary preferences according to pellet physical properties. Animal Feed Science and Technology 255, 114223.

Pajor EA, Fraser D and Kramer DL 1991. Consumption of solid food by suckling pigs: individual variation and relation to weight gain. Applied Animal Behaviour Science 32, 139–155.

Pascual JJ 2001. Early weaning of young rabbits: a review. World Rabbit Science 9, 165–170.

de Passillé AM, Pelletier G, Ménard J and Morisset J 1989. Relationships of weight gain and behavior to digestive organ weight and enzyme activities in piglets. Journal of Animal Science 67, 2921–2929.

Peeters JE 1987. Etiology and pathology of diarrhoea in weanling rabbits. In Rabbit production systems including welfare. (ed. T. Auxilia), pp. 127–137. Commission of the European Communities.

Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR and Lin J 2007. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. Pediatric Research 61, 37–41.

Perey DY and Good RA 1968. Experimental arrest and induction of lymphoid development in intestinal lymphoepithelial tissues of rabbits. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology 18, 15–26.

Perez JM, Gidenne T, Bouvarel I, Arveux P, Bourdillon A, Briens C, Le Naour J, Messager B and Mirabito L 2000. Replacement of digestible fibre by starch in the diet of the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by diarrhoea. Annales de Zootechnie 49, 369–377.

Perez JM, Gidenne T, Lebas F, Caudron I, Arveux P, Bourdillon A, Duperray J and Messager B 1994. Dietary lignins in growing rabbits. 2- Consequences on growth performances and mortality. Annales de Zootechnie 43, 323–332.

Perez JM, Lebas F, Gidenne T, Maertens L, Xiccato G, Parigi-Bini R, Dalle Zotte A, Cossu ME, Carazzolo A, Villamide MJ, Carabaño R, Fraga MJ, Ramos MA, Cervera C, Blas E,

Fernandez Carmona J, Falcao E Cunha L and Bengala Freire J 1995. European reference method for in-vivo determination of diet digestibility in rabbits. World Rabbit Science 3, 41–43.

Pérez-Berezo Teresa, Franch Angels, Ramos-Romero Sara, Castellote Cristina, Pérez-Cano Francisco J. and Castell Margarida 2011. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. Molecular Nutrition & Food Research 55, S56–S66.

Peterson LW and Artis D 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. Nature Reviews Immunology 14, 141–153.

Peterson ME and Kutzler M 2010. Small Animal Pediatrics - E-Book: The First 12 Months of Life. Elsevier Health Sciences.

Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl J-P, Edelman L, Sansonetti PJ and Corthésy B 2002. Secretory Component: A New Role in Secretory IgA-Mediated Immune Exclusion In Vivo. Immunity 17, 107–115.

Phuoc TL and Jamikorn U 2017. Effects of probiotic supplement (Bacillus subtilis and Lactobacillus acidophilus) on feed efficiency, growth performance, and microbial population of weaning rabbits. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 30, 198–205.

Piccolo G, Bovera F, Di Meo C, Gazaneo MP and Nizza A 2005. Performance of suckling rabbits fed a low fibre concentrate. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 18, 1421–1424.

Pierce J and Halpern BP 1996. Orthonasal and Retronasal Odorant Identification Based upon Vapor Phase Input from Common Substances. Chemical Senses 21, 529–543.

Pluske JR, Payne HG, Williams, I. H. and Mullan BP 2005. Early feeding for lifetime performance of pigs. Recent advances in animal nutrition in Australia, 15, 171-181.

Pluske JR, Turpin DL and Kim J-C 2018. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. Animal Nutrition 4, 187–196.

Pongrácz P, Altbäcker V and Fenes D 2001. Human handling might interfere with conspecific recognition in the european rabbit (Oryctolagus cuniculus). Developmental Psychobiology 39, 53–62.

Prebble JL and Meredith AL 2014. Food and water intake and selective feeding in rabbits on four feeding regimes. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 98, 991–1000.

Presch S 1984. A gastric intubation technique for preweanling rabbits and its application in creep feed evaluation.

Rashwan AA and Marai IFM 2010. Mortality in young rabbits: a review. World Rabbit Science 8, 111–124.

Read T 2016. Stratégies d'alimentation autour du sevrage en élevage cunicole pour améliorer la santé et les performances de lapereaux et de leur mère. thesis Thesis. Toulouse, INPT.

Read T, Combes S, Gidenne T, Destombes N, Grenet L and Fortun-Lamothe L 2015. Stimulate feed intake before weaning and control intake after weaning to optimise health and growth performance. World Rabbit Science 23, 145–153.

Read T, Combes S, Gidenne T, Destombes N, Grenet L and Fortun-Lamothe L 2016. Feed composition at the onset of feeding behaviour influences slaughter weight in rabbits. Livestock Science 184, 97–102.

Read T, Fortun-Lamothe L, Pascal G, Le Boulch M, Cauquil L, Gabinaud B, Bannelier C, Balmisse E, Destombes N, Bouchez O, Gidenne T and Combes S 2019. Diversity and Co-occurrence Pattern Analysis of Cecal Microbiota Establishment at the Onset of Solid Feeding in Young Rabbits. Frontiers in Microbiology 10.

Rebours G, Raffin J, Vastel P and Reys S 2019. Effets du rapport entre fibres digestibles et indigestibles dans l'aliment sur la santé digestive et les performances des lapins en engraissement. pp. 152–155.

Rhee K-J, Sethupathi P, Driks A, Lanning DK and Knight KL 2004. Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 172, 1118–1124.

Rogier EW, Frantz AL, Bruno MEC, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ and Kaetzel CS 2014. Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 3074–3079.

Rosenberg E and Zilber-Rosenberg I 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. Microbiome 6.

Scapinello C, Gidenne T and Fortun-Lamothe L 1999. Digestive capacity of the rabbit during the post-weaning period, according to the milk/solid feed intake pattern before weaning. Reproduction Nutrition Development 39, 423–432.

Schaal B 2005. From Amnion to Colostrum to Milk: Odor Bridging in Early Developmental Transitions. In Prenatal development of postnatal functions, Advances in infancy research, pp. 51–102. Praeger Publishers/Greenwood Publishing Group, Westport, CT, US.

Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E and Perrier G 2003. Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. Nature 424, 68–72.

Schaal B, Marlier L and Soussignan R 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. Behavioral Neuroscience 112, 1438–1449.

Schofield WB and Palm NW 2018. Gut Microbiota: IgA Protects the Pioneers. Current Biology 28, R1117–R1119.

Segura É and Amigorena S 2014. Les cellules dendritiques inflammatoires. médecine/sciences 30, 64–68.

Sekirov I and Finlay BB 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. The Journal of Physiology 587, 4159–4167.

