



HAL
open science

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA CORTICOSTERONE PILAIRE CHEZ LE LAPIN POUR VALUER LEUR STRESS ET LEURS CAPACITES D'ADAPTATION

Valérie Fillon, Manon Despeyroux, Davi Savietto, Manon Fetiveau, Laurence
Lamothe

► **To cite this version:**

Valérie Fillon, Manon Despeyroux, Davi Savietto, Manon Fetiveau, Laurence Lamothe. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA CORTICOSTERONE PILAIRE CHEZ LE LAPIN POUR VALUER LEUR STRESS ET LEURS CAPACITES D'ADAPTATION. Journées de la Recherche Cunicole, ITAVI; INRAE; ASFC, Mar 2023, Le Mans (72000), France. pp.118-123. hal-04047795

HAL Id: hal-04047795

<https://hal.inrae.fr/hal-04047795>

Submitted on 27 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE DOSAGE DE LA CORTICOSTERONE PILAIRE CHEZ LE LAPIN POUR EVALUER LEUR STRESS ET LEURS CAPACITES D'ADAPTATION

Fillon V.^{1*}, Despeyroux M.¹, Ly P.¹, Savietto D.¹, Fetiveau M.¹, Fortun-Lamothe L.¹

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

*Auteur correspondant : valerie.fillon@inrae.fr

Résumé – Il y a un enjeu fort à disposer d'indicateurs physiologiques pour évaluer le bien-être animal et/ou le stress dans différents environnements et pour différentes populations afin d'accompagner la ré-conception des systèmes d'élevage. La corticostérone est une hormone de l'adaptation. Elle s'accumule dans le poil des animaux. Son dosage permet donc d'évaluer le niveau de stress sur une période donnée. Une méthode de dosage de la corticostérone pileire Elisa par immuno-compétition a été développée avec succès. La méthode est simple, reproductible, juste, sensible et le stress potentiel vécu par les animaux lors du prélèvement n'influe pas sur le résultat. Des valeurs de références ont été établies pour des lapins INRA1777 mâles et femelles âgés de 1, 3, 6 et 13 mois. Aucun effet du sexe n'a été mis en évidence (P -value = 0,46). En revanche, un fort effet de l'âge a été observé avec des valeurs de corticostérone élevées chez le lapereau au sevrage (8,40 pg/mg de poil en moyenne) qui baissent progressivement et fortement avec l'âge pour atteindre 2,82 pg/mg de poil chez les adultes de 13 mois (P -value < 0,0001). La corticostérone a été redosée sur les lapines à l'âge de 15 mois après un changement de bâtiment et d'animaliers concernant 9 lapines. Les valeurs moyennes sont passées de 2,69 (avant) à 3,80 pg/mg de poil (après) (P -value = 0,01), alors que pour les 6 lapines n'ayant pas subi de changement la valeur moyenne est passée de 3,14 à 3,44 pg/mg de poil (P -value = 0,42). Ceci suggère que ce dosage pourrait permettre d'objectiver le stress des animaux après une perturbation. Des études ultérieures vont être entrepris pour étudier l'influence qui conditions de vie des lapins et de la relation homme/animal sur le niveau de corticostérone pileire.

Abstract – There is a strong need for physiological indicators to assess animal welfare and/or stress in different environments and for different populations in order to support the redesign of breeding systems. Corticosterone is an adaptation hormone. It accumulates in the hair of animals. Its measurement therefore makes it possible to assess the level of stress over a given period. A method for the determination of hair corticosterone by Elisa immuno-competition has been successfully developed. The method is simple, reproducible, accurate, sensitive and the potential stress experienced by the animals during sampling does not influence the result. Reference values has been established for male and female INRA1777 rabbits aged 1, 3, 6 and 13 months. No sex effect was found (P -value = 0.46). However, a strong age effect was observed with high corticosterone values in weanling rabbits (8.40 pg/mg hair on average) which progressively and strongly decreased with age to 2.82 pg/mg hair in 13-month-old adults (P -value < 0.0001). Corticosterone was re-dosed on the does at 15 months of age after a change of animal housing for 9 does. The mean value increased from 2.69 (before) to 3.80 pg/mg hair (after) (P -value = 0.01), while for the 6 control does the mean value increased from 3.14 to 3.44 pg/mg hair (P -value = 0.42). This suggests that it may be possible to objectify the stress of the animals after a disturbance. Further studies will be undertaken to investigate the influence of the living conditions of the rabbits and the human/animal relationship on the hair corticosterone level.

