



**HAL**  
open science

# Conséquences d'un contrôle de l'ingestion sur la physiopathologie digestive et le comportement alimentaire du lapin en croissance.

Mélanie Martignon

## ► To cite this version:

Mélanie Martignon. Conséquences d'un contrôle de l'ingestion sur la physiopathologie digestive et le comportement alimentaire du lapin en croissance.. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2010. Français. NNT: . tel-04274939v1

**HAL Id: tel-04274939**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04274939v1>**

Submitted on 6 Jun 2020 (v1), last revised 8 Nov 2023 (v2)

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**  
Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**  
Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

---

**Présentée et soutenue par :**  
MARTIGNON Mélanie

**le :** mercredi 15 décembre 2010

**Titre :**  
CONSEQUENCES D'UN CONTROLE DE L'INGESTION SUR  
LA PHYSIOPATHOLOGIE DIGESTIVE ET LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE  
DU LAPIN EN CROISSANCE

---

**JURY**

I. BADIOLA, président du jury et rapporteur  
M.-C. MEUNIER-SALAUN, rapporteur  
T. GIDENNE, directeur de thèse  
I. GABRIEL, Membre

---

**Ecole doctorale :**  
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

**Unité de recherche :**  
UMR 1289 TANDEM (INRA), UAA (Anses, ex-AFSSA)

**Directeur(s) de Thèse :**  
T. GIDENNE  
C. BUREL

**Rapporteurs :**  
M.-C. MEUNIER-SALAUN  
I. BADIOLA



## REMERCIEMENTS

---

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR TANDEM (INRA Auzeville-Tolosane) d'une part et des Unités d'Alimentation Animale (AA, Anses) et d'Epidémiologie et Bien-être Avicole et Cunicole (EBEAC) (Laboratoire Ploufragan-Plouzané, Anses) d'autre part, et est issu d'un co-financement INRA-AFSSA (nouvellement Anses).

Dans un premier temps, je remercierai les personnes qui me font l'honneur de participer à ce jury :

M. Ignacio Badiola du département de microbiology du Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, IRTA Barcelone) qui a accepté la présidence de ce jury ainsi que le rôle de rapporteur.

Mme Marie-Christine Meunier-Salaün de l'unité Système d'Elevage, Nutrition Animale et Humaine (SENAH) de l'INRA de Rennes, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Mmes Irène Gabriel, de l'unité de Recherches Avicoles (URA) de l'INRA de Tours-Nouzilly.

Je remercie aussi Mme Séverine Boullier de l'unité Interactions Hôtes - Agents Pathogènes (IHAP) de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) et M. Dominique Licois de l'unité d'Infectiologie Animale et Santé Publique (IASP), INRA Tours-Nouzilly d'avoir accepté l'invitation à participer à ce jury.

Je remercie ensuite Christine Burel (co-directrice, AA, Anses) et Thierry Gidenne (directeur, UMR TANDEM, INRA) pour m'avoir fait confiance, encadrée, conseillée et soutenue tout au long des trois années, ainsi que pour s'être investis à mes côtés pour le bon déroulement de ce projet et enfin, pour tout ce qu'ils m'ont appris. Travailler à vos côtés a été un plaisir particulièrement enrichissant.

Je tiens aussi à remercier Sylvie Combes (UMR TANDEM, INRA), Maryse Guinebretière (EBEAC, Anses), Virginie Michel (EBEAC, Anses), Gilbert Postollec (AA, Anses) et Charlotte Valat (AA, Anses) pour leurs conseils avisés et leurs remarques constructives sur mon travail.

J'adresse également mes remerciements aux autres membres du comité de pilotage : Lucile Montagne (UMR SENAH, INRA St Gilles) et Diego Morgavi (URH, INRA Theix) pour avoir partagé leurs idées et favorisé la discussion et la réflexion autour de ce projet.

Je remercie également Xavier Fernandez et Gilles Salvat pour m'avoir accueillie au sein de leurs entités de recherche, respectivement UMR TANDEM et Laboratoire de Ploufragan-Plouzané de l'Anses, et pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements aux personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail par leur appui scientifique et technique. J'entends par là, Dominique Licois (UIASP, INRA Tours-Nouzilly) pour son aide lors de la mise en place du challenge infectieux. Mais aussi Didier Huonnic (UEBEAC, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Anses) pour son aide lors de l'étude comportementale. Les responsables des unités GVB et HQPAP (Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Anses), respectivement André Jestin et Gilles Salvat, pour m'avoir permis d'accéder à leurs locaux et matériel, et j'en profite pour remercier tout particulièrement Françoise Lalande (HQPAP, Anses) qui m'a enseigné avec patience et gentillesse les bases de bactériologie utiles à mon étude.

Je n'oublie pas de remercier pour leur investissement et les soins aux animaux lors de chacun de mes protocoles les équipes de Robert Maurice (SEAC, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Anses), de Michel Amelot (SEEPA, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Anses) et d'André Lapanouse (UMR TANDEM, INRA). Je remercie particulièrement Patrick Aymard (UMR TANDEM, INRA), Lionel Le Moal (SEEPA, Anses) et Florence Marie (SEAC, Anses) pour avoir accepté que je m'appuie sur leurs compétences techniques, pour s'être impliqués dans ce projet et pour leur patience.

Je remercie les équipes de recherche qui m'ont accueillie.

A Toulouse, l'ensemble du personnel de l'UMR TANDEM et principalement les agents du site de l'INRA, en plus des personnes précédemment citées : Carole Bannelier, Viviane Batailler, Laurent Cauquil, Laurence Fortun-Lamothe, Béatrice Gabinaud, Muriel Ségura et Véronique Tartié. Un soutien puissant, des conseils pertinents, toujours une présence à mes côtés.

Et à Ploufragan, les Unités AA, EBEAC, en plus des personnes précédemment remerciées : Eric Boilletot, Laurence Gordon, Elisabeth Repérant, Virginie Allain, Adeline Huneau, Sophie Le Bouquin-Leneveu, Rozenn Souillard, Amel Tactac et Jean-Yves Toux et Stéphanie Bougeard (UEBEP, Anses).

Je remercie Anne Jourden (Licence Professionnelle) pour son aide et son implication dans le projet d'étude comportementale.

Il est important pour moi de remercier aussi les doctorants que j'ai cotoyés et qui sont maintenant docteurs : Jean-Philippe M., Christine J., Mélanie G., Rory M., M. Kimsé et Yann W., merci pour nos discussions et pour m'avoir enrichie de vos expériences. Et les doctorants futurs docteurs, stagiaires ou personnes de passage dans mes unités qui ont partagé quelques moments de ma vie de doctorante : Julien A., Stéphanie A., Andras B., Helen B., Emilie C., Claire F., Jilalie G. Taous H., Lyvia I., Véronique M., Mickaël R., Carlos R.M , Laetitia T., Pauline T., Uyen T. et Asma Z.

Je remercie aussi Flavie, pour l'oreille bienveillante qu'elle a su me prêter, pour nos rires et surtout pour son amitié. Céline pour sa présence discrète mais fiable à mes côtés depuis plusieurs années maintenant, ainsi que Kristell et Aurore, pour nos discussions passionnées sur un air d'Andro.

Pour finir, je remercie ma famille, principalement mes parents pour leur soutien inconditionnel, leur présence discrète dans ma vie et aussi pour avoir fait de moi ce que je suis, quoi que vous en pensiez, je vous assure que si je suis arrivée là, c'est grâce à vous !



## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SE RAPPORTANT A LA THESE

### PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE DE RANG A

- M.H. MARTIGNON, D. LICOIS, C. BUREL, E. REPERANT, G. POSTOLLEC, T. GIDENNE, C. VALAT. **Digestive response of young rabbits to an experimental inoculation of colibacillosis with Escherichia coli O128:C6, according to the feed intake level.** In prep. Veterinary Microbiology
- M.H. MARTIGNON, M. GUINEBRETIERE, G. POSTOLLEC, D. HUONNIC, E. BOILLETOT, G. POSTOLLEC, V. MICHEL. **The effect of feed intake restriction on the growth of digestive and lymphoid organs and on the feeding behaviour of fattening rabbits** In prep. Animal
- M.H. MARTIGNON, S. COMBES, T. GIDENNE. **Control of feeding behaviour in the young rabbit: impact of restriction and frequency of feed delivery on digestive physiology, health and growth.** In prep. Journal of Animal Science
- M.H. MARTIGNON, S. COMBES, T. GIDENNE. 2010. **Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 156(1), 156-162.

### COMMUNICATIONS DANS DES CONGRES ET LORS DE JOURNEES D'ANIMATION

#### Communications orales

- M. MARTIGNON. **Efficacité d'une stratégie d'alimentation : la restriction alimentaire, sur la santé digestive des lapins en engraissement.** Journées Doctorants et Post-doctorants de l'AFSSA, 22 janvier 2010, Maison-Alfort, France.



- M.H. MARTIGNON, S. COMBES, T. GIDENNE. **Rôle du mode de distribution de l'aliment dans une stratégie de rationnement : conséquences sur le profil d'ingestion, la croissance et la santé digestive du lapin** . 13<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, 17-18 novembre 2009, Le Mans, France, 39-42.

#### Posters

- M.H. MARTIGNON, E. REPERANT, C. VALAT. **Digestive response of young rabbits to an experimental reproduction of colibacillosis according to two feeding strategies**. The Prato Conference on the Pathogenesis of Bacterial Diseases of Animals, 6-9 October 2010, Monash Prato Campus, Prato, Italy
- M. MARTIGNON, S. COMBES, T.GIDENNE. **Effect of age and feed intake level on structure and diversity of caecal bacterial community in the young rabbit** . 6<sup>th</sup> INRA-RRI symposium Gut Microbiome, 18-20 June 2008, Clermont-Ferrand, France, pp.40

## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>                                                                                                           | <b>3</b>  |
| <b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SE RAPPORTANT A LA THESE .....</b>                                                                 | <b>7</b>  |
| <b>TABLE DES MATIERES .....</b>                                                                                                      | <b>9</b>  |
| <b>Liste des tableaux .....</b>                                                                                                      | <b>13</b> |
| <b>Liste des figures .....</b>                                                                                                       | <b>15</b> |
| <b>Liste des abréviations .....</b>                                                                                                  | <b>17</b> |
| <b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>                                                                                                   | <b>19</b> |
| <b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>                                                                                                   | <b>23</b> |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                                                                            | <b>25</b> |
| <b>CHAPITRE 1 – L’ELEVAGE DU LAPIN : ALIMENTATION, CROISSANCE ET COMPORTEMENT ALIMENTAIRE .....</b>                                  | <b>27</b> |
| I. Le sevrage : du lait maternel à l'aliment solide végétal .....                                                                    | 27        |
| I.A. De la naissance au sevrage, une alimentation lactée.....                                                                        | 27        |
| I.B. ...progressivement supplantée par une alimentation solide.....                                                                  | 28        |
| II. Apres le sevrage, une alimentation exclusivement solide .....                                                                    | 29        |
| II.A. ...distribuée à volonté aux animaux en engraissement .....                                                                     | 29        |
| III. Performances de croissance du lapin d'élevage .....                                                                             | 30        |
| IV. L'excretion du lapin, rythme et particularités .....                                                                             | 32        |
| IV.A. Excrétion de fèces dures, rythme parallèle à l'ingestion des granulés.....                                                     | 32        |
| IV.B. Excrétion de cécotrophes, une activité diurne .....                                                                            | 32        |
| <b>CHAPITRE 2 – DES ORGANES DIGESTIFS SPECIALISES POUR UNE FONCTION DE DIGESTION EFFICACE CHEZ LE LAPIN .....</b>                    | <b>35</b> |
| I. APPAREIL DIGESTIF ET FONCTION DE DIGESTION .....                                                                                  | 35        |
| I.A. L'appareil digestif du lapin .....                                                                                              | 35        |
| I.B. De la préhension des aliments à la déglutition du bol alimentaire.....                                                          | 35        |
| I.C. L'estomac, début de digestion proteique et lipidique .....                                                                      | 35        |
| I.D. L'intestin grêle, la digestion enzymatique et l'absorption des protides, lipides et glucides.....                               | 37        |
| I.D.1. Digestion des nutriments .....                                                                                                | 37        |
| I.D.2. La neutralisation du chyme gastrique, le pancréas impliqué.....                                                               | 38        |
| I.D.3. L'absorption des nutriments digérés, facilitée par une surface d'échange importante .....                                     | 39        |
| I.E. Le cæcum, lieu de digestion microbienne des glucides parietaux .....                                                            | 41        |
| I.E.1. Les micro-organismes du cæcum.....                                                                                            | 41        |
| I.E.2. Les apports nutritionnels pour l'animal, issus des digestions microbiennes .....                                              | 42        |
| I.F. Le côlon, élaboration de crottes dures et molles .....                                                                          | 43        |
| <b>CHAPITRE 3 – SANTE DIGESTIVE DU LAPIN ET RELATION AVEC L'ALIMENTATION : CAS PARTICULIER DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE .....</b>   | <b>45</b> |
| I. troubles digestifs du lapin en engraissement.....                                                                                 | 45        |
| I.A. Principale cause de mortalité du lapin en croissance .....                                                                      | 45        |
| I.B. Quelques pathologies digestives des lapins en engraissement.....                                                                | 45        |
| I.B.1. Maladies digestives d'étiologie connue .....                                                                                  | 45        |
| I.B.2. Maladie d'étiologie indéterminée : l'entéropathie épizootique du lapin ou EEL .....                                           | 46        |
| II. Influence de l'alimentation sur l'état sanitaire du lapin en croissance .....                                                    | 47        |
| II.A. Influence de la composition de l'aliment sur l'écosystème digestif et la santé du lapin .....                                  | 47        |
| II.A.1. Teneur en énergie digestible.....                                                                                            | 47        |
| II.A.2. Protéines.....                                                                                                               | 47        |
| II.A.3. Fibres.....                                                                                                                  | 48        |
| II.B. Influence de la quantité d'aliment distribuée et du mode de distribution sur l'état sanitaire des exploitations cunicoles..... | 49        |
| II.B.1. La restriction alimentaire limite les troubles digestifs .....                                                               | 49        |
| II.B.2. Le nombre de distributions quotidiennes ne semble pas influencer l'état sanitaire des lapins en croissance .....             | 50        |
| <b>CHAPITRE 4 - EFFET DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LES PERFORMANCES ET LE BIEN-ETRE DES LAPINS D'ELEVAGE .....</b>              | <b>51</b> |
| I. Restriction alimentaire et reproduction.....                                                                                      | 51        |
| II. Qualité de la viande produite par les lapins restreints .....                                                                    | 51        |

|                                                                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III. Performances zootechniques modulées par la restriction alimentaire .....                                                                                                                                     | 52        |
| III.A. La croissance est altérée par la mise en place d'une restriction alimentaire .....                                                                                                                         | 52        |
| III.A.1. Performances de croissance .....                                                                                                                                                                         | 52        |
| III.B. L'efficacité alimentaire semble être améliorée par la distribution contrôlée de l'aliment .....                                                                                                            | 53        |
| IV. Digestibilité des nutriments favorisée par la restriction alimentaire .....                                                                                                                                   | 54        |
| V. Comportement, bien-être et restriction alimentaire .....                                                                                                                                                       | 55        |
| <b>OBJECTIFS .....</b>                                                                                                                                                                                            | <b>57</b> |
| <b>ETUDE EXPERIMENTALE.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>61</b> |
| <b>PARTIE 1 –INFLUENCE D 'UNE LIMITATION DE L 'INGESTION SUR QUELQUES<br/>PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DU JEUNE LAPIN. ....</b>                                                                                      | <b>63</b> |
| <b>PHYSIOLOGIE DIGESTIVE ET COMMUNAUTE BACTERIENNE INTESTINALE DU JEUNE LAPIN<br/>(ORYCTOLAGUS CUNICULUS) : EFFETS DE L'AGE ET D'UNE LIMITATION A COURT TERME DE<br/>L'INGESTION .....</b>                        | <b>65</b> |
| <b>DIGESTIVE PHYSIOLOGY AND HIN DGUT BACTERIAL COMMUNITY OF THE YOUNG RABBIT<br/>(ORYCTOLAGUS CUNICULUS): EFFECTS OF AGE AND SHORT-TERM INTAKE LIMITATION .....</b>                                               | <b>67</b> |
| I. Abstract.....                                                                                                                                                                                                  | 69        |
| II. Introduction .....                                                                                                                                                                                            | 71        |
| III. Material and methods.....                                                                                                                                                                                    | 71        |
| III.A. Experimental design and animals .....                                                                                                                                                                      | 71        |
| III.B. Chemical analyses .....                                                                                                                                                                                    | 72        |
| III.C. Sampling procedure, physic-chemical parameters of cæcum and stomach .....                                                                                                                                  | 73        |
| III.D. Caecal fermentative activity .....                                                                                                                                                                         | 73        |
| III.E. Physiologic parameters .....                                                                                                                                                                               | 74        |
| III.E.1. Maltase activity .....                                                                                                                                                                                   | 74        |
| III.E.2. Histometric analysis .....                                                                                                                                                                               | 74        |
| III.F. Analysis of caecal bacterial community.....                                                                                                                                                                | 74        |
| III.F.1. Real-time PCR assay conditions.....                                                                                                                                                                      | 74        |
| III.F.2. Amplification of the V3 region of the 16S rRNA gene and CE-SSCP procedure .....                                                                                                                          | 75        |
| III.F.3. Diversity index and structure of communities .....                                                                                                                                                       | 75        |
| III.G. Statistical analysis .....                                                                                                                                                                                 | 76        |
| IV. Results.....                                                                                                                                                                                                  | 76        |
| IV.A. Feed intake pattern, growth and digestive health of growing rabbits .....                                                                                                                                   | 76        |
| IV.B. Gastric and ileal digestive parameters .....                                                                                                                                                                | 79        |
| IV.C. Caecal biotote: pH, Eh, dry matter, VFA, NH <sub>3</sub> -N .....                                                                                                                                           | 79        |
| IV.D. Caecal bacterial community: bacterial quantity and community structure and diversity .....                                                                                                                  | 80        |
| V. Discussion .....                                                                                                                                                                                               | 82        |
| V.A. Feed intake pattern, growth and digestive health of growing rabbits .....                                                                                                                                    | 82        |
| V.B. Maturation of the gut .....                                                                                                                                                                                  | 82        |
| V.C. Impact of a short-term feed intake limitation on the post-weaning digestive physiology .....                                                                                                                 | 83        |
| V.C.1. Short-term feed intake restriction and small intestine physiology .....                                                                                                                                    | 83        |
| V.C.2. Short-term feed intake restriction and caecal ecosystem.....                                                                                                                                               | 84        |
| VI. Conclusion .....                                                                                                                                                                                              | 85        |
| VII. Acknowledgements .....                                                                                                                                                                                       | 85        |
| VIII. References.....                                                                                                                                                                                             | 85        |
| <b>PARTIE 2 –L'EFFICACITE DE LA RE STRICTION ALIMENTAIRE CONTRE L ES TROUBLE S<br/>DIGESTIFS PROVIENT-ELLE D'UN EFFET "QUANTITATIF" (INGESTION REDUITE), OU D'UN<br/>EFFET DU JEUNE INDUIT ? .....</b>            | <b>91</b> |
| <b>CONTROLE DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DU JEUNE L APIN : INFL UENCE DE L A<br/>RESTRICTION ET DE LA FREQUENCE DE DISTRIBUTION DE L 'ALIMENT SUR LA<br/>PHYSIOLOGY DIGESTIVE, LA SANTE ET LA CROISSANCE .....</b> | <b>93</b> |
| <b>CONTROL OF FEEDING BEHAVIOUR IN THE YOUNG RABBIT: IMPACT OF RESTRICTION AND<br/>FREQUENCY OF FEED DELIVERY ON DIGESTIVE PHYSIOLOGY, HEALTH AND GROWTH .....</b>                                                | <b>95</b> |
| I. Abstract.....                                                                                                                                                                                                  | 97        |
| II. Introduction .....                                                                                                                                                                                            | 99        |
| III. Materials and methods .....                                                                                                                                                                                  | 99        |
| III.A. Experimental designs and animals .....                                                                                                                                                                     | 99        |
| III.B. Intake level, growth and health status (trial 1).....                                                                                                                                                      | 101       |
| III.C. Feed intake and faecal excretion patterns (trial 2) .....                                                                                                                                                  | 101       |
| III.D. Measurements of growth, feed intake, digestibility and ratio hard faeces:soft faeces (trial 3) .....                                                                                                       | 101       |

|                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| III.E. Chemical analyses of feed and hard faeces .....                                           | 101        |
| III.F. Sampling procedure, physicochemical parameters of caecum and stomach (trial 3) .....      | 102        |
| III.G. Fibrolytic activity of caecal bacteria .....                                              | 102        |
| III.H. Caecal fermentative activity .....                                                        | 103        |
| III.I. Analysis of caecal bacterial community.....                                               | 103        |
| III.J. Statistical analysis.....                                                                 | 104        |
| IV. Results.....                                                                                 | 105        |
| IV.A. Growth performances and digestive health .....                                             | 105        |
| IV.B. Feed intake pattern .....                                                                  | 106        |
| IV.C. Hard faeces excretion pattern and soft faeces production.....                              | 107        |
| IV.D. Whole digestive tract efficiency.....                                                      | 108        |
| IV.E. Gastric digestive parameters and caecal biotope .....                                      | 109        |
| IV.F. Caecal bacterial community: activity, structure and diversity .....                        | 109        |
| V. Discussion .....                                                                              | 111        |
| VI. Acknowledgements.....                                                                        | 114        |
| VII. Literature cited.....                                                                       | 114        |
| <b>EFFET DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LA CROISSANCE D'ORGANES DIGESTIFS ET</b>              |            |
| <b>LYMPHOÏDES ET SUR LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DES LAPINS EN ENGRAISSEMENT .....</b>           | <b>119</b> |
| <b>THE EFFECT OF FEED INTAKE RESTRICTION ON THE GROWTH OF DIGESTIVE AND</b>                      |            |
| <b>LYMPHOID ORGANS AND ON THE FEEDING BEHAVIOUR OF FATTENING RABBITS .....</b>                   | <b>121</b> |
| I. Abstract.....                                                                                 | 123        |
| II. Introduction .....                                                                           | 125        |
| III. Material and methods.....                                                                   | 126        |
| III.A. Experimental design and animals .....                                                     | 126        |
| III.B. Feeding and others activities, behavioural traits .....                                   | 128        |
| III.C. Digestive tract and lymphoid tissues growth .....                                         | 128        |
| III.D. Feed intake level and growth.....                                                         | 129        |
| III.E. Lesions and health status .....                                                           | 129        |
| III.F. Statistical analyses .....                                                                | 129        |
| IV. Results.....                                                                                 | 130        |
| IV.A. Feeding behaviour.....                                                                     | 130        |
| IV.B. Resting behaviour.....                                                                     | 132        |
| IV.C. Digestive tract and lymphoid tissues growth.....                                           | 132        |
| IV.D. Feed intake and growth .....                                                               | 133        |
| IV.E. Lesions and health status .....                                                            | 134        |
| V. Discussion .....                                                                              | 134        |
| V.A. Feed intake restriction and behaviour.....                                                  | 134        |
| V.B. Feed intake restriction and maturation of the gut and some lymphoid organs .....            | 135        |
| V.C. Feed intake, growth, feed efficiency and health status of restricted fattening rabbits..... | 136        |
| VI. Conclusion .....                                                                             | 137        |
| VII. Acknowledgments .....                                                                       | 138        |
| VIII. References .....                                                                           | 138        |
| <b>PARTIE 3 – LA RESTRICTION ALIMENTAIRE PEUT ELLE RENFORCER LA RESISTANCE DU</b>                |            |
| <b>LAPIN A UN PATHOGENE DIGESTIF ? .....</b>                                                     | <b>141</b> |
| <b>REPONSE DIGESTIVE DE S JEUNES LAPINS A UN ENOCULATION EXPERIMENTALE DE</b>                    |            |
| <b>COLIBACILLOSE AVEC ESCHERICHIA COLI O128:C6, SELON LE NIVEAU D'INGESTION .....</b>            | <b>143</b> |
| <b>DIGESTIVE RESPONSE OF YOUNG RABBITS TO AN EXPERIMENTAL INOCULATION OF</b>                     |            |
| <b>COLIBACILLOSIS WITH ESCHERICHIA COLI O128:C6, ACCORDING TO THE FEED INTAKE</b>                |            |
| <b>LEVEL .....</b>                                                                               | <b>145</b> |
| I. Abstract.....                                                                                 | 147        |
| II. Introduction .....                                                                           | 149        |
| III. Material and methods.....                                                                   | 150        |
| III.A. Experimental design and animals .....                                                     | 150        |
| III.B. Intake level, growth and sanitary status .....                                            | 150        |
| III.C. Sampling procedure in ileum and caecum and caecal pH measurement.....                     | 151        |
| III.D. Histometric analysis .....                                                                | 151        |
| III.E. Serum haptoglobin measurement.....                                                        | 151        |
| III.F. Culture of Gram- bacillus .....                                                           | 152        |
| III.G. Analysis of caecal and ileal bacterial communities by CE-SSCP.....                        | 152        |
| III.G.1. DNA extraction.....                                                                     | 152        |
| III.G.2. PCR for all bacteria.....                                                               | 152        |
| III.G.3. Data analysis: Diversity index and structure of communities .....                       | 153        |
| III.H. Statistical analysis .....                                                                | 153        |

|                                                                                                                                                        |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| IV. Results.....                                                                                                                                       | 154        |
| IV.A. Digestive health of growing rabbits .....                                                                                                        | 154        |
| IV.B. Feed intake pattern and growth of young rabbits.....                                                                                             | 154        |
| IV.C. Bacteriological analysis.....                                                                                                                    | 157        |
| IV.D. Bacterial communities structure diversity and variability .....                                                                                  | 157        |
| IV.E. Caecal pH measurements.....                                                                                                                      | 158        |
| IV.F. Ileum histometric measurements .....                                                                                                             | 159        |
| IV.G. Haptoglobin measurements.....                                                                                                                    | 159        |
| V. Discussion .....                                                                                                                                    | 159        |
| VI. Conclusion .....                                                                                                                                   | 161        |
| VII. Acknowledgements .....                                                                                                                            | 161        |
| VIII. References .....                                                                                                                                 | 161        |
| <b>DISCUSSION GENERALE .....</b>                                                                                                                       | <b>165</b> |
| I. De nombreux paramètres ont été explorés en relation avec la restriction alimentaire .....                                                           | 167        |
| I.A. évolution de la croissance et de l'efficacité digestive en rapport avec la restriction alimentaire .....                                          | 167        |
| I.B. Comportement et bien-être du lapin soumis à une restriction alimentaire.....                                                                      | 169        |
| I.C. Impact d'une ingestion restreinte sur quelques fonctions digestives, inflammatoires et immunitaires.....                                          | 170        |
| II. Analyse critique de LA méthodologie.....                                                                                                           | 172        |
| II.A. Difficultés à atteindre un niveau précis de contrôle de l'ingestion .....                                                                        | 172        |
| II.B. Impact des conditions expérimentales pour redémontrer l'effet favorable d'une ingestion restreinte sur la fréquence des troubles digestifs ..... | 172        |
| II.C. Un suivi difficile de la rémission des animaux suite à un épisode de colibacillose.....                                                          | 173        |
| II.D. Un nécessaire compromis entre les contraintes expérimentales et les questions scientifiques à résoudre .....                                     | 173        |
| II.E. Quelques paramètres complémentaires seraient à étudier .....                                                                                     | 173        |
| III. Quelques pistes pouvant expliquer l'efficacité de la régulation du niveau d'ingestion pour améliorer l'état sanitaire.....                        | 174        |
| III.A. Une efficacité qui ne serait pas liée à la période de jeûne induite .....                                                                       | 174        |
| III.B. Une stabilisation de la communauté bactérienne après une perturbation.....                                                                      | 174        |
| III.C. Induire la faim stimulerait certaines hormones.....                                                                                             | 176        |
| III.D. Une alimentation couvrant les besoins des animaux sans excès.....                                                                               | 177        |
| III.E. Cas de la relation troubles digestifs et restriction alimentaire dans d'autres filières de production .....                                     | 178        |
| <b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES .....</b>                                                                                                            | <b>179</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>                                                                                                                | <b>183</b> |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                                                  | <b>193</b> |
| <b>RESUME .....</b>                                                                                                                                    | <b>194</b> |

