

Comportement d'ingestion de fèces dures maternelles par les lapereaux au nid. 2. Influence sur l'implantation du microbiote caecal et sur la survie des lapereaux

S. COMBES¹, T. GIDENNE¹, C. CAUQUIL¹, E. BALMISSE², P. AYMARD², J.M. BONNEMERE²,
C. BANNELIER¹, B. GABINAUD¹, M. SEGURA¹, V. TARTIE¹, L. FORTUN-LAMOTHE¹

¹INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

²INRA, UE1322 PECTOUL, F-31326 Castanet-Tolosan, France

Résumé. Pendant l'allaitement la lapine émet des fèces dures dans le nid, qui sont en partie ingérées par les lapereaux. L'objectif de notre étude est i) d'évaluer l'effet de l'ingestion de fèces maternelles au nid sur l'implantation du microbiote caecal par séquençage 454 de la région V3-V4 des gènes codant pour l'ARN 16S, la croissance et la survie des lapereaux et ii) d'orienter le processus d'implantation du microbiote en substituant les fèces maternelles par des fèces issues d'autres femelles sous antibiothérapie ou non. Dans le lot témoin, les fèces maternelles sont dénombrées et laissées à disposition des lapereaux dans le nid (lot T, n=24 portées), dans le lot R (n=28 portées) les fèces sont comptées puis retirées. Dans les deux derniers lots les fèces maternelles sont comptées, retirées et remplacées par des fèces issues de femelles étrangères non traitées (E, n=28 portées) ou traitées aux antibiotiques (Eab, n=29 portées). L'apport de fèces de lapines étrangères multiplie par 3 le comportement de coprophagie du lapereau ($p < 0,001$ période 2-20j d'âge) mais il est plus faible dans le lot Eab que dans le lot E (29 ± 10 , vs 36 ± 9 fèces consommées, respectivement, $p < 0,05$). Entre 36-49 jours d'âge et sur l'ensemble de la période (2-80j), la mortalité est plus élevée dans le groupe R (9,5% et 22,8%, respectivement) et plus faible dans le groupe E (2,8% et 9,3%) que dans les groupes T (5,8% et 15,5%) ou Eab (4,7% et 13,2% ; $p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement). La prévention de l'ingestion de fèces (lot R), entraîne un retard d'implantation du microbiote, avec une abondance relative supérieure de Bacteroidaceae et inférieure de Ruminococcaceae à 35 jours d'âge, comparativement aux 3 autres groupes ($p < 0,1$). En conclusion le comportement de coprophagie du lapereau au nid jouerait un rôle important dans la transmission du microbiote de la mère vers sa portée et contribuerait à garantir une meilleure survie.

Abstract. Ingestion of feces in the nest enhances coprophagous behaviour of pups, affects implantation process of caecal microbiota and improves health. At the time of nursing, maternal fecal excretion in the nest has been observed, and coprophagous behaviour of the pups has been described. The aim of the study was to i) evaluate the effect of coprophagous behaviour of the pups on the implantation process of caecal microbiota using 454 pyrosequencing of the V3-V4 region of 16S RNA genes, growth and health. ii) to modify the implantation process of the microbiota by substituting maternal faeces with feces from other females supplemented or not with antibiotics. In the control group maternal feces were counted and left available to rabbits in the nest (lot T, n = 24 litter), in group R (n = 28 litter) feces were counted and removed. In the last two groups maternal feces were counted, removed and replaced with feces from foreign untreated females (E, n = 28 litter) or supplemented with antibiotics (Eab, n = 29 litter). The distribution of foreign feces to rabbits increase by 3 fold the behavior of coprophagia ($p < 0,001$) but the feces consumption was lower in Eab than in E group (29 ± 10 vs. 36 ± 9 faeces, respectively, $p < 0,05$). Between 36-49 days of age and on the whole period (2d-80d), mortality was higher in the R group (9,5% and 22,8%, respectively) and lowest in group E (2,8% and 9,3%) than in group T (5,8% and 15,5%) and Eab (4,7% and 13,2%, $p < 0,05$ and $p < 0,01$, respectively). Preventing the ingestion of feces (R group) causes a delay in the establishment of the microbiota with a higher relative abundance of Bacteroidaceae and lower Ruminococcaceae at 35 days of age, compared to three other groups ($p < 0,1$). In conclusion, this behaviour contributes to the transmission of microbiota from the does to their offsprings in the nest and helps to ensure a better health.