Introduction

Les conditions d'élevage et le bien-être des animaux interpellent aujourd'hui l'ensemble de la société, à la fois les professionnels (éleveurs et filières de production), les citoyens et les consommateurs. La filière cunicole intensive ne fait pas exception. Elle s'est fortement rationalisée depuis plusieurs décennies et l'élevage a connu des progrès dans tous les domaines (génétique, alimentation, reproduction...). Mais elle est aujourd'hui critiquée car le mode de logement dominant (cages grillagées de petites dimensions) ne permet pas aux animaux

d'exprimer la totalité des comportements propre à l'espèce lapin et de répondre aux attendus du bien-être animal (Anses, 2018).

Pour évaluer et objectiver le bien-être des lapins, il est essentiel de pouvoir mesurer l'impact des conditions de vie sur le niveau de stress vécu par les animaux. Il est donc nécessaire de recourir à des indicateurs physiologiques en lien avec l'état des animaux. Les glucocorticoïdes (cortisol, corticostérone) sont des hormones du stress et de l'adaptation (Mormède *et al.*, 2007). Ils sont

responsables du maintien de l'homéostasie en ajustant le métabolisme aux besoins physiologiques. Ils ont une action anti-inflammatoire. Ces molécules sont présentes dans tous les tissus, fluides corporels et phanères à des concentrations variables. Leur sécrétion fluctue tout au long de la journée, et peut varier avec l'exercice musculaire, la prise alimentaire, le rythme nyctéméral.

Afin de pouvoir utiliser les glucocorticoïdes pour évaluer le niveau de stress de lapins dans des conditions d'élevage contrastées, il faut d'abord mettre au point une méthode de dosage de la corticostérone pileire et établir des valeurs de références chez des lapins élevés dans le système dominant (cages grillagées).

Les glucocorticoïdes sont classiquement dosés dans le sang ou la salive. Mais, du fait de sa nature d'espèce proie, le lapin est un animal craintif, le stress des manipulations lors du prélèvement de sang peut entraîner une élévation ponctuelle du taux de cortisol plasmatique. Le résultat obtenu est alors difficile à interpréter.

Les glucocorticoïdes s'accumulent aussi progressivement dans les poils au fur et à mesure de leur croissance (Meyer and Novak, 2012). De nombreuses études rapportent le dosage du cortisol dans les cheveux ou les poils pour évaluer le niveau de stress sur une période donnée tant chez les humains que chez les espèces animales sauvages ou domestiques (Heimbürge *et al.*, 2019). Le prélèvement de poils présente en plus l'avantage d'être non-invasif. La quantité de glucocorticoïdes accumulés dans le poil tout au long de sa croissance reflète ainsi le niveau de cortisol global sur la durée de vie du poil (environ 5 semaines chez le lapin) et donc pendant une période définie, contrairement à la salive et au sang qui permettent de doser le cortisol à l'instant *T* sans s'affranchir des fluctuations quotidiennes. La mesure des glucocorticoïdes dans les poils vise ainsi à évaluer le niveau de stress chronique des animaux, en lien avec leurs conditions de vie.

Une méthode de dosage de la corticostérone dans les poils de lapins a été développée en adaptant la méthode utilisée pour doser le cortisol dans la salive. Nous avons pu valider la méthode et établir les premières valeurs de références pour une cinquantaine de lapins de la souche INRA 1777 selon leur âge et stade physiologique. Certaines lapines reproductrices ont changé de milieu de vie pour des raisons de conduite du troupeau. De façon opportuniste, nous avons évalué l'impact de ce changement sur le niveau de corticostérone pileire à partir d'un 2^{ème} prélèvement réalisé 1 mois et demi après.