Serra J and Nowak R 2008. Olfactory preference for own mother and litter in 1-day-old rabbits and its impairment by thermotaxis. Developmental Psychobiology 50, 542–553.

Silva SD, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, Mancuso A, Mercade-Loubière M, Salvador-Cartier C, Gillet M, Ferrier L, Loubière P, Dague E, Theodorou V and Mercier-Bonin M 2014. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology 307, G420–G429.

Simecka JW 1998. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. Advanced Drug Delivery Reviews 34, 235–259.

Skrivanova E, Molatova Z, Skrivanova V and Marounek MD-:10. 1016/j. vetmic. 2008. 09. 083 2009. Inhibitory activity of rabbit milk and medium-chain fatty acids against enteropathogenic Escherichia coli O128. Veterinary Microbiology 135, 358–362.

Slavin J 2013. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. Nutrients 5, 1417–1435.

Slotnick B 2001. Animal cognition and the rat olfactory system. Trends in Cognitive Sciences 5, 216–222.

Smith HF, Parker W, Kotzé SH and Laurin M 2013. Multiple independent appearances of the cecal appendix in mammalian evolution and an investigation of related ecological and anatomical factors. Comptes Rendus Palevol 12, 339–354.

Snipes RL 1978. Anatomy of the rabbit cecum. Anat. Embryol. 155, 57–80.

Söderholm JD, Yang P-C, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM and Perdue MH 2002. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. Gastroenterology 123, 1099–1108.

Stěpánková R, Kovárů F and Kruml J 1980. Lymphatic tissue of the intestinal tract of germfree and conventional rabbits. Folia Microbiologica 25, 491–495.

Stephen-Victor E and Chatila TA 2019. Regulation of oral immune tolerance by the microbiome in food allergy. Current Opinion in Immunology 60, 141–147.

Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, Aiba Y, Kubo C and Koga Y 1997. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. The Journal of Immunology 159, 1739–1745.

Szendrő Zs, Cullere M, Atkári T and Zotte AD 2019. The birth weight of rabbits: Influencing factors and effect on behavioural, productive and reproductive traits: A review. Livestock Science 230, 103841.

Thaiss CA, Zmora N, Levy M and Elinav E 2016. The microbiome and innate immunity. Nature 535, 65–74.

Thomas M and Van der Poel AFB 1996. Physical quality of pelleted animal feed 1. Criteria for pellet quality. Animal Feed Science and Technology 61, 89–112.

Thum C, McNabb WC, Young W, Cookson AL and Roy NC 2016. Prenatal caprine milk oligosaccharide consumption affects the development of mice offspring. Molecular Nutrition & Food Research 60, 2076–2085.

Tordesillas L and Berin MC 2018. Mechanisms of Oral Tolerance. Clinical Reviews in Allergy & Immunology 55, 107–117.

Torow N and Hornef MW 2017. The Neonatal Window of Opportunity: Setting the Stage for Life-Long Host-Microbial Interaction and Immune Homeostasis. The Journal of Immunology 198, 557–563.

Torrallardona D and Roura E 2009. Voluntary Feed Intake in Pigs. Wageningen Academic Pub.

Travel A, Mirabito L, Chanay I, Souchet C, Galliot P, Weissman D, Corrent E and Davoust C 2009. Préférences alimentaires du lapereau selon le diamètre du granulé, dans le cadre d'une alimentation séparée mère-jeunes. In (ed. G. Bolet). ITAVI, Paris.

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 Science 18, 199–210.

Tschudin A, Clauss M, Codron D, Liesegang A and Hatt JM 2011. Water intake in domestic rabbits (Oryctolagus cuniculus) from open dishes and nipple drinkers under different water and feeding regimes. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 95, 499–511.

Tsuruta T, Inoue R, Nojima I, Tsukahara T, Hara H and Yajima T 2009. The amount of secreted IgA may not determine the secretory IgA coating ratio of gastrointestinal bacteria. FEMS Immunology & Medical Microbiology 56, 185–189.

Vajdy M, Sethupathi P and Knight KL 1998. Dependence of antibody somatic diversification on gut-associated lymphoid tissue in rabbits. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 160, 2725–2729.

Van Soest PJ, Robertson JB and Lewis BA 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597.

Velasco-Galilea M, Piles M, Viñas M, Rafel O, González-Rodríguez O, Guivernau M and Sánchez JP 2018. Rabbit Microbiota Changes Throughout the Intestinal Tract. Frontiers in Microbiology 9.

Verschuren LMG, Schokker D, Bergsma R, Jansman AJM, Molist F and Calus MPL 2020. Prediction of nutrient digestibility in grower-finisher pigs based on faecal microbiota

composition. Journal of Animal Breeding and Genetics = Zeitschrift Fur Tierzuchtung Und Zuchtungsbiologie 137, 23–35.

Verwer CM, van Amerongen G, van den Bos R and Hendriksen CFM 2009. Handling effects on body weight and behaviour of group-housed male rabbits in a laboratory setting. Applied Animal Behaviour Science 117, 93–102.

Volek Z, Marounek M and Skrivanova V 2007. Effect of a starter diet supplementation with mannan-oligosaccharide or inulin on health status, caecal metabolism, digestibility of nutrients and growth of early weaned rabbits. Animal 1, 523–530.

Wiest R and Rath HC 2003. Bacterial translocation in the gut. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology 17, 397–425.

Willems F, Vollstedt S and Suter M 2009. Phenotype and function of neonatal DC. European Journal of Immunology 39, 26–35.

Wong RCW, Favaloro EJ, Pollock W, Wilson RJ, Hendle MJ, Adelstein S, Baumgart K, Homes P, Smith S, Steele RH, Sturgess A and Gillis D 2004. A multi-centre evaluation of the intra-assay and inter-assay variation of commercial and in-house anti-cardiolipin antibody assays. Pathology 36, 182–192.

Woof JM and Kerr MA 2006. The function of immunoglobulin A in immunity. The Journal of Pathology 208, 270–282.

Xiao J, Alugongo GM, Li J, Wang Y, Li S and Cao Z 2020. Review: How Forage Feeding Early in Life Influences the Growth Rate, Ruminal Environment, and the Establishment of Feeding Behavior in Pre-Weaned Calves. Animals 10, 188.

Xiccato G 1996. Nutrition of lactating does. In (ed. F. Lebas), pp. 29–48. Assoc. Française de Cuniculture, Lempdes, France.

Xiccato G and Trocino A 2010. Energy and protein metabolism and requirements. In Nutrition of the rabbit (eds. C. De Blas and J. Wiseman), pp. 83–118. CABI; Wallingford; UK.