## LISTE DES TABLEAUX

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tableau 1:</b> Taux d'incorporation habituels des différentes matières premières en alimentation cunicole. ....                                                                                                                                              | 29  |
| <b>Tableau 2 :</b> Ingestion, croissance et efficacité alimentaire du lapin domestique sevré.....                                                                                                                                                               | 31  |
| <b>Tableau 3:</b> Composition des crottes dures et des cæcotrophes chez le lapin.....                                                                                                                                                                           | 44  |
| <b>Tableau 4 :</b> Effet d'une restriction alimentaire sur l'état sanitaire des lapins en croissance ..                                                                                                                                                         | 49  |
| <b>Tableau 5:</b> Croissance d'animaux lors d'essais portant sur le rationnement quantitatif.....                                                                                                                                                               | 53  |
| <b>Tableau 6:</b> Comparaison de l'efficacité alimentaire lors d'essais menés sur la restriction alimentaire.....                                                                                                                                               | 54  |
| <b>Tableau 7:</b> Evolution du coefficient d'utilisation digestive des nutriments au cours d'essais menés sur la restriction.....                                                                                                                               | 55  |
| <b>Tableau 8 :</b> Présentation rapide des 4 expériences mises en place et des principales mesures réalisées. ....                                                                                                                                              | 60  |
| <b>Tableau 9 :</b> Ingredients and chemical composition of the experimental diet.....                                                                                                                                                                           | 72  |
| <b>Tableau 10 :</b> Growth and intake pattern of the young rabbits, according to the intake level .                                                                                                                                                             | 77  |
| <b>Tableau 11 :</b> Effect of intake level on mortality and morbidity from to digestive troubles in the young rabbit.....                                                                                                                                       | 77  |
| <b>Tableau 12 :</b> Stomach pH according to age and intake level in the young rabbit.....                                                                                                                                                                       | 78  |
| <b>Tableau 13 :</b> Maltase activity and histometric parameters of the ileal mucosa according to age and intake level of the young rabbit .....                                                                                                                 | 78  |
| <b>Tableau 14 :</b> Caecal physico-chemical and fermentation parameters, according to age and intake level, in the young rabbit .....                                                                                                                           | 78  |
| <b>Tableau 15 :</b> Caecal bacteria community, according to age and intake level, in the young rabbit.....                                                                                                                                                      | 79  |
| <b>Tableau 16 :</b> Ingredients and chemical composition of the experimental diet.....                                                                                                                                                                          | 100 |
| <b>Tableau 17 :</b> Fattening performances of weanling rabbits, according to the intake level (AL, ad libitum or R, -25 % restricted intake) and the feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 1) .....                                             | 105 |
| <b>Tableau 18 :</b> Effect of the intake level (AL, ad libitum or R, -25 % restricted intake) and of the feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) on digestive health of the growing rabbits (Trial 1) .....                                              | 106 |
| <b>Tableau 19 :</b> Apparent fecal nutrient digestibility and caecotrophy production in the growing rabbits, according to feed intake level (AL, ad libitum or R, -25% restricted intake) and to feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 3) ..... | 108 |
| <b>Tableau 20 :</b> Physico-chemical parameters of stomach and caecum in 50 days old rabbits according to feed intake level (AL, ad libitum or R, -25 % restricted intake ) and to feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 3) .....               | 109 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tableau 21</b> ; Caecal bacterial community activity and diversity in 50 days old rabbits, according to feed intake level (AL, ad libitum or R, -25 % restricted intake) and to feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 3) .....                          | 110 |
| <b>Tableau 22</b> : Ingredients of the experimental diet.....                                                                                                                                                                                                              | 127 |
| <b>Tableau 23</b> : Characteristics of drinks and meals considering both periods of the study and according to feed intake level (AL, ad libitum vs. R, restricted) and to days part (from 0830 h to 2130 h: 1st phase and from 2130 h to 0830 h: 2nd phase).....          | 131 |
| <b>Tableau 24</b> : Digestive tract and lymphoid tissues growth according to the age (49 or 72 days old) and to the intake level (AL, ad libitum vs. R, restricted).....                                                                                                   | 133 |
| <b>Tableau 25</b> : Growth and intake pattern of the young rabbits, according to the intake level                                                                                                                                                                          | 134 |
| <b>Tableau 26</b> : Ingredients of the experimental diet.....                                                                                                                                                                                                              | 150 |
| <b>Tableau 27</b> : Effects of infection (control, C vs. infected, I) and intake level (ad libitum, 100 vs. restricted, 75) on morbidity <sup>1</sup> in the young rabbit .....                                                                                            | 155 |
| <b>Tableau 28</b> : Growth and intake pattern of the young rabbit according to infection (control, C vs. infected, I) and intake level (ad libitum, 100 vs. restricted, 75) .....                                                                                          | 155 |
| <b>Tableau 29</b> : Effects of infection (control, C vs. infected, I) and intake level (ad libitum, 100 vs. restricted, 75) on caecal and ileal bacterial diversity <sup>3</sup> .....                                                                                     | 156 |
| <b>Tableau 30</b> : Effects of infection (control, C vs. infected, I) on ileal and caecal bacterial community structure.....                                                                                                                                               | 156 |
| <b>Tableau 31</b> : Effects of infection (control, C vs. infected, I) and intake level (ad libitum, 100 vs. restricted, 75) on inflammatory and on few parameters of digestive organs: ileal mucosa histometric parameters, caecal pH .....                                | 158 |
| <b>Tableau 32</b> : Récapitulatif des modifications observées lors des expériences de ce travail de thèse, chez des lapins soumis tout d'abord à une restriction alimentaire puis à une alimentation ad libitum, comparés à des lapins nourris uniquement ad libitum. .... | 168 |
| <b>Tableau 33</b> : Effet de la restriction alimentaire sur la croissance de certains organes lymphoïdes. ....                                                                                                                                                             | 171 |
| <b>Tableau 34</b> : Effet de la restriction alimentaire sur les paramètres de physiologie digestive étudiés.....                                                                                                                                                           | 171 |

## LISTE DES FIGURES

---

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| <b>Figure 1:</b> Lapereaux âgés de 3 jours, dans le nid. ....                                                                                                                                                                                                                                                    | 27   |
| <b>Figure 2:</b> Evolution de la composition en nutriments de l'alimentation des lapereaux, entre la naissance et le sevrage.....                                                                                                                                                                                | 28   |
| <b>Figure 3:</b> Evolution de l'ingestion de lait, d'eau et d'aliment solide chez le lapereau. ....                                                                                                                                                                                                              | 28   |
| <b>Figure 4:</b> Evolution de la consommation volontaire d'aliment solide par des lapins âgés de 6 semaines, au cours d'un nyctémère.....                                                                                                                                                                        | 30   |
| <b>Figure 5 :</b> Jeunes lapins sevrés, hébergés en cages collectives. ....                                                                                                                                                                                                                                      | 30   |
| <b>Figure 6 :</b> Courbes d'ingestion et de croissance de lapins domestiques nourris à volonté avec un aliment granulé, depuis le sevrage (28 jours d'âge) jusqu'à l'âge adulte. ....                                                                                                                            | 31   |
| <b>Figure 7:</b> Début de la période de cæcotrophie au cours d'un nyctémère. Mesures moyennées sur 20 jours pour 42 animaux, dont 27 monophasiques (une période de cæcotrophie en 24h) et 15 animaux pratiquant deux périodes de cæcotrophie en 24h (diphasiques).....                                           | 33   |
| <b>Figure 8:</b> Représentation des différents segments digestifs du lapin en croissance, caractéristiques et fonction digestive. ....                                                                                                                                                                           | 34   |
| <b>Figure 9:</b> Face viscérale et muqueuse gastrique de l'estomac du lapin. ....                                                                                                                                                                                                                                | 36   |
| <b>Figure 10:</b> Systèmes d'amplification de la surface de la muqueuse intestinale.....                                                                                                                                                                                                                         | 39   |
| <b>Figure 11:</b> Conformation externe du cæcum de lapin.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 41   |
| <b>Figure 12 :</b> Influence d'une déficience en fibres de l'aliment (moins de 8-11 g ADF/kg PV/jour), sur les paramètres de la biocénose cæcale. ....                                                                                                                                                           | 48   |
| <b>Figure 13:</b> Schéma du tube digestif d'un lapin synthétisant l'ensemble des paramètres fonctionnels étudiés au cours du projet de thèse, en fonction de leur nature. ....                                                                                                                                   | 58 - |
| <b>Figure 14 :</b> Effect of the intake level on the bacterial community structure approached by a two-dimensional nMDS plot (stress = 0.183) of the 48 CE-SSCP profiles.....                                                                                                                                    | 80   |
| <b>Figure 15 :</b> Effect of the age on the bacterial community structure approached by a two-dimensional nMDS plot (stress = 0.183) of the 48 CE-SSCP profiles. ....                                                                                                                                            | 81   |
| <b>Figure 16 :</b> Between and within group variability of the CE-SSCP profiles according to age (mean ± standard deviation; n=12 rabbits for the 28d. group and n=18 for the 36d and 52d groups).....                                                                                                           | 81   |
| <b>Figure 17 :</b> Feed intake patterns at 36d (figure A) and 46d (B) old, and faecal excretion patterns (hard faeces) at 37d (figure C) and 47d (figure D) old, according to the intake level (AL, ad libitum or R, -25 % restricted intake) and the feed delivery frequency (1 or 13 per day). (Trial 2) ..... | 107  |
| <b>Figure 18 :</b> Effect of the feed intake level (AL, ad libitum or R, -25 % restricted intake) and of the feed delivery frequency (1 or 13 per day) on the bacterial community structure approached by a two-dimensional nMDS plot of the 44 CE-SSCP profiles (Trial 3) .....                                 | 111  |
| <b>Figure 19 :</b> Average number of rabbits eating (A-) and resting (B-) over 24 hours (lightening period □ and darkness period ■) during restriction period for restricted (R) and ad libitum fed (AL) rabbits.....                                                                                            | 130  |



|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figure 20</b> : Average number of rabbits eating (A-) and resting (B-) over 24 hours (lightening period □ and darkness period ■) once rabbits were fed freely for restricted rabbits just after ad libitum feed supply (Ra), 2 days after ad libitum feed supply (Rb) and for ad libitum rabbits (AL).....                                                                              | 132 |
| <b>Figure 21</b> : Evolution of the concentration of E. coli in caecal content (n = 5/day/group) and feces (n = 5/day/group) throughout the experiment, according to infection (control, C vs. infected, I) and intake level (ad libitum, 100 vs. restricted, 75).....                                                                                                                     | 156 |
| <b>Figure 22</b> : Evolution nyctémérale (jour □ et nuit ■) du nombre moyen d'animaux observés à la mangeoire ( , à 44 jours d'âge), de la proportion d'aliment ingérée (—, à 46 jours d'âge) et de la proportion de fèces excrétée (- -, à 47 jours d'âge) par rapport aux quantités quotidiennes distribuées et excrétées chez les animaux nourris ad libitum (A) et restreints(B) ..... | 169 |
| <b>Figure 23</b> : Boîtes à moustaches représentant la variabilité intra groupe des structures des communautés bactériennes iléales des animaux infectés, alimentés à volonté (I100) ou restreints (I75), à J-2 (A-, P=0.088), à J5=pic d'infection (B-, P=0.164) et à J11 (C-, P=0.097).....                                                                                              | 175 |

## LISTE DES ABBREVIATIONS

---

|                                      |                                                   |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|
| ADF                                  | Acid detergent fiber                              |
| ADL                                  | Acid detergent lignin                             |
| ADN                                  | Acide désoxyribonucléique                         |
| AEB                                  | Activités enzymatiques bactériennes               |
| AGV                                  | Acides gras volatils                              |
| ARNr                                 | Acide ribonucléique ribosomal                     |
| cf.                                  | <i>Confer</i>                                     |
| CFU                                  | Colonie formant unité                             |
| €                                    | euro                                              |
| <i>E. coli</i>                       | <i>Escherichia coli</i>                           |
| EEL                                  | Entéropathie épizootique du lapin                 |
| Eh                                   | Potentiel rédox                                   |
| ERE                                  | Epizootic Rabbit Enteropathy                      |
| G:F                                  | Efficacité alimentaire (GMQ/ingestion)            |
| GALT                                 | Gut associated lymphoid tissue                    |
| GMQ                                  | Gain moyen quotidien                              |
| MS                                   | Matière sèche                                     |
| NDF                                  | Neutral detergent fiber                           |
| NH <sub>3</sub> ou N-NH <sub>3</sub> | Ammoniaque ou Azote ammoniacal                    |
| NS                                   | Non significatif                                  |
| PV                                   | Poids vif                                         |
| (R)EPEC                              | (Rabbit) enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> |
| UI                                   | Unité internationale                              |
| UTH                                  | Unité de Travail Humain                           |
| vs.                                  | <i>versus</i>                                     |



# INTRODUCTION GENERALE



Les 80 000 T de carcasses produites chaque année par la filière cunicole française, correspondent à environ 0,5% de la production carnée nationale (Office de l'élevage, 2008). Pourtant, la cuniculture française se situe au 4<sup>ème</sup> rang mondial, après la Chine (450 000 T), l'Italie (225 000 T) et l'Espagne (108 000 T), ces 4 pays représentant environ 72% de la production mondiale. Celle-ci, bien qu'en augmentation depuis 2000, ne dépasse pas 1% de la totalité de la production de viande mondiale, toutes espèces confondues (FAO, 2009). En France, la rationalisation de la filière entraîne une diminution du nombre d'élevages (4880 élevages recensés en 2000) et une augmentation de leur taille moyenne (environ 450 femelles reproductrices pour 1 UTH). La quasi-totalité des élevages est construite sur le modèle naisseur-engraisseur (Fortun-Lamothe et Gidenne, 2008).

En élevage cunicole, les troubles digestifs post-sevrage sont fréquents et représentent la première cause de mortalité en engraissement, avec au moins 49 % des cas autopsiés lors d'une étude menée de janvier 1994 à juin 1998 par Marlier et al (2003). Bien que les symptômes cliniques soient similaires (ballonnements, diarrhées...), l'étiologie de ces troubles est très diverse : colibacillose, entéropathie épizootique du lapin (EEL), hygiène, déséquilibres alimentaires, stress du sevrage, etc. Les affections digestives sont donc responsables d'importantes pertes économiques pour les élevages (mortalité, retard de croissance, coûts de la prophylaxie...), et la pratique d'antibiothérapie, curative ou préventive, est fréquente. Ainsi, le rapport AFSSA sur les ventes d'antibiotiques en élevage indique que la filière cunicole représenterait 18 % des ventes (Chevance et Moulin, 2009), alors qu'elle représente environ 0,5% de la production carnée nationale brute (Office de l'élevage, 2008).

Face à cette problématique, des recherches sont menées pour améliorer la maîtrise des pathologies digestives chez le lapin en croissance, tout en réduisant l'emploi de médicaments. Un meilleur ajustement des teneurs de l'aliment en fibres alimentaires (Gidenne, 2003) est l'une des alternatives non médicamenteuses pour contribuer à la maîtrise des entéropathies post-sevrage. Plus récemment, une autre alternative a été découverte et validée par deux études du groupe GEC (Gidenne et al., 2003; Gidenne et al., 2008). Elles ont permis de démontrer que les stratégies de contrôle de l'ingestion après le sevrage renforcent clairement la résistance du lapereau aux entéropathies. Une meilleure résistance de lapins alimentaires restreints, en engraissement, a aussi été mise en évidence lors d'une reproduction expérimentale de l'EEL (Boisot et al., 2003) et lors d'épisodes spontanés de cette maladie (Gidenne et al., 2009b). Selon une étude épidémiologique réalisée sur un réseau d'élevages français (Larour et al., 2004), la stratégie d'alimentation consistant à réduire la quantité d'aliment ingérée par rapport à l'ingéré volontaire, aussi appelée restriction

alimentaire, ressort comme étant une des pratiques d'élevage limitant l'apparition d'EEL. De plus, la restriction alimentaire permet d'améliorer l'efficacité digestive des animaux (Gidenne et al., 2009b) et leur indice de consommation, ce qui compense en partie le retard de croissance et permet de limiter les rejets. L'usage de stratégies de rationnement en engraissement est ainsi largement répandu, principalement sur la période allant du sevrage à 55 jours d'âge pour 80% des exploitations enquêtées et dans 63 % des exploitations jusqu'à l'enlèvement (Jentzer Azard, 2009). Même si la régulation se fait principalement par l'aliment, environ 15 % des éleveurs déclarent réguler l'ingestion d'aliment de leurs animaux en modulant l'accessibilité à l'eau de boisson. Mais cette pratique de rationnement alimentaire, et surtout si elle passe par une restriction de l'accès à l'eau, peut soulever des questions de bien-être animal. Pourtant, bien que parfois controversée du point de vue du bien-être des animaux, la restriction alimentaire est cohérente avec la volonté de notre société de réduire l'utilisation d'antibiotiques. En effet, les résultats de la campagne 2007-2008 du programme CUNIMIEUX (Jentzer Azard, 2009) ont montré que la mise en place d'une meilleure maîtrise sanitaire et la propagation des systèmes d'alimentation automatisés, facilitant le contrôle de l'ingestion, ont augmenté la proportion d'aliments non médicamenteux « blancs » utilisés (40% pour cette campagne vs. 37% et 32% pour les campagnes de 2005-2006 et 2003-2004 respectivement, maternité et engraissement confondus).

Actuellement, diverses stratégies de rationnement sont employées en élevage, mais nos connaissances sur les mécanismes physiologiques impliqués lors d'une restriction sont très limitées. De nombreuses hypothèses sont avancées pour expliquer la meilleure résistance du lapereau aux entéropathies. Ainsi, la modification du cycle circadien d'ingestion peut entraîner des modifications de l'écosystème cæcal, de l'activité enzymatique intestinale, de la morphologie de la muqueuse, de l'état inflammatoire général, des hormones liées à l'appétit et à la régulation de l'ingestion, etc. Aussi, une partie de nos travaux sera consacrée à l'étude de certaines de ces hypothèses. Par ailleurs, limiter l'ingestion d'un animal modifie drastiquement son comportement et pourrait conduire à dégrader son bien-être. Il convient donc en parallèle d'étudier le comportement alimentaire du lapereau en situation de restriction d'ingestion, ce qui correspondra à une autre partie de nos travaux. Le présent travail a donc pour objectif principal de contribuer à mieux connaître les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'amélioration de la santé digestive du jeune lapin, et aussi à mieux décrire les conséquences d'une limitation de l'ingestion sur le comportement alimentaire et le bien-être de l'animal.

**ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE**





## INTRODUCTION

---

Jusqu'en 2003, la grande majorité des élevages n'utilisaient aucune stratégie de limitation de l'ingestion en engraissement et les animaux étaient nourris à volonté. Face, à l'importance croissante des entéropathies post-sevrages, notamment due à l'apparition de l'EEL (fin 1996), l'usage d'aliments médicamenteux s'est accru. Outre l'augmentation des coûts de la prophylaxie, cette pratique dégrade l'image de la filière cunicole auprès des consommateurs. L'amélioration des bâtiments d'élevage, la pratique d'élevage en bande unique et l'optimisation de l'antibiothérapie préventive ont permis d'améliorer fortement l'hygiène de l'atelier cunicole de nos jours. En parallèle, depuis 2003, les stratégies de limitation de l'ingestion se sont largement répandues en France pour renforcer la résistance des lapereaux aux troubles digestifs, bien que l'on ne connaisse pas les mécanismes physiologiques impliqués. La régulation peut être réalisée en agissant sur l'aliment (près de la moitié des ateliers déclarant pratiquer la restriction alimentaire) quantitativement (contrôle de la quantité distribuée, contrôle du temps d'accès à l'aliment), ou qualitativement (variation de la teneur énergétique de l'aliment distribué), ou bien par une modulation de l'accessibilité de l'eau, puisque les consommations d'eau et d'aliment sont corrélées (Gidenne et Lebas, 2006).

Dans une première partie de cette étude bibliographique sera développée la relation nutrition – santé en élevage cunicole. Ensuite, le comportement alimentaire du lapin depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte sera présenté et relié aux phénomènes d'excrétion. Pour finir nous détaillerons ensemble le système digestif du lapin et son fonctionnement. Ainsi, nous pourrons nous appuyer sur ces connaissances pour prospecter plus avant les paramètres de physiologie digestive potentiellement influencés par la restriction alimentaire. Aussi, pour étudier les modalités de cette stratégie d'alimentation expliquant son efficacité et pour finir, nous nous concentrerons sur les modifications du comportement des lapins restreints, et leurs implications dans une éventuelle dégradation du bien-être des animaux.



## CHAPITRE 1 - L'ELEVAGE DU LAPIN : ALIMENTATION, CROISSANCE ET COMPORTEMENT ALIMENTAIRE

---

Au cours de sa croissance, le lapereau passe progressivement d'une alimentation lactée à une alimentation solide, formulée à base de végétaux. Cette évolution de l'ingestion induit une évolution de l'excrétion chez le lapereau, avec la mise en place de la cæcotrophie qui est caractéristique des *Lagomorphes*.

### I. LE SEVRAGE : DU LAIT MATERNEL A L'ALIMENT SOLIDE VEGETAL

#### I.A. DE LA NAISSANCE AU SEVRAGE, UNE ALIMENTATION LACTEE...

Dès la naissance, les lapereaux peuvent ingérer jusqu'à 25 % de leur poids en lait, soit 5 à 10g le jour de la naissance (Lincoln, 1974; Hudson et al., 1996; Coureaud et al., 2008). Tout au long de l'allaitement, les femelles domestiques réalisent en moyenne 1,12 ( $\pm 0.49$ ) allaitements par jour (Selzer, 2000), chacun durant moins de 4 minutes et ayant lieu en période nocturne (Hudson et al., 1996).



**Figure 1:** Lapereaux âgés de 3 jours, dans le nid.  
(source F. Marie)

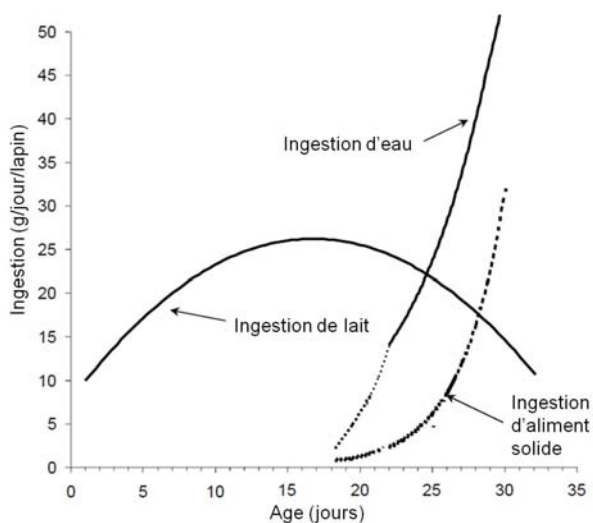
La première semaine de vie (Figure 1), la capacité sensori-motrice des lapereaux leur permet d'être en état d'éveil maximal pour la tétée (Hudson et Distel, 1982; Jilge, 1993; Bautista et al., 2003). A cet âge, les

lapereaux font preuve de compétition vis-à-vis de l'ingestion de lait. Ainsi, les lapereaux les plus gros à la naissance ont une croissance plus importante (Seitz, 1997). Jusqu'au sevrage, la hiérarchie est établie et reste fixe (Drummond et al., 2000).

Lors des deuxième et troisième semaines de vie, les lapereaux commencent à manger les pelotes fécales laissées dans le nid par la mère, et à grignoter les éléments du nid (Hudson et al., 1996), en plus de la consommation de lait qui diminue progressivement (Figure 3). Celle-ci est d'environ 30 g/j entre la fin de la deuxième semaine et le début de la troisième semaine. Au-delà de 25 jours d'âge des lapereaux, la production de lait de la mère décroît.

## I.B. ...PROGRESSIVEMENT SUPPLANTEE PAR UNE ALIMENTATION SOLIDE

Dès 16-18 jours d'âge, alors qu'ils commencent à quitter le nid et à accéder à la mangeoire maternelle, les lapins s'alimentent solidement, à raison de moins de 2 g/j d'aliment



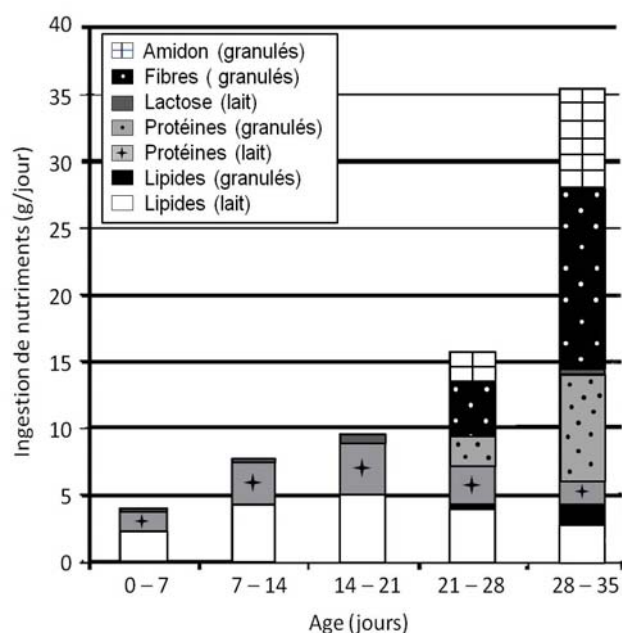
**Figure 3:** Evolution de l'ingestion de lait, d'eau et d'aliment solide chez le lapereau.

*D'après Gidenne et Lebas, 2005*

avant 20 jours. Vers 25 jours d'âge, la quantité d'aliment solide consommée augmente fortement, pour atteindre de 40 à 50 g/j au sevrage (Figure 3, Gidenne et Fortun-Lamothe, 2002). Aux alentours de la quatrième semaine d'âge, l'ingestion d'aliment solide et d'eau dépasse la consommation de lait maternel (Figure 3, (Scapinello et al., 1999; Gidenne et Lebas, 2006). Le début de l'alimentation solide est fonction de la taille de la portée et de la production laitière maternelle (Fortun-

Lamothe et Gidenne, 2000). Les caractéristiques de l'aliment, telles que la présentation, la taille et la qualité des granulés peuvent aussi intervenir (Maertens et Villamide, 1998).

Cette transition, d'une alimentation lactée à une alimentation solide, a lieu progressivement. En parallèle, les besoins nutritionnels du lapereau évoluent ainsi que ses capacités digestives. Ainsi, d'une alimentation principalement protéique et lipidique (chacun de 12 à 13 %) (Maertens et al., 2006), ils passent à une alimentation principalement glucidique et protéique (seulement 2 à 5% de lipides dans les granulés) (Figure 2, Coureaud et al., 2008).



**Figure 2:** Evolution de la composition en nutriments de l'alimentation des lapereaux, entre la naissance et le sevrage.

*D'après Gidenne et Lebas, 2005*

## II. APRES LE SEVRAGE, UNE ALIMENTATION EXCLUSIVEMENT SOLIDE

### II.A. ...DISTRIBUEE A VOLONTE AUX ANIMAUX EN ENGRAISSEMENT

L'aliment sec est présenté sous forme de granulés. Les matières premières le composant, et leur taux d'incorporation varient selon l'âge et l'état physiologique des animaux. Les taux habituellement incorporés dans l'aliment des lapins figurent dans le tableau 1.

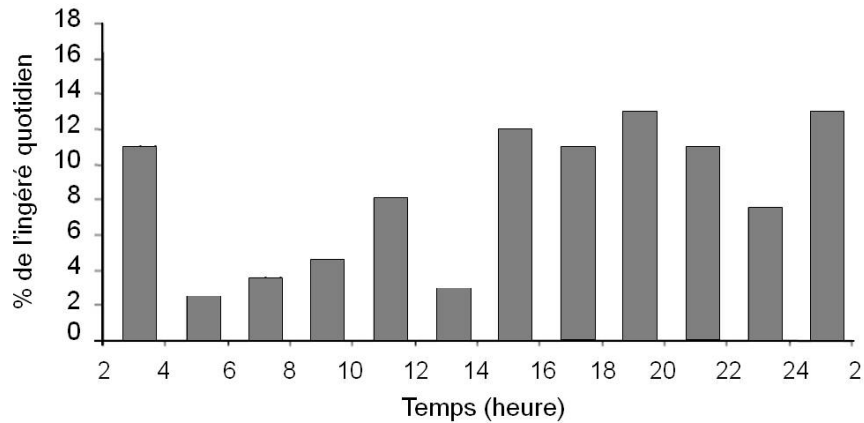
**Tableau 1:** Taux d'incorporation habituels des différentes matières premières en alimentation cunicole.

| Matières premières             | Taux (%) |
|--------------------------------|----------|
| Luzerne déshydratée            | 25-35    |
| Céréales                       | 15-25    |
| Sous-produits de céréales      | 15-25    |
| Concentrés protéiques          | 15-20    |
| Sous-produits fibreux          | 5-10     |
| Graisses animales ou végétales | 1-3      |
| Mélasses                       | 1-3      |
| Pulpes de betterave            | 0-10     |

*D'après De Blas et Mateos, 1998*

Entre 6 et 9 semaines d'âge, la quantité d'aliment solide ingérée est presque doublée, pour un nombre de repas quotidiens stable (39 repas), ainsi, l'ingestion par repas passe de 2,6 g à 4,4g (Prud'hon et al., 1975b). Par la suite, la quantité d'aliment solide ingérée par repas reste fixe à 4,4g et le nombre quotidien de repas augmente jusqu'à la 15ème semaine d'âge (41 repas). Pour le lapin adulte (de 28 à 44 semaines d'âge), le temps passé à s'alimenter est de 1h30 à 2h15 par jour, réparti en 23 à 33 repas (Prud'hon et al., 1972). Ces caractéristiques sont variables dans le temps entre les individus, mais stables intra-individu. La consommation d'eau quotidienne est fragmentée en 30 à 35 abreuvements, entre 5 et 18 semaines d'âge (Prud'hon et al., 1975b).