L'objectif de cet article est de présenter la méthodologie de dosage de la corticostérone dans les poils de lapins, les paramètres de qualité de cette méthode (justesse, robustesse et répétabilité) et les valeurs de référence disponibles à ce jour.

1. Matériel et méthodes

L'expérience a reçu un avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale et a été autorisée par le MESRI sous le numéro #16330-2018072716211212v3.

1.1. Les animaux

Tous les lapins sont de la lignée INRA 1777 (Legault *et al.*, 1996). Pour établir des valeurs de référence, nous avons prélevé des lapins d'âges et de stades physiologiques différents : 10 lapereaux de 1 mois (mâles et femelles) au sevrage, 10 lapins de précheptel non sexuellement matures de 3 mois (mâles et femelles), 5 lapines reproductrices de 6 mois (2^{ème} insémination artificielle (IA)), 18 lapines reproductrices de 13 mois (6^{ème} ou 7^{ème} IA) et 9 mâles reproducteurs de 13 mois. Ces lapins ont tous été élevés à l'Installation Expérimentale de GenPhySE (INRAE) dans des cages grillagées (P : 96 × L : 46 × H : 30 cm), sans plateforme et avec repose-pattes. Ces échantillons ont également servi pour valider la méthode (justesse, robustesse et répétabilité). Parmi les 18 lapines en reproduction, 9 ont déménagé dans un nouveau bâtiment équipé de logements de plus grandes dimensions (P : 90 × L : 46 × H : 90 cm) et ont changé d'équipe d'animaliers. Un 2^{ème} prélèvement a été réalisé 1 mois et demi après le déménagement (lapines de 15 mois et à la 8^{ème} IA) pour évaluer l'impact de ce changement sur le niveau de corticostérone pileire. Pour les 9 lapines qui n'ont pas déménagé, 6 étaient vivantes à 15 mois. Leur poil a été reprélevé et elles ont servi de témoins.

1.2. Prélèvement des poils

Comin *et al.* (2012) ont montré qu'il n'y a pas de différence significative sur les taux de corticostérone mesurés à partir de poils échantillonnés sur diverses parties du corps de lapins Néozélandais. Nous avons choisi la région dorsale scapulaire car c'est une zone facile à prélever, même pour un opérateur seul. Les poils ont été prélevés par rasage à l'aide d'une tondeuse électrique sur une zone d'environ 25 cm² (5×5 cm ; Figure 1). Cela a permis de récolter environ 250 mg de poil. Les échantillons ont été mis en sachet et conservés à -20°C jusqu'aux analyses.



Figure 1 : Prélèvement de poil à la tondeuse dans la région scapulaire d'un jeune lapin.

1.3. Extraction de la corticostérone

La méthode de quantification est un dosage Elisa par immuno-compétition adapté de la méthode développée par Davenport *et al.* (2006). La première étape consiste à laver 250 mg de poils à trois reprises avec 5 à 7 mL d'isopropanol afin d'éliminer les sources externes de stéroïdes. Les poils sont ensuite complètement séchés à température ambiante pendant au moins 2 jours. Environ 50 mg de poils sont ensuite coupés en fragments d'environ 1 mm avec des ciseaux ou broyés avec un broyeur *Fast-prep* (6 m/s pendant 2 fois 1 min entrecoupées d'une pause de 5 min) à l'aide de 6 billes en acier de 3 mm (MP Biomedical), puis placés en tubes de 2 mL. Après l'ajout de 1,5 mL de méthanol les tubes sont agités pendant 18 à 22h à 30°C. Après centrifugation (15 min à 13000 g), 600 µL de surnageant sont transférés dans des tubes Eppendorf de 2 mL et incubés pendant 3h20 à 30°C dans un *Speedvac* jusqu'à évaporation complète. Les culots séchés sont remis en suspension dans 100 µL de solution de dilution (kit Salimetrics® Cortisol), puis mélangés par vortex. Il est possible de stocker cet extrait à -20°C jusqu'au dosage, pendant 2 mois maximum.