Xiccato G, Trocino A, Carraro L, Fragkiadakis M and Majolini D 2008. Digestible fibre to starch ratio and antibiotic treatment time in growing rabbits affected by epizootic rabbit enteropathy. In (ed. A.T. G. Xiccato S.D. Lukefahr), pp. 847–851. Fond. Ini. Zooprofilattiche E Zoot. publ. Brescia Italy.

Xiccato G, Trocino A, Sartori A and Queaque PI 2003. Effect of weaning diet and weaning age on growth, body composition and caecal fermentation of young rabbits. Animal Science 77, 101–111.

Yáñez-Ruiz DR, Abecia L and Newbold CJ 2015. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. Frontiers in Microbiology 6, 1133.

Yardin M 2009. Evolution des dents du jeune lapin. Mammalia 32, 677–689.

Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R and Gordon JI 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 486, 222–227.

Yu B and Chiou PWS 1996. Effects of crude fibre level in the diet on the intestinal morphology of growing rabbits. Lab. Anim. 30, 143–148.

Yu B and Tsen HY 1993. Lactobacillus cells in the rabbit digestive tract and factors affecting their distribution. J. Appl. Bact. 75, 269–275.

Yun JW 1996. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. Enzyme and Microbial Technology 19, 107–117.

Zaman SA and Sarbini SR 2016. The potential of resistant starch as a prebiotic. Critical Reviews in Biotechnology 36, 578–584.

Zarrow MX, Denenberg VH and Anderson CO 1965. Rabbit: frequency of suckling in the pup. Science (New York, N.Y.) 150, 1835–1836.

Zhang L, Ouyang Y, Li H, Shen L, Ni Y, Fang Q, Wu G, Qian L, Xiao Y, Zhang J, Yin P, Panagiotou G, Xu G, Ye J and Jia W 2019. Metabolic phenotypes and the gut microbiota in response to dietary resistant starch type 2 in normal-weight subjects: a randomized crossover trial. Scientific Reports 9, 1–11.

Zheng L, Kelly CJ, Battista KD, Schaefer R, Lanis JM, Alexeev EE, Wang RX, Onyiah JC, Kominsky DJ and Colgan SP 2017. Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950) 199, 2976–2984.

Zhu Y, Wang C and Li F 2015. Impact of dietary fiber/starch ratio in shaping caecal microbiota in rabbits. Canadian Journal of Microbiology 61, 771–784.

Zhu YL, Wang CY, Wang XP, Li B, Sun LZ and Li FC 2013. Effects of dietary fiber and starch levels on the non-specific immune response of growing rabbits. Livestock Science 155, 285–293.

Annexe 1 : Protocole de fabrication de gels alimentaires à destination de lapereaux allaités

Ingrédients utilisés pour la production d'un gel d'aliments, sans additif :

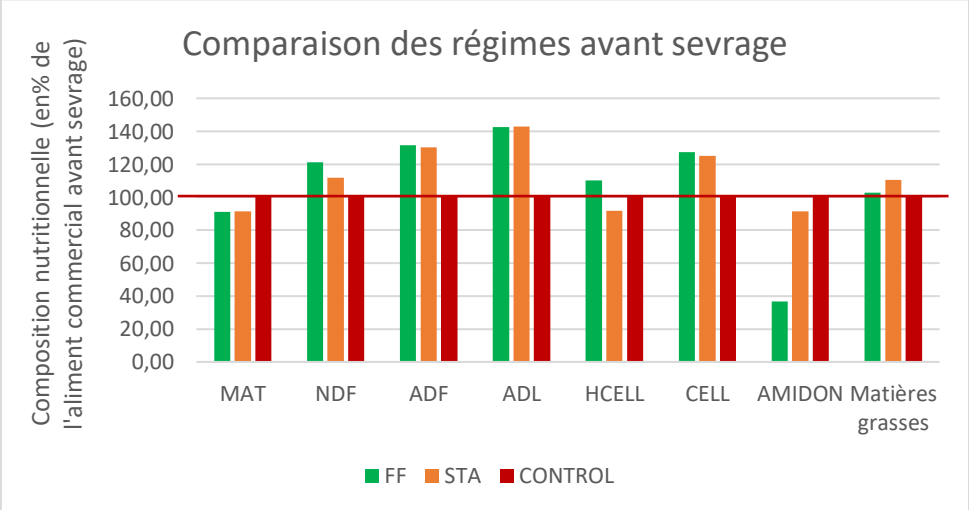
Farine d'aliment (moulure)	200 g
Eau	600 mL
Agar	4,9 g

- Mettre l'eau dans un bécher et la porter à 80°C, apporter progressivement l'agar-agar tout en mélangeant
- Une fois l'ensemble de l'agar-agar dissous dans l'eau chaude, laisser le bécher 2 minutes sur plaque chauffante tout en mélangeant avec une spatule
- Après les 2 minutes, retirer le bécher de la plaque chauffante et y verser l'intégralité de la farine. Bien mélanger l'ensemble
- Verser le mélange dans une barquette que l'on placera ensuite au réfrigérateur pendant dix minutes pour accélérer le refroidissement.
- Une fois la préparation solidifiée, remplir les coupelles correspondantes aux ¾.

Annexe 2 : Composition en ingrédients et valeur nutritionnelle des régimes FF (riche en fibres digestibles), STA (riche en amidon) et CONTROL