La fragmentation des activités est observée pour tous les comportements. En effet, les lapins changent d'activité environ 47 fois par heure (Jordan et al., 2008). Ils passent près des deux tiers de la journée à se reposer, environ 20% du temps à se toiletter et se gratter et en moyenne 10 % de la journée à manger, soit environ 2h30, selon Jordan et al. (2008).



**Figure 4:** Evolution de la consommation volontaire d'aliment solide par des lapins âgés de 6 semaines, au cours d'un nyctémère (éclairage de 7 à 19h).

*D'après Bellier et al., 1995; Lebas et al., 1996*

La consommation d'eau et d'aliment solide a principalement lieu au cours de la nuit (Figure 4, Prud'hon et al., 1972; Prud'hon et al., 1975a; Sanderson et Vanderweele, 1975; Jolivet et al., 1983; Bellier et al., 1995). En effet, la fréquence des repas au cours de la période diurne est réduite. Prud'hon et ses collaborateurs (1972) avaient émis l'hypothèse que la baisse de la fréquence des repas était liée à l'existence de phases de sommeil lent et paradoxal en période diurne, phénomènes décrits par Faure et al. (1965).

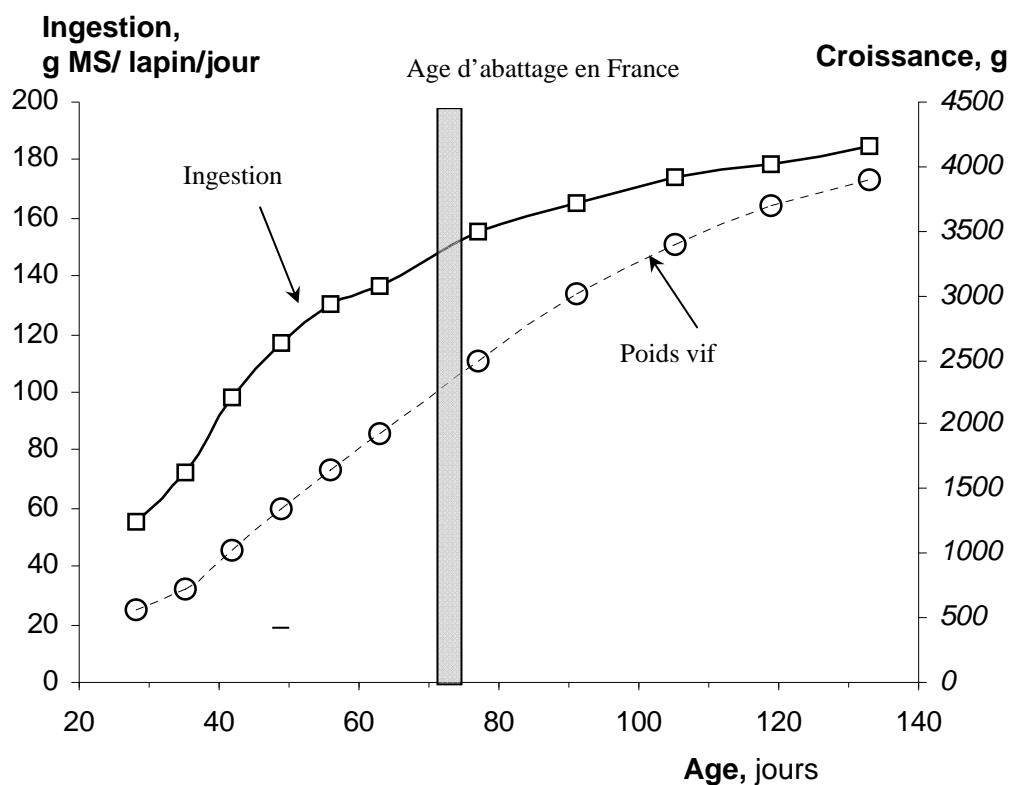
### III. PERFORMANCES DE CROISSANCE DU LAPIN D'ELEVAGE

Les lapins en engraissement sont élevés en cages collectives. Ils sont alimentés par un aliment équilibré, sec et granulé (cf. Etude Bibliographique, Chapitre 1, II-3-A), formulé afin de répondre aux besoins d'entretien des animaux et de favoriser une croissance maximale au regard des capacités génétiques des animaux. Parallèlement, l'eau est disponible à volonté via une pipette (excepté lors d'un contrôle du niveau d'ingestion par restriction hydrique, Figure 5)



**Figure 5** : Jeunes lapins sevrés, hébergés en cages collectives.

Source :F. Marie



**Figure 6** : Courbes d'ingestion et de croissance de lapins domestiques nourris à volonté avec un aliment granulé, depuis le sevrage (28 jours d'âge) jusqu'à l'âge adulte.

D'après les données de Gidenne et Lebas, 1987 et d'après Gidenne et al., 2010b

L'ingestion quotidienne du lapin domestique, alimenté par un aliment complet granulé et fourni à volonté, augmente proportionnellement au poids vif des animaux et se stabilise aux environs de 5 mois (Figure 6). Entre le sevrage (entre 4 et 5 semaines d'âge) et 8 semaines d'âge, le gain moyen quotidien atteint son niveau le plus important ; simultanément l'indice de consommation est optimal (Tableau 2). En France, les lapins sont abattus aux environs de 10 semaines d'âge.

**Tableau 2** : Ingestion, croissance et efficacité alimentaire du lapin domestique sevré.

|                                                       | Périodes d'âge |               |
|-------------------------------------------------------|----------------|---------------|
|                                                       | 5-7 semaines   | 7-10 semaines |
| Ingestion d'aliment (g/j)                             | 100-120        | 140-170       |
| Gain de poids vif (g/j)                               | 45-50          | 35-45         |
| Efficacité alimentaire<br>(g aliment/g gain de poids) | 2,2 - 2,4      | 3,4 - 3,8     |

Valeurs moyennes pour des lapins (lignées commerciales actuelles), nourris à volonté avec un aliment granulé équilibré (89% MS), et ayant librement accès à de l'eau potable

D'après Gidenne et Lebas, 2005



#### IV. L'EXCRETION DU LAPIN, RYTHME ET PARTICULARITES

Le lapin excrète deux types de fèces : les crottes dures éliminées dans le milieu environnant, et les cæcotrophes, petites grappes de crottes molles entourées d'une couche de mucus, et récupérées par l'animal dès leur émission directement à l'anus par aspiration. Cette dualité d'excrétion est caractéristique des *Lagomorphes*. Le côlon, est l'acteur principal de cette double production (cf. Etude bibliographique, chapitre 2-1-F).

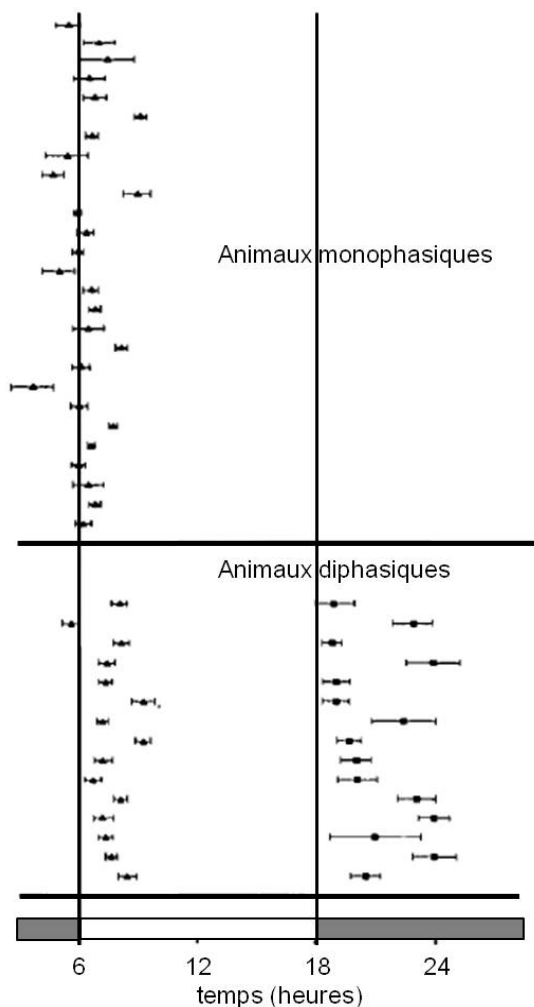
##### IV.A. EXCRETION DE FECES DURES, RYTHME PARALLELE A L'INGESTION DES GRANULES

L'étude, menée par Lebas et Laplace (1974), de l'excrétion fécale de matière sèche sur des lapins de 8 semaines nourris *ad libitum* et libres de leur comportement, a montré que les moments d'excrétion importante (de 17h à 1h) sont simultanés aux pics d'ingestion. Pareillement, la faible excrétion constatée entre 9h et 17h (Lebas et Laplace, 1974) est parallèle à la période de repos alimentaire présentée précédemment. Ainsi, la période obscure du nyctémère est le terrain à la fois de la plus grande partie de l'ingestion (cf. précédemment), mais aussi de l'excrétion de crottes dures.

##### IV.B. EXCRETION DE CÆCOTROPHES, UNE ACTIVITE DIURNE

La cæcotrophie, qui consiste à aspirer les cæcotrophes produits directement à l'anus, commence autour de 4 semaines d'âge (Orengo et Gidenne, 2007), soit lorsque les lapereaux commencent à consommer de l'aliment solide.

L'activité de cæcotrophie a lieu en période de faible excrétion de crottes dures (Jilge, 1974), soit en période diurne (entre 9h30 et 16h30) comme l'ont constaté de nombreux auteurs (Fioramonti et Ruckebusch, 1974; Jilge, 1974). Ainsi, lors d'une alternance jour-nuit de 12 h-12 h, les lapins pratiquent la cæcotrophie pendant 6 à 9 heures, principalement pendant la première partie de la période d'éclaircissement (Jilge, 1974; Lebas et Laplace, 1974; Leng et Hörnicke, 1975; Jilge, 1982). Toutefois, comme l'ont souligné Lebas et Laplace (1974) et Jilge (1982), certains animaux présentent deux périodes de cæcotrophie par nyctémère. Dans ce cas, la seconde période a lieu au cours de la phase d'obscurité du nyctémère, avec une variabilité inter individuelle plus importante que la première en ce qui concerne le moment et la durée de l'activité (Figure 7, Jilge, 1982).

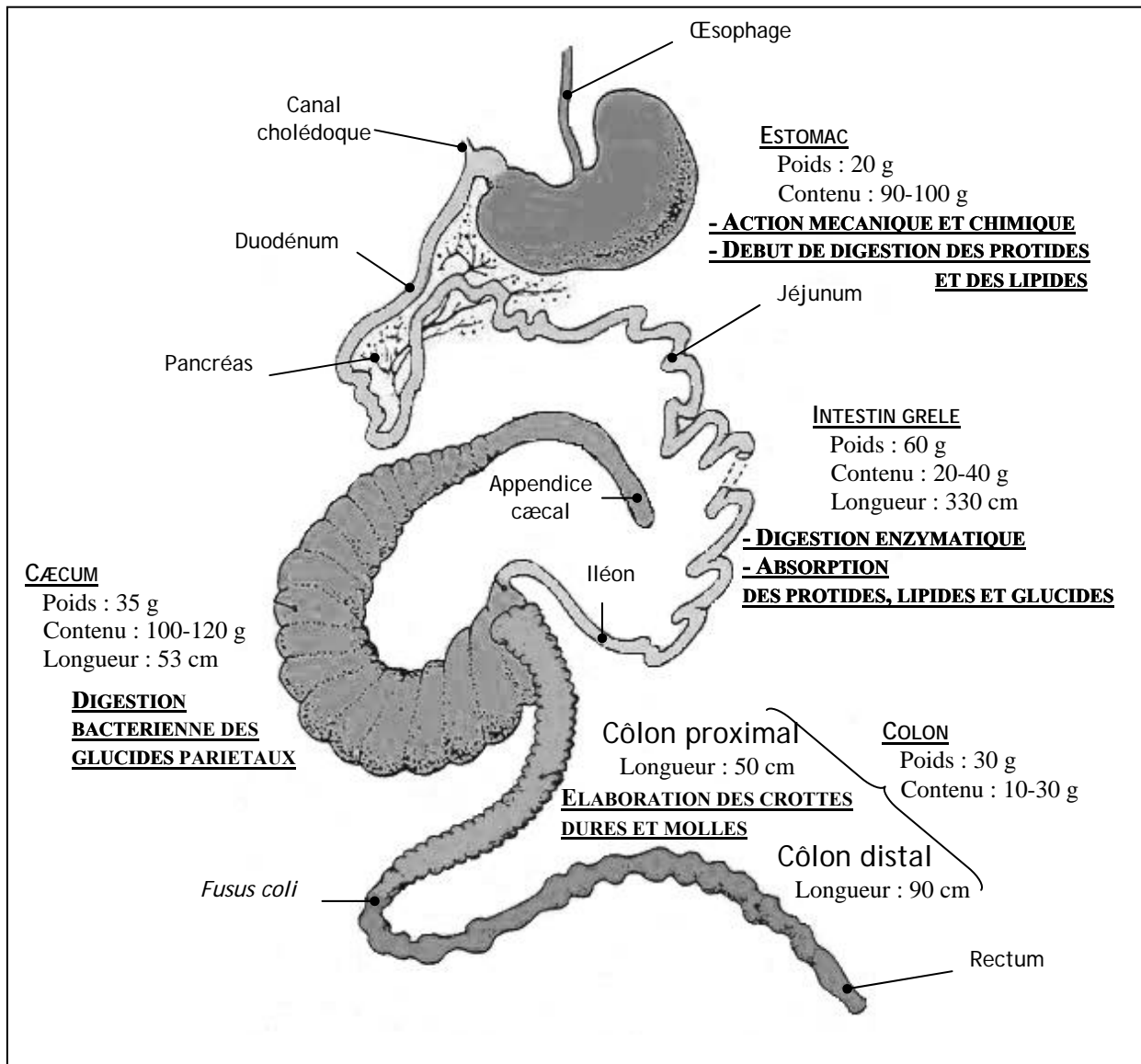


**Figure 7:** Début de la période de cæcotrophie au cours d'un nyctémère. Mesures moyennées sur 20 jours pour 42 animaux, dont 27 monophasiques (une période de cæcotrophie en 24h) et 15 animaux pratiquant deux périodes de cæcotrophie en 24h (diphasiques).

*D'après* Jilge, 1982

La pratique diphasique de la cæcotrophie a été observée pour 20 à 30 % des lapins adultes étudiés par Jilge (1982). Il est à noter que les repas de cæcotrophes augmenteraient chez le lapin sauvage quand la disponibilité de l'aliment diminue (Gidenne et Lebas, 2006). Hörnicke et Batsch (1977) ont montré qu'en éclairage continu, le rythme d'ingestion est atténué ou absent, alors que la cæcotrophie est toujours rythmée, selon semble-t-il une périodicité circadienne endogène, supérieure à 24h et indépendante du rythme d'ingestion. Toutefois, la restriction du temps d'accès à la mangeoire en condition d'éclairage continu induit la réapparition d'un cycle d'émission de cæcotrophes calé sur 24h. Ainsi, certains auteurs (Hörnicke et Batsch, 1977), ont émis l'hypothèse que la prise de nourriture entraînerait l'apparition de la cæcotrophie environ 8h après le début du repas, par des phénomènes digestifs, mécaniques et chimiques. Ceci a été confirmé par Ruckebusch et Fioramonti (1976).

L'élevage rationalisé du lapin de chair français est orienté vers l'optimisation des moyens afin de faire face aux difficultés du marché (Lamothe et Gidenne, 2008). C'est pourquoi la génétique et les conditions d'élevage, principalement l'alimentation, ont été étudiées pour favoriser une croissance rapide à moindre coût, en tenant compte des spécificités de l'espèce : ingestion fonction du rythme nyctéméral et pratique de la cæcotrophie



**Figure 8:** Représentation des différents segments digestifs du lapin en croissance, caractéristiques et fonction digestive.

Mesures réalisées sur des lapins Néo-Zélandais de 12 semaines; d'après Lebas et al., 1996.

## CHAPITRE 2 - DES ORGANES DIGESTIFS SPECIALISES POUR UNE FONCTION DE DIGESTION EFFICACE CHEZ LE LAPIN

---

### I. APPAREIL DIGESTIF ET FONCTION DE DIGESTION

#### I.A. L'APPAREIL DIGESTIF DU LAPIN

L'appareil digestif est composé d'une succession de compartiments : la bouche, l'œsophage, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum puis iléon), le cæcum, le côlon (proximal et distal), puis le rectum aboutissant à l'anus (Figure 8). Le système digestif du lapin est très particulier (Snipes et Snipes, 1997) : l'intestin grêle représente une faible part du tractus digestif (56% de la longueur et 12% du volume de l'ensemble intestin grêle-cæcum-côlon), alors que le cæcum est très développé : en volume, il représente 90% de l'ensemble intestin grêle-cæcum-côlon alors que pour la plupart des espèces domestiques, il compte seulement pour 4 à 11% de cet ensemble. Seul le cheval a également un cæcum bien développé (30%). A ces organes viennent s'ajouter des glandes et organes annexes sécrétoires reliés à différents niveaux de ce dispositif : les glandes salivaires, le foie et le pancréas. Par ailleurs des éléments lymphoïdes, diffus ou organisés, sont disséminés tout au long de l'appareil digestif lui conférant un rôle important dans la défense de l'organisme : les plaques de Peyer de l'intestin grêle, le *sacculus rotundus* au niveau de la jonction iléo-cæcale et l'appendice cæcal (ou vermiforme) à l'extrémité distale du cæcum (Mage, 1998).

#### I.B. DE LA PREHENSION DES ALIMENTS A LA DEGLUTITION DU BOL ALIMENTAIRE

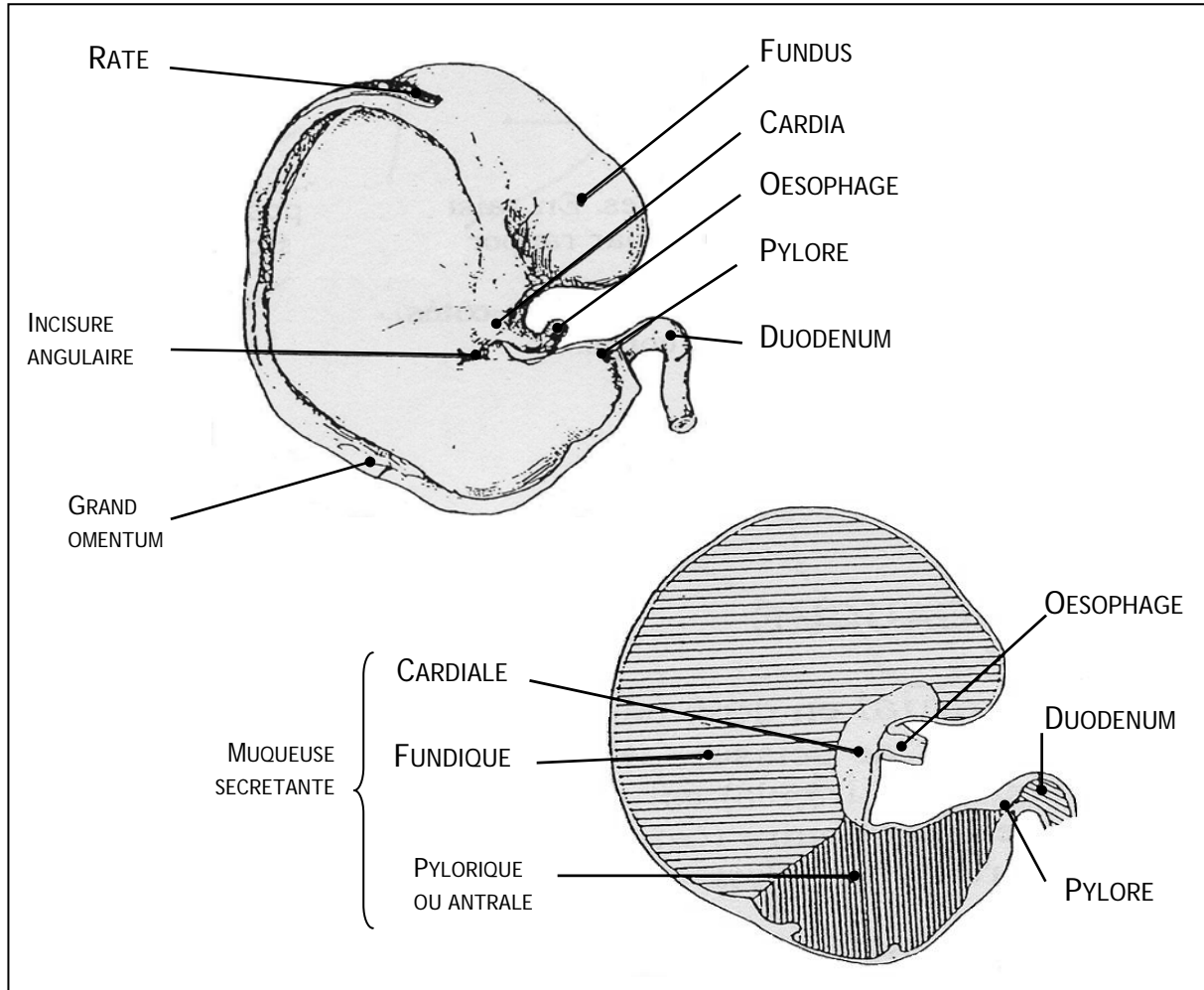
La cavité buccale du lapin est spécifique des *Lagomorphes*. Ainsi, la deuxième paire d'incisives à la mâchoire supérieure, dissimulée derrière la première paire, distingue l'ordre des *Lagomorphes*, dont fait partie le lapin européen, de celui des rongeurs.

Les mouvements masticateurs latéraux rapides aboutissent à une réduction importante de la taille des particules alimentaires. Les glandes salivaires sont bien développées (parotide, mandibulaire, sublinguale...) et sécrètent diverses enzymes. Le bol alimentaire ainsi constitué est dégluti, traverse l'œsophage et entre dans l'estomac au niveau du cardia.

#### I.C. L'ESTOMAC, DEBUT DE DIGESTION PROTEIQUE ET LIPIDIQUE

Le bol alimentaire dégluti s'accumule dans l'estomac et y séjourne pour transformation mécanique et chimique en chyme gastrique. L'estomac fait suite à l'œsophage au niveau du

cardia et précède l'intestin grêle au niveau du pylore. Il forme une poche constituée de deux parties : le fundus et l'antrum (Figure 9), distinguées notamment par leurs activités digestives et sécrétrices.



**Figure 9:** Face viscérale et muqueuse gastrique de l'estomac du lapin.  
*D'après Barone, 1984*

L'estomac produit un suc gastrique comprenant différents types de sécrétions : de l'acide chlorhydrique participant à l'acidification du milieu, du mucus (glycoprotéines) constituant une couche protectrice de l'épithélium contre les attaques acides, et des enzymes. Le pH de l'estomac du lapin adulte oscille entre des valeurs de 1,5 et 2,6 (Penney et al., 1986; Marounek et al., 1995). Cette acidité gastrique, due à la sécrétion d'acide chlorhydrique, a un rôle dans la digestion (dénaturation des protéines, activation du pepsinogène...), mais également dans la protection de l'organisme par l'inactivation des micro-organismes pathogènes ingérés (Martinsen et al., 2005).

Les glandes stomacales produisent deux enzymes majeures : une lipase gastrique et du pepsinogène (Bernadac, 1996). La lipase gastrique du lapin hydrolyse préférentiellement les acides gras à chaînes courtes ou moyennes (Moreau et al., 1988) à un pH optimum compris entre 5 et 6. Son optimum d'activité pour les acides gras à longues chaînes se situe à pH 4 (Moreau et al., 1988). La digestion des protéines débute dans l'estomac sous l'action de la pepsine. Secrétée sous forme inactive et alors appelée pepsinogène, la pepsine est ensuite activée par l'acidité gastrique.

La paroi musculuse de l'estomac assure différents types de contractions favorisant le brassage du bol alimentaire avec les sucs gastriques, avant l'évacuation du chyme vers le duodénum. Les aliments séjournent entre 1,7 et 4 heures dans l'estomac du lapin (Gidenne, 1993).

#### I.D. L'INTESTIN GRELE, LA DIGESTION ENZYMATIQUE ET L'ABSORPTION DES PROTIDES, LIPIDES ET GLUCIDES

Les fonctions de digestion de l'intestin grêle sont assistées par les sécrétions de glandes et d'organe annexés à ce segment digestif. Ainsi, la bile synthétisée par les hépatocytes, secrétée dans le foie, puis stockée dans la vésicule biliaire, est excrétée de manière régulée dans le duodénum. Elle contient des sels et des pigments biliaires. De plus, les sécrétions exocrines des acini sécrétoires du pancréas sont une solution aqueuse alcaline riche en bicarbonate contenant des enzymes et proenzymes protéolytiques, glycolytiques et lipolytiques (Davies et Davies, 2003).

##### I.D.1. Digestion des nutriments

L'hydrolyse des différents composés alimentaires et endogènes se produit à 3 niveaux : au niveau extracellulaire dans la lumière intestinale sous l'action des enzymes pancréatiques, au niveau de la membrane entérocytaire sous l'action des enzymes de la bordure en brosse, et au niveau intracellulaire sous l'action d'enzymes cytoplasmiques ou lysosomiales.

##### ° Digestion des protides

Au niveau intestinal, des protéases d'origine pancréatique et des peptidases localisées dans les entérocytes poursuivent la protéolyse amorcée dans l'estomac. Dans un premier temps, les protéases pancréatiques (trypsine, chymotrypsine, carboxypeptidases A et B ou élastases) hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines. Puis, au niveau de la bordure en brosse et dans le cytoplasme des entérocytes, différentes peptidases hydrolysent les peptides issus de la digestion par les protéases.

° Digestion des lipides

La digestion des lipides alimentaires dans l'intestin grêle est réalisée par différentes enzymes : la lipase et la colipase pancréatiques responsables de l'hydrolyse des triglycérides, et des estérases à l'origine de l'hydrolyse des autres composés lipidiques (phospholipides, cholestérol, esters de cholestérol...) : phospholipase A2, cholestérol estérase...

Ces enzymes sont secrétées par le pancréas directement sous forme active (lipase), ou sous forme de procoenzymes (colipase) ou proenzymes (phospholipase A2) nécessitant une activation dans l'intestin grêle par la trypsine (Carey et al., 1983). Les lipides, peu solubles dans l'eau, entrent difficilement en contact avec les enzymes hydrosolubles. De plus, ils tendent à former des agrégats. Ainsi, au niveau intestinal, la digestion des triglycérides est rendue plus efficace par un processus d'émulsification par les sels biliaires secrétés par le foie, aboutissant à la formation de micelles hydrophiles.