1.4. Dosage de la corticostérone avec le kit Elisa Salimetrics®

Nous avons utilisé un kit de dosage par immuno-compétition conçu pour la mesure quantitative du cortisol salivaire (Salimetrics®, Carlsbad, CA, USA) et suivi les recommandations du fournisseur. La température de la pièce a été notée lors de chaque dosage. La mesure de l'absorbance est faite par un spectrophotomètre Glomax (Promega) à 450 et 490 nm (Figure 2). Le dosage d'une gamme étalon de concentration en cortisol connue est systématiquement réalisée.

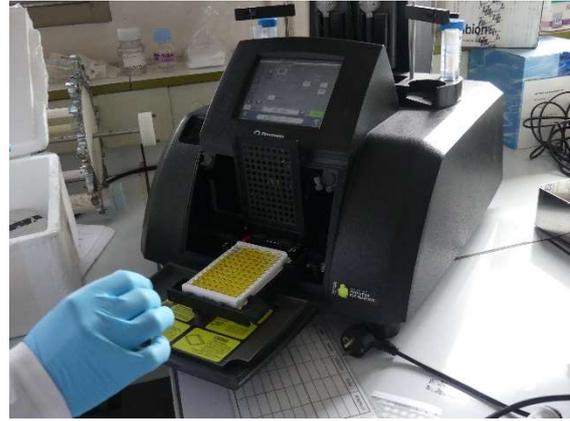


Figure 2 : Lecture de la densité optique avec le spectrophotomètre Glomax.

La concentration de chaque échantillon est déterminée par interpolation en utilisant un ajustement de courbe de régression non linéaire à 4 paramètres (logiciel Myassays 4PL) et convertie en pg/mg en tenant compte des facteurs de dilution.

1.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R (R Core Team, 2022 ; <https://www.R-project.org/>). La normalité des variables a été testée par un test de Shapiro. Les tests de validation de la méthode ont été réalisés par des Test t de Student apparié (répétabilité). Des analyses de variances (Anova) ont été réalisées pour évaluer l'effet du stade physiologique et du sexe (valeurs de référence). L'effet d'une perturbation (déménagement) a été analysé par un Test t de Student apparié.

2. Résultats et discussion

2.1. Validation de la méthode

Le tableau 1 rapporte les résultats obtenus pour le dosage de la gamme étalon réalisé à une température ambiante de 23 ou 27°C, mesurés sur des jours différents. Les résultats montrent que la méthode est juste (valeurs mesurées proches de la valeur cible) et reproductible (valeurs identiques pour deux séries de mesures faites à 23°C ; P -value = 0,19). En revanche, le dosage doit être réalisé entre 20 et 23°C pour ne pas perdre en justesse, comme recommandé par le fabricant du kit. En effet, un dosage réalisé l'été à une température ambiante de 27°C a montré un fort écart entre les valeurs de la gamme connues et mesurées.

Tableau 1 : Effet de la température ambiante sur le dosage de la corticostérone de la gamme étalon.

Gamme (µg/dl)	Dosage à 27°C	Dosage 1 à 23°C	Dosage 2 à 23°C
3,00	4,70	2,99	3,00
1,000	1,350	1,010	1,000
0,333	0,184	0,332	0,332
0,111	0,052	0,112	0,111
0,037	0,033	0,037	0,038
0,012	0,025	0,011	0,010

Par ailleurs, 9 échantillons de concentration inconnue ont été dosés deux fois en parallèle sur deux plaques distinctes et par des manipulateurs

Tableau 2 : Valeurs moyennes de corticostérone (pg/mg) pour des lapins INRA 1777.