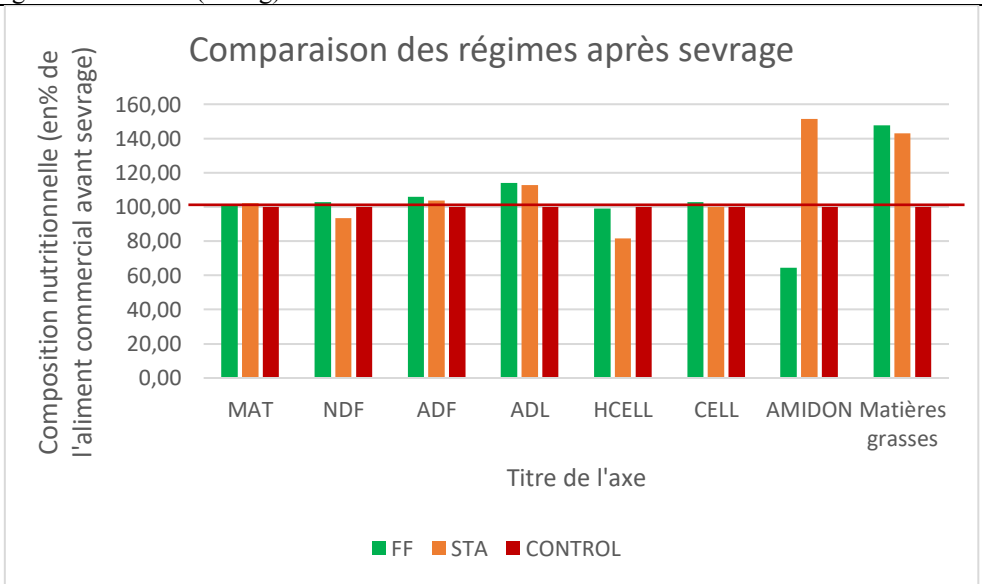
Avant le sevrage

	STA	FF	CONTROL avant sevrage
Ingredients (%)			
Tourteau de tournesol	25.00	20.00	23,60
Tourteau de colza			3,00
Coque de tournesol			8,90
Orge	15.00	2.40	17,40
Son de blé	12.80	21.00	30,06
Luzerne	6.90	6.00	
Pulpe de betterave	6.70	22.20	9,50
Marc de pomme	6.00	4.00	
Mélasse de canne	5.50	5.20	
Mélasse de betterave			5,00
Blé	5.20	2.00	
Paille	5.00	2.10	
Farine de colza	3.50	5.80	
Graine de colza	2.30	2.30	
Pulpe de raison	2.20	3.80	
Carbonate de calcium	1.18	0.78	1,16
Sel			0,58
L-Lysine 25%	0.56	0.36	0,10
Huile de colza	0.50	0.50	0,20
Thréonine 10%	0.42	0.26	
Méthionine 15%	0.24	0.30	
Prémix de vitamines et minéraux	1.00	1.00	0,50
Composition chimique (g/kg as fed-basis)			
Cendres	67	69	64
Protéines brutes	160	160	176
NDF	356	387	319
ADF	215	217	165
ADL	73	73	51
Hémicelluloses (NDF-ADF)	141	170	154
Amidon	119	48	131
Matières grasses	28	26	25
Energie brute (MJ/kg)	17.0	16.7	16,3
Energie digestible calculée (MJ/kg)	9.3	9.3	9,5