Introduction

Outre sa fonction d'hydrolyse et de fermentation des nutriments, le microbiote joue un rôle clé dans le développement du tractus gastro-intestinal et la maturation du système immunitaire et agit en tant que barrière contre les agents pathogènes (Hooper *et al.*, 2012). Contrôler son implantation et/ou sa dynamique d'établissement est un levier pertinent pour améliorer la santé digestive du lapin. Dans les 2 semaines qui suivent la mise bas, les lapines émettent au moment de l'allaitement des fèces dures dans le nid, qui sont

en partie ingérées par les lapereaux (Moncomble *et al.*, 2004; Kovács *et al.*, 2006). Nous avons dans un premier temps conforté et affiné ces observations (Gidenne *et al.*, 2013). Nous émettons l'hypothèse que ce comportement est impliqué dans le processus de transmission du microbiote en direction des lapereaux. L'objectif de notre étude était i) d'évaluer l'effet de cette ingestion sur l'implantation du microbiote caecal, la croissance et la survie du lapin, et ii) d'évaluer les possibilités d'orienter ce processus d'implantation en amplifiant et prolongeant le

comportement naturel de coprophagie au nid par substitution des fèces maternelles par des fèces issues de femelles traitées ou non aux antibiotiques.

1. Matériels et Méthodes

1.1 Animaux et conduite d'élevage

Un total de 109 femelles et leurs portées (PS Hyplus 19 × PS Hyplus 39, Hypharm, France) ont été élevées à l'unité expérimentale INRA de PECTOUL (Castanet-Tolosan) et conduites en trois répétitions. Les femelles et leur portée suivie jusqu'à 70-80 jours ont reçu le même aliment commercial tout au long de l'expérience. Les portées ont été équilibrées à 8-10 lapereaux sans adoption avec un allaitement contrôlé jusqu'à 21j (ouverture des boîtes à nid pendant 20 min). Les portées ont été réparties en 4 lots. Dans le lot témoin (T), les lapereaux avaient librement accès aux fèces éventuellement émises par leur mère. Les fèces maternelles étaient comptées avant ouverture et après fermeture de la boîte à nid et laissées en place. Selon les quantités émises et ingérées, les fèces maternelles pouvaient s'accumuler dans le nid. Dans le lot R, les lapereaux n'avaient pas accès aux fèces : à la fermeture de la boîte à nid les fèces émises étaient comptées et retirées. Dans les deux derniers groupes, les lapereaux avaient accès à des fèces congelées issues de femelles étrangères non traitées (lot E) ou supplémentées en antibiotiques (lot Eab ; tetracycline 50 mg/kg et tiamulin 10 mg/kg). Les fèces maternelles étaient retirées à la fermeture des boîtes à nid et remplacées par des fèces exogènes congelées en quantité croissante pour suivre l'augmentation de la consommation (exactement 5, 7 et 9 fèces entre le 2^{ème} et 13^{ème} jour, 14^{ème} et 17^{ème} jour, et 18^{ème} et 20^{ème}). Les fèces exogènes non consommées étaient dénombrés, retirés et remplacés par de nouvelles fèces exogènes. Il n'y avait pas d'accumulation. Les

lapereaux, avaient accès à l'aliment distribué à la mère dès la sortie du nid et ont été sevrés à 35 jours. Après le sevrage les portées ont été maintenues dans leur cage.

1.2 Performances de croissance et mortalité

Les lapereaux de la première répétition ont été pesés individuellement à 2, 14, 35, 49 et 80 jours d'âge (n=342). Ceux de la deuxième et troisième répétition ont été pesés individuellement à 2, 21, 35, et 70 jours d'âge (n=720). La mortalité a été suivie quotidiennement. La mortalité a été analysée par un test de χ^2 .

1.3 Composition de la communauté bactérienne caecale

La composition de la communauté bactérienne caecale a été déterminée sur 128 échantillons de contenu caecal prélevés sur 8 lapereaux par lot à 14, 35, 49 et 80 jours par pyroséquençage 454 des régions V3-V4 des gènes codant pour l'ARN16S sur la plateforme GeT de Toulouse. Un total de 1 011 323 séquences de 408± 70 nucléotides a été nettoyé et assigné chacune à un taxon (logiciel MOTHUR Schloss *et al.*, 2009). Les données ont été normalisées et standardisées (transformation racine carrée) puis analysées avec un modèle linéaire mixte avec l'âge et le lot comme effet fixe, la portée en effet aléatoire et le poids à 2 jours comme covariable.

2. Résultats et discussion

Cette étude fait suite aux observations d'excrétion de fèces par les lapines dans le nid et d'ingestion de celles-ci par les lapereaux (Gidenne *et al.* 2013), l'objectif étant ici d'étudier l'impact sur la survie des animaux et la mise en place du microbiote caecal.