Age (mois)	Stade Physiologique	Sexe	Effectif	Corticostérone (pg/mg de poil)	Ecart-type
1	Sevrage	Mâles et Femelles	10	8,40 ^a	2,55
3	Pré-cheptel	Mâles et Femelles	10	4,98 ^{bc}	2,17
6	Adulte	Femelles	5	4,02 ^{cd}	0,39
13	Adulte	Femelles	18	2,91 ^e	0,67
13	Adulte	Mâles	9	2,74 ^e	0,55

a, b, c, d, e Les moyennes n'ayant pas de lettres communes sont significativement différentes ($P < 0,01$).

Le taux de corticostérone baisse fortement et progressivement avec l'âge. L'effet âge est significatif (P -value $< 0,001$; Tableau 3).

Tableau 3 : Comparaison deux à deux entre les moyennes de corticostérone dosée pour chaque âge.

Âges (en mois) Comparés 2 à 2	Différence de niveaux de Corticostérone (pg/mg de poil) entre âges	P-value
1 vs 3	3,42	$< 0,0001^{***}$
1 vs 6	4,38	$0,0002^{***}$
1 vs 13	5,58	$< 0,0001^{***}$
3 vs 6	0,96	0,64
3 vs 13	2,16	0,09
6 vs 13	1,20	0,01*

Des observations similaires ont été faites chez les porcs et les bovins (Heimbürge *et al.*, 2020). Les valeurs de corticostérone élevées observées pour les lapereaux au sevrage sont peut-être à mettre en relation avec un métabolisme très actif du jeune. Cela a été démontré chez l'humain où le métabolisme est deux fois plus intense chez le bébé de moins de 1 an que chez l'adulte (Pontzer *et al.*, 2021). Il est également possible que les follicules pileux du lapereau fixent une partie des glucocorticoïdes sécrétés pour le déclenchement de la mise-bas. Cette différence pourrait être également

différents. Il n'y a pas eu d'effet significatif de la plaque ou du manipulateur (P -value = 0,19). La méthode est donc reproductible.

2.2. Valeurs de référence pour des lapins de la lignée INRAE 1777

Le tableau 2 rapporte les taux de corticostérone pileire pour des lapins à différents stades physiologiques. La variabilité individuelle est importante. Aucun effet du sexe n'a été observé (P -value = 0,46), pour les animaux prépubères, les valeurs moyennes ont été calculées en agrégeant les valeurs provenant des animaux des deux sexes.

expliquée par un taux très bas chez les adultes, en lien avec une vie en claustration et un état d'inactivité. Chez les chevaux, des niveaux bas de cortisol plasmatique ont été mis en lien avec des états dépressifs (Pawluski *et al.*, 2017). Chez l'être humain, une baisse du niveau de cortisol a également été observé chez des personnes en situation de burn out (Marchand *et al.*, 2014). Le stress chronique entraîne une sécrétion importante et prolongée de cortisol qui conduit à un épuisement des surrénales et à une chute du taux de cortisol plasmatique. Un niveau trop bas de cortisol est préjudiciable car il diminue les capacités d'adaptation métabolique et physiologique de l'individu.

Dans la littérature, la couleur du poil est un facteur qui pourrait influencer le taux de cortisol, les poils blancs montrant généralement une accumulation plus importante de glucocorticoïdes (Heimbürge *et al.*, 2019). Le mécanisme n'est pas parfaitement compris. Il pourrait s'agir d'une différence dans le flux sanguin des zones blanches ou noires du pelage, d'une interaction avec la mélanine, ou une dégradation plus importante du cortisol des poils noirs sous l'effet des rayons ultra-violet. Dans la présente étude, tous les lapins avaient un pelage blanc.

Par ailleurs, Fétiqueau *et al.* (2023) ont mis en évidence un effet du type génétique sur le taux de corticostérone pileire chez des lapereaux de 71 jours issus de deux croisements (souche 1001 \times 1777 vs PS119 \times 1777) élevés dans un système permettant l'accès à un parcours herbager.