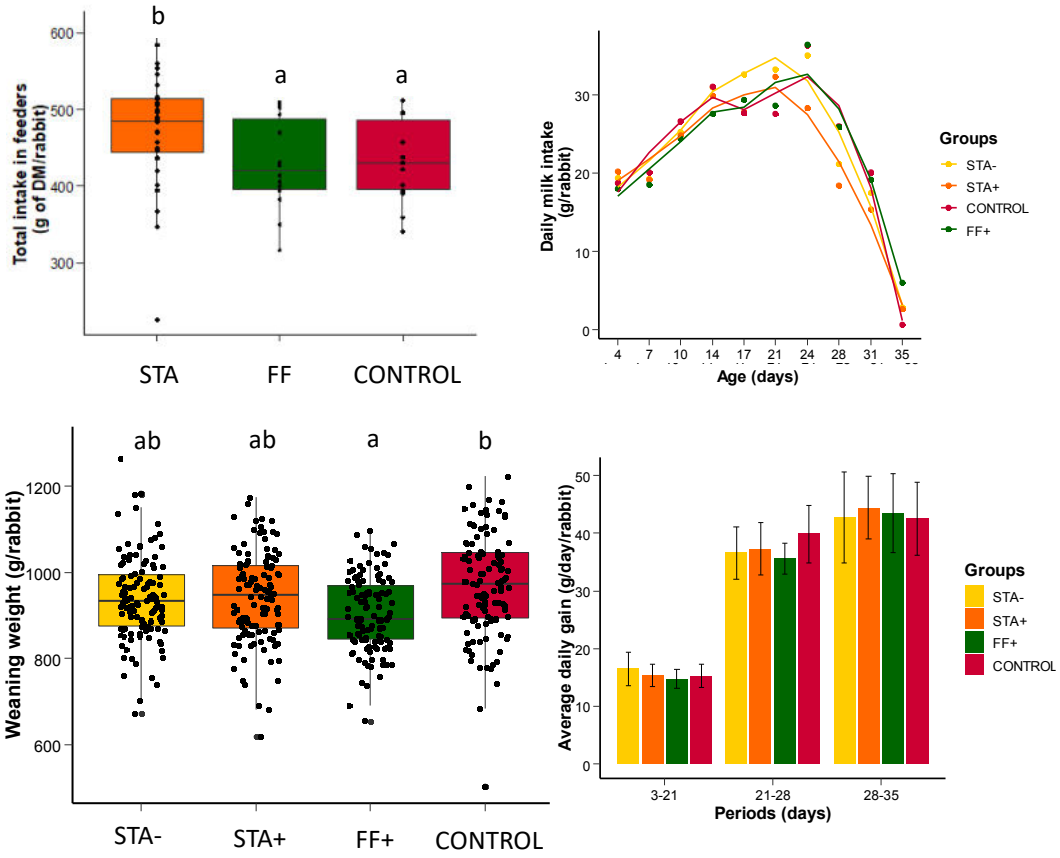


Après le sevrage

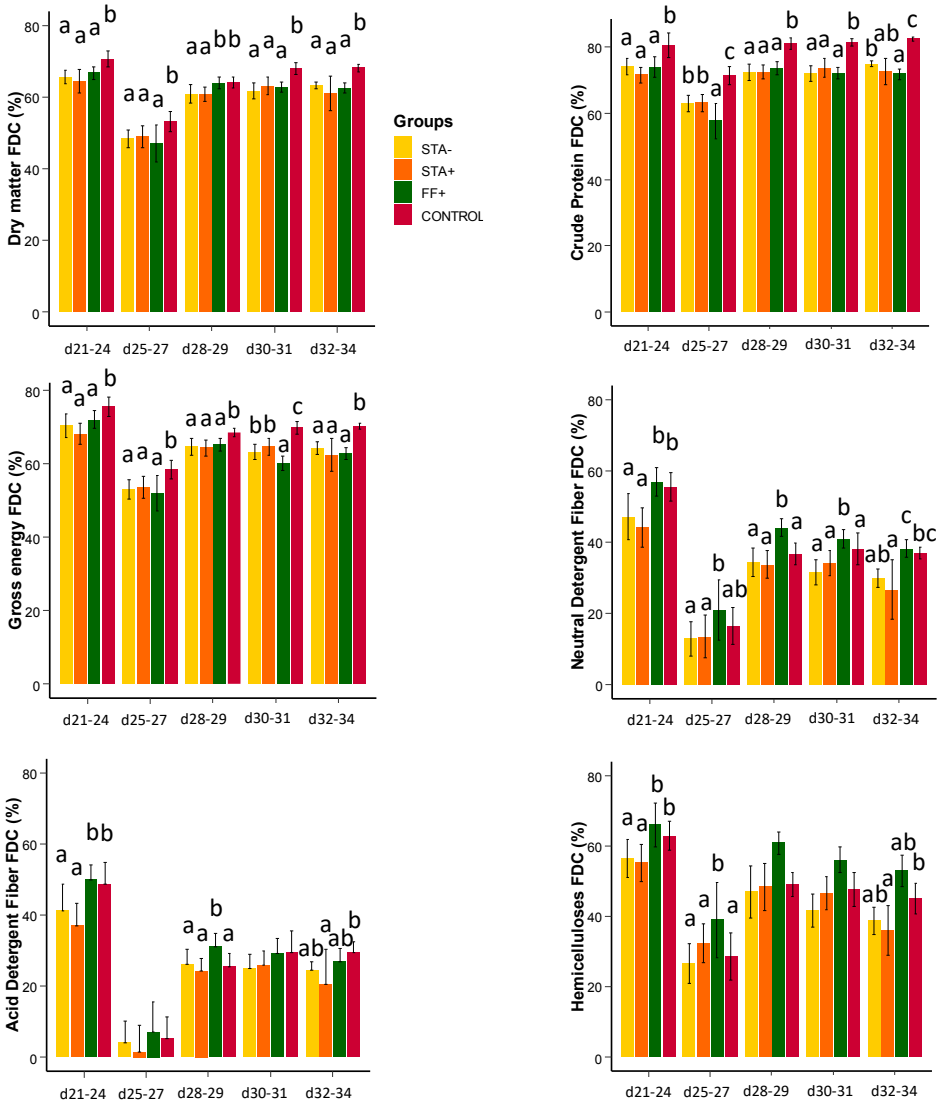
	STA	FF	CONTROL après sevrage
Ingredients (%)			
Tourteau de tournesol High Pro	25.00	20.00	10,10
Tourteau de tournesol Low Pro			7,70
Tourteau de colza			3,00
Coque de tournesol			10,00
Orge	15.00	2.40	
Son de blé	12.80	21.00	25,09
Luzerne	6.90	6.00	8,00
Pulpe de betterave	6.70	22.20	18,70
Marc de pomme	6.00	4.00	
Mélasse de canne	5.50	5.20	
Mélasse de betterave			5,00
Blé	5.20	2.00	8,40
Paille	5.00	2.10	
Farine de colza	3.50	5.80	
Graine de colza	2.30	2.30	
Pulpe de raison	2.20	3.80	
Carbonate de calcium	1.18	0.78	1,92
Sel			0,69
L-Lysine 25%	0.56	0.36	0,10
Huile de colza	0.50	0.50	0,30
Thréonine 10%	0.42	0.26	
Méthionine 15%	0.24	0.30	
Prémix de vitamines et minéraux	1.00	1.00	1,00
Composition chimique (g/kg as fed-basis)			
Cendres	67	69	87
Protéines brutes	160	160	154
NDF	356	387	375
ADF	215	217	205
ADL	73	73	64
Hémicelluloses (NDF-ADF)	141	170	171
Amidon	119	48	77
Matières grasses	28	26	19
Energie brute (MJ/kg)	17.0	16.7	15,9
Energie digestible calculée (MJ/kg)	9.3	9.3	9.1



Annexe 3 : Article 4 du chapitre 2 complété du lot CONTROL



Annexe 3, Figure 1 : Profils d'ingestion de granulés (de 15 jours au sevrage, pour toutes les portées) et de lait (à partir de 21 jours d'âge la consommation de lait n'était mesurée que sur les portées en digestibilité) ainsi que les performances zootechniques des 4 lots. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.

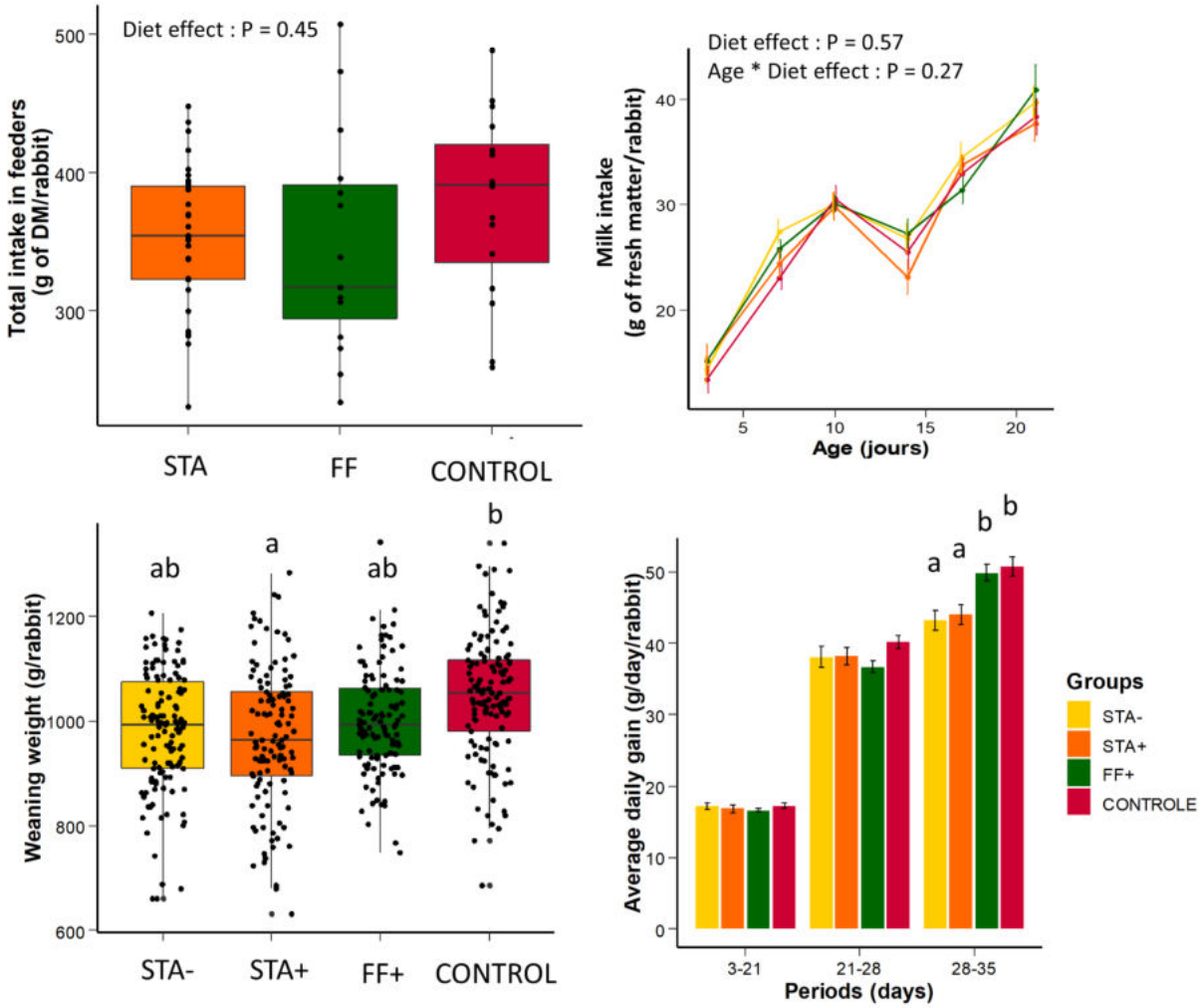


Annexe 3, Figure 2 : Coefficients de digestibilité apparente (CUDa) de la matière sèche, des protéines (azote), de l'énergie brute, des fibres NDF, ADF et des hémicelluloses. Les différentes lettres représentent des différences significatives entre lots pour une période de digestibilité donnée.