° Digestion des glucides

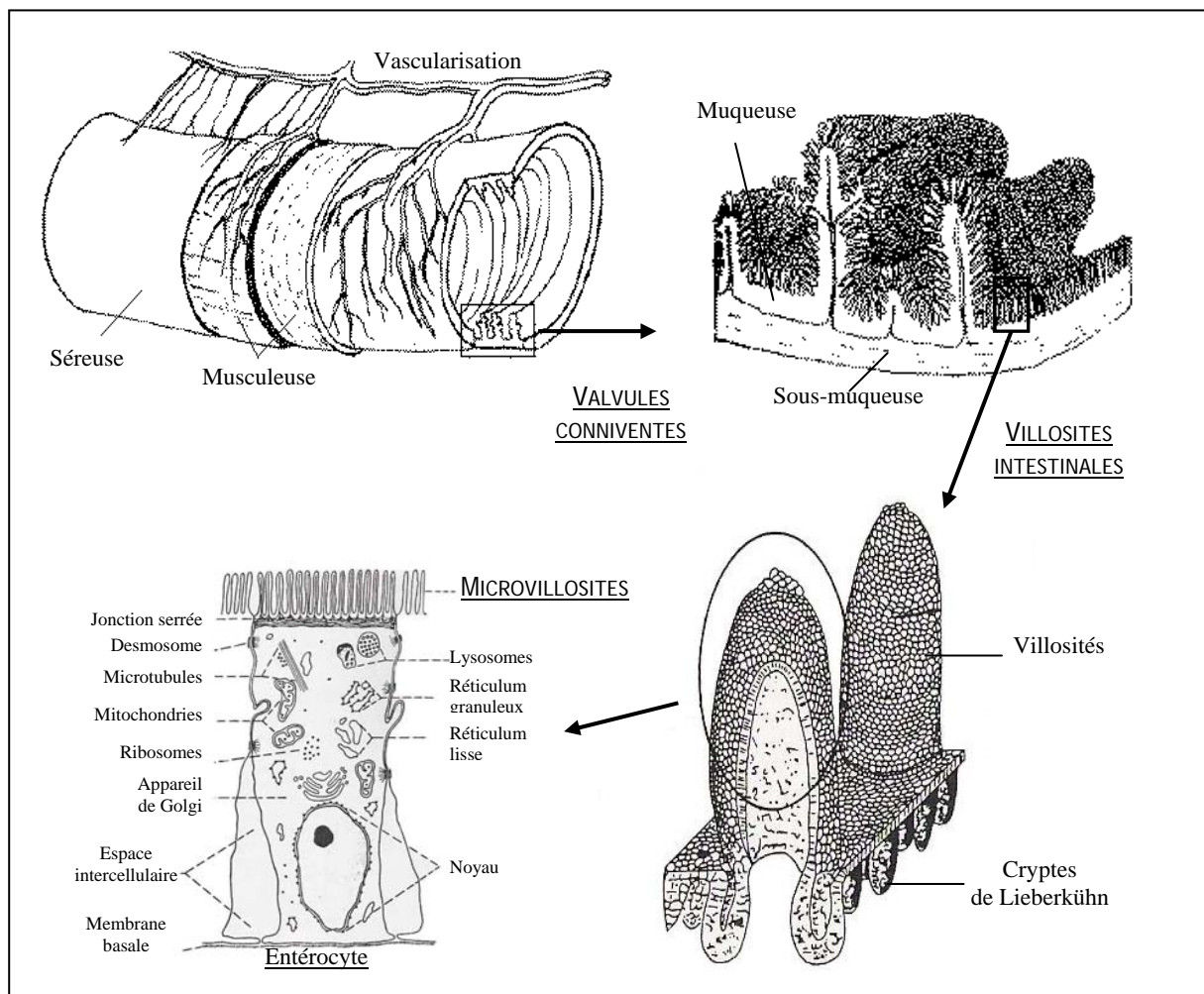
Chez les mammifères, l'équipement enzymatique pour digérer les glucides est en général très incomplet. Si les glucides intracellulaires des végétaux, tel l'amidon, sont très bien valorisés par les sécrétions propres de l'animal, de nombreuses enzymes d'origine exogène, secrétées par des bactéries intestinales, sont nécessaires pour assurer la digestion des glucides pariétaux. Concernant les enzymes d'origine endogène, l'amylase pancréatique a un rôle majeur dans la digestion de l'amidon. Elle conduit à la formation de maltotriose, de maltose et de dextrans dans le suc intestinal (Corring et Rérat, 1983). Puis, les oligo- ou di-saccharidases ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) de la muqueuse intestinale interviennent en fin de digestion pour libérer des oses simples.

I.D.2. La neutralisation du chyme gastrique, le pancréas impliqué

Au niveau duodéal, des glandes de Brunner et les cellules de la muqueuse secrètent, dans la lumière du tube digestif, une solution contenant des mucines et des bicarbonates qui participent à la neutralisation du chyme gastrique, en association avec les bicarbonates duodénaux contenus dans le suc pancréatique. De valeurs oscillant entre 1,5 et 2 dans l'estomac, le pH du contenu augmente dans le duodénum jusqu'à avoisiner des valeurs comprises entre 6,5 et 7 (Penney et al., 1986; Marounek et al., 1995).

I.D.3. L'absorption des nutriments digérés, facilitée par une surface d'échange importante

L'intestin grêle représente une augmentation considérable de la surface d'échange entre le milieu extérieur (le contenu digestif) et le milieu intérieur (via la circulation sanguine). Au plan anatomique, il mesure environ 3 mètres de long chez le lapin adulte, et est replié en anses intestinales. Il est classiquement divisé de l'estomac, vers le cæcum, en 3 parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon.



**Figure 10:** Systèmes d'amplification de la surface de la muqueuse intestinale.

*D'après Cheeke, 1987; Madara et Trier, 1987; Calas et al., 1997*

A la surface de la paroi intestinale, les valvules conniventes, replis circulaires macroscopiques, participent également à l'augmentation de la surface d'échange (Figure 10). Puis, la muqueuse présente d'innombrables petites évaginations de quelques centaines de micromètres appelées villosités et une multitude d'invaginations, dans la couche profonde de la muqueuse, de quelques dizaines de micromètres, appelées les cryptes. Au niveau cellulaire, les entérocytes présentent à leur surface apicale une multitude de replis : les microvillosités.



° Absorption des protéines

Les protéines soumises à la digestion dans la lumière intestinale peuvent être d'origine alimentaire ou d'origine endogène (enzymes, corps bactériens, entérocytes desquamés...). Leur hydrolyse produit des peptides ou des acides aminés libres. Les fragments protéiques sont ensuite conduits dans la circulation porte (Erickson et Kim, 1990).

° Absorption des lipides

L'hydrolyse des lipides entraîne la libération d'acides gras libres, de mono- et diglycérides de différentes longueurs de chaînes, de glycérol, de phosphatidylcholine et de cholestérol. Le transport des acides gras libres et des 2-monoglycérides jusqu'à la membrane des entérocytes est permis par les sels biliaires qui maintiennent ces éléments en solution dans des micelles d'une taille de l'ordre du nanomètre. Ensuite, la traversée de la membrane par ces éléments liposolubles est réalisée soit par diffusion passive, soit par l'intermédiaire de transporteurs. Une fois internalisés dans l'entérocyte, les lipides vont se réorganiser en chylomicrons qui vont être exportés par exocytose dans la lymphe (Thomson et al., 1993). En revanche, les acides gras à chaînes courtes et moyennes sont généralement transportés directement dans la circulation porte (Ramirez et al., 2001).

° Absorption des glucides

Les oses, libérés par la digestion intestinale des glucides, sont absorbés par la bordure en brosse entérocytaire selon divers mécanismes : transport passif (fructose) ou transport actif couplé avec le sodium (galactose et glucose). Le passage de ces sucres vers le sang se fait ensuite par transport passif au niveau de la membrane basale entérocytaire (Wright et al., 2003).

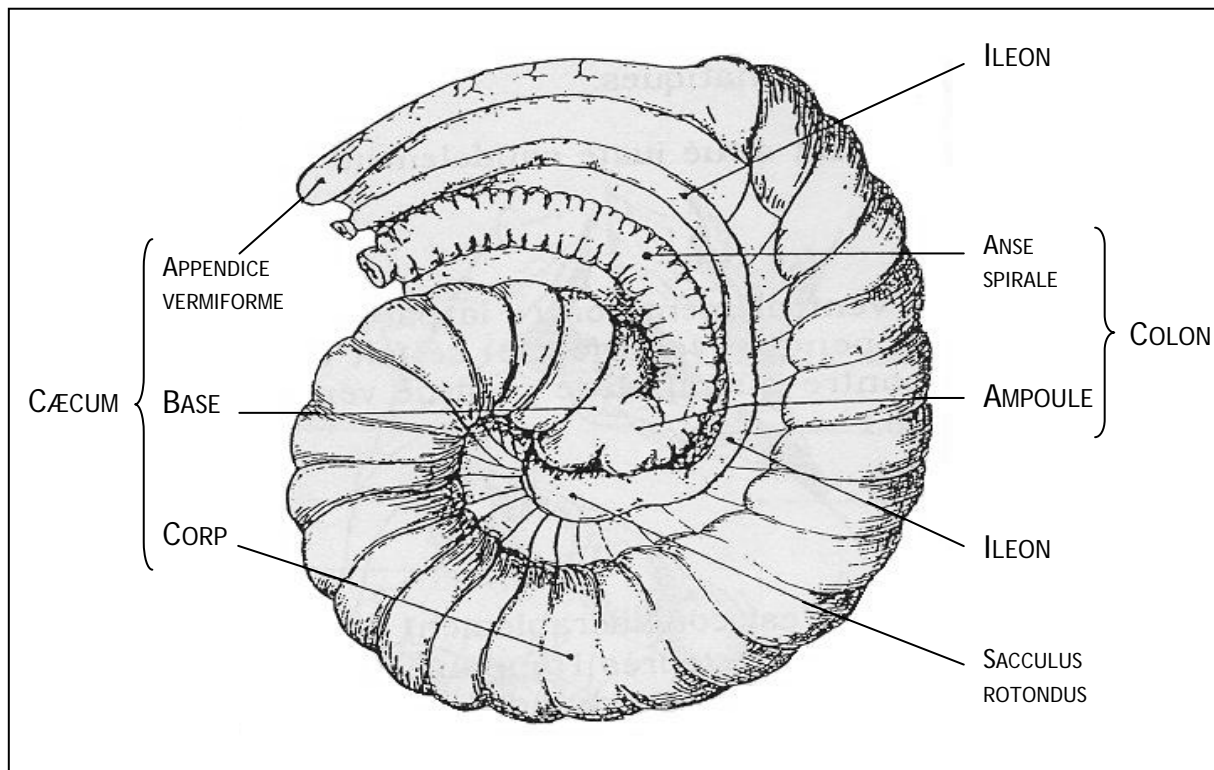
Tout au long de l'intestin grêle, le muscle de Brücke et les fibres musculaires intégrées aux villosités favorisent le péristaltisme intestinal. Leurs contractions permettent un brassage du contenu luminal avec les sécrétions, la mise au contact de la muqueuse avec les digesta, la limitation du reflux des aliments vers l'estomac, et la progression du contenu intestinal vers le cæcum. Chez le lapin, le temps de rétention moyen des digesta entre la bouche et l'iléon terminal est estimé entre 3 et 8 heures (Gidenne, 1992).

## I.E. LE CÆCUM, LIEU DE DIGESTION MICROBIENNE DES GLUCIDES PARIETAUX

Le cæcum est un compartiment en dérivation sur l'axe intestin grêle-côlon. C'est un milieu relativement stable qui permet à la flore intestinale de se développer : son contenu a une teneur en matière sèche de 21 à 23%, et un pH oscillant entre 5,5 et 6 selon l'heure de la journée (Gidenne et Lebas, 1984).

## I.E.1. Les micro-organismes du cæcum

Le symbiote comprend des micro-organismes autochtones ainsi que de nombreux micro-organismes en transit qui constituent la flore transitoire ou allochtone. La flore autochtone hébergée par le cæcum serait particulièrement originale. Une étude récente, utilisant des techniques d'hybridation moléculaire, évoque un symbiote presque exclusivement composée de bactéries (80 à 90% de l'ARNr 16S) (Bennegadi et al., 2003). Plus précisément, le cæcum du lapin contiendrait de  $10^9$  à  $10^{10}$  bactéries par gramme de contenu (Gouet et Fonty, 1979; Padilha et al., 1995), des *Archea* (Bennegadi et al., 2003) mais ne semble pas héberger de champignons (Bennegadi et al., 2003). Les études les plus récentes employant une approche moléculaire indiquent que les *Firmicutes* représentent 93 % du microbiote et les *Bacteroidetes*, 4 % (Monteils et al., 2008).



**Figure 11:** Conformation externe du cæcum de lapin.

D'après Barone et al., 1973

La flore commensale est intéressante pour, outre sa participation active à la dégradation des aliments, ses rôles dans la protection de l'hôte vis-à-vis d'agressions extérieures. En effet, cette flore entre en compétition avec les micro-organismes potentiellement pathogènes. De plus, elle stimule l'immunité de l'hôte et la diversification du répertoire des anticorps de l'animal. Ainsi, elle est intégrée aux moyens non spécifiques de défense de l'organisme. Cette tâche est suppléée au niveau du cæcum par deux organes lymphoïdes spécifiques au lapin : le *sacculus rotundus* à la jonction iléo-cæcale et l'appendice vermiforme à l'extrémité distale du cæcum (Lanning et al., 2000) (Figure 11). Ces deux organes sont, avec les Plaques de Peyer disséminées le long de l'intestin grêle, les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue).

#### I.E.2. Les apports nutritionnels pour l'animal, issus des digestions microbiennes

Un rôle majeur des micro-organismes présents dans le tractus digestif est l'hydrolyse et la fermentation 1) des résidus alimentaires non digérés et absorbés dans la partie antérieure du tractus digestif, donc essentiellement les fibres, et 2) des molécules endogènes, essentiellement protéiques (Forsythe et Parker, 1985; Guarner et Malagelada, 2003).

##### ◦ Digestion des glucides

Les principales sources de carbone et d'énergie pour la croissance bactérienne sont l'amidon résistant à la dégradation par les enzymes de l'hôte, les polysaccharides de la paroi cellulaire des végétaux, les mucopolysaccharides de l'hôte, et autres oligosaccharides ayant échappé à la digestion et à l'absorption dans l'intestin grêle. Ces polymères complexes sont dégradés par les enzymes bactériennes en oligomères et sucres simples. Les bactéries sont ensuite capables de fermenter ces substances en acides gras volatils, acides dicarboxyliques, alcools, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>... Chez un herbivore, comme le lapin, les sources majeures de glucide pour les bactéries cæcales sont les polysaccharides des parois végétales.

Récemment, plusieurs techniques d'estimation des activités enzymatiques fibrolytiques bactériennes ont été développées : détermination des activités cellulolytique (digestion de la cellulose), pectinolytique (digestion des pectines) et xylanolytique (digestion des hémicelluloses) (Boulahrouf et al., 1991). L'activité de la pectinase est classiquement supérieure dans la littérature à celle de la xylanase, elle-même supérieure à celle de la cellulase. Aussi, les substances pectiques sont relativement bien digérées chez le lapin, alors que la cellulose est peu valorisée (Gidenne, 1996). Les bactéries du genre *Bacteroides* seraient les principaux micro-organismes pectinolytiques (Sirotek et al., 2001).

La fermentation des oses simples produit différents gaz : des acides gras volatils (AGV), de l'hydrogène, du méthane et du dioxyde de carbone. Le profil des AGV est spécifique du lapin : l'acétate est prédominant (70 à 80%), suivi par le butyrate (8 à 20%) puis par le propionate (3 à 10%). Les AGV ainsi produits sont absorbés par la paroi cœcale par diffusion passive. Ils constituent une source énergétique estimée entre 10 et 40% des besoins d'entretien de l'animal (Hoover et Heitmann, 1972; Marty et Vernay, 1984).

◦ Métabolisme azoté

Chez le lapin, l'azote apporté par les aliments est majoritairement digéré et absorbé avant le cæcum. Aussi, la source azotée pour les micro-organismes cæcaux est essentiellement constituée de molécules endogènes : cellules épithéliales desquamées, mucus, bactéries lysées et urée. Les activités métaboliques (protéolytiques et uréolytiques) aboutissent à la production d'ammoniac, après fermentation des acides aminés. L'ammoniac produit peut être soit directement absorbé par la muqueuse cœcale pour la synthèse hépatique des acides aminés non essentiels ou pour la synthèse d'urée éliminée par voie urinaire, soit utilisé dans les biosynthèses microbiennes essentiellement protéiques. Les produits de ces biosynthèses pourront être valorisés par l'hôte lors de la cæcotrophie (cf. chapitre 2-I-F) (Forsythe et Parker, 1985).

◦ Autres métabolismes et apports de vitamines et minéraux

Les microorganismes ont également un rôle dans l'absorption de certains minéraux tel que le phosphore. Par ailleurs, dans de bonnes conditions sanitaires, la biosynthèse microbienne des vitamines B et K couvre les besoins des animaux (Lebas, 2000).

Des activités amylolytiques, lipolytiques et mucinolytiques ont également été identifiées au niveau cæcal (Marounek et al., 1995; Padilha et al., 1995).

Le temps de séjour moyen des particules alimentaires dans le cæcum des lapereaux est fonction de leur taille. Le temps de rétention serait en moyenne de 7 à 16 heures pour les particules grossières (> 300 µm), et de 16 à 42 heures pour les particules les plus fines (< 300 µm) et les liquides (Gidenne, 1997).

## I.F. LE COLON, ELABORATION DE CROTTES DURES ET MOLLES

Le lapin présente une excrétion très particulière, il produit deux types d'excréments : des crottes dures et des cæcotrophes. Le côlon, qui fait suite au cæcum, est l'acteur principal de

cette double production. L'organe est divisé en deux parties : le côlon proximal et le côlon distal.

Les cæcotrophes correspondent à du contenu cæcal ayant transité dans le côlon sans y subir de changements notoires (fines et grosses particules). Cette similarité entre les cæcotrophes et le contenu cæcal s'observe aussi vis-à-vis des caractéristiques microbiologiques (Michelland et al., 2010). En revanche, la production de crottes dures implique de nombreuses modifications du contenu cæcal au cours de la traversée du côlon : tandis que les grosses particules (supérieures à 300 µm, donc principalement des fibres) poursuivent leur transit dans le côlon, les fines particules sont refoulées vers le cæcum pour y subir une nouvelle dégradation bactérienne (Gidenne, 1997). Ainsi, la composition des cæcotrophes et des crottes dures est différente (Tableau 3). De plus, lors de la formation des fèces dures, l'eau est intensément réabsorbée au niveau colique.

**Tableau 3:** Composition des crottes dures et des cæcotrophes chez le lapin.

|                   | Crottes dures |          | Cæcotrophes |          |
|-------------------|---------------|----------|-------------|----------|
|                   | moyenne       | extrêmes | moyenne     | extrêmes |
| Matière sèche (%) | 58,3          | 48-66    | 27,1        | 18-37    |
| Protéines         | 13,1          | 9-25     | 29,5        | 21-37    |
| Cellulose brute   | 37,8          | 22-54    | 22,0        | 14-33    |
| Lipides           | 2,6           | 1,3-5,3  | 2,4         | 1,0-4,6  |
| Minéraux          | 8,9           | 3-14     | 10,8        | 6-18     |

*D'après Gidenne et Lebas, 2005*

Les cæcotrophes sont riches en protéines, vitamines (B et K) et minéraux, tandis que les crottes dures sont majoritairement constituées de fibres. Ainsi, les protéines des cæcotrophes, issues des biosynthèses microbiennes, contribuent à 15-20% des apports azotés journaliers (Garcia et al., 1995; Belenguer et al., 2005). De plus, ces protéines sont riches en acides aminés essentiels, tels que la lysine, la thréonine et la méthionine (Ferrando et al., 1972).

La digestion du lapin est rendue efficace par la spécialisation des organes dans une activité de digestion. Les organes clés de la digestion du lapin sont, outre l'intestin grêle :

- le cæcum : par son volume important et le fait qu'il renferme une communauté de micro-organismes dont l'intérêt est majeur pour la digestion de l'hôte.
- le côlon : dont le fonctionnement permet la production de cæcotrophes, phénomène caractéristique des *Lagomorphes*.

## CHAPITRE 3 - SANTE DIGESTIVE DU LAPIN ET RELATION AVEC L'ALIMENTATION : CAS PARTICULIER DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE

---

### I. TROUBLES DIGESTIFS DU LAPIN EN ENGRAISSEMENT

#### I.A. PRINCIPALE CAUSE DE MORTALITE DU LAPIN EN CROISSANCE

L'ensemble des conditions d'élevage peuvent favoriser ou entraîner l'apparition de troubles digestifs chez le lapin en croissance (Marlier et al., 2003) par l'induction de stress. Ainsi, de bonnes conditions de logement et d'alimentation sont des facteurs de prévention des maladies. Les données de GTE pour des ateliers cunicoles avec un système en bande (RENACEB) rapportent un taux de mortalité en engraissement de 8,0 % en 2008 (Lebas, 2009). Sachant que ces chiffres sont obtenus avec un fréquent usage d'antibiothérapie préventive, le lapin en croissance a une réputation d'animal assez sensible aux troubles digestifs. De plus, le sevrage est une période critique, et les jeunes lapins tendent à s'alimenter de façon boulimique (Foubert et al., 2007). Une étude menée sur la base d'autopsies réalisées à l'Université de Liège (Marlier et al., 2003) a permis de mettre en évidence qu'au moins 45 % des affections dans les ateliers d'engraissement des élevages cunicoles belges sont d'origine digestive.

#### I.B. QUELQUES PATHOLOGIES DIGESTIVES DES LAPINS EN ENGRAISSEMENT

Les pathologies digestives peuvent être favorisées d'abord par une mauvaise gestion de l'hygiène et de la prophylaxie. Mais des rations inadaptées qualitativement, quantitativement ou un abreuvement inadéquat (Marlier et al., 2003), ou encore des changements brutaux de régime peuvent aussi être des facteurs de risques supplémentaires. Seules les principales affections digestives trouvées, entraînant des troubles majeurs entre 4 et 10 semaines d'âge des lapins, vont être rapidement présentées.

##### I.B.1. Maladies digestives d'étiologie connue

- ° Les coccidioses intestinales

Dues à des parasites protozoaires, les *Eimeria*, de pathogénicité variable, cette maladie induit des lésions macroscopiques intestinales telles qu'une segmentation marquée des intestins et, une congestion associée à un œdème de la paroi intestinale. Pour les coccidies les plus pathogènes (*E. intestinalis* et *E. flavescens*), les fortes diarrhées observées

s'accompagnent d'un retard de croissance important et d'une mortalité pouvant dépasser 50 % (Marlier et al., 2003). Parfois agents primaires d'infection, ces parasites sont aussi fréquemment trouvés en agents secondaires, associés à d'autres agents pathogènes primaires.

° Les colibacilloses

Cause bactérienne importante de maladies chez le lapin en engraissement, les conséquences de ces affections sont variables selon la souche d'*Escherichia coli* considérée (Peeters et al., 1988). Certaines souches d'*E. coli* sont commensales du tube digestif du lapin. Les souches incriminées dans les troubles digestifs du lapin sont entéropathogènes (REPEC). Elles s'attachent à la muqueuse intestinale et induisent des lésions spécifiques (Licois et Marlier, 2008) qui mènent à un désordre profond du métabolisme hydro-minéral et à une diarrhée parfois mortelle. A noter qu'en France, la souche O103:H2:K- rhamnose négatif est la plus pathogène ; elle peut induire de 90 à 100 % de mortalité lors d'une reproduction de colibacillose expérimentale (Licois et al., 1992). D'autres souches moins pathogènes entraînent un simple retard de croissance (Camguilhem et Milon, 1989; Milon et al., 1990; Milon et al., 1992)

° Les clostridioses

Les *Clostridium* sont des bactéries fréquemment détectées dans le milieu digestif du lapin en engraissement. Deux espèces de *Clostridium* sont reconnues comme agents pathogènes primaires : *C. spiroforme* et *C. piliforme*. La première produit une toxine induisant une entérotoxémie dont les symptômes sont : une paralysie intestinale avec accumulation de gaz dans l'estomac et l'intestin ou bien une entérite avec diarrhée faisant suite à une constipation (Licois et Marlier, 2008). La seconde est l'agent pathogène de la maladie de Tyzzer (Licois, 1986), peu fréquente en élevages rationnels. Sous sa forme chronique elle est caractérisée par une perte de poids, un mauvais état général, des diarrhées aqueuses et une faible mortalité ; la forme aigüe associe à ces symptômes une entérite hémorragique nécrosante de la partie distale du tube digestif (Marlier et al., 2003; Licois et Marlier, 2008).

I.B.2. Maladie d'étiologie indéterminée : l'entéropathie épizootique du lapin ou EEL

L'EEL touche les animaux des élevages intensifs, précédemment exempts ou non de troubles digestifs. Les vétérinaires estimaient que plus de 95 % des élevages français avaient été touchés par cette maladie sur la période allant de 1997 à 2001 (Lebas, 2001). L'étiologie de cette maladie n'est pas encore connue. Il semblerait qu'elle provienne d'une bactérie anaérobie aéro-tolérante encore inconnue, non cultivable sur les milieux nutritifs connus et

produisant une toxine à diffusion et action rapide, soluble et thermosensible, probablement protéique et non encore identifiée (Licois, 2007). L'EEL est caractérisée par un ballonnement abdominal important lié à une dilatation de tous les organes digestifs, une diarrhée aqueuse de faible intensité et parfois, une parésie cœcale (de 40 à 60 % des cas) et la présence de mucus dans le côlon (Marlier et al., 2003; Licois et al., 2005; Licois et Marlier, 2008). Dans les années d'émergence de la maladie (1996-1997) une mortalité importante a été observée : de 30 à 80 % (Licois et al., 2005). Le déséquilibre intestinal induit par l'EEL favoriserait l'implantation de *Cl. Perfringens* (Licois et al., 2003; Marlier et al., 2006) et d'*E. coli* (Marlier et al., 2003), ce qui expliquerait les taux de mortalité importants. Une association d'EEL et de coccidiose entraîne aussi un fort taux de mortalité (Licois et al., 2005).

## II. INFLUENCE DE L'ALIMENTATION SUR L'ETAT SANITAIRE DU LAPIN EN CROISSANCE

### II.A. INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE L'ALIMENT SUR L'ECOSYSTEME DIGESTIF ET LA SANTE DU LAPIN

L'aliment a une action sur l'écosystème cœcal car il est le substrat nutritif apporté aux microorganismes. De plus, il a une influence sur les conditions physico-chimiques du biotope cœcal, sur la motricité intestinale et le transit digestif.

#### II.A.1. Teneur en énergie digestible

L'incorporation de lipides dans l'aliment des lapins en croissance semblerait favoriser une maturation harmonieuse du système digestif, ainsi que le développement du système immunitaire (Maertens et al., 2005; Fortun-Lamothe et Boullier, 2007), ce qui contribuerait à réduire les risques sanitaires.

#### II.A.2. Protéines

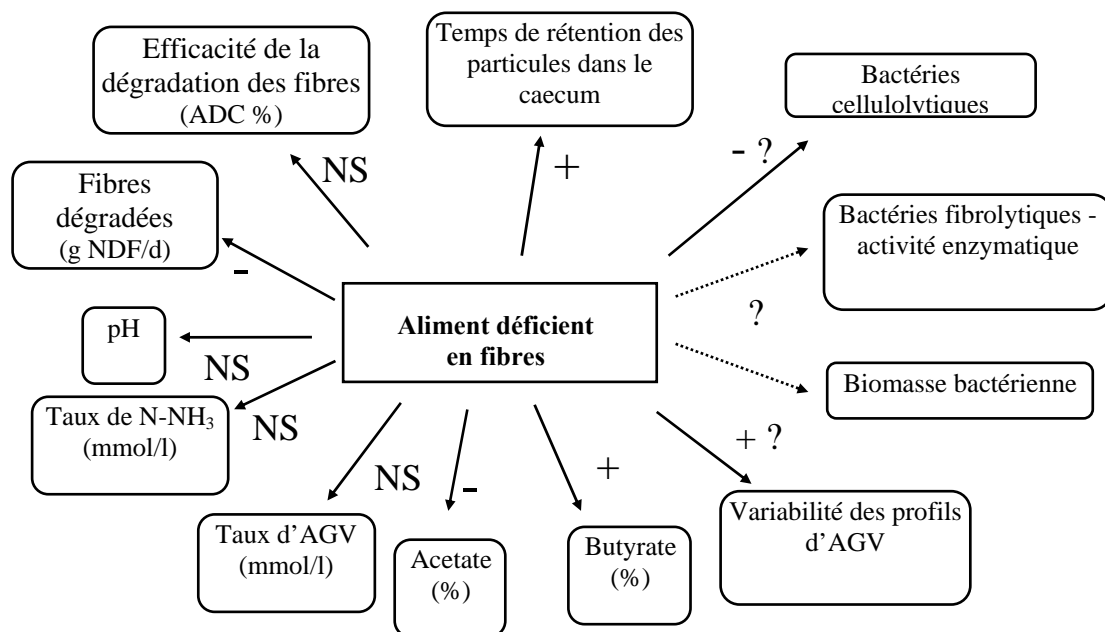
Les protéines sont impliquées, entre autres, dans la croissance de l'animal ainsi que dans le renouvellement et le développement de la muqueuse intestinale (Gidenne et al., 2010a). Pourtant, un excès de protéines dans l'aliment altère l'état sanitaire des animaux et peut favoriser le développement de pathogènes, tels que des *Clostridium* ou des *E. coli* (De Blas et al., 1981; Cortez et al., 1992). Aussi, Gidenne et al. (2001) ont montré qu'un taux d'incorporation important de protéines en remplacement de fibres digestibles augmentait le risque de diarrhées. En revanche, un ratio fibres digestibles/matière azotée totale supérieur à 1,3 apparaît protecteur vis-à-vis de l'EEL (Gidenne et al., 2001). En outre, une augmentation



des teneurs en azote du cæcum semble favoriser les bactéries pathogènes, telles que les *Clostridium* (Cortez et al., 1992).

### II.A.3. Fibres

Le taux d'incorporation (Figure 12) et la nature des fibres incorporées à l'aliment affectent la santé des jeunes lapins en croissance (Gidenne et al., 2010a). De plus, l'interaction entre la teneur en amidon de l'aliment et les fibres alimentaires doit être prise en compte lors de la formulation (Marlier et al., 2003), bien qu'une expérience récente, à grande échelle, montre que de ces deux composants, seule la teneur en fibres de l'aliment influencerait la santé digestive des animaux (Gidenne et al., 2004).



**Figure 12** : Influence d'une déficience en fibres de l'aliment (moins de 8-11 g ADF/kg PV/jour), sur les paramètres de la biocénose cæcale.