Tableau 1 : Nombre de fèces déposées par la femelle dans le nid et nombre de fèces ingérées par les lapereaux (mesure par portée) sur l'ensemble de la période (2 j – 20 j)

	Groupes				RMSE ¹	P-valeur
	R	E	Eab	T		
Nombre de fèces déposées par la femelle (2 – 20 j)	15	19	18	12	120	0,20
Nombre de fèces ingérées par la portée (2 – 20 j) ¹	-	36 a	29 b	10 c	9	<0,001

¹ La présence de fèces dans l'estomac des lapereaux a été confirmée par examen du contenu stomacal lors du sacrifice réalisé à 14 j

^{a,b} Dans un colonne les moyennes affectées de lettres différentes diffèrent à au seuil de $p < 0,05$

Le nombre de fèces déposées dans le nid n'était pas significativement différent entre les 4 groupes bien que numériquement plus faible pour le lot T (Tableau 1). En accord avec les données présentées dans ces mêmes journées par Gidenne *et al.* (2013), l'apport de fèces issues de femelles étrangères multiplie par 3 le comportement d'ingestion par portée chez les lapereaux (Tableau 1). Nous confirmons l'existence d'un décalage entre le pic d'émission des fèces par la mère (maximum lors des 6^{er} jours après la mise bas)

et le pic d'ingestion de fèces par la portée lorsque les fèces exogènes sont mises à disposition (entre le 13^{ème} et le 17^{ème} jours). Les lapereaux seraient encore trop jeunes pour grignoter beaucoup de fèces avant 7 jours. Par ailleurs, il semblerait que les fèces congelées distribuées aux lapereaux et renouvelées chaque jour soient plus attractives que les fèces maternelles excrétées 10 jours plutôt. Enfin, la consommation de fèces exogènes de femelles traitées aux antibiotiques est significativement plus faible que celle issues de

femelles non traitées aux antibiotiques (avec une différence de 7 fèces entre 2-20 jours; Tableau 1). La moindre attractivité des fèces issues de femelles traitées aux antibiotiques pourrait résulter des modifications d'odeur liées à l'altération des processus de fermentation et/ou de composition du microbiote des femelles (Willing *et al.*, 2011) puisque l'aliment était le même pour les femelles "donneuses" de fèces des lots E et Eab.

Un effet du lot a pu être observé sur le poids au sevrage : les lapereaux n'ayant pas eu accès aux fèces (lot R) présentaient un poids plus faible (- 54g, $P < 0,05$) que ceux ayant ingéré les fèces issues de femelles étrangères sans traitement antibiotique (lot E) (Tableau 2). Par ailleurs, la mortalité enregistrée sur la période 36-49 jours est la plus élevée dans le groupe des lapereaux n'ayant pas eu accès aux fèces (lot R) (Tableau 3). A l'inverse, les lapereaux du lot E montrent le plus faible taux de mortalité ($< 3\%$) sur cette même période. Si l'on extrapole le calcul de la mortalité en tenant compte des animaux sacrifiés, cette différence est encore plus marquée (9,3 % vs 22,8 % sur l'ensemble de la période 2-80 jours pour le lot E et R respectivement).

Tableau 2 : Moyenne (estimées des moindres carrés) des poids vif des lapins des groupes Eab, E, R et T à 2, 35 et 70 jours d'âge

Groupe	2 jours	35 jours	70 jours
Eab	68	881 ab	2641
E	65	891 a	2609
R	67	837 b	2570
T	70	858 ab	2566
P-valeur ¹			
lot	NS	*	NS
répétition	***	*	*
lot*série	*	NS	NS
poids2jours	-	***	**
portée	***	***	***

¹ Le modèle pour générer les moyennes ajustées considère le lot et la répétition comme effet fixe, le poids à 2 j en covariable et la portée en effet aléatoire

^{a,b} Dans une colonne les moyennes affectées de lettres différentes diffèrent au seuil de $p < 0,05$

La figure 1 illustre la relation entre la mortalité enregistrée au sein d'une portée et la quantité de fèces ingérée par la portée. Aucune relation significative n'a pu être démontrée, cependant entre ces deux variables de comptage on observe que la consommation élevée de fèces n'est jamais associée à une mortalité élevée.