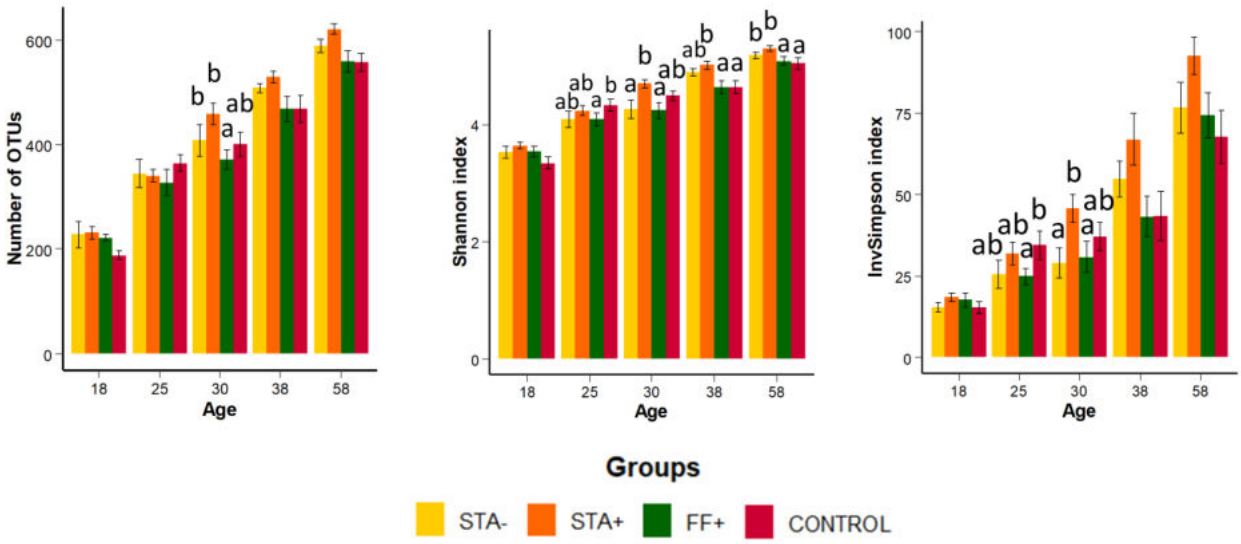
Analyses complémentaires :

- Le contenu en digesta de la totalité du tractus digestif était significativement inférieur dans le lot CONTROL par rapport aux animaux ayant reçu un aliment préocément (lots AMI+ et FF+) avec des écarts de 3 et 2 grames respectivement, sur la totalité de la période étudiée. L'allométrie des principaux organes digestifs était en revanche identique entre les lots.
- Le caecum des animaux du lot CONTROL contenait plus de propionate que les trois lots expérimentaux à 30 jours (+2 ou +3 Mmol selon les lots). Les autres paramètres du caecum (pH, NH_3, acétate et butyrate) n'étaient pas affectés par les traitements.

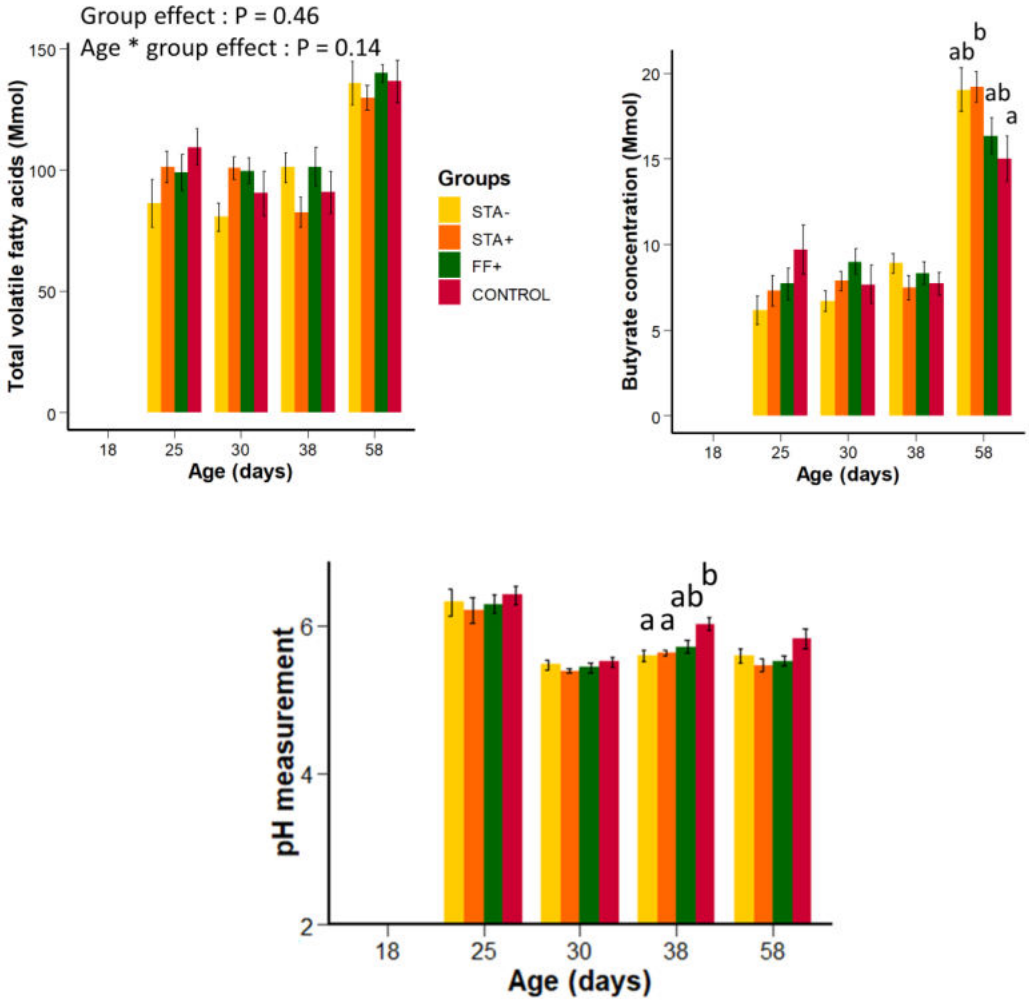
Annexe 4 : Article 5 du chapitre 3 complété du lot CONTROL