+ : augmentation, - : réduction, NS : effet non significatif, ? : des études complémentaires sont nécessaires

D'après Gidenne et al., 2010

L'effet favorable observé sur la santé digestive des lapins en croissance d'un taux d'incorporation élevé de fibres peu digestibles (lignocellulose ou ADF) (Gidenne et al., 2001; Gidenne et Licois, 2005), pourrait être lié à une modulation du flux des nutriments pour le symbiote cæcal, qui serait plus stable.

## II.B. INFLUENCE DE LA QUANTITE D'ALIMENT DISTRIBUEE ET DU MODE DE DISTRIBUTION SUR L'ETAT SANITAIRE DES EXPLOITATIONS CUNICOLES

### II.B.1. La restriction alimentaire limite les troubles digestifs

La majorité des études observent un effet favorable des stratégies de limitation de l'ingestion vis-à-vis de l'état sanitaire des lapins en croissance (Tableau 4). Les différences de résultats observées entre les études peuvent être liées à un effectif trop faible pour mettre en évidence une différence significative, ou à un bon état sanitaire initial ne permettant pas de mettre en avant d'amélioration.

Récemment publiés (Gidenne et al., 2009b), les résultats d'une étude multi-sites, impliquant 496 animaux pour chacun des lots expérimentaux considéré, ont mis en évidence une diminution de la mortalité et de la morbidité dès -20 % et -30 % de restriction, respectivement. Ultérieurement, les conclusions de cette étude ont été confirmées par une étude s'appuyant sur les mêmes sites et visant notamment à vérifier l'amélioration de l'état sanitaire des élevages soumis à un rationnement (Gidenne et al., 2009c).

**Tableau 4** : Effet d'une restriction alimentaire sur l'état sanitaire des lapins en croissance

| Taux de restriction | Mortalité              |                                |                 | Morbidité              |                                |                 | Références            |
|---------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------------|
|                     | Période de restriction | Alimentation <i>ad libitum</i> | Période globale | Période de restriction | Alimentation <i>ad libitum</i> | Période globale |                       |
| 0 % (témoins)       | 28,1 %                 |                                |                 | 56,3 %                 |                                |                 |                       |
| -20 %               | 20,8 %                 | Non rapportée                  | 24,3 % (NS)     | 39,6 %                 | Non rapportée                  | 0,7 % (NS)      | Boisot et al., 2003   |
| -40 %               | 12,5 %                 |                                |                 | 29,2 %                 |                                |                 |                       |
| Tous lots           | 2,1 % (NS) (3/140)     |                                |                 |                        | Non rapportée                  |                 | Foubert et al., 2008  |
| 0 % (témoins)       | 10,2 %                 |                                | 15,9 %          | 12,4 %                 |                                | 11,7 %          |                       |
| -20 %               | 5,5 %                  | 7,8 (NS)                       | 12,4 %          | 11,2 %                 | 3,2 (NS)                       | 11,2%           | Gidenne et al., 2009b |
| -30 %               | 5,4 %                  |                                | 15,0 %          | 5,4 %                  |                                | 6,7 %           |                       |
| 0 % (témoins)       | 19,9 %                 |                                | 21,6 %          | 15,3 %                 |                                | 18,7 %          |                       |
| -25 %               | 10,7 %                 | 1,7 % (NS)                     | 11,9 %          | 10,1 %                 | 5,0 % (NS)                     | 14,0 %          | Gidenne et al., 2009d |
| 0 % (témoins)       | 21,2 %                 | 0 % (NS)                       | 21,2 % (NS)     | 24,7 % (NS)            | 0 % (NS)                       | 24,7 % (NS)     | Gidenne et al., 2009a |
| -25 %               |                        |                                |                 |                        |                                |                 |                       |
| Tous lots           | 2,8 % (NS) (2/80)      |                                |                 |                        | Non rapportée                  |                 | Bergaoui et al., 2008 |

Une reproduction expérimentale d'EEL par l'inoculum TEC3 (Boisot et al., 2003) a montré que restreindre d'au moins 20 % l'ingéré volontaire permettait de diminuer significativement la morbidité et la mortalité dues à la maladie. Les effets bénéfiques de cette

stratégie d'alimentation sur l'état sanitaire des animaux pourraient être dus à l'augmentation du niveau d'AGV 5 heures après le pic d'ingestion d'aliment, proportionnelle au taux de restriction appliqué (Gidenne et Feugier, 2009). Cette variation est concomitante à une chute de pH cæcal, sans modification de l'activité fibrolytique bactérienne de ce compartiment digestif. Toutefois, il est à noter que la différence d'activité des bactéries révélée par le taux d'AGV pourrait être due au délai séparant le repas du prélèvement entre les animaux rationnés ou témoins.

#### II.B.2. Le nombre de distributions quotidiennes ne semble pas influencer l'état sanitaire des lapins en croissance

Une étude multi-sites (5 stations expérimentales) s'intéressant à la fois à la régulation de l'ingestion (2 lots : 100 % ou 75 % de l'ingéré volontaire) et au nombre de distributions quotidiennes (1 ou 2) par l'interdiction de l'accès à la mangeoire pendant 6 heures n'a pas mis en évidence d'amélioration de la morbidité ou de la mortalité des lapins par l'effet du nombre de distributions quotidiennes (Gidenne et al., 2009d). Afin de compléter cette étude, il serait intéressant d'augmenter la différence de fréquence de distribution entre les deux modalités. Par exemple, l'un des niveaux pourrait correspondre à la simulation du profil d'ingestion des lapins nourris à volonté par le fractionnement tout au long de la journée.

L'influence de l'aspect qualitatif de l'aliment distribué aux animaux en cours d'engraissement, en particulier sa teneur en fibres, sur la résistance aux troubles digestifs chez le lapin en croissance a été démontrée.

**L'effet favorable d'une restriction de la quantité d'aliment ingérée par les animaux en croissance a été montré récemment, mais les mécanismes expliquant cet effet favorable n'ont pas encore été étudiés.**

## CHAPITRE 4 - EFFET DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LES PERFORMANCES ET LE BIEN-ETRE DES LAPINS D'ELEVAGE

---

La restriction alimentaire, aussi appelée rationnement, est une stratégie d'alimentation étudiée chez les lapins d'élevage depuis trois décennies environ. Toutefois, ses premiers objectifs étaient l'amélioration de la qualité des carcasses et de la viande et aussi celle des performances des femelles reproductrices. De nos jours, cette pratique est largement répandue (Jentzer, 2009) dans les exploitations, mais plutôt pour des raisons sanitaires.

### I. RESTRICTION ALIMENTAIRE ET REPRODUCTION

La restriction alimentaire appliquée en maternité retarde la puberté chez la lapine (Hulot et al., 1982). Pratiquée sur les 10 premiers jours de gestation, elle n'affecte pas les performances maternelles des femelles, ni leur fertilité (Eiben et al., 2001; Rommers et al., 2004). Mise en place sur les 15 et 20 premiers jours de gestation, cette stratégie d'alimentation induit une augmentation de l'ingestion durant la période de retour à une alimentation ad libitum, c'est à dire en fin de gestation, ce qui permet un meilleur comportement maternel avant la parturition, d'avoir des femelles plus lourdes au moment de la mise bas, avec des lapereaux et des portées plus lourds à la naissance mais aussi au sevrage (Manal et al., 2010). L'effet bénéfique d'un niveau d'ingestion important en fin de gestation, sur la survie et le poids des jeunes à la naissance, avait déjà été souligné par Rommers et al. (2004).

### II. QUALITE DE LA VIANDE PRODUITE PAR LES LAPINS RESTREINTS

Une réduction de 10% de l'ingéré volontaire a par exemple pour conséquence de diminuer le gain de poids moyen quotidien des animaux de 5,4 g/jour sur l'ensemble de la période d'engraissement (Xiccato, 1999), retardant ainsi l'abattage des lapins de 5 jours. De plus, la restriction alimentaire réduit les teneurs en graisse et énergie de la viande de 2,1 points et de 0,73 MJ/kg, respectivement, ce sans modification significative des teneurs en protéines et matière minérale (Xiccato, 1999). Plusieurs études montrent une réduction de la teneur en tissus adipeux de la carcasse (Parigi-Bini et al., 1974; Schlolaut et al., 1978; Perrier, 1998) et du rendement carcasse (Schlolaut et al., 1978; Ouhayoun et al., 1986; Cavani et al., 1991; Gidenne et al., 2009b). Metzger et ses collaborateurs (2009) n'ont pas souligné de modification du rendement carcasse lors d'une restriction en énergie digestible par contre, ils

constatent une baisse des poids des carcasses froides et de référence et une modulation de la répartition des muscles sur le squelette ainsi qu'un effet sur le pH ultime, la teneur en eau des muscles, les pertes à la cuisson et la coloration de la viande. Aussi, à la fin de la période de restriction, pour un poids identique aux animaux nourris à volonté, Ledin (1984) a mis en évidence une teneur plus faible en matière grasse, plus élevée en protéine et identique en eau dans les tissus musculaires des animaux rationnés. Si les lapins rationnés reviennent à une alimentation *ad libitum*, en fin de période d'engraissement la teneur en matière grasse reste plus faible dans les muscles des animaux anciennement restreints, mais les teneurs en protéines et en eau évoluent : elles sont respectivement identiques et supérieures à celles des muscles des lapins témoins. Perrier (1998) ne décelait pas de modification de la répartition de la masse musculaire sur la carcasse des lapins restreints, de plus, une étude a montré que le niveau d'ingestion régule le dépôt lipidique musculaire sans changer la proportion des types de fibres présentes (Gondret et al., 2000). Ainsi, l'application des stratégies de restriction alimentaire pour des raisons sanitaires influencera probablement certaines paramètres de qualité de la viande de lapin, tel qu'un plus faible état d'engraissement des carcasses, et un âge un peu plus avancé à l'abattage pour atteindre le poids commercial.

### III. PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES MODULEES PAR LA RESTRICTION ALIMENTAIRE

#### III.A. LA CROISSANCE EST ALTEREE PAR LA MISE EN PLACE D'UNE RESTRICTION ALIMENTAIRE

##### III.A.1. Performances de croissance

Pendant la période d'application du rationnement, la vitesse de croissance est affectée par le taux de restriction (Lebas et Laplace, 1982). La baisse de Gain Moyen Quotidien (GMQ) observée par Gidenne et al. (2003) est proportionnelle au niveau de rationnement. Mais ce résultat n'est pas répété pour chacune des expériences menées sur la restriction alimentaire. En effet, d'autres facteurs peuvent influencer la croissance comme la composition de l'aliment ou l'état sanitaire général des animaux étudiés.

Comme nous le montre le tableau 5, le poids vif des animaux est diminué en fin de période de rationnement. Pour des niveaux de restriction allant de 15 à 25%, les poids vifs moyens sont inférieurs de 7% à 10% par rapport aux animaux témoins (Boisot et al., 2003; Bergaoui et al., 2008; Gidenne et al., 2003; Gidenne et al., 2008b). Pour des niveaux de restriction plus forts: 30%, 40% et même 50%, les poids vifs sont alors diminués de 14 à 20 % selon Boisot et al. (2003), Foubert et al. (2008), Perrier (1998).

**Tableau 5:** Croissance d'animaux lors d'essais portant sur le rationnement quantitatif.

| Taux de restriction | GMQ période restriction<br>g/j | GMQ Période <i>ad libitum</i><br>g/j | GMQ période totale<br>g/j | Poids vif fin de restriction<br>g | Poids vif Abattage<br>g | Références            |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 0 % (témoins)       | 49,6                           | 42,0                                 | 45,8                      | 2175                              | 3059                    | Perrier, 1998         |
| - 30 %              | 28,2                           | 54,6                                 | 41,6                      | 1729                              | 2877                    |                       |
| - 50 %              | 15,3                           | 62,4                                 | 39,0                      | 1460                              | 2772                    |                       |
| 0 % (témoins)       | 47,8                           | 38,3                                 | 43,7                      | 1907                              | 2519                    | Boisot et al., 2003   |
| - 20 %              | 41,3                           | 42,5                                 | 41,8                      | 1772                              | 2451                    |                       |
| - 40 %              | 32,3                           | 47,7                                 | 38,7                      | 1573                              | 2337                    |                       |
| 0 % (témoins)       | 51,4                           | 38,6                                 | 46,2                      | 1908                              | 2438                    | Foubert et al., 2008  |
| - 30 %              | 36,9                           | 46,5                                 | 40,3                      | 1585                              | 2218                    |                       |
| 0 % (témoins)       | 40,7                           | 46,1                                 | 43,5                      | 1799                              | 2468                    | Gidenne et al., 2003  |
| - 20 %              | 32,3                           | 51,1                                 | 40,8                      | 1624                              | 2373                    |                       |
| - 30 %              | 28,4                           | 54,6                                 | 40,0                      | 1540                              | 2340                    |                       |
| 0 % (témoins)       | 46,4                           | 39,9                                 | 45,1                      | 2319                              | 2612                    | Gidenne et al., 2008  |
| - 25 %              | 38,9                           | 47,6                                 | 40,6                      | 2112                              | 2454                    |                       |
| 0 % (témoins)       | 45,7                           | 49,2                                 | 46,4                      | 2352                              | 2724                    | Gidenne et al., 2009a |
| - 20 %              | 37,8                           | 73,9                                 | 44,8                      | 2100                              | 2650                    |                       |
| 0 % (témoins)       |                                |                                      |                           |                                   |                         | Bergaoui et al., 2008 |
| - 15 %              |                                | 34,2                                 |                           | 1937                              |                         |                       |
| - 30 %              |                                |                                      |                           |                                   |                         |                       |

Cependant, la mise en place d'une période d'alimentation *ad libitum* post-rationnement induit, quelle que soit sa durée, un phénomène de croissance compensatrice (Perrier, 1998; Gidenne et al., 2003; Foubert et al., 2008; Gidenne et al., 2008). La vitesse de croissance des animaux rationnés est supérieure de près de 20% dans le cas de rationnements à 70, 75 ou 80% de l'*ad libitum* (Tableau 5). Dans le cas spécifique des animaux inoculés de l'EEL (Boisot et al., 2003), cette croissance compensatrice est plus modérée (+ 11% pour un rationnement à 80% de l'*ad libitum*). Mais ce phénomène ne permet pas de compenser totalement la perte de poids à l'abattage par rapport à des lapins nourris librement. La mise en place de la restriction alimentaire en élevage pour des raisons sanitaires induit donc un plus faible poids à l'enlèvement, ou un allongement de la durée d'élevage, qui sera directement dépendant de la durée des périodes de restriction et d'alimentation libre.

### III. B. L'EFFICACITE ALIMENTAIRE SEMBLE ETRE AMELIOREE PAR LA DISTRIBUTION CONTROLEE DE L'ALIMENT

Si les animaux rationnés sont pénalisés par des vitesses de croissance plus faibles, ils valorisent mieux l'aliment distribué. On observe une réduction de l'indice de consommation

(IC), réduction modérée pendant l'application du rationnement mais beaucoup plus marquée lors de l'alimentation *ad libitum*, quelle qu'en soit la durée (Tableau 6). La forte variabilité des indices de consommation entre les essais est à souligner. Elle peut être due à une composition différente de l'aliment et/ou à un état sanitaire variable(s) entre les expériences considérées.

**Tableau 6:** Comparaison de l'efficacité alimentaire lors d'essais menés sur la restriction alimentaire.

| Taux restriction | IC période restriction | IC période <i>ad libitum</i> | IC période totale | Références            |
|------------------|------------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------|
| 0% (témoins)     | -                      | -                            | 3,74              | Perrier, 1998         |
| -30%             | -                      | -                            | 3,66              |                       |
| -50 %            | -                      | -                            | 3,56              |                       |
| 0% (témoins)     | 2,36                   | 4,37                         | 3,13              | Boisot et al., 2003   |
| -20 %            | 2,26                   | 3,21                         | 2,70              |                       |
| -40 %            | 2,18                   | 2,85                         | 2,57              |                       |
| 0% (témoins)     | 2,18                   | 4,04                         | 2,75              | Foubert et al., 2008  |
| -30 %            |                        | 2,89                         | 2,49              |                       |
| 0% (témoins)     |                        | 2,93                         | 2,69              | Gidenne et al., 2003  |
| -20 %            | 2,48                   | 2,43                         | 2,54              |                       |
| -30 %            |                        | 2,32                         | 2,46              |                       |
| 0% (témoins)     | 2,99                   | 4,84                         | 3,31              | Gidenne et al., 2008  |
| -25 %            | 2,65                   | 4,53                         | 3,04              |                       |
| 0% (témoins)     | 2,75                   | 3,15                         | 2,85              | Gidenne et al., 2009a |
| -20 %            |                        | 2,30                         | 2,55              |                       |
| 0% (témoins)     |                        |                              |                   | Bergaoui et al., 2008 |
| -15 %            |                        | 3,75                         |                   |                       |
| -30 %            |                        |                              |                   |                       |

#### IV. DIGESTIBILITE DES NUTRIMENTS FAVORISEE PAR LA RESTRICTION ALIMENTAIRE

L'amélioration de l'efficacité alimentaire soulignée lors d'une alimentation restreinte pourrait être liée à une meilleure digestibilité des nutriments comme plusieurs essais l'ont montrée (Tableau 7). Le temps de séjour rallongé de l'aliment dans le tube digestif pourrait en être l'une des raisons. En effet, Gidenne et Feugier (2009) ont mis en évidence un temps de rétention, des particules et de la phase liquide du digesta, prolongé de 50 % chez les animaux restreints.

**Tableau 7:** Evolution du coefficient d'utilisation digestive des nutriments au cours d'essais menés sur la restriction.

| Restriction |           | Protéines | Energie | Lipides | NDF    | ADF    | CB | Références               |
|-------------|-----------|-----------|---------|---------|--------|--------|----|--------------------------|
| Taux, %     | Temps, j. |           |         |         |        |        |    |                          |
| - 40        | 45        | + 9,7     | + 8,9   |         | + 24,5 | + 11,9 |    | Ledin, 1984              |
|             | 120       | + 6,9     | + 6,4   |         |        | + 5,4  |    |                          |
| - 30        | 7         | + 1,4     |         |         |        |        |    | Gidenne et Feugier, 2009 |
| - 11        | 7         | + 7,9     |         | + 4,4   |        |        |    | Tumova et al., 2004      |
|             | 14        |           |         |         |        | + 6,9  |    |                          |
| -25         | 1         | +6,1      | +3,2    |         | +4,2   | +2,8   |    | Gidenne et al., 2009d    |

Toutefois, l'effet favorable de la stratégie d'alimentation sur la digestion dépend du taux de restriction et de la durée. De plus, des conditions intrinsèques à chaque essai, par exemple la composition de l'aliment et les paramètres d'ambiance, peuvent expliquer des résultats différents.

## V. COMPORTEMENT, BIEN-ETRE ET RESTRICTION ALIMENTAIRE

La quantité d'aliment ingérée volontairement est fonction de la teneur en énergie digestible de l'aliment solide, puisque le lapin régule son ingestion en fonction de ses besoins énergétiques. Néanmoins, l'ingéré volontaire est mieux corrélé à la concentration en fibres alimentaires (Gidenne et Lebas, 2005). Chez l'animal restreint et recevant une ration quotidienne en une seule distribution, le rythme d'ingestion des lapins en engraissement n'est plus fonction du rythme nyctéméral, mais déclenché par la distribution (Gidenne et al., 2009b). Lors d'une restriction de 15% de l'ingéré, la totalité de l'aliment est consommée en 16 heures, si le taux de restriction est doublé, les animaux ont terminé en 10 heures (Bergaoui et al., 2008). Chez les animaux restreints se développe un comportement d'anticipation du moment de distribution. Cette période est caractérisée notamment par une forte activité locomotrice, une augmentation de la température corporelle et une stimulation du système digestif (Froy, 2007).

Le bien-être des lapins en croissance a été considéré en relation avec leur hébergement (Mirabito et al. 1999; Postollec et al. 2006; Postollec et al. 2008) mais pas en relation avec leur mode d'alimentation. Or, les modifications du rythme d'ingestion, soulignées précédemment, au cours d'études menées sur la restriction alimentaire (Bergaoui et al., 2008; Gidenne et al., 2009b) incitent à poursuivre la réflexion en direction du bien-être des animaux.



En effet, lorsque la totalité de l'aliment est ingérée en 10 ou 16 heures, l'animal n'a plus la possibilité de manger pendant le reste du nycthémère, soit durant 14 et 8 heures respectivement. Ceci pourrait induire la mise en place de comportements anormaux telles que la stéréotypie et une agressivité accrue lorsque la mangeoire est pleine, par compétition, et lorsque la mangeoire est vide, par ennui. De plus, le Farm Animal Welfare Council (1992) a listé 5 principes indépendants qui doivent être respectés pour garantir le bien-être des animaux d'élevage. Parmi ces 5 principes apparaissent : « l'absence de faim et de soif » qui est à relier à la restriction alimentaire, mais aussi « la bonne santé et l'absence de blessure ou de douleur ». En effet, la restriction alimentaire est appliquée en élevage dans le souci de réduire les troubles digestifs enregistrés post-sevrage, et de diminuer la morbidité et la mortalité qui lui sont conséquentes. Il est donc important d'un point de vue éthique de prospecter l'impact de la restriction alimentaire également vis-à-vis du bien-être des animaux. Certaines études ont déjà été menées sur l'influence d'une restriction alimentaire sur l'agressivité et le comportement de certaines volailles et des porcelets (Hocking et al. 1999; MillmanetDuncan 2000; Merlet et al. 2005; Bruni et al. 2008).

Les études menées sur la restriction alimentaire montrent qu'elle influence la croissance et améliore l'efficacité alimentaire des animaux, ainsi que la digestibilité des aliments.

Elle apparaît aussi modifier le rythme d'ingestion et induit une plage horaire au cours de laquelle les animaux vont éprouver des sensations de faim, peu compatibles avec les notions de bien-être animal.

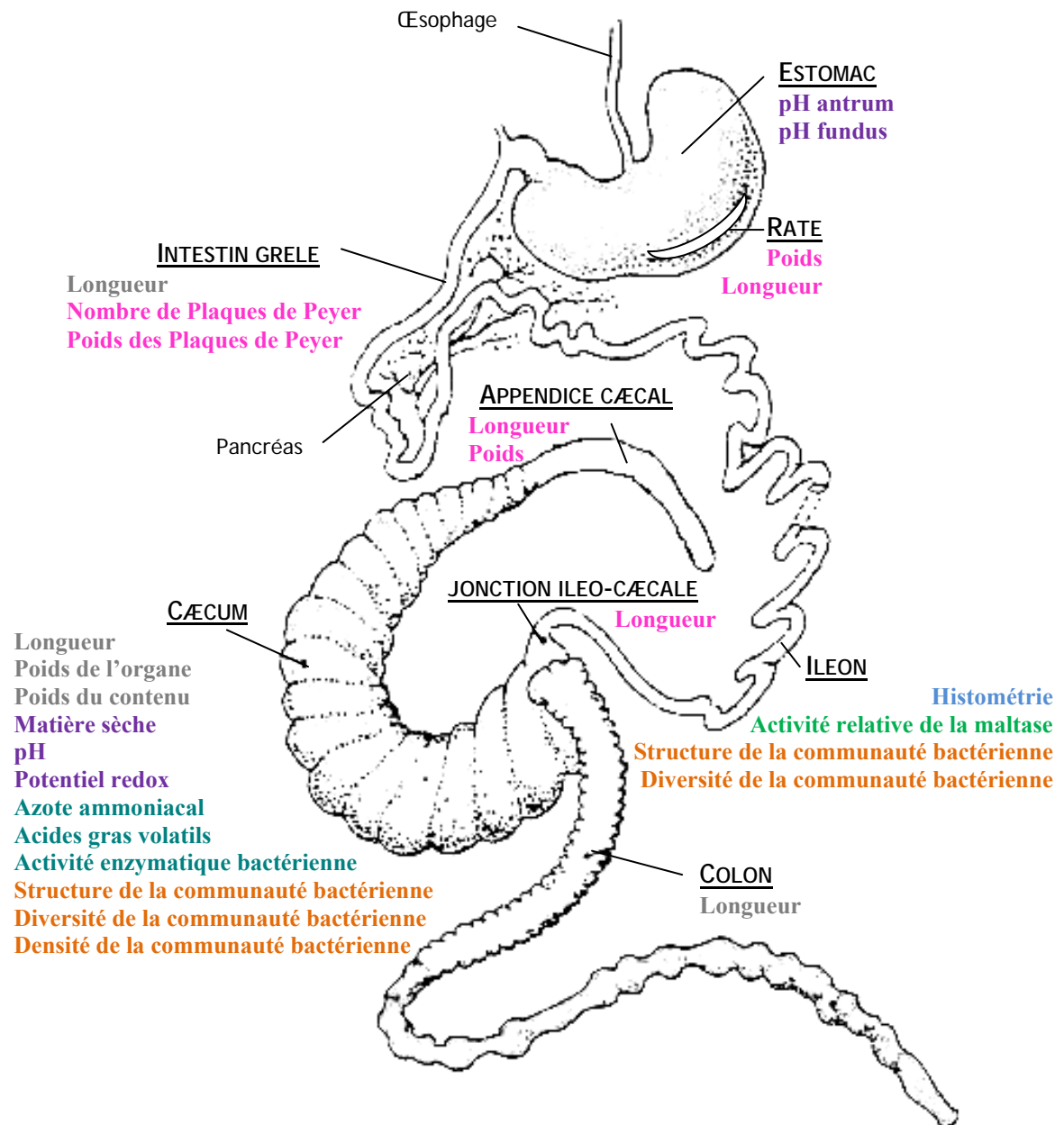
### **Problématiques et questions scientifiques**

L'efficacité de la restriction alimentaire pour lutter contre les troubles digestifs post-sevrages pourrait-elle être liée à la période de jeûne induite ?

Quels paramètres de physiologie digestive pourraient être influencés par la restriction alimentaire, justifiant ainsi l'amélioration de l'état sanitaire des élevages appliquant cette stratégie d'alimentation ?

Quelles sont les conséquences de la restriction alimentaire sur le comportement des lapins et sur leur bien-être ?

# OBJECTIFS



Nature des paramètres étudiés :  
 Anatomiques  
 Immunologiques  
 Physico-chimiques, caractérisant le biotope

Impliqués dans l'absorption  
 Impliqués dans la digestion  
 Impliqués dans la digestion bactérienne  
 Indicateurs de l'activité bactérienne

**Figure 13:** Schéma du tube digestif d'un lapin synthétisant l'ensemble des paramètres fonctionnels étudiés au cours du projet de thèse, en fonction de leur nature.

Ce travail de thèse a pour premier objectif de contribuer à élucider les mécanismes physiologiques impliqués dans la meilleure résistance aux troubles digestifs, par le lapereau lorsque son ingestion est restreinte. Plusieurs paramètres biologiques potentiellement influencés par cette stratégie d'alimentation ont été prospectés, et en particulier : le potentiel digestif propre à l'hôte (enzymologie et morphologie intestinale) et celui lié à son écosystème bactérien digestif.

Le second objectif de ce travail de thèse a pour but de déterminer par quelle modalité la restriction alimentaire limite les troubles digestifs en engraissement. Cet objectif se scinde en deux parties étudiées. La première partie s'intéresse à deux hypothèses :

- aspect nutritionnel : l'efficacité de la restriction alimentaire est directement liée à la baisse de la quantité d'aliment ingérée.

- aspect digestif : l'efficacité de ce mode d'alimentation pourrait être due à une relative vacuité digestive mise en place par la restriction, et non à l'aspect « quantité » limitée d'aliment ingéré. En effet, les animaux nourris à volonté s'alimentent tout au long de la journée, alors que lors d'une restriction alimentaire en une distribution quotidienne, les lapins ingèrent la totalité de l'aliment distribué rapidement, leur laissant une relative vacuité digestive d'environ une demi-journée.

Cela modifie aussi le comportement général du lapin, et influe probablement sur d'autres activités que l'activité d'alimentation. Ainsi, l'éventuelle dégradation du bien-être des lapins en engraissement soumis au contrôle de leur ingestion sera également analysée.

Le troisième et dernier objectif de ce travail de thèse était d'analyser la réponse de l'animal restreint face à une pathologie digestive identifiée, afin de compléter les travaux existants menés avec un modèle de reproduction expérimentale de l'EEL.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons mis en place quatre expériences (Tableau 8) intégrant une approche multicritères. Outre les paramètres de zootechnie et de comportement alimentaire, nous nous sommes intéressés à la fonction de digestion par une mesure de digestibilité de l'aliment mais aussi de paramètres internes. Les paramètres fonctionnels étudiés sont répertoriés sur la figure 13, par organe et selon un code couleur indiquant leur domaine d'implication.