Notons, qu'il n'est pas possible de comparer entre elles des valeurs brutes de corticostérone obtenues par des méthodes différentes.

2.3. Effet d'un changement du milieu de vie

Après le déménagement (changement du milieu de vie et d'animaliers) et durant la période d'acclimatation, le taux moyen de corticostérone dans le poil des 9 lapines est passé de 2,69 (avant) à 3,80 pg/mg de poil (après) (différence significative, P -value = 0,01). Pour les 6 lapines témoins n'ayant pas déménagé, la valeur moyenne est passée de 3,14 à 3,44 pg/mg de poil (différence non significative, P -value = 0,42). Ce résultat suggère que ce changement (de milieu de vie et équipe d'animaliers) a pu constituer un stress et que les capacités d'adaptation des animaux ont été sollicitées. Ce résultat suggère que la méthode est suffisamment sensible pour évaluer l'impact d'un facteur de stress. Peric *et al.* (2017) avaient fait des observations analogues sur 19 lapines et avaient montré des élévations du taux de corticostérone pileaire lors d'un changement de lieu, et de l'arrivée d'une nouvelle équipe d'animaliers.

De plus, Perez-Fuentes *et al.* (2020) ont montré que des lapines élevées en groupes avaient des niveaux de corticostérone trois fois plus élevés que des lapines logées en cages individuelles.

Conclusions

La méthode de dosage Elisa de la corticostérone pileaire est simple, juste, reproductible et sensible. Nous proposons ici des premières valeurs de référence pour les lapins de la lignée INRAE 1777.

La corticostérone pileaire est un biomarqueur simple à doser qui pourrait permettre d'objectiver l'effet d'un événement potentiellement stressant sur les lapins. La bioaccumulation quotidienne permet de s'affranchir du stress de la contention ou de la capture et de la sécrétion fluctuante de cortisol.

Avant toute interprétation, il faut garder à l'esprit que la corticostérone est une hormone de l'adaptation. Elle est donc nécessaire. Un excès, comme un manque sont préjudiciables à la santé. Par ailleurs, dans des systèmes innovants avec accès à l'extérieur, ou de l'élevage en parc, l'augmentation de l'activité motrice ou de la thermorégulation peuvent s'accompagner de niveaux de glucocorticoïdes plus importants, sans que le bien-être des animaux soit dégradé. C'est donc un indicateur à utiliser avec précaution, et à mettre en relation avec d'autres paramètres de santé et de bien-être. Pour évaluer le stress sur une période donnée, nous recommandons de tondre le poil en début de période pour réaliser les analyses sur le poil qui aura repoussé sur la période étudiée. Cela évite de prendre

en compte une bioaccumulation de corticostérone sur la période précédant l'étude.

Ces travaux seront poursuivis pour évaluer si les conditions de vie des lapins (cages vs parc ; bâtiment vs extérieur ; milieu simple vs milieu enrichi ; relation homme-animal positive vs relation neutre) influencent ce biomarqueur et objectiver l'impact des conditions de vie sur le niveau de stress chronique de lapins en croissance.

Remerciements

Ce travail a été financé par la Région Occitanie, le fonds FEDER et le CLIPP dans le cadre du projet Living Lab Lapins.

Nous remercions les animaliers pour la conduite des troupeaux.