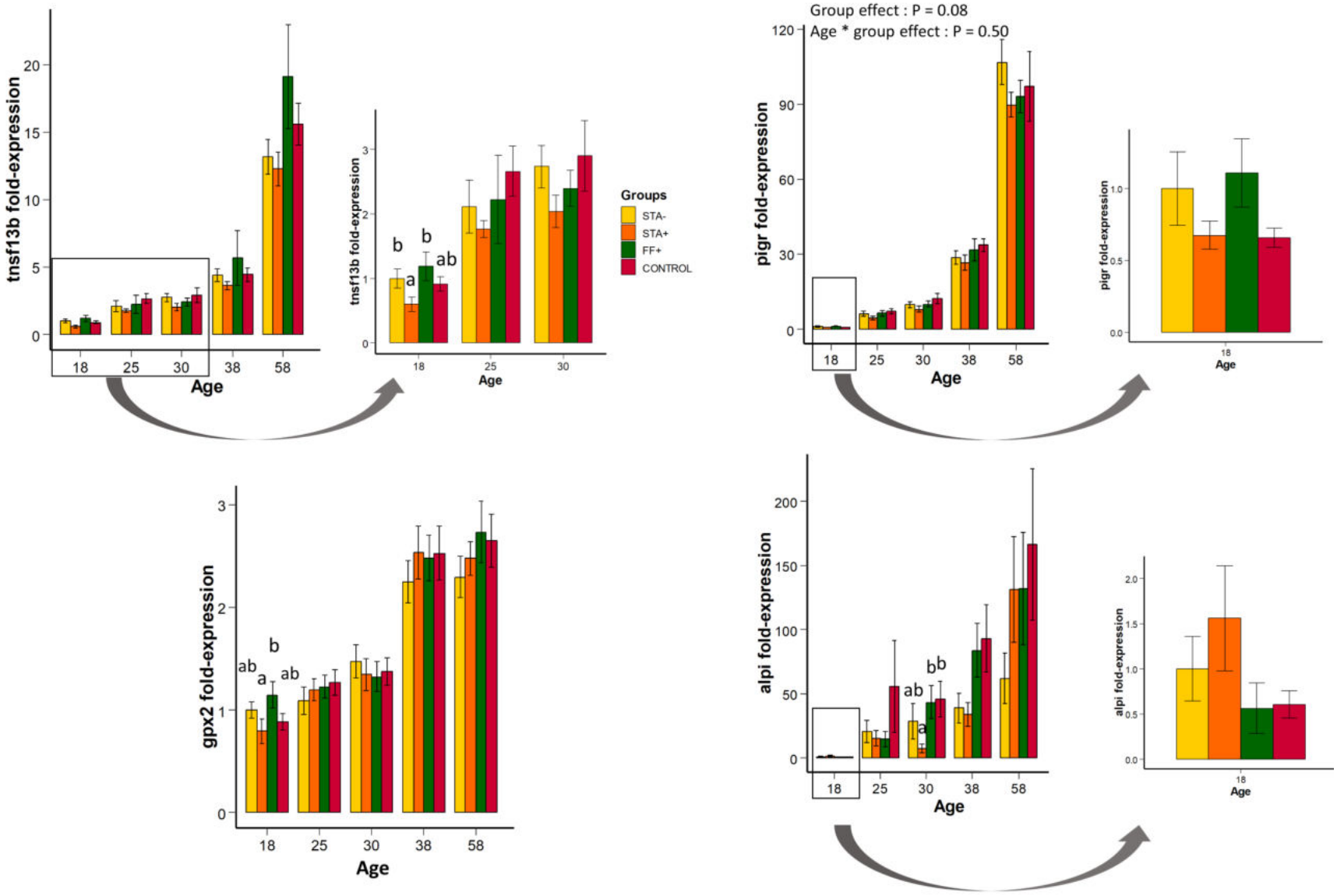
Annexe 4, Figure 1 : Profils d'ingestion de granulés (de 15 jours au sevrage, pour toutes les portées) et de lait jusqu'à 21 jours d'âge ainsi que les performances zootechniques des 4 lots. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard (se).



Annexe 4, Figure 2 : Indices d'alpha-diversité calculés pour les 4 lots.

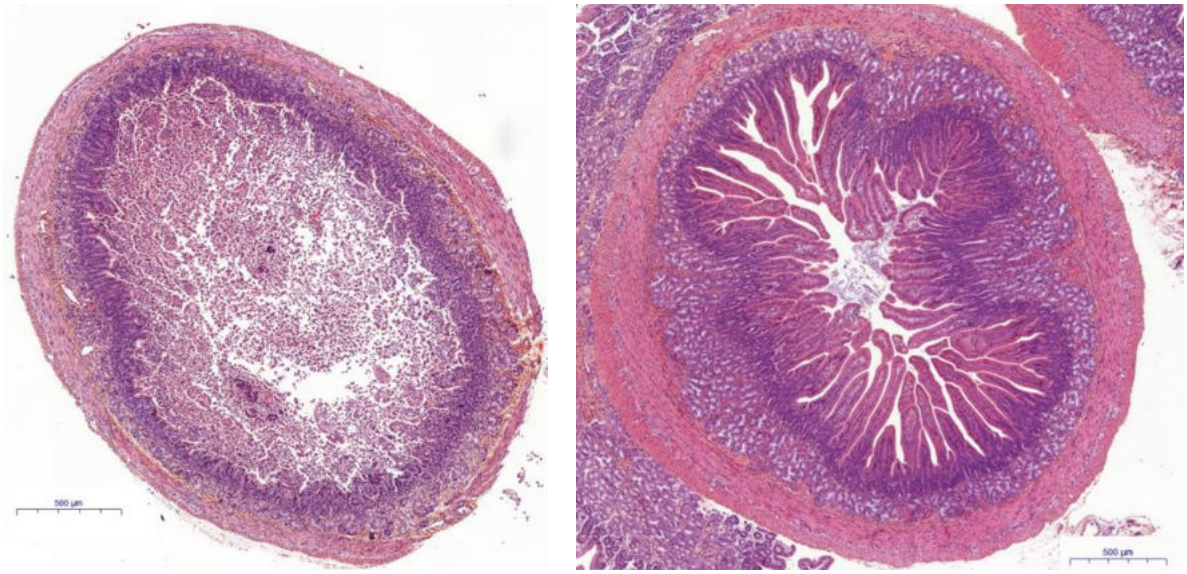


Annexe 4, Figure 3 : Caractéristiques de l'environnement caecal de 25 à 58 jours d'âge (contenu en AGV évalué par chromatographie en phase gazeuse et pH mesuré après abattage via une sonde). Les mesures n'ont pu être réalisées à 18 jours d'âge faute de contenu caecal en quantité suffisante.