**Tableau 8** : Présentation rapide des 4 expériences mises en place et des principales mesures réalisées.

Ces 4 expériences ont quelques points communs :

- Age au sevrage : 28 jours
- Eau disponible à volonté
- Suivi de la consommation, de la croissance et du statut sanitaire réguliers

| Facteurs étudiés                                              | Niveaux                                                           | Effectif<br>au sevrage | Durée de<br>l'expérience | Paramètres suivis                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| niveau d'ingestion                                            | <i>ad libitum</i><br>restriction : -28%, 25j                      | 92                     | 25j                      | niveau d'ingestion<br>activité maltasique iléale<br>activité bactérienne caecale: AGV, NH3<br>communauté bactérienne caecale : structure, diversité, densité<br>physiologie digestive : pH stomacaux et caecal, histométrie iléale,                                            |
| niveau d'ingestion<br>nb distribution quotidiennes            | <i>ad libitum</i><br>restriction : -29%, 24j<br>1<br>13           | 320                    | 43j                      | physiologie digestive : pH stomacaux et caecal<br>activité bactérienne caecale: Activité enzymatique, AGV, NH3<br>communauté bactérienne caecale : structure, diversité, densité<br>comportement d'ingestion<br>comportement d'excrétion, caecotrophie<br>digestibilité fécale |
| niveau d'ingestion                                            | <i>ad libitum</i><br>restriction : -36%, 28j                      | 432                    | 45j                      | comportement : alimentaire et de repos<br>agressivité et compétition : statut lésionnel<br>système immunitaire : anatomie d'organes lymphoïdes                                                                                                                                 |
| niveau d'ingestion<br>infection par<br><i>E. coli</i> O128:C6 | <i>ad libitum</i><br>restriction : -40%, 14j<br>sains<br>infectés | 180                    | 14j                      | cinétique de l'infection : excrétion fécale et concentration caecale d' <i>E. coli</i><br>statut inflammatoire : haptoglobine sérique<br>communautés bactériennes caecale et iléale : structure, diversité<br>physiologie digestive : pH caecal, histométrie iléale            |

**ETUDE  
EXPERIMENTALE**



Comme précisé précédemment, une réduction de l'ingestion d'au moins 20 % diminue la morbidité et la mortalité des lapins post-sevrage (Gidenne et al., 2003; Gidenne et al., 2009b). Toutefois, les mécanismes impliqués dans cette meilleure résistance aux troubles demeurent non élucidés. Nous avons donc réalisé des mesures physiologiques dans différents segments digestifs du lapereau soumis à une ingestion réduite de 25 %. Ce modèle de réduction de l'ingestion de 25 % sera employé pour l'ensemble des expérimentations.

## **PARTIE 1 -INFLUENCE D'UNE LIMITATION DE L'INGESTION SUR QUELQUES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES DU JEUNE LAPIN.**

---





## PHYSIOLOGIE DIGESTIVE ET COMMUNAUTE BACTERIENNE INTESTINALE DU JEUNE LAPIN (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) : EFFETS DE L'AGE ET D'UNE LIMITATION A COURT TERME DE L'INGESTION

---

**Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 2010.** 156 (1): 156-162

M.H. Martignon, S. Combes, T. Gidenne

Mots clés : microbiote cæcal, physiologie digestive, morphométrie iléale, niveau d'ingestion, activité microbienne, restriction quantitative, lapin.

Résumé : La réponse digestive du jeune lapin par rapport à la limitation, à court terme (28 à 53 jours), de son ingestion volontaire (-25%) a été analysée en fonction de l'âge des animaux et en relation avec l'apparition de troubles digestifs. Plusieurs paramètres physico-chimiques du biotope cæcal ont été étudiés en relation avec la structure et la diversité de la communauté bactérienne cæcale et avec d'autres paramètres physiologiques (pH de l'estomac, morphométrie iléale et activité de la maltase). La morphométrie de l'iléon a été significativement affectée par l'âge (36 vs. 52 jours) mais pas par le niveau d'ingestion, alors que l'activité relative de la maltase reste inchangée. Au niveau de l'estomac, le pH de l'antrum et du fundus a augmenté d'approximativement de 1/3 entre 36 et 52 jours. Et il a été 31 % ( $P=0,003$ ) et 79 % ( $P<0,001$ ) plus important pour les animaux restreints comparés aux lapins *ad libitum* respectivement pour l'antrum et le fundus. Alors que le pH cæcal est resté inchangé (en moyenne 5,83). Le potentiel redox cæcal a légèrement augmenté, de 8 unités ( $P=0,02$ ), lorsque l'ingestion était limitée, mais n'a pas varié entre 36 et 52 jours. La diversité des bactéries cæcales a augmenté avec l'âge (4,8 vs. 5,2,  $P=0,014$ ) simultanément à une variation de la structure de la communauté bactérienne, mais la régulation de l'ingestion pendant 16 jours n'a pas modifié la structure et la diversité de cette communauté bactérienne.



**DIGESTIVE PHYSIOLOGY AND HINDGUT BACTERIAL COMMUNITY OF THE  
YOUNG RABBIT (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*): EFFECTS OF AGE AND  
SHORT-TERM INTAKE LIMITATION**

---

**Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 2010. 156 (1): 156-162**

M.H. Martignon<sup>a,b,c,d</sup>, S. Combes<sup>a,b,c</sup>, T. Gidenne<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>b</sup> Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>c</sup> ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

<sup>d</sup> AFSSA, Unité Alimentation Animale, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

Keywords: caecal microbiota, digestive physiology, ileal morphometry, intake level, microbial activity, quantitative restriction, rabbit



## I. ABSTRACT

The digestive response of the young rabbit to a short-term (28–53 days) limitation of its voluntary intake (25%) was analysed according to age and in relation to the incidence of digestive troubles. Several physico–chemical parameters of the caecal biotope were studied in relation to the caecal bacterial community structure and diversity, and with other physiological criteria (stomach pH, ileum morphometry and maltase activity). The morphometry of the ileum was significantly affected by age (36 vs. 52 days) but not by the intake level, while the relative maltase activity remained unchanged. In the stomach, the pH of antrum and fundus increased by approximately 1/3 between 36 and 52 days, and was 31% ( $P=0.003$ ) and 79% ( $P<0.001$ ) higher for restricted compared to *ad libitum* rabbits respectively. However the caecal pH remained unchanged (mean: 5.83). The caecal redox potential increased slightly, by 8 units ( $P=0.02$ ), when intake was limited, but did not change between 36 and 52 days. The caecal bacterial diversity increased with age (4.8 vs. 5.2,  $P=0.014$ ) while bacterial structure was modified. Limiting the intake for 16 days did not modify the structure or the diversity of the bacterial community.



## II. INTRODUCTION

Food intake limitation affects numerous physiological functions, and its effects depend on its intensity and duration. Consequently, long-term effects of an intake restriction differ from short-term ones (Pico et al., 2003; Kirkwood and Shanley, 2005). While long-term effects have been described, particularly in relation to human ageing, studies on short-term effects remain relatively scarce. However, a short-term intake limitation might improve digestive functions and health in young animals. For instance, the endocrine and immunological status of the young fowl was modified after a short-term intake restriction (Nir et al., 1996), and also the development and characteristics of its digestive organs (Zubair and Leeson, 1994; Ocak and Sivri, 2008). To our knowledge, few studies have dealt with the short-term effects of an intake limitation in mammals, or on small intestine morphology or the hindgut ecosystem, including an approach to the biotope and the microbiota. This question is particularly important and depends on the nutrient intake. Moreover, gut maturation processes seem to interact directly with the digestive health of the young mammal (Lalles et al., 2004). For instance, it has been recently shown that a short-term restriction of the intake of the young rabbit, during the 3 weeks after its weaning, led to a higher caecal fermentative activity and a longer transit (Gidenne and Feugier, 2009), associated with a lower incidence of post-weaning digestive troubles (Gidenne et al., 2009a).

In the present study, we hypothesized that intake limitation decreases the incidence of digestive disorders through a modification of the development pattern of the gut. Therefore our study explored, in the newly-weaned young rabbit, the effect of an intake restriction on the development and maturation of the upper- and hindgut functions, such as enzymology, intestinal morphometry and caecal ecosystem. We also aimed to relate these parameters to the resistance of the young rabbit to digestive troubles.

## III. MATERIAL AND METHODS

### III.A. EXPERIMENTAL DESIGN AND ANIMALS

Ninety-six young rabbits (*Oryctolagus cuniculus*; New Zealand White x Californian), weaned at 28 days old, were caged collectively (four rabbits per cage) and allotted to two groups: a control, “AL” group fed *ad libitum* and a “IR75” group for which the intake was limited to 75% of the voluntary intake. The IR75 group was fed daily between 08:00 and 09:00 with a quantity of feed adjusted every 3 or 4 days according to the mean intake of AL group. This



feeding program was applied for 25 days (from 28 to 53 days old). Water was available ad libitum for both groups. The experimental diet (Table 9) was formulated to cover the nutritional requirements of the growing rabbit (Gidenne, 2000). The breeding unit was kept at a temperature of 20 °C ( $\pm 2$  °C) and the lighting schedule alternated 14 h of night with 10 h of light from 24:00 to 10:00. This lighting schedule was timed to synchronize the digestion rhythm of AL rabbits, that eat particularly during the night (Gidenne and Lebas, 2006), with the digestion rhythm of IR75 animals which depended on the feed distribution time. Feed intake, morbidity and mortality were checked once a day and live mass was measured once a week. Animals were handled according to the care of animals in experimentation, in agreement with European legislation (European Union, 2003).

**Tableau 9** : Ingredients and chemical composition of the experimental diet

| Ingredients, g.kg <sup>-1</sup>            |     | Nutrients, g.kg <sup>-1</sup> of dry matter |     |
|--------------------------------------------|-----|---------------------------------------------|-----|
| Wheat bran                                 | 215 |                                             |     |
| Dehydrated alfalfa                         | 210 |                                             |     |
| Sunflower oil                              | 200 |                                             |     |
| Barley                                     | 89  | Dry matter                                  | 922 |
| Wheat                                      | 89  | Crude protein (N*6.25)                      | 182 |
| Wheat straw                                | 55  | Crude fat                                   | 19  |
| Dehydrated sugar beet pulp                 | 50  | Neutral Detergent Fibre                     | 389 |
| Sucrose                                    | 40  | Acid Detergent Fibre                        | 201 |
| Soybean oil                                | 25  | Acid Detergent Lignin                       | 52  |
| Calcium carbonate                          | 10  | Crude ash                                   | 90  |
| Vitamins and minerals mixture <sup>a</sup> | 10  |                                             |     |
| Salt                                       | 5   |                                             |     |
| L-lysine                                   | 1   |                                             |     |
| DL-methionin                               | 1   |                                             |     |

<sup>a</sup> Vitamins: A: 1,500,000 UI/kg; D<sub>3</sub>: 200,000 UI/kg; E: 3,000 mg/kg; B<sub>1</sub>: 200 mg/kg; K<sub>3</sub>: 50 mg/kg and oligo elements: Cu<sup>2+</sup>: 800 mg/kg; Fe<sup>2+</sup>: 8,000 mg/kg; Zn<sup>2+</sup>: 20,000 mg/kg; Mn<sup>2+</sup>: 4,000 mg/kg and coccidiostatic: robénidine.

### III. B. CHEMICAL ANALYSES

The following chemical analyses were carried out on feed (EGRAN, 2001): dry matter (24 h at 103 °C), ash (5 h at 550 °C), fibrous fractions (neutral detergent fibre “NDF”, acid detergent fibre “ADF” and acid detergent lignin “ADL”) according to the sequential method of Van Soest et al. (1991) with an amylolytic pre-treatment, and crude fat according to the method described by Alstin and Nilsson (1990). Nitrogen was determined according to the DUMAS combustion method using the Leco auto-analyser (model FP-428, Leco Corporation, St Joseph, MI, USA) and converted to crude protein (CP; Nx6.25).

### III.C. SAMPLING PROCEDURE, PHYSIC-CHEMICAL PARAMETERS OF CAECUM AND STOMACH

Samplings were made between 14:00 and 16:00, during the phase of active digestion in the caeco–colic segments, that is mainly about 5 h after feed distribution (for IR75 group) as shown by Gidenne et al. (1993). At 36 and 52 days of life, 9 rabbits of each group (chosen as healthy and having an average weight for the group) were first anesthetized using an intramuscular injection of ketamine (Imalgene™, Merial, Lyon, France; 20 to 25 mg/kg live mass), then euthanized with an intra-cardiac injection of embutramide (T61™, Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany; 0.3 mL/kg LM). Thereafter, the full caecum was quickly removed and weighed. Caecal contents, ileal segments (15 cm length prior ileo–caecal junction) and mucosa were sampled immediately. Then the pH was measured in the fundus and in the antrum of the stomach, and in the caecum using a glass pH “Unitrode” electrode (Pt1000/B/2/3MKCl; Metrohm™). The Eh was measured in the caecum with an Eh platinum electrode “Combined” (Pt-ring electrode with Ag: AgCl as reference; Pt/–2 to 80 °C; Metrohm™) after 20 min of stabilisation, following the recommendations of Kimse et al. (2009). The Eh value was then corrected by adding the potential of the reference hydrogen electrode: +199 mV (Nordstrom, 1977). Dry matter of caecal content was determined by heating at 103 °C for 24 h.

### III.D. CAECAL FERMENTATIVE ACTIVITY

Two samples of 1 g of fresh caecal content were diluted in storage solutions: one in HgCl<sub>2</sub> (2 mL, 2% w/v) and one in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 mL, 2% w/v), for further analysis of VFA and NH<sub>3</sub>-N, respectively. These caecal samples were stored at –20 °C until measurements were made. Ammonia–nitrogen concentration was measured with the procedure of Verdouw et al. (1977) using an auto-analyser (Technicon, Domont, France). Volatile fatty acid concentrations were determined by gas chromatography (CP9000, Chrompack, Middelburg, The Netherlands). After thawing, the stored samples were centrifuged for 20min at 7700×g. One mL of the supernatant was mixed with 0.2 mL of HPO<sub>3</sub> (25% w/v). This mixture was centrifuged at 20,000×g for 15 min, and 1 mL of the supernatant was transferred in a glass vial with extra 50 µL of an internal standard: 4-methyl valeric acid at 1%. 0.5 µL of this last mixture was injected into a gas chromatograph. The total quantity of VFA represented the sum of four components: C2 acetic acid, C3 propionic acid, C4 butyric acid, C5 valeric acid and was expressed in mmol/L of water of the caecal content.

### III.E. PHYSIOLOGIC PARAMETERS

#### III.E.1. Maltase activity

Ileal segments were gently rinsed with physiologic saline solution, opened along their entire length and the mucosa was scraped from the 10 cm intestinal segments with a glass slide. The mucosa was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until dilution. The mucosa was twice thawed and homogenized: 1 g for 7 mL of cold distilled water, with an Ultra-Turrax (8000 rpm, 2 times for 15 s). Maltase (EC 3.2.1.20) activity was measured in mucosa using the procedure described by Dahlqvist (1962) and expressed as relative activity.

#### III.E.2. Histometric analysis

Each sample of ileum was taken about 15 cm before the *sacculus rotundus* at the ileo-caecal junction. The segments were rinsed with saline solution of NaCl (9 g/L), then opened longitudinally and immersed in buffered formalin for 12 to 24 h, and then stored in 90% ethanol until being analysed using the method of Goodlad et al. (1991). The samples were stained with Feulgen reagent. Firstly, *villi* and crypts were carefully separated under a dissecting microscope. Secondly, the preparations were mounted between slide and strip with a few drops of an aqueous agent for microscopy. *Villi* and crypts were measured using an optical microscope (Nikon Eclipse E600), a camera (Sony XC77E) and image analysis software (Visilog 6, Noesis). Length and surface area of 20 *villi* and 20 crypts were recorded and then averaged for each sample, and the ratio of *villus* height to crypt depth was calculated for each sample.

### III.F. ANALYSIS OF CAECAL BACTERIAL COMMUNITY

DNA was extracted using QIAamp™ DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) from about 200 mg of sample, according to the manufacturer's instructions.

#### III.F.1. Real-time PCR assay conditions

The quantification of total bacteria was done by real-time PCR. The amplification reactions were carried out in a total volume of 10  $\mu\text{L}$ . All reaction mixtures contained 4  $\mu\text{L}$  of template DNA and 5  $\mu\text{L}$  TaqMan primers Bact1369F (5'-CGGTGAATACGTTCCCGG-3') and Bact1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACT-3') and 250 nM of TaqMan probe TM1389F (5'-CTTGACACACC GCCCGTC-3') was added to amplify 16S rDNA (Suzuki et

al., 2000). Amplification reactions were run on an ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems). Reactions took place after a sequence of 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles: 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. All tests were performed in triplicate. Results were compared with a standard curve to obtain the number of target copies in the sample. The standard DNA curves were generated by amplification of the serial 10-fold dilutions of a reference clone (GenBank accession no. EF445158) (Monteils et al., 2008). The cycle threshold (CT) corresponded to the cycle number at which the reaction became exponential. The sample's CT was compared with a linear standard curve plotted with CT vs. gene copy number. The results were expressed as the number of target copies in the sample.

#### III.F.2. Amplification of the V3 region of the 16S rRNA gene and CE-SSCP procedure

Then genes coding for V3 region of 16S rRNA were amplified by PCR with 30 cycles (94 °C for 30 s, 61 °C for 30 s, 72 °C for 30 s) using primers w49 and 5'-6Fam-labeled w34 (Delbès et al., 1998; Zumstein et al., 2000). The PCR amplification was performed in a total volume of 50 µL containing: 5 µL of PfuUltra™ II Fusion buffer, 25 µg of bovine serum albumin (New England Biolabs), 200 µM of dNTP mix, 200 nM of each primer, 0.25 U of Taq PfuUltra™ II Fusion (Stratagene) and 1 µL of 1/200 diluted DNA extracted from fresh caecal content (Michelland et al., in press).

The caecal bacterial community structure and diversity were characterised using the CE-SSCP method. This is a capillary electrophoresis method based on heterogeneity of single-strand ribotype secondary structure providing different mobility through a non-denaturing gel. The result is a chromatogram of bacterial communities, where each peak corresponds to at least one operational taxonomic unit or ribotype, but more often to more than one (Loisel et al., 2006). One µL of amplified DNA was added to 7.8 µL of deionised formamide (Genescan, Applied Biosystems) and to 0.2 µL of size marker (5-Rox, GenescanHD400) (Michelland et al., in press). Before capillary electrophoresis and laser detection, done with an ABI 3100 sequencer, the mix previously described was denatured for 5 min at 95 °C followed by 5 min in ice.

#### III.F.3. Diversity index and structure of communities

The Simpson diversity index was estimated as previously described by Michelland et al. (in press). It summarized a complex community represented in a molecular fingerprint pattern by a single value by taking into account the number of species (number of peaks) and their relative abundance (area under each peak). The study of the structure of the bacterial

communities involved the analysis of the size of the various peaks throughout the CE-SSCP profiles and was achieved using StatFingerprints (Michelland et al., 2009).

### III.G. STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were performed using R software version 2.7.2. (R development Core Team, 2007). For data on growth and feed intake patterns, rabbits weights at 28 days were included as a covariable in the model, with groups as main effects. Categorical data (morbidity, mortality and health risk index) were analysed using a chi-square test. Numerical data (pH, VFA, etc.) were subjected to an analysis of variance using a two-factor model - rabbit age and intake level group - and their interaction. Differences were considered significant at  $P < 0.05$  and trends were discussed at  $P < 0.1$ . To study the structure of the bacterial community, we calculated the pairwise Euclidean distances between the 48 CE-SSCP profiles. To explore this distance matrix, nMDS was carried out using 10,000 random starts (Clarke, 1993; Michelland et al., 2009). nMDS provides a visual representation of the pattern of proximities (i.e., similarities or distances) among a set of data. Given a matrix of distances between profiles, nMDS plots profiles on a map so that the profiles that are perceived to be very similar are placed near each other. The difference in caecal bacterial community structure between feeding levels and ages was calculated using an ANOSIM which return a p-value giving the significance of similarity and an ANOSIM-R giving the level of similarity (Ramette, 2007). Variability within each group was assessed using pairwise Euclidean distance calculation for within each group and tested by ANOVA and a TukeyHSD test for age or group effect (Michelland et al., 2009).

## IV. RESULTS

### IV.A. FEED INTAKE PATTERN, GROWTH AND DIGESTIVE HEALTH OF GROWING RABBITS

Over the whole experiment (28-53 days), rabbits fed freely grew rapidly (mean 53.4 g/day) and had a high voluntary feed intake and a good feed efficiency (2.19). From weaning to 42 days of life, the limitation of intake for IR75 rabbits was slightly greater (to 68% of AL) than initially planned (75%, Table 10), while from 42 to 53 days, the intake averaged 74% of that of the AL group. Accordingly, over the whole experiment the intake level of IR75 group was limited to 72% of that of the control (AL) group fed *ad libitum*. As expected, the feed restriction decreased growth by 23%, and at the end of the experiment, the restricted rabbits

weighed 17% less than control ones. Considering the whole period, the feed conversion ratio was 4% lower ( $P=0.045$ ) for IR75 than for AL. Surprisingly at the beginning of the experiment, the feed conversion ratio was 6% higher for restricted rabbits ( $P=0.047$ ).

**Tableau 10** : Growth and intake pattern of the young rabbits, according to the intake level

|                                              | Intake level |       | RMSE <sup>a</sup>   | P level |
|----------------------------------------------|--------------|-------|---------------------|---------|
|                                              | AL           | IR75  |                     |         |
| Feed intake (g/day/rabbit)                   |              |       |                     |         |
| Days 28 to 42 (n=23)                         | 92.0         | 62.5  | $4.8 \cdot 10^{-4}$ | <0.001  |
| Days 42 to 53 (n=23)                         | 149.9        | 110.6 | 4.9                 | <0.001  |
| Days 28 to 53 (n=23)                         | 117.5        | 83.7  | $3.5 \cdot 10^{-3}$ | <0.001  |
| Live mass (g)                                |              |       |                     |         |
| Day 28, weaning (n=92)                       | 634          | 652   |                     |         |
| Day 42 (n=74)                                | 1,349        | 1,118 | 31.4                | <0.001  |
| Day 53 (n=54)                                | 1,981        | 1,647 | 29.5                | <0.001  |
| Mass gain (g/day/rabbit)                     |              |       |                     |         |
| Days 28 to 42 (n=71)                         | 52.1         | 34.2  | 6.8                 | <0.001  |
| Days 42 to 53 (n=53)                         | 56.2         | 48.6  | 6.5                 | <0.001  |
| Days 28 to 53 (n=52)                         | 53.4         | 40.5  | 5.4                 | <0.001  |
| Relative feed intake (g/day/kg of live mass) |              |       |                     |         |
| Days 28 to 42 (n=23)                         | 91.1         | 70.8  | 3.5                 | <0.001  |
| Days 42 to 53 (n=23)                         | 89.1         | 79.9  | 3.4                 | <0.001  |
| Days 28 to 53 (n=23)                         | 89.2         | 72.9  | 3.3                 | <0.001  |
| Feed conversion ratio                        |              |       |                     |         |
| Days 28 to 42 (n=23)                         | 1.77         | 1.88  | 0.62                | 0.047   |
| Days 42 to 53 (n=23)                         | 2.69         | 2.31  | 0.77                | <0.001  |
| Days 28 to 53 (n=23)                         | 2.19         | 2.10  | 0.66                | 0.045   |

<sup>a</sup> RMSE: root mean square error

Since the number of animals was moderate, no significant difference was detected for the incidence of digestive troubles among the two groups, although the mortality rate of AL group was almost significantly ( $P=0.069$ ) higher between 42 and 53 days (Table 11).

**Tableau 11** : Effect of intake level on mortality and morbidity from to digestive troubles in the young rabbit

|                                | Intake level |      | P level |
|--------------------------------|--------------|------|---------|
|                                | AL           | IR75 |         |
| Mortality <sup>a</sup>         |              |      |         |
| Days 28-42                     | 0/48         | 1/44 | NS      |
| Days 42-53                     | 6/48         | 1/43 | 0.069   |
| Days 28-53                     | 6/48         | 2/44 | NS      |
| Morbidity <sup>b</sup>         |              |      |         |
| Days 28-42                     | 5/48         | 3/44 | NS      |
| Days 42-53                     | 0/48         | 1/43 | NS      |
| Days 28-53                     | 4/48         | 4/44 | NS      |
| Health Risk Index <sup>c</sup> |              |      |         |
| Days 28-42                     | 5/48         | 4/44 | NS      |
| Days 42-53                     | 6/48         | 2/43 | NS      |
| Days 28-53                     | 10/48        | 6/44 | NS      |

NS:  $P>0.1$

<sup>a</sup> agonising rabbits were euthanized. Naturally dead rabbits were not distinguished from euthanized rabbits

<sup>b</sup> morbidity: prostrated and bloated rabbits and/or showing diarrhoea

<sup>c</sup> Health Risk Index = mortality + morbidity

**Tableau 12** : Stomach pH according to age and intake level in the young rabbit

|                  | Age (days) |      | Intake level |      | RMSE <sup>a</sup> | P level |              |                |
|------------------|------------|------|--------------|------|-------------------|---------|--------------|----------------|
|                  | 36         | 52   | AL           | IR75 |                   | Age     | Intake level | Age X Int.lev. |
|                  | n=18       | n=18 | n=18         | n=18 |                   |         |              |                |
| <i>Antrum</i> pH | 1.67       | 2.29 | 1.62         | 2.34 | 0.7               | 0.007   | 0.003        | NS             |
| <i>Fundus</i> pH | 3.94       | 2.62 | 2.35         | 4.21 | 2.3               | <0.001  | <0.001       | NS             |

NS: P&gt;0.1

<sup>a</sup> RMSE: root mean square error**Tableau 13** : Maltase activity and histometric parameters of the ileal mucosa according to age and intake level of the young rabbit

|                                                     | Age (days) |        | Intake level |        | RMSE <sup>a</sup> | P level |              |                |
|-----------------------------------------------------|------------|--------|--------------|--------|-------------------|---------|--------------|----------------|
|                                                     | 36         | 52     | AL           | IR75   |                   | Age     | Intake level | Age X Int.lev. |
|                                                     | n=18       | n=18   | n=18         | n=18   |                   |         |              |                |
| Relative maltase activity (µmol/g mucosa/min/kg LM) | 16.1       | 13.7   | 13.4         | 16.2   | 1.3               | NS      | NS           | NS             |
| Villus height (µm)                                  | 283        | 410    | 365          | 328    | 25                | 0.001   | NS           | NS             |
| Villus area (µm <sup>2</sup> )                      | 26,842     | 46,934 | 38,161       | 35,615 | 9                 | <0.001  | NS           | NS             |
| Crypt depth (µm)                                    | 94         | 109    | 105          | 97     | 10                | 0.01    | NS           | NS             |
| Crypt area (µm <sup>2</sup> )                       | 2,552      | 2,843  | 2,828        | 2,567  | 2                 | NS      | NS           | NS             |
| <i>Villus</i> height / crypt depth                  | 3.1        | 3.8    | 3.5          | 3.4    | 3                 | 0.082   | NS           | NS             |
| <i>Villus</i> area / crypt area                     | 11.8       | 16.9   | 13.6         | 14.2   | 6                 | 0.005   | NS           | NS             |

NS: P&gt;0.1

<sup>a</sup> RMSE: root mean square error**Tableau 14** : Caecal physico-chemical and fermentation parameters, according to age and intake level, in the young rabbit

|                              | Age (days) |       | Intake level |       | RMSE <sup>a</sup> | P level |              |                |
|------------------------------|------------|-------|--------------|-------|-------------------|---------|--------------|----------------|
|                              | 36         | 52    | AL           | IR75  |                   | Age     | Intake level | Age x Int.lev. |
|                              | n=18       | n=18  | n=18         | n=18  |                   |         |              |                |
| pH                           | 5.80       | 5.86  | 5.79         | 5.87  | 1.2               | NS      | NS           | NS             |
| Redox potential (mV)         | -212       | -218  | -219         | -211  | 7                 | 0.054   | 0.02         | NS             |
| Dry matter (%)               | 23.9       | 22.2  | 22.6         | 23.6  | 3.7               | 0.046   | NS           | 0.071          |
| Total VFA (mmol/l)           | 124.3      | 126.8 | 126.7        | 124.6 | 10.3              | NS      | NS           | NS             |
| VFA (mol/100 mol)            |            |       |              |       |                   |         |              |                |
| Acetate                      | 82.0       | 83.0  | 82.2         | 82.8  | 3.5               | NS      | NS           | 0.07           |
| Propionate                   | 6.3        | 4.2   | 4.9          | 5.5   | 0.8               | <0.001  | NS           | NS             |
| Butyrate                     | 11.3       | 12.0  | 12.1         | 11.2  | 3.4               | NS      | NS           | NS             |
| Propionate to butyrate ratio | 0.53       | 0.36  | 0.43         | 0.45  | 0.8               | 0.003   | NS           | NS             |
| NH <sub>3</sub> -N (mmol/l)  | 17.7       | 13.1  | 14.2         | 16.7  | 5.1               | 0.006   | NS           | NS             |

NS: P&gt;0.1

<sup>a</sup> RMSE: root mean square error

## IV.B. GASTRIC AND ILEAL DIGESTIVE PARAMETERS

The pH of both stomach parts were significantly affected by feed restriction, with an increase of 44% and 79% respectively in *antrum* and *fundus* (Table 12). They were also significantly modified by age: *antrum* pH rose by 37% between 36 and 52 days of age, while *fundus* pH decreased by 34%. The morphology of ileal *villi* and crypts (length and area) was not significantly affected by the intake, but it changed with age. The ratio of *villus* to crypt area increased sharply after weaning, from 11 at 36 days to 17 at 52 days (Table 13). This resulted mainly from *villus* modification, with a 70% greater height and almost twice the area at 52 days.