Références

- ANSES, 2018. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au « Bien-être animal : contexte, définition et évaluation ».
- Comin, A., Zufferli, V., Peric, T., Canavese, F., Barbeta, D., Prandi, A., 2012. Hair cortisol levels determined at different body sites in the New Zealand White rabbit. *World Rabbit Sci.* 20, 149–154.
- Davenport, M.D., Tiefenbacher, S., Lutz, C.K., Novak, M.A., Meyer, J.S., 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 255–261.
- Fetiveau, M., Savietto, D., Bannelier, C., Fillon, V., Despeyroux, M., Pujol, S., Lamothe, L. 2023. Effect of outdoor grazing-area size and genotype on space and pasture use, behaviour, health and growth traits of weaned rabbits. *Animal Open Space* (accepté le 27/01/2023).
- Heimbürge, S., Kanitz, E., Otten, W., 2019. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 270, 10–17.
- Heimbürge, S., Kanitz, E., Tuchscherer, A., Otten, W., 2020. Within a hair's breadth – Factors influencing hair cortisol levels in pigs and cattle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 288, 113359.
- Legault, C., Ménissier, F., Ricordeau, G., Rouvier, R., 1996. Les lignées originales de l'INRA : Historique, développement et impact sur les productions animales. *Productions Animales, HS*, 41-56.
- Marchand, A., Juster, R.-P., Durand, P., Lupien, S.J., 2014. Burnout symptom sub-types and cortisol profiles: what's burning most? *Psychoneuroendocrinology* 40, 27–36.
- Meyer, J.S., Novak, M.A., 2012. Minireview: Hair Cortisol: A Novel Biomarker of Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Activity. *Endocrinology* 153, 4120–4127.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S., Veissier, I., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav., Stress and Welfare in Farm Animals* 92, 317–339.
- Pawluski, J., Jegou, P., Henry, S., Bruchet, A., Palme, R., Coste, C., Hausberger, M., 2017. Low plasma cortisol and fecal cortisol metabolite measures as indicators of compromised welfare in domestic horses (*Equus caballus*). *PLoS ONE* 12, e0182257.

- Pérez-Fuentes, S., Muñoz-Silvestre, A., Moreno-Grua, E., Martínez-Paredes, E., Viana, D., Selva, L., Villagrà, A., Sanz-Tejero, C., Pascual, J.J., Cervera, C., Corpa, J.M., 2020. Effect of different housing systems (single and group penning) on the health and welfare of commercial female rabbits. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 14, 1270–1277.
- Peric, T., Comin, A., Corazzin, M., Montillo, M., Canavese, F., Stebel, M., Prandi, A., 2017. Relocation and Hair Cortisol Concentrations in New Zealand White Rabbits. *J. Appl. Anim. Welf. Sci. JAAWS* 20, 1–8.
- Pontzer, H., Yamada, Y., Sagayama, H., Ainslie, P.N., Andersen, L.F., Anderson, L.J., Arab, L., Baddou, I., Bedu-Addo, K., Blaak, E.E., Blanc, S., Bonomi, A.G., Bouten, C.V.C., Bovet, P., Buchowski, M.S., Butte, N.F., Camps, S.G., Close, G.L., Cooper, J.A., Cooper, R., Das, S.K., Dugas, L.R., Ekelund, U., Entringer, S., Forrester, T., Fudge, B.W., Goris, A.H., Gurven, M., Hambly, C., El Hamdouchi, A., Hoos, M.B., Hu, S., Joonas, N., Joosen, A.M., Katzmarzyk, P., Kempen, K.P., Kimura, M., Kraus, W.E., Kushner, R.F., Lambert, E.V., Leonard, W.R., Lessan, N., Martin, C., Medin, A.C., Meijer, E.P., Morehen, J.C., Morton, J.P., Neuhouser, M.L., Nicklas, T.A., Ojiambo, R.M., Pietiläinen, K.H., Pitsiladis, Y.P., Plange-Rhule, J., Plasqui, G., Prentice, R.L., Rabinovich, R.A., Racette, S.B., Raichlen, D.A., Ravussin, E., Reynolds, R.M., Roberts, S.B., Schuit, A.J., Sjödin, A.M., Stice, E., Urlacher, S.S., Valenti, G., Van Etten, L.M., Van Mil, E.A., Wells, J.C.K., Wilson, G., Wood, B.M., Yanovski, J., Yoshida, T., Zhang, X., Murphy-Alford, A.J., Loechl, C., Luke, A.H., Rood, J., Schoeller, D.A., Westerterp, K.R., Wong, W.W., Speakman, J.R., IAEA DLW DATABASE CONSORTIUM, 2021. Daily energy expenditure through the human life course. *Science* 373, 808–812.