A la naissance, le tractus digestif des lapereaux est stérile. Sa colonisation est rapide et débute lors du contact avec la mère et l'environnement immédiat du lapereau. La figure 2 illustre l'évolution avec l'âge des trois principales familles bactériennes présentes dans l'écosystème caecal : Lachnospiraceae, Ruminococcaceae et Bacteroidaceae (figure 2). À 14 jours la communauté bactérienne du caecum est dominée par le phylum des Bacteroidetes ($63 \pm 15\%$), la famille Bacteroidaceae ($36 \pm 19\%$) et le genre

Bacteroides ($36 \pm 2\%$). Avec l'âge le phylum des Firmicutes devient largement dominant ($92 \pm 5\%$ à 80 jours); le ratio des Bacteroidetes : Firmicutes passe de 0,6 à 14 jours à plus de 35 à 80 jours ($p < 0,001$). Comme décrit précédemment (Massip *et al.*, 2012), les Lachnospiraceae et les Ruminococcaceae deviennent alors les familles dominantes; ($44 \pm 14\%$; $38 \pm 12\%$, respectivement).

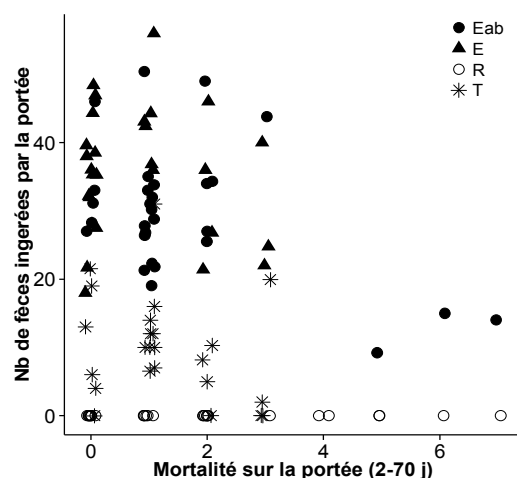
Tableau 3 : Mortalité (%) des 4 lots

Période	2-14j	15-35j	36-49j	50-80j	2-80j
Eab	7,8 (282) ¹	3,7 (240)	4,7ab (211)	3,9 (127)	13,2b
E	4,8 (270)	1,3 (238)	2,8b (215)	0,8 (132)	9,3b
R	5,4 (279)	3,2 (246)	9,5a (220)	6,7 (120)	22,8a
T	3,8 (237)	2,4 (212)	5,8ab (191)	4,5 (110)	15,5ab
P-valeur	0,253	0,383	0,035	0,109	0,003

¹ nombre des lapins vivants en début de période

^{a,b} Dans une colonne les moyennes affectées de lettres différentes diffèrent au seuil de $p < 0,05$

Figure 1 : Relation entre le nombre de mort dans une portée (période 2-70 jours) et la quantité de fèces ingérée par la portée (entre 2 et 20j).



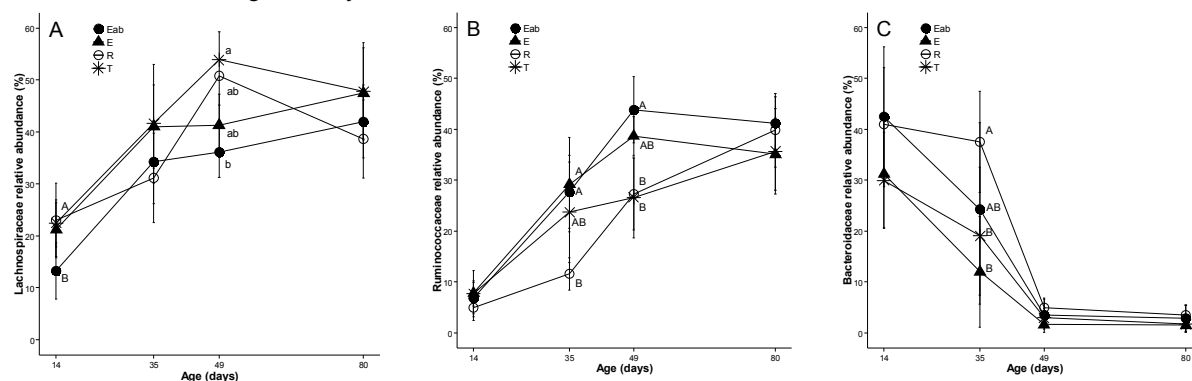
La prévention de l'ingestion de fèces (lot R) retarde cette succession écologique. En effet à 35 jours, contrairement aux lapereaux des trois autres lots, l'abondance relative des familles Bacteroidaceae reste élevée tandis que celle des Ruminococcaceae est plus basse ($p < 0,1$). Ainsi le comportement de coprophagie du lapereau au nid pourrait être un moyen d'assurer la transmission du microbiote de la femelle vers sa portée. En effet la lapine contrairement à la plupart des mammifères a une très faible fréquence de contact avec sa portée : en moyenne 1 visite du nid par 24 h et un temps de contact réduit (3 à 5 min; Zarrow *et al.*, 1965; Hoy et Selzer, 2002; González-Mariscal, 2007).