IV.C. CAECAL BIOTOPE: PH, EH, DRY MATTER, VFA, NH<sub>3</sub>-N

None of the caecal biotope parameters were affected by the feeding level, except the redox potential (Table 14) which was slightly (+8 mV) but significantly higher for restricted animals. Also, at 36 days old, the caecal VFA concentration had already reached 124 mM, and remained at this level 16 days later. Neither pH nor acetate and butyrate proportions were significantly affected by age, while the propionate proportion decreased by 2 units. Consequently, the propionate to butyrate ratio significantly decreased, by one third, between 36 and 52 days. Meanwhile, the ammonia concentration decreased by almost one fourth between 36 and 52 days. Also, redox potential and dry matter tended to be lower with age.

**Tableau 15** : Caecal bacteria community, according to age and intake level, in the young rabbit

|                                            | Age (days)             |                        | Intake level           |                        | RMSE <sup>a</sup>    | P level |              |               |
|--------------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|---------|--------------|---------------|
|                                            | 36                     | 52                     | AL                     | IR75                   |                      | Age     | Intake level | Age x Int.lev |
| Bacterial 16S rDNA copies/g                | 2.35 10 <sup>+12</sup> | 1.52 10 <sup>+12</sup> | 1.97 10 <sup>+12</sup> | 1.91 10 <sup>+12</sup> | 2.8 10 <sup>+6</sup> | 0.078   | NS           | NS            |
| Bacterial community diversity <sup>b</sup> | 4.83                   | 5.21                   | 5.11                   | 4.93                   | 0.4                  | 0.014   | NS           | NS            |

NS: P>0.1

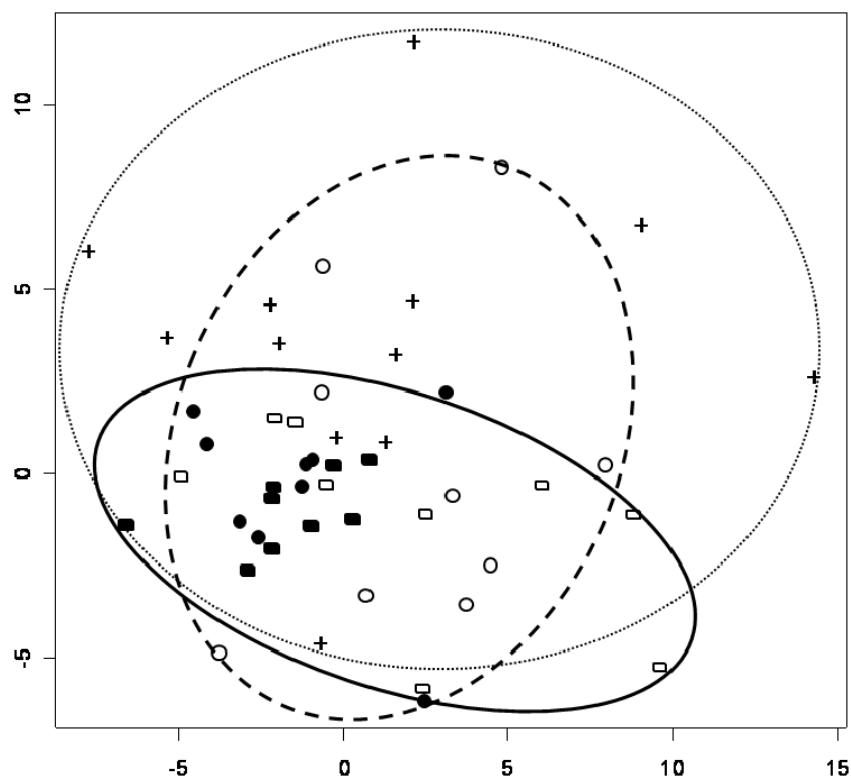
<sup>a</sup> RMSE: root mean square error

<sup>b</sup> Simpson index modified (Michelland et al., 2009a)

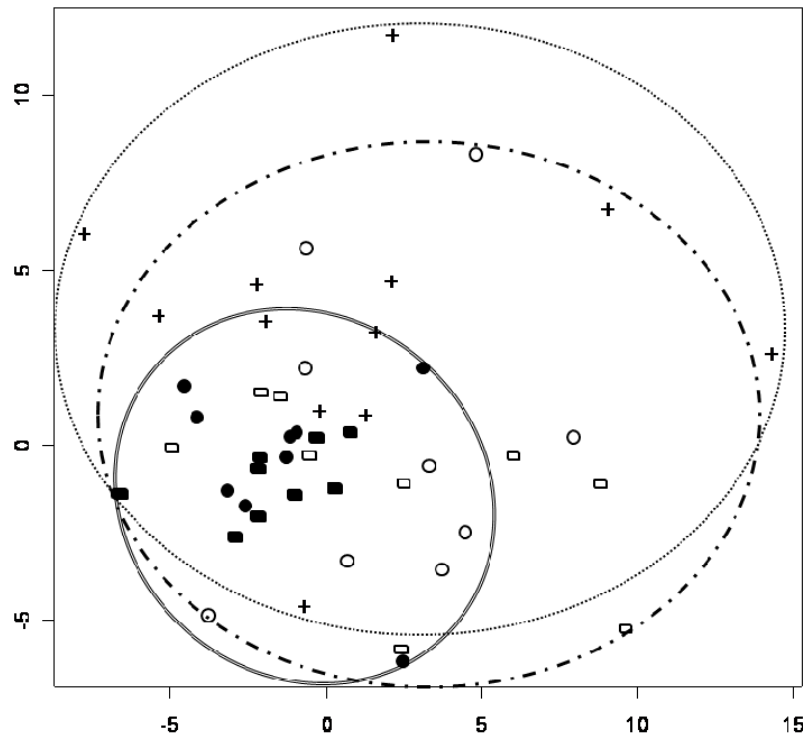


#### IV.D. CAECAL BACTERIAL COMMUNITY: BACTERIAL QUANTITY AND COMMUNITY STRUCTURE AND DIVERSITY

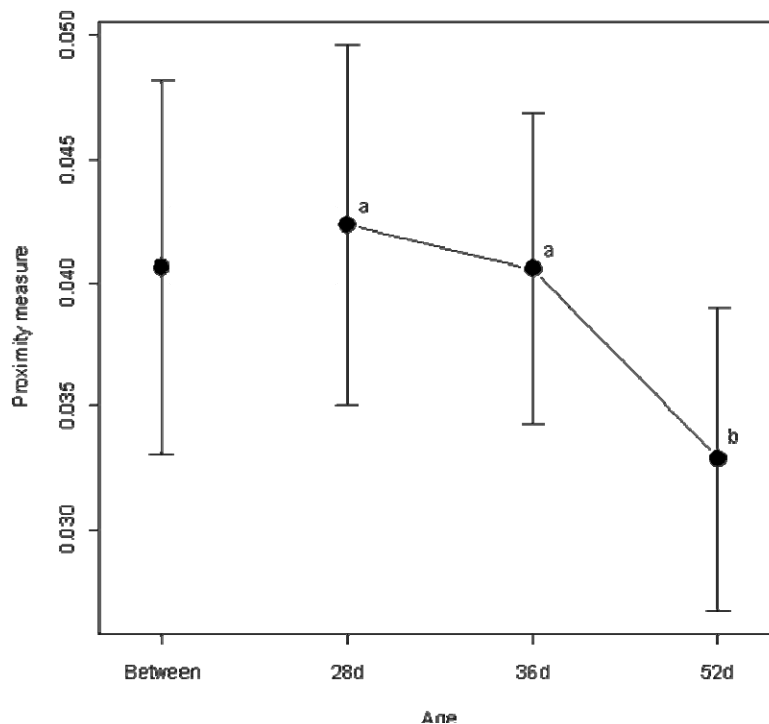
The number of bacterial 16S rDNA copies was already high ( $10^{12}$ ) 1 week after weaning and tended to fall slightly with age (Table 15). Bacterial community diversity, calculated as the Simpson diversity index, increased slightly with age ( $P=0.014$ ) but was not affected by intake level. As shown in Fig. 14, the bacterial community structure was also unaffected by feed intake level. Bacterial community profiles of both extreme age groups were significantly separated but overlapping (Fig. 15; ANOSIM-R 28 days vs. 52 days=0.34,  $P<0.001$ ) while the 36-day-old group was barely separated from the 28-day-old group (ANOSIM-R 28 days vs. 36 days=0.17,  $P=0.009$ ). Variability of CE-SSCP profiles within the IR75 group tended to be higher than within the AL group ( $P=0.076$ ). CE-SSCP profile variability within each age group decreased significantly with age ( $P<0.001$ , Fig. 16).



**Figure 14** : Effect of the intake level on the bacterial community structure approached by a two-dimensional nMDS plot (stress = 0.183) of the 48 CE-SSCP profiles  
 + for the 28-day-old rabbits; o and □ for the 36-day-old rabbits; ● and ■ for the 52-day-old rabbits; □ and ■ for AL rabbits; o and ● for IR75 rabbits CE-SSCP profiles. Clustering of the CE-SSCP profiles with dotted line, continuous line and dashed line respectively for 28d, AL and IR75 individuals.



**Figure 15** : Effect of the age on the bacterial community structure approached by a two-dimensional nMDS plot (stress = 0.183) of the 48 CE-SSCP profiles. + for the 28-day-old rabbits; o and □ for the 36-day-old rabbits; ● and ■ for the 52-day-old rabbits; □ and ■ for AL rabbits, o and ● for IR75 rabbits CE-SSCP profiles. Clustering of the CE-SSCP profiles with dotted line, dash-dotted line and double line respectively for 28, 36 and 52 days old individuals.



**Figure 16** : Between and within group variability of the CE-SSCP profiles according to age (mean  $\pm$  standard deviation; n=12 rabbits for the 28d. group and n=18 for the 36d and 52d groups).

The mean having a common letter are not different at the level  $P=0.05$ .

## V. DISCUSSION

### V.A. FEED INTAKE PATTERN, GROWTH AND DIGESTIVE HEALTH OF GROWING RABBITS

Over the whole experiment, the food intake for IR75 rabbits agreed reasonably well with that initially planned (72 vs. 75% of AL). A growth reduction of 24% was observed, in agreement with the large scale study of Gidenne et al. (2009a). However, this relative reduction is not always observed, since Gidenne et al. (2009b) found only a 16% growth reduction for a 25% intake limitation. This later observation might result from an improvement of the digestive efficiency. Two large scale studies demonstrated the favourable impact of a short-term intake limitation on the incidence of digestive troubles (Gidenne et al., 2009a,b). Our results agreed with these observations, although the limited number of animals used here was insufficient to give a significant result.

### V.B. MATURATION OF THE GUT

In the present study, we developed an original approach combining parameters of the digestive maturation of both the small intestine and the large one, with a comprehensive assessment of the bacterial caecal ecosystem, associating measurements of the biotope and of the microbiota characteristics using molecular methods. We found that ileal *villus* height and area and crypt depth increased after weaning, as described by Gallois et al. (2005).

The post-weaning maturation of the ileal histology is generally related to an increase of digestive enzyme activities. However, we did not find any further maturation in the activity of ileal maltase activity, contrary to previous studies (Gidenne et al., 2007; Debray et al., 2003), possibly because we focused on too short a period (16 days).

Usually, the biotope of a digestive ecosystem is studied through physic-chemical criteria, resulting from microbial activity (pH, VFA concentrations). But recent studies also included the oxydo-reductive status, by measuring the redox potential (Marden et al., 2005), since it could affect the structure and activity of the bacterial community. The caecal redox status is barely documented in the rabbit, since the technology for caecal Eh measurement was only recently developed by Kimse et al. (2009). They reported a mean caecal Eh ranging between -200 and -220 mV for the adult, indicating a strongly anaerobic medium. For the young rabbit, we found a similar value (-215 mV), with a slight effect of age (36 vs. 52 days) decreasing the Eh.

Since we centred the sampling time within the high fermentative activity period (4 to 6 h after feeding), we measured a relatively high caecal concentration of total VFA (mean 126 mmol/L), without any changes between 36 and 52 days. The caecal fermentation profile is particular in the rabbit, with a higher proportion of butyrate compared to propionate, leading to a C3/C4 ratio of about 0.5. We confirmed that this ratio and the ammonia concentration decreased after weaning (Bellier et al., 1995; Piattoni et al., 1995; Jehl and Gidenne, 1996).

The effect of age on the rabbit caecal microbial community was studied using culture methods, and Gouet and Fonty (1979) first described microbiota changes between birth and 6 weeks of age: from facultative bacteria (at birth) to a functional ecosystem mainly containing strictly anaerobic species. We provided here original data on the caecal microbiota characteristics, such as diversity and structure, obtained using molecular tools. We observed a slight rise in diversity together with a decrease in the variability of the structure between 5 and 7 weeks of age. The number of total bacteria was similar 1 or 3 weeks after weaning, which was consistent with the data obtained with culture technique (Padilha et al., 1995). The number of total anaerobic bacteria in the cæcum tended to be constant after weaning (Gouet and Fonty, 1979; Padilha et al., 1995).

#### V.C. IMPACT OF A SHORT-TERM FEED INTAKE LIMITATION ON THE POST-WEANING DIGESTIVE PHYSIOLOGY

Intake restriction obviously increases the appetite, since the young rabbits ate their ration in 6 to 10 h instead of 24 h. Accordingly, the flow of digesta in the stomach is rather high just after the feed distribution. We found in both stomach parts a lower pH for restricted animals compared to control ones, as described by Gidenne and Feugier (2009). This decrease in pH is probably transitory and might be related to a dilution of secreted gastric acidity because of the large meal eaten by restricted animals in a reduced time.

##### V.C.1. Short-term feed intake restriction and small intestine physiology

The effect of the feed quantity ingested on the intestinal histometry is not documented in the young rabbit. The three-week intake limitation applied here did not affect the morphometric development of the ileal mucosa. Conversely, the quality of the feed and more particularly the dietary fibre concentration, increased the *villus* height to crypt depth ratio (Chao and Li, 2008), or else simply modified the ileal crypt depth (Chiou et al., 1994). Thus, the ileal histometry seemed more affected by the food quality than by the intake level. Also the

variations in the enzyme substrate availability related to differences in feed composition modify the level of the digestive intestinal enzymes produced (Corring, 1980). In addition to feed quality, the intake restriction induced a rise in sucrase, amylase and lipase activities in broilers (Pinheiro et al., 2004). However in our study, ileal maltase activity was not affected by the intake level. The consequences of a reduction in feed intake may depend on the sampling delay after intake, on animal species or on the digestive enzyme considered.

#### V.C.2. Short-term feed intake restriction and caecal ecosystem

The intake limitation seemed not to greatly influence the physico-chemical parameters (pH, VFA) of the caecal biotope, although the redox potential was slightly reduced. In contrast, Gidenne and Feugier (2009) reported a lower caecal pH in restricted rabbits, but probably because sampling time was not synchronized with the digestion rhythms of freely fed rabbits. An increase of the voluntary feed intake level of the does (obtained through the size of the litters) fed a diet without antibiotics decreased the caecal microbiota diversity (Abecia et al., 2007). However, a modulation of the voluntary feed intake is rather different from a restriction of the intake, and after 16 days of restriction we did not observe any change in fattening rabbits of caecal biodiversity of the bacterial community. Similarly, the intake level had no significant effect on the number of bacterial 16S rDNA copies per gram of caecum content. The lack of influence of the feed intake level on the bacterial community structure can be due to both the relatively constant composition of the material entering the caecum located at the end of the digestive tract and the buffering capacity of the caecal content, as suggested by Michelland et al. (in press). However, our approach to the bacterial community diversity and structure through a CE-SSCP profiles analysis took the major bacterial populations into account. We cannot exclude the possibility that some specific bacteria, or the ratio of bacterial phylotypes, were modified by the feeding strategy, leading to a greater stability of the microbiota or a better resistance to digestive troubles. For instance, some prebiotic strategies aimed at stimulating the growth or activity of some specific bacteria more implicated in the digestive health (Gibson and Roberfroid, 1995). More targeted analyses of *Archaea* or of some predominant bacteria species of the caecal microbiota, such as *Firmicutes* or *Bacteroidetes*, could reveal changes that were not addressed by our fingerprint approach.

## VI. CONCLUSION

The maturation of the gut in the young rabbit seemed largely developed 1 week after weaning, although some parameters still evolved, such as stomach pH, ileal morphometry, bacterial diversity or quality of the caecal fermentation. A short-term limitation of the intake seemed not to delay or accelerate the maturation of the small intestine, or of the whole bacterial communities in the cæcum. Therefore, it would be of considerable interest to supplement our study with parameters quantifying the main bacterial phyla in the cæcum. Besides, addressing the immunological status of the gut will also be useful to elicit the mechanisms underlying the digestive health improvement obtained with short-term intake limitation.

## VII. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Andre Lapanouse, Patrick Aymard, Jacques De Dapper and Jean De Dapper for their technical assistance in animal care (INRA Toulouse, UMR 1289 Tandem). Also Carole Bannelier, Laurent Cauquil, Beatrice Gabinaud, Rory Michelland, Muriel Segura and Veronique Tartie for their help in sampling and biochemical analyses (INRA Toulouse, UMR 1289 Tandem). The work of the staff at the Centre de Ressources, Genotypage et Sequencage of INRA Toulouse is gratefully considered.

## VIII. REFERENCES

- Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J., Lobley, G.E., McEwan, N.R., 2007. The effect of medicated diets and level of feeding on caecal microbiota of lactating rabbit does. *J. Appl. Microbiol.* 103, 787-793.
- Alstin, F., Nilsson, M., 1990. The Soxtec(R) hydrolysis system improves the official methods for determining total fat content. *Ind. Aliment. Agric.* 107, 1271-1274.
- Bellier, R., Gidenne, T., Vernay, M., Colin, M., 1995. In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *J. Anim. Sci.* 73, 128-135.
- Chao, H.Y., Li, F.C., 2008. Effect of level of fibre on performance and digestion traits in growing rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 279-291.
- Chiou, P.W.S., Yu, B., Lin, C., 1994. Effect of different components of dietary fiber on the intestinal morphology of domestic rabbits. *Comp. Biochem. Physiol. A* 108, 629-638.
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Aust. J. Ecol.* 18, 117-143.

- Corring, T., 1980. The adaptation of digestive enzymes to the diet: its physiological significance. *Reprod. Nutr. Dev.* 20, 1217-1235.
- Dahlqvist, A., 1962. A method for the determination of amylase in intestinal content. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 14, 145-151.
- Debray, L., Le Huerou-Luron, I., Gidenne, T., 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. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135, 443-455.
- Delbès, C., Godon, J.J., Moletta, R., 1998. 16S rDNA sequence diversity of a culture accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Anaerobe* 4, 267-275.
- EGRAN, 2001. Technical note: attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. *World Rabbit Sci.* 9, 57-64.
- European Union, 2003. Protection of Animals used for Experimental Purposes. Directive 86/609/EEC of 24th Novembre 1986, amended 16th Septembre 2003. Official Journal of European Union.
- Gallois, M., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J.P., 2005. An early stimulation of solid feed intake slightly influences the morphological gut maturation in the rabbit. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 109-122.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401-1412.
- Gidenne, T., 2000. Recent advances in rabbit nutrition: emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Sci.* 8, 23-32.
- Gidenne, T., Feugier, A., 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal* 3, 501-508.
- Gidenne, T., Lebas, F., 2006. Feeding Behaviour in Rabbits. In: Bels, V. (Ed.), *Feeding in Domestic Vertebrates: from Structure to Behaviour*, pp. 179-194.
- Gidenne, T., Bellier, R., Bouyssou, T., 1993. An improved technique for cecal cannulation in the rabbit - effect of sampling time after feeding on cecal VFA pattern. *Ann. Zootech.* 42, 163.
- Gidenne, T., Debray, L., Fortun-Lamothe, L., 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. *Comp. Biochem. Physiol. A* 148, 834-844.
- Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S., 2009a. Feed restriction strategy in the growing

- rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3, 509-515.
- Gidenne, T., Murr, S., Travel, A., Corrent, E., Foubert, C., Bebin, K., Mevel, L., Rebours, G., Renouf, B., 2009b. Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau. Premiers resultats d'une etude concertee du reseau GEC. *Cuniculture Mag.* 36, 65-72.
- Goodlad, R.A., Levi, S., Lee, C.Y., Mandir, N., Hodgson, H., Wright, N.A., 1991. Morphometry and cell proliferation in endoscopic biopsies: evaluation of a technique. *Gastroenterology* 101, 1235-1241.
- Gouet, P., Fonty, G., 1979. Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 19, 553-566.
- Jehl, N., Gidenne, T., 1996. Replacement of starch by digestible fibre in feed for the growing rabbit. 2. Consequences for microbial activity in the cæcum and on incidence of digestive disorders. *Anim. Feed Sci. Technol.* 61, 193-204.
- Kimse, M., Monteils, V., Bayourthe, C., Gidenne, T., 2009. A new method to measure the redox potential (Eh) in rabbit cæcum: relationship with pH and fermentation pattern. *World Rabbit Sci.* 17, 63-70.
- Kirkwood, T.B.L., Shanley, D.P., 2005. Food restriction, evolution and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 1011-1016.
- Lalles, J.P., Boudry, G., Favier, C., Le Floc'h, N., Luron, I., Montagne, L., Oswald, I.P., Pie, S., Piel, C., Seve, B., 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53, 301-316.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenes, J.P., Godon, J.J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ. Microbiol.* 8, 720-731.
- Marden, J.P., Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R., 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88, 277-281.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 1359-1363.
- Michelland, R.J., Combes, S., Monteils, V., Cauquil, L., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., in press. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe*, Corrected Proof. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.05.002.



- Monteils, V., Cauquil, L., Combes, S., Godon, J.J., Gidenne, T., 2008. Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit cæcum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 620-629.
- Nir, I., Nitsan, Z., Dunnington, E.A., Siegel, P.B., 1996. Aspects of food intake restriction in young domestic fowl: metabolic and genetic considerations. *Worlds Poult. Sci. J.* 52, 261-266.
- Nordstrom, D.K., 1977. Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41, 1835-1841.
- Ocak, N., Sivri, F., 2008. Liver colourations as well as performance and digestive tract characteristics of broilers may change as influenced by stage and schedule of feed restriction. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92, 546-553.
- Padilha, M.T.S., Licois, D., Gidenne, T., Carre, B., Fonty, G., 1995. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reprod. Nutr. Dev.* 35, 375-386.
- Piattoni, F., Maertens, L., Demeyer, D., 1995. Age dependent variation of caecal contents composition of young rabbits. *Arch. Anim. Nutr.* 48, 347-355.
- Pico, C., Oliver, P., Sanchez, J., Palou, A., 2003. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. *Br. J. Nutr.* 90, 735-741.
- Pinheiro, D.F., Cruz, V.C., Sartori, J.R., Vicentini Paulino, M.L.M., 2004. Effect of early feed restriction and enzyme supplementation on digestive enzyme activities in broilers. *Poult. Sci.* 83, 1544-1550.
- R development Core Team, 2007. R: a Language and Environment for Statistical Computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 3-900051-07-0. URL: <http://www.R-project.org>.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 142-160.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F., 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4605-4614.
- 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.
- Verdouw, H., Van Echteld, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1977. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399-402.

- Zubair, A.K., Leeson, S., 1994. Effect of early feed restriction and realimentation on heat production and changes in sizes of digestive organs of male broilers. *Poult. Sci.* 73, 529–538.
- Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.J., 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ. Microbiol.* 2, 69–78.



## **PARTIE 2 -L'EFFICACITE DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE CONTRE LES TROUBLES DIGESTIFS PROVIENT-ELLE D'UN EFFET "QUANTITATIF" (INGESTION REDUITE), OU D'UN EFFET DU JEUNE INDUIT ?**

---

En parallèle de l'étude précédente centrée sur une approche physiologique « multicritères », nous avons choisi d'analyser l'origine de l'effet favorable, en distinguant l'influence d'une ingestion moindre, de celle d'une période de jeûne. En effet, une distribution unique d'aliment, en quantité restreinte, induit une période de jeûne pouvant dépasser 12 heures (Gidenne et al., 2009b) et qui est concomitante à une vacuité intestinale. En revanche, un lapin nourri à volonté effectue un grand nombre de repas (une trentaine) complété par l'ingestion de cæcotrophes (Prud'hon et al., 1972). Au cours de la journée, l'estomac n'est alors jamais en état de vacuité (Gidenne, 1987).

Ainsi, notre travail a pour but de déterminer i) si l'efficacité de la restriction alimentaire est liée seulement à la réduction de la quantité d'aliment ingérée ou à la période de jeûne et ii) si la "seule" modification du comportement alimentaire des lapins soumis à restriction pourrait expliquer une amélioration de l'état sanitaire des animaux.



## **CONTROLE DU COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DU JEUNE LAPIN : INFLUENCE DE LA RESTRICTION ET DE LA FREQUENCE DE DISTRIBUTION DE L'ALIMENT SUR LA PHYSIOLOGY DIGESTIVE, LA SANTE ET LA CROISSANCE**

---

**Article en préparation / Revue choisie pour soumission : Journal of Animal Science**

M.H. Martignon, S. Combes, T. Gidenne

Mots clés : comportement alimentaire, restriction alimentaire, fréquence de distribution de l'aliment, lapins

### Résumé

La limitation de l'ingestion a été proposée comme un outil efficace pour réduire les troubles digestifs des jeunes lapereaux. Cette étude avait pour objectif de déterminer si l'effet positif de la restriction alimentaire sur l'état sanitaire du lapin est dû à la réduction de la quantité d'aliment ingéré ou aux heures de jeûne induites par cette stratégie d'alimentation. Au sevrage (28 jours), les animaux ont été divisés en 4 lots selon 2 facteurs : le niveau d'ingestion (ad libitum vs. -25% de l'ingéré volontaire) et la fréquence de distribution de l'aliment (1 vs. 13 distributions). A 52 jours, tous les animaux ont été alimentés à volonté, avec le même aliment. Trois essais ont été mis en place afin de déterminer la croissance, l'ingestion, l'indice de consommation et l'état sanitaire (essai 1, n=320 lapins), les profils d'excrétion fécale et d'ingestion (essai 2, n=200 lapins), l'excrétion de cæcotrophes, la digestibilité, l'activité, la structure et la diversité de la communauté bactérienne cæcale (essai 3, n=32 lapins). A 36 jours d'âge, les lapins restreints alimentés une fois par jour consomment environ 44 % de l'aliment en 2 h, 65 % en 4 h et plus de 95 % en 7 h. Une distribution de l'aliment fragmentée sur 24 h tendrait à diminuer de 43 % le taux de morbidité mesuré pour les 14 premiers jours de restriction ( $P=0,06$ ). Cependant, en considérant toute la durée de l'expérience, la restriction alimentaire n'a pas amélioré significativement l'état sanitaire des lapins, mais a augmenté l'indice de consommation ( $P<0,001$ ). La digestibilité de la totalité des nutriments a été améliorée pour les animaux restreints recevant une distribution quotidienne par rapport au lot témoin (protéines +4.5,  $P=0,003$ , énergie +5.3,  $P<0,001$ , ADF +9.7,  $P<0,001$ ). Une distribution fractionnée est apparue altérer la digestibilité de la cellulose, quel que soit le niveau d'ingestion considéré ( $P<0,001$ ). La production d'AGV, indicateur de l'activité de la

communauté bactérienne cœcale, a montré une augmentation de l'activité fibrolytique pour les animaux restreints ( $P=0,001$ ). Toutefois, ni la structure, ni la diversité de la communauté bactérienne cœcale n'a été modifiée par les facteurs étudiés. Pour conclure, cette étude a permis de décrire pour la première fois les profils d'ingestion et d'excrétion de lapins soumis à une restriction de l'ingestion. Finalement, l'effet positif de la restriction pourrait être lié aux heures de jeûne induites par la stratégie d'alimentation, au moins en ce qui concerne la digestibilité des nutriments, mais pas pour l'amélioration des performances de croissance. Cependant, le bon état sanitaire dans animaux étudiés ne nous permet pas de conclure quand à l'action bénéfique de la restriction sur la santé, bien que une distribution fragmentée tout au long de la journée tend à réduire la morbidité des lapins.

**CONTROL OF FEEDING BEHAVIOUR IN THE YOUNG RABBIT:  
IMPACT OF RESTRICTION AND FREQUENCY OF FEED DELIVERY  
ON DIGESTIVE PHYSIOLOGY, HEALTH AND GROWTH**

---

**Article in preparation / Journal chosen for submission: Journal of Animal Science**

M.H. Martignon,\* † ‡ § S. Combes,\* † ‡ T. Gidenne,\* † ‡<sup>2</sup>

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

†Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

‡ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

§Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Alimentation Animale, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

Running head: Control of feeding behaviour in the young rabbit

Key words: feeding behaviour, feeding restriction, frequency of feed delivery, rabbits.