Annexe 4, Figure 4 : Comparaison de l'expression de gènes d'intérêt entre les quatre conditions expérimentales.

Annexe 5 : Photos de lames histologiques



Annexe 5, Photo 1 : Exemple de coupes histologiques de duodénum obtenues après coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Des dégâts importants étaient observés au niveau de la lumière intestinale sur une partie de nos coupes (photo de gauche). La photo de droite représente une coupe de bonne qualité permettant la réalisation de mesures.

Abstract

Further reduction of antibiotics use in rabbit farming requires the research of new solutions to preserve animals health. Indeed, shortly after weaning, the occurrence of digestive disorders remains high, in conjunction with the incomplete maturation of the rabbit's immunity. Knowing the key role of the digestive microbiota in shaping and stimulating the immune system, a targeted control of this symbiotic relationship in early life represents a promising avenue of research to prevent enteritis. The gut microbiota establishment is controlled by solid feed intake, intake that occurs in the first week of life in wildlife conditions but is currently hindered in rabbit husbandry. This PhD work aimed to stimulate the early solid feed intake of the suckling rabbit in order to promote the colonization of a balanced gut microbiome. First, the investigation of the suckling rabbit's feeding behaviour enabled us to 1/ design a feeding system for providing solid feed inside the nest and 2/ to identify a gel feed form as a palatable feed presentation. Thanks to those necessary pre-requirements, the effects of early feeding on digestive capacity, growth performances, microbiota and several health parameters were evaluated by modulating the nutritional content in polysaccharides (rapidly fermentable fibres and starch) or oligosaccharides (fructo-oligosaccharides or mannan-oligosaccharides). We demonstrated that the feed intake in the nest started around 7 days of age and amounted over the first 17 days of life to 1.3 ± 0.2 g of dry matter per rabbit on average in our seven experimental trials. The intake of starter feed in the nest did not affect milk intake, rabbit's growth and faecal digestibility coefficients of the dietary nutrients provided before weaning (dry matter digestibility between 49 and 67% depending on the period considered). However, the intake of solid feed in early life induced modifications of caecal microbiota establishment, with greater effects when the intake in the nest was high. Acceleration of the caecal microbiota maturity was observed after the supply of a gel feed in the nest, with persistent effects. As a main feature, we observed a growth of bacteria from Ruminococcaceae family together with a decreased relative abundance of Bacteroidaceae. Even though the supplementation of starter feed in functional ingredients (prebiotics) had limited effect on caecal bacterial communities, the modulation of the ratio digestible fibres/starch (1.7 vs 5.5) had marked effects on taxonomic profiles and microbiota fermentative activity. Concomitantly with those changes in the ecosystems, the caecal mucosa expression of genes involved in immunity (in particular *Gpx2*, *Tnfsf13b* and *pigR*) changed according to the composition of the starter feed. Taken together, those results indicate the relevance of starter feeds to engineer the young rabbit maturing digestive ecosystem and its developing immunity. Complementary research project aiming to assess the health benefits of the nutritional support that we developed are now necessary to confirm the interest of an early feeding strategy in rabbit farms.

Résumé

La poursuite de la réduction de l'usage d'antibiotiques en élevage cunicole passe par la recherche de nouveaux leviers d'action permettant de maîtriser la santé. En effet, l'occurrence des troubles digestifs survenant peu de temps après le sevrage reste importante, en lien avec la maturation incomplète de l'immunité du lapereau. Etant donné le rôle clé du microbiote digestif dans la construction et la stimulation du système immunitaire, un pilotage ciblé de ce partenaire microbien en début de vie représente une piste prometteuse de prévention des entérites. L'implantation du microbiote digestif est dépendante de l'ingestion d'aliment solide, observée dès la première semaine de vie en conditions naturelles mais impossible en élevage faute de dispositifs alimentaires adaptés. Ce travail de thèse avait pour objectif de comprendre les déterminants de l'ingestion solide précoce du lapereau allaité pour la stimuler, de manière à promouvoir l'installation d'un microbiote digestif favorable à la santé de l'hôte. Dans un premier temps, l'étude du comportement alimentaire du lapereau allaité a permis de concevoir un dispositif de mise à disposition d'aliment solide au nid et d'identifier un support nutritionnel appétant se présentant sous la forme d'un aliment gélifié. Grâce à ces prérequis, les effets d'une alimentation précoce sur la capacité digestive, les performances de croissance, l'implantation du microbiote et quelques paramètres de santé ont été évalués en faisant varier le type d'apports en polysaccharides (ratio fibres digestibles/amidon) ou oligosaccharides (fructo-oligosaccharides et mannan-oligosaccharides). Nous avons démontré que la consommation d'aliment au nid débutait autour de 7 jours d'âge et représentait en moyenne 1,3 ± 0,2 g de matières sèches par lapereau au cours des 17 premiers jours de vie dans nos sept essais expérimentaux. La consommation d'aliment dans le nid n'affectait pas l'ingestion de lait, les performances de croissance et les coefficients d'utilisation digestive des nutriments apportés avant sevrage (digestibilité de la matière sèche comprise entre 49 et 67% avant sevrage selon la période étudiée). La stimulation précoce de l'ingestion d'aliment solide permettait en revanche de moduler la colonisation du microbiote caecal avec des effets d'autant plus marqués que cette ingestion était élevée. Une maturation plus rapide du microbiote digestif était observée sur le long terme lors de l'introduction d'un aliment gélifié dans le nid, maturation caractérisée en particulier par une croissance des bactéries de la famille Ruminococcaceae conjointement à une réduction de l'abondance des Bacteroidaceae. Si l'enrichissement de l'aliment démarrage en ingrédients fonctionnels (prébiotiques) n'impactait que peu les communautés bactériennes du caecum, la modulation du ratio fibres digestibles/amidon influençait en revanche fortement les profils taxonomiques et l'activité fermentaire du microbiote. En lien avec ces changements observés au niveau des écosystèmes, l'expression dans la muqueuse caecale de gènes impliqués dans l'immunité (notamment *Gpx2*, *Tnfsf13b* et *pigR*) variait selon la nature des aliments distribués au nid. L'ensemble de ces résultats indiquent la pertinence de la distribution d'un aliment à destination du lapereau nouveau-né pour orienter la construction conjointe de son microbiote et son immunité. Des travaux permettant d'étayer les bénéfices santé du support nutritionnel développé permettraient de confirmer l'intérêt d'une stratégie d'alimentation précoce pour l'élevage cunicole.