Le groupe Eab a été mis en place afin de valider que la stimulation de l'ingestion de fèces, dont on pourrait moduler la composition (ici à l'aide d'antibiotiques),

pouvait être un moyen simple de contrôle des processus d'implantation. L'ingestion de fèces issues de femelles traitées aux antibiotiques n'affecte que peu la composition du microbiote comparativement au

lot E. Toutefois, elle tend à orienter la colonisation initiale, puisqu'à 14 jours les lapereaux du groupe Eab présentent une plus faible abondance relative de Lachnospiraceae.

Figure 2. Abondance relative des familles bactériennes de Lachnospiraceae (A), Ruminococcaceae (B) Bacteroidaceae (C) dans le caecum des lapins des groupes Eab, E, R et T à 14, 35, 49 et 80 jours d'âge (moyenne $\pm$ écart type de la moyenne) a, b Au même âge, les moyennes affectées de lettres différentes diffèrent au seuil de $P < 0.05$; A, B Au même âge, les moyennes affectées de lettres différentes diffèrent au seuil de $P < 0.1$



Conclusion

Nous avons montré, que l'apport de fèces issues de lapines étrangères multipliait par 3 le comportement naturel de coprophagie du lapereau au nid. Inhiber ce comportement entraîne un retard à la mise en place du microbiote, et une plus grande mortalité. A l'inverse, l'ingestion de fèces issues de femelles non traitées aux antibiotiques diminue la mortalité. Ainsi, ce comportement est un moyen d'assurer la transmission du microbiote de la femelle vers sa portée et d'améliorer sa survie. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour contrôler le microbiote du lapin avec l'objectif d'améliorer la santé et, éventuellement, d'améliorer l'efficacité digestive.

Remerciements

Le personnel technique et administratif de l'UMR TANDEM, de l'Unité expérimentale de PECTOUL et de la plateforme de séquençage GeT sont remerciés pour leur appui.

Références

HOOPER L.V., LITTMAN D.R., MACPHERSON A.J. 2012. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science*, 336, 1268-1273.

HOY S., SELZER D. 2002. Frequency and time of nursing in wild and domestic rabbits housed outdoors in free range. *World Rabbit Sci*, 77-83.

GIDENNE T., COMBES S., FIDLER C., FORTUN-LAMOTHE L. 2013. Comportement d'ingestion de fèces dures maternelles par les lapereaux au nid. 1. Quantification de la production maternelle de fèces et de leur ingestion par les lapereaux au nid. In: Bolet, G. (Ed.), *14èmes Journées de la recherche Cunicole, ITAVI, Paris., Le Mans, France*, pp. 33-48.

GONZÁLEZ-MARISCAL G. 2007. Mother rabbits and their offspring: Timing is everything. *Dev. Psychobiol.*, 49, 71-76.

KOVÁCS M., SZENDRŐ Z., MILISITS G., BIRO-NEMETH E., RADNAI I., POSA R., BÓNAI A., KOVÁCS F., 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.

MASSIP K., COMBES S., CAUQUIL L., ZEMB O., GIDENNE T., 2012. High throughput 16S-DNA sequencing for phylogenetic affiliation of the caecal bacterial community in the rabbit - Impact of the hygiene of housing and of the intake level, In Proc.: VIIIth INRA-RRI Symposium on Gut Microbiology. Gut microbiota: friend or foe?, INRA Rowett Institute of Nutrition and Health. (Ed.) publ., Clermont-Ferrand - France, 17 - 20 june, p57.

MONCOMBLE A.S., QUENNEDEY B., COUREAUD G., LANGLOIS D., PERRIER G., SCHAAL B., 2004. Newborn rabbit attraction toward maternal faecal pellets, In Proc.: *International Society for Developmental Psychobiology, 37th annual meeting*, Barr G. (Ed.) Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, publ., Aix-en-Provence, France, 277.

SCHLOSS P.D., WESTCOTT S.L., RYABIN T., HALL J., HARTMANN M., HOLLISTER E., LESNIEWSKI R., OAKLEY B., PARKS D., ROBINSON C., SAHL J., STRES B., THALLINGER G., VAN HORN D., WEBER C. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 7537-7541.

WILLING B.P., RUSSELL S.L., FINLAY B.B. 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Micro*, 9, 233-243.

ZARROW M.X., DENENBERG V.H., ANDERSON C.O. 1965. Rabbit : Frequency of sulking in the pup. *Science*, 150, 1835-1836