## I. ABSTRACT

Feed intake limitation has been proposed as an effective tool to reduced digestive troubles in young rabbits. This study investigated whether the positive effect of feed restriction on rabbit digestive health status was due to decrease of feed quantity ingested or to hours of fast induced by this feeding strategy. At weaning (28 days) animals were split into 4 groups considering 2 factors: feed intake level (*ad libitum* vs- 25 % of voluntary feed intake) and frequency of feed delivery (1 vs. 13 feed supplies). At 52 d all the animals were fed freely the same diet. Three trials were performed to determine, ADG, ADFI, G:F and health status (trial 1, n=320 rabbits), faecal excretion and feed intake patterns (trial 2, n=200 rabbits), caecotrophy excretion, caecal bacterial community activity, structure and diversity (trial 3, n=32 rabbits). At 36 days old, restricted rabbits fed once a day, consumed around 44 % of the food in 2 h, 65 % in 4 h and more than 95 % in 7 h. A fragmented feed delivery over 24 h tended to decrease of 43 % morbidity rate measured for the 14 first days of restriction ( $P=0.06$ ). However throughout the experiment feed restriction did not significantly improved rabbits health status, but increased G:F ( $P<0.001$ ). Digestibility of all nutrients was enhanced for restricted feeding animals supplied once a day compared to control group, (proteins +4.5,  $P=0.003$ , energy +5.3,  $P<0.001$ , ADF +9.7,  $P<0.001$ ). A fractioned feed delivery appeared damaging to cellulose digestibility whatever feeding level considered ( $P<0.001$ ). The VFA production, indicator of the activity of the caecal bacterial community, showed an increase of the fibrolytic activity for restrictive fed animals ( $P=0.001$ ). Nevertheless neither structure nor diversity of caecal bacterial community was modified by both factors studied. To conclude this study allowed to describe for the first time the ingestion and excretion patterns of rabbits submitted to feed intake limitation. Finally, the positive effect of restriction might be related to hours of the fast induced by this feeding strategy at least for nutrient digestibility but not for growth performance improvement. However due to good sanitary status of the experimental rabbits, it was not possible to conclude on the benefit action of restriction on health although fragmented delivery along the day tends to decrease rabbits morbidity.



## II. INTRODUCTION

Strategies to control the feed intake in animals have been mainly explored in the young, for improving the meat and carcass quality, the digestive efficiency (Lebas 1979; Ledin 1984; Diaz Arca et al. 1999) or energy metabolism (Lovatto et al. 2006), and scarcely to favour the health status such as the resistance to digestive disease (Rantzer et al. 1996). For instance, the favourable impact of the intake limitation on the digestive health of the growing rabbit was recently demonstrated (Gidenne et al. 2009a) with a large-scale experimental design. Presently, intake limitation strategies are commonly used by French rabbit breeders, not only to improve the resistance to specific pathology, such as Epizootic Rabbit Enteropathy (Boisot et al. 2003; Larour et al. 2004), but also to increase feed efficiency and thus to reduce feed costs. However, restricting feed intake might be detrimental for animal welfare, since their feeding behaviour is largely modified, even if to our knowledge literature provides no study on this point. In addition, the physiological mechanisms underlying the positive impact of short term feed restriction remained to be clarified, although some recent studies reported a longer rate of passage (Gidenne et al. 2009b), but no changes in intestinal morphology or enzymatic activity (Martignon et al. 2010).

Our purpose is thus to analyse the effect of feed intake pattern on digestive physiology of restricted animal, to investigate if the positive effect of a restriction on digestive troubles originated from a strict impact of the quantity of feed consumed, or from the change of the intake pattern leading to sharp variations in nutrients supply.

Therefore we designed a 2X2 bifactorial experiment to independently analyse the effect of reducing the intake level (*ad libitum* vs. 75% of *ad libitum*) and that of the intake behaviour (1 vs. 13 feed deliveries to simulate a conventional feeding pattern).

## III. MATERIALS AND METHODS

### III.A. EXPERIMENTAL DESIGNS AND ANIMALS

This study was organised in three trials to determine: growth, intake, feed efficiency and health status (trial 1), feed intake and faecal excretion patterns (trial 2), caecotrophy pattern caecal bacterial community activity, structure and diversity (trial 3). For all experiments, rabbits (New Zealand white x Californian), were weaned at 28 d old and allotted to four groups (AL1, R1, AL13 and R13) arranged in a 2X2 bifactorial experiment design (till 52 d old): intake level ("AL" = *ad libitum* vs. "R" restricted at 75% of AL) and frequency of feed

delivery "FDF" (1 vs. 13 feed deliveries over 24 h). The R1 group was fed with one delivery per day at around 1100 h, and both groups R13 and AL13 were fed with 8 deliveries during night (see the detailed deliveries schedule on figures 17.A and 17.B) and 5 deliveries during light period to simulate a natural feed intake pattern of *ad libitum* rabbits (Gidenne et al. 2006). To impose the rhythm of 13 deliveries, particularly for the rabbits fed *ad libitum*, the intake level of AL13 group was adjusted 5% lower than AL one. The R1, R13 and AL13 were fed with a quantity of feed adjusted each three or four days according to the mean intake of AL1 group. Water was freely available for all groups throughout the experiments.

From 53 to 70 d old, all animals were fed freely the same diet (Table 16) formulated to cover the nutritional requirements of the growing rabbit (Gidenne 2000). The breeding unit was kept at a temperature of 20°C ( $\pm$  2°C) and under a 0200 h to 1200 h lighting schedule alternated with 14 h of night. This lighting schedule was adjusted to synchronize the digestion rhythm of AL group, which eat more particularly during the night (Gidenne et al. 2006), with the digestion rhythm of IR75 animals directly depending on the feed delivery time (around 1100 h). Animals were handled according to the care of animals in experimentation, in agreement with European legislation (European Union 2003).

**Tableau 16** : Ingredients and chemical composition of the experimental diet

| <i>Ingredients, g/kg (as-fed)</i>          |     | <i>Analysed composition, g/kg<sup>-</sup> of DM</i>               |       |
|--------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------------------------|-------|
| Wheat bran                                 | 215 | DM                                                                | 905   |
| Dehydrated alfalfa                         | 210 | Ash                                                               | 91    |
| Sunflower oil                              | 200 | CP                                                                | 179   |
| Wheat                                      | 94  | NDF                                                               | 401   |
| Barley                                     | 89  | ADF                                                               | 228   |
| Wheat straw                                | 55  | ADL                                                               | 61    |
| Dehydrated sugar beet pulp                 | 50  | <i>Calculated composition,<sup>2</sup> g/kg<sup>-</sup> of DM</i> |       |
| Sucrose                                    | 40  | Starch                                                            | 140.4 |
| Soybean oil                                | 25  | Lysine                                                            | 7.2   |
| Calcium carbonate                          | 10  | Methionine                                                        | 3.8   |
| Vitamins and minerals mixture <sup>a</sup> | 5   | Methionine+cysteine                                               | 6.5   |
| Salt                                       | 5   | Calcium                                                           | 9.8   |
| L-lysine                                   | 1   | Phosphorus                                                        | 5.5   |
| DL-methionine                              | 1   |                                                                   |       |

<sup>1</sup> Vitamins: A: 1,500,000 UI/kg; D<sub>3</sub>: 200,000 UI/kg; E: 3,000 mg/kg; B<sub>1</sub>: 200 mg/kg; K<sub>3</sub>: 50 mg/kg and oligo elements: Cu<sup>2+</sup>: 800 mg/kg; Fe<sup>2+</sup>: 8,000 mg/kg; Zn<sup>2+</sup>: 20,000 mg/kg; Mn<sup>2+</sup>: 4,000 mg/kg and coccidiostatic: robenidine.

<sup>2</sup> Calculated values according to Sauvante et al. (2004)

### III. B. INTAKE LEVEL, GROWTH AND HEALTH STATUS (TRIAL 1)

Growth performances were measured during two repetitions of the trial (with a three weeks interval) counting first 200 rabbits and secondly 120 animals, equally split in the four groups and collectively caged (five rabbits per cage, 46x70x33 cm). Feed intake was measured daily, except for control group (AL1: three times a week). Morbidity and mortality were checked daily and health risk index (morbidity + mortality) was calculated, while BW was measured twice a week.

### III. C. FEED INTAKE AND FAECAL EXCRETION PATTERNS (TRIAL 2)

At 36 d and 46 d old, the intake pattern was measured over a 24 h period for the four groups (200 animals collectively caged). At each feed supply time (for AL13 and R13 groups) the refusal was weighed and feed intake calculated.

In parallel, at 37 d and 47 d old, the hard faeces excretion pattern was measured every 2 h over a 24 h period, on 20 rabbits kept in individual metabolism cages (50x40x33 cm) equipped with an automatic faecal collector (Gidenne et al. 1997). The number of rabbits studied per group was determined taking account of the variability of faecal excretion between individuals within a group (5, 6, 3 and 6 rabbits respectively for the AL1, AL13, R1 and R13 groups). Each collect of hard faeces was dried (24 h at 103°C) then weighed.

### III. D. MEASUREMENTS OF GROWTH, FEED INTAKE, DIGESTIBILITY AND RATIO HARD FAECES:SOFT FAECES (TRIAL 3)

Digestibility of diet (caecotrophy was not prevented) was measured from 41 to 47 d old according to Perez et al. (1995) on four groups of 8 rabbits, caged individually in metabolism cages (50x40x33 cm) from weaning (28 d). Then at 48 d soft faeces were collected, for 16 h (1700 h – 0900 h) on rabbits equipped with a rigid plastic collar (Gidenne et al. 2000). Soft faeces were dried and weighed. The ratio soft faeces:hard faeces and soft faeces:DMI were calculated.

### III. E. CHEMICAL ANALYSES OF FEED AND HARD FAECES

The following chemical analyses were carried out on feed (EGRAN 2001) and faeces: DM (24 h at 103 °C), ash (5 h at 550 °C), fibrous fractions (NDF, ADF and ADL) according to the sequential method of Van Soest et al. (1991) with an amyolytic pre-treatment, and crude fat

according to the method described by Alstin and Nilsson (1990). Nitrogen was determined according to the DUMAS combustion method using the Leco auto-analyser (model FP-428, Leco Corporation, St Joseph, MI, USA) and converted to CP.

### III.F. SAMPLING PROCEDURE, PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF CAECUM AND STOMACH (TRIAL 3)

Sampling time was chosen between 1600 h and 2000 h, during the phase of the active digestion in the caeco-colic segments, that is meanly 5 h after the feed delivery (for R1 group) as shown by Gidenne et al. (1993). At 49, 50 and 51 d of life, 12 rabbits of each group (chosen healthy and in the mean weight of the group) were first anesthetized using an intra muscular injection of ketamine (Imalgène™, Merial, Lyon, France; 20 to 25 mg/kg BW), then euthanized with an intra cardiac injection of embutramide (T61™, Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany; 0.3 mL/kg BW). pH was measured in the fundus and the antrum of the stomach, and in the caecum using a glass pH “Unitrode” electrode (Pt1000/B/2/3MKCl; Metrohm™) connected to a digital pH meter (Metrohm model 713 CH-9101, Herisau, Switzerland). Thereafter full caecum was quickly removed and weighed, then emptied and weighed. DM of caecal content was determined by heating at 103°C during 24 h.

### III.G. FIBROLYTIC ACTIVITY OF CAECAL BACTERIA

Portions of caecal content stored at -80 °C were thawed and frozen three times to weaken cell membranes (Martin et al. 1995). Microorganism cells were then disrupted under a CO<sub>2</sub> stream by ultrasonic disintegration at 4 °C for 30 s. These 2 latter steps were repeated 3 times more. Finally, homogenates were centrifuged (15 min at 20,000×g and 4 °C) and supernatants containing released soluble proteins were stored at -80 °C under a CO<sub>2</sub> headspace (Gidenne et al. 2002). Fibrolytic activity of bacteria was determined with measurements of polysaccharidase activities (carboxymethylcellulase, xylanase and pectinase). Amount of reducing sugars released from purified substrates (carboxymethylcellulose, Sigma C5678; birchwood-xylan, Sigma-Aldrich X1500; and citrus-pectins, Sigma P9135) were measured after incubation of 0.1 mL of supernatants with 1 mL of substrate for 60 min at 39 °C and heating at 100 °C for 5 min. Reducing sugars were quantified with a spectrophotometer, using the p-hydroxybenzoic acid and hydrazide method (Lever 1977). Enzymatic activity was expressed as μmol of reducing sugars released in 1 h by enzymes extracted from 1 g of digesta DM basis.

### III.H. CAECAL FERMENTATIVE ACTIVITY

Two samples of 1 g of fresh caecal content were diluted in storage solutions: one in HgCl<sub>2</sub> (2 mL, 2% w/v) and one in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3 mL, 2% w/v), for further analysis of VFA and ammonia-nitrogen (NH<sub>3</sub>-N), respectively. These caecal samples were stored at -20 °C until measurements were made. NH<sub>3</sub>-N concentration was measured with the procedure of Verdouw et al. (1977) using an auto-analyser (Technicon, Domont, France). VFA concentrations were determined by gas chromatography (CP9000, Chrompack, Middelburg, the Netherlands). After thawing, the stored samples were centrifuged for 20 min at 7700×g. One mL of the supernatant was mixed with 0.2 mL of HPO<sub>3</sub> (25% w/v). This mixture was centrifuged at 20,000×g for 15 min, and 1 mL of the supernatant was transferred in a glass vial with extra 50 µL of an internal standard: 4-methyl valeric acid at 1%. 0.5 µL of this last mixture was injected into a gas chromatograph. The total quantity of VFA represented the sum of four components: C2 acetic acid, C3 propionic acid, C4 butyric acid, C5 valeric acid and was expressed in mM of water of the caecal content.

### III.I. ANALYSIS OF CAECAL BACTERIAL COMMUNITY

DNA was extracted using QIAamp™ DNA Stool Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) from about 200 mg of sample, according to the manufacturer's instructions.

Then genes coding for V3 region of 16S rRNA were amplified by PCR with 30 cycles (94 °C for 30 s, 61 °C for 30 s, 72 °C for 30 s) using primers w49 and 5'-6Fam-labeled w34 (Delbès et al. 1998; Zumstein et al. 2000). The PCR amplification was performed in a total volume of 50 µl containing: 5 µl of PfuUltra™ II Fusion buffer, 25 µg of bovine serum albumin (New England Biolabs), 200 µM of dNTP mix, 200 nM of each primer, 0.25 U of Taq PfuUltra™ II Fusion (Stratagene) and 1 µl of 1/200 diluted DNA extracted from fresh caecal content (Michelland et al. 2010).

The caecal bacterial community structure and diversity were characterised using the CE-SSCP method. This is a capillary electrophoresis method based on heterogeneity of single-strand ribotype secondary structure providing different mobility through a non-denaturing gel. The result is a chromatogram of bacterial communities, where each peak corresponds to at least one operational taxonomic unit or ribotype, but more often to more than one (Loisel et al. 2006). One µl of amplified DNA was added to 7.8 µl of deionised formamide (Genescan, Applied Biosystem) and to 0.2 µl of size marker (5-Rox, GenescanHD400) (Michelland et al. 2010). Before capillary electrophoresis and laser detection, done with an ABI 3100 sequencer,



the mix previously described was denatured for 5 minutes at 95 °C followed by 5 minutes in ice.

The Simpson diversity index was estimated as previously described by Michelland et al. (2010). It summarized a complex community represented in a molecular fingerprint pattern by a single value by taking into account the number of species (number of peaks) and their relative abundance (area under each peak). The study of the structure of the bacterial communities involved the analysis of the size of the various peaks throughout the CE-SSCP profiles and was achieved using StatFingerprints (Michelland et al. 2009).

### III.J. STATISTICAL ANALYSIS

Categorical (morbidity, mortality and health risk index) and quantitative variables (daily mass gain, pH, VFA, *etc.*) were analyzed according to a model including two main effects: intake level and feed delivery frequency, and considering their interaction. All the parameters were also analyzed using a model with only one factor (groups) and four levels: AL1, AL13, R1, R13, to study the effect of each feeding strategy combining both effects previously described. Categorical variables were analyzed using the CATMOD procedure of SAS (SAS online guide), while quantitative one were analyzed using R software (version 2.7.2, R development Core Team, 2007). Differences were considered significant at  $P < 0.05$  and trends were discussed at  $P < 0.1$ . Feed restriction reduced intra-group variability of ADFI down to 0 in R1 and R13 groups thus the statistical analysis was performed only when it was pertinent. To study the structure of the bacterial community, we calculated the pairwise “Chisquare method” distances between the 44 CE-SSCP profiles. The “Chisquare method” calculated frequencies of distances between observed data and expected values. To explore this distance matrix, non-metric multidimensional scaling (nMDS) was performed using 10,000 random starts (Clarke 1993; Michelland et al. 2009). Variability of caecal bacterial community structure between feeding levels and age was measured using an analysis of similarity (ANOSIM) which return a p-value giving the significance of similarity and an ANOSIM-R giving the level of similarity (Ramette 2007). Variability within each group was assessed using pairwised “Chisquare method” distance calculation for within each group and tested by ANOVA and a TukeyHSD test for the intake level and the frequency of feed delivery (FDF in the tables) effects (Michelland et al. 2009).

## IV. RESULTS

## IV.A. GROWTH PERFORMANCES AND DIGESTIVE HEALTH

The intake limitation from 28 to 52 d was slightly over the restriction level initially planned (-30% vs. -25%), while AL13 group consumed about 5% less feed than control (AL1) as expected, to impose the rhythm of 13 deliveries per 24 h (Table 17). Accordingly, at 52 d the restricted rabbits weighted 16.5 % less (-310 g) than *ad libitum* rabbits ( $p < 0.001$ ), but G:F was improved by the restriction level (+5%). Once all the groups were fed *ad libitum* (from 53 d), ADFI of AL1 group was 12% higher than the 3 others groups, leading to a significant interaction among the two main factors. Restricted rabbits showed a high compensatory growth compared to AL groups (+20%), while high feed delivery frequency tended to also improve the ADG ( $P = 0.062$ ). Consequently restriction and 13 feed deliveries improved the G:F (+29% and +10%,  $P < 0.001$  respectively).

**Tableau 17** : Fattening performances of weanling rabbits, according to the intake level (AL, *ad libitum* or R, -25 % restricted intake) and the feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 1)

| Item                                       | Groups             |                    |                    |                    | SEM               | <i>P-value</i> <sup>1</sup> |                 |                 |
|--------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------|-----------------|
|                                            | AL1                | AL13               | R1                 | R13                |                   | Intake                      | FDF             | Inter.          |
| <i>Restriction period (28 to 52 d old)</i> |                    |                    |                    |                    |                   |                             |                 |                 |
| BW, 28 d old, g                            | 654                | 653                | 654                | 653                | 4.0               | 0.96                        | 0.93            | 0.99            |
| ADFI, g/d/rabbit <sup>2</sup>              | 120.4 <sup>b</sup> | 115.5 <sup>a</sup> | 83.0               | 84.5               | 0.83 <sup>4</sup> | ND <sup>5</sup>             | ND <sup>5</sup> | ND <sup>5</sup> |
| ADG, g/d/rabbit <sup>3</sup>               | 52.1 <sup>b</sup>  | 50.6 <sup>b</sup>  | 37.5 <sup>a</sup>  | 38.9 <sup>a</sup>  | 0.53              | <0.001                      | 0.93            | 0.039           |
| G:F <sup>2</sup>                           | 0.434 <sup>a</sup> | 0.441 <sup>a</sup> | 0.461 <sup>b</sup> | 0.460 <sup>b</sup> | 0.0025            | <0.001                      | 0.43            | 0.28            |
| <i>Ad libitum period (52 to 70 d old)</i>  |                    |                    |                    |                    |                   |                             |                 |                 |
| BW, 52 d old, g                            | 1874 <sup>b</sup>  | 1845 <sup>b</sup>  | 1532 <sup>a</sup>  | 1561 <sup>a</sup>  | 14.8              | <0.001                      | 0.99            | 0.20            |
| ADFI, g/d/rabbit <sup>2</sup>              | 192.1 <sup>b</sup> | 166.5 <sup>a</sup> | 163.8 <sup>a</sup> | 165.7 <sup>a</sup> | 3.04              | 0.010                       | 0.035           | 0.015           |
| ADG, g/d/rabbit                            | 42.1 <sup>a</sup>  | 42.2 <sup>a</sup>  | 49.3 <sup>b</sup>  | 53.1 <sup>b</sup>  | 0.59              | <0.001                      | 0.062           | 0.078           |
| G:F                                        | 0.225 <sup>a</sup> | 0.259 <sup>b</sup> | 0.303 <sup>c</sup> | 0.323 <sup>c</sup> | 0.0055            | <0.001                      | <0.001          | 0.19            |
| <i>Whole experiment (28 to 70 d old)</i>   |                    |                    |                    |                    |                   |                             |                 |                 |
| BW, 70 d old, g                            | 2661 <sup>c</sup>  | 2634 <sup>bc</sup> | 2457 <sup>a</sup>  | 2550 <sup>ab</sup> | 15.1              | <0.001                      | 0.25            | 0.038           |
| ADFI, g/d/rabbit <sup>2</sup>              | 152.5 <sup>c</sup> | 138.8 <sup>b</sup> | 118.9 <sup>a</sup> | 121.5 <sup>a</sup> | 2.13              | <0.001                      | 0.035           | 0.003           |
| ADG, g/d/rabbit                            | 47.7 <sup>c</sup>  | 47.0 <sup>bc</sup> | 42.9 <sup>a</sup>  | 45.2 <sup>b</sup>  | 0.30              | <0.001                      | 0.16            | 0.006           |
| G:F                                        | 0.317 <sup>a</sup> | 0.343 <sup>b</sup> | 0.365 <sup>c</sup> | 0.374 <sup>c</sup> | 0.0034            | <0.001                      | <0.001          | 0.042           |

<sup>1</sup>P levels for a bifactorial model, with effect of intake level (AL vs. R) and feed delivery frequency (1 vs. 13).

<sup>2</sup>n = 16 cages per group, G:F : ADG/ADFI

<sup>3</sup>n = 80 rabbits per group

<sup>4</sup>SEM calculated for AL1 and AL13 groups (only)

<sup>5</sup>ND: not determined,  $\sigma^2 = 0$

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)

Over the whole growth period, a significant interaction was detected between intake level and frequency of feed delivery for ADFI, ADG and G:F. For instance, a high feed delivery

frequency reduced ADFI only for *ad-libitum* rabbits ( $P < 0.05$ ) and without reduction of ADG, thus leading to a better G:F (+10%). In return, for restricted rabbits, a high feed delivery frequency increased significantly the ADFI and the ADG (+5%), but not the G:F. At 70d old, BW of AL1 and AL13 was similar, while that of R13 was 4% lower (-93g).

Relatively good sanitary status was observed throughout the trial, since the incidence of digestive troubles leading to mortality remained low (Table 18). Therefore, the effect of the intake level was not significant on mortality or morbidity rate. However, an increased feed delivery frequency tended ( $P = 0.057$ ) to decrease the morbidity rate (11.9 vs 19.4%) during the two weeks after weaning.

**Tableau 18** : Effect of the intake level (AL, *ad libitum* or R, -25 % restricted intake) and of the feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) on digestive health of the growing rabbits (Trial 1)

| Item                                              | Groups |       |      |      | P-value <sup>1</sup> |       |        |
|---------------------------------------------------|--------|-------|------|------|----------------------|-------|--------|
|                                                   | AL1    | AL13  | R1   | R13  | Intake               | FDF   | Inter. |
| <i>First period (28 to 52 d old)</i> <sup>2</sup> |        |       |      |      |                      |       |        |
| Morbidity, %                                      | 18.8   | 8.8   | 20.0 | 15.0 | 0.28                 | 0.057 | 0.41   |
| Mortality, %                                      | 5.0    | 6.3   | 2.5  | 5.0  | 0.39                 | 0.39  | 0.67   |
| Health risk index <sup>3</sup> , %                | 23.8   | 15.0  | 22.5 | 20.0 | 0.62                 | 0.20  | 0.46   |
| <i>Second period (52 to 70 d old)</i>             |        |       |      |      |                      |       |        |
| Morbidity, %                                      | 5.9    | 4.5   | 4.3  | 5.9  | 0.97                 | 0.97  | 0.58   |
| Mortality, %                                      | 0      | 0     | 2.9  | 0    | 0.59                 | 0.59  | 0.59   |
| Health risk index <sup>2</sup> , %                | 5.9    | 4.5   | 7.1  | 5.9  | 0.64                 | 0.64  | 0.94   |
| <i>Whole experiment (28 to 70 d old)</i>          |        |       |      |      |                      |       |        |
| Morbidity, %                                      | 22.5   | 12.5  | 21.3 | 17.5 | 0.58                 | 0.107 | 0.43   |
| Mortality, %                                      | 5.0    | 6.3   | 5.0  | 5.0  | 0.81                 | 0.82  | 0.81   |
| Health risk index <sup>3</sup> , %                | 27.5   | 18.75 | 26.3 | 22.5 | 0.75                 | 0.19  | 0.58   |

<sup>1</sup> P levels for a bifactorial model, with effect of intake (AL vs. R) and feed delivery frequency (1 vs. 13).

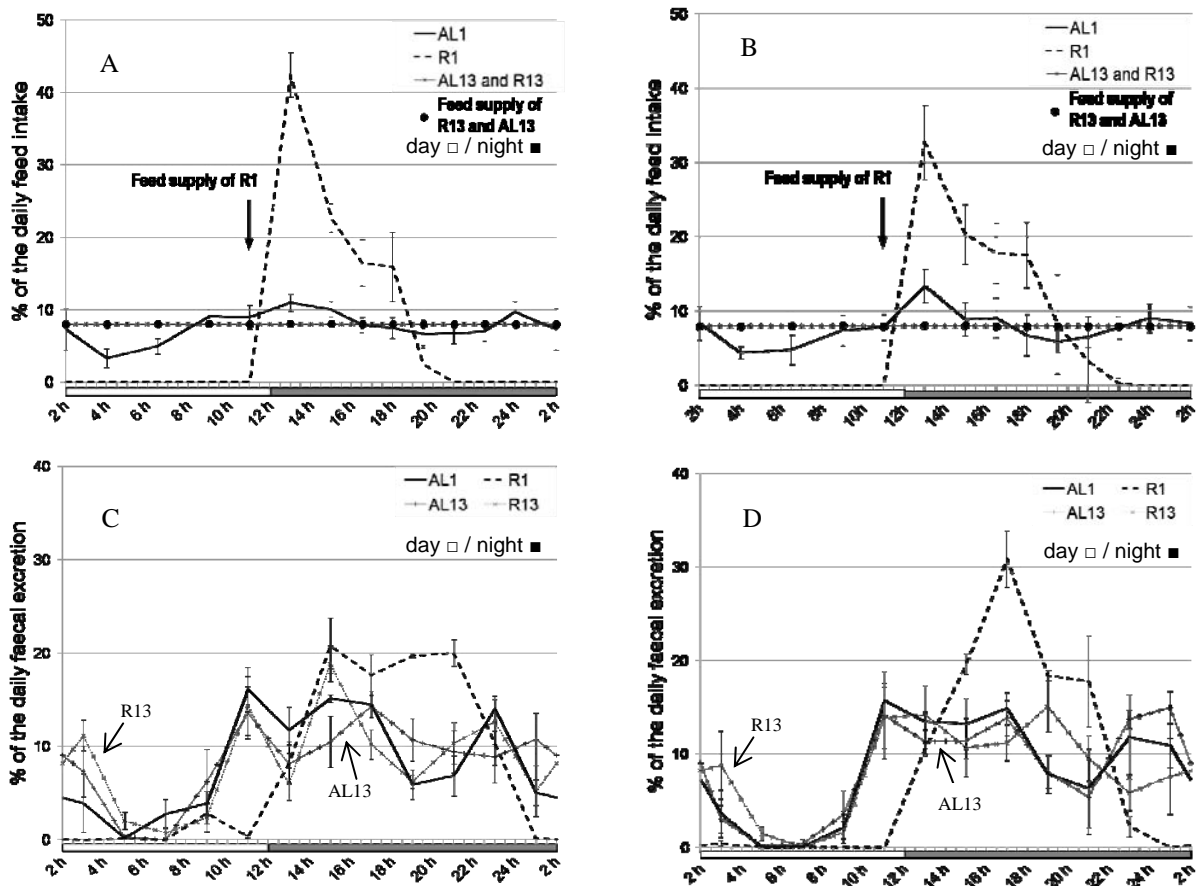
<sup>2</sup> Eighty rabbits per groups, at 28d

<sup>3</sup> Health risk index = mortality + morbidity (within the same period)

#### IV.B. FEED INTAKE PATTERN

The intake behaviour of rabbits fed freely (AL1 group) evolved significantly between 36 d (Figure 17.A) and 46 days (Figure 17.B) since the feed intake proportion was different for almost half of the measurements (4, 9, 11, 13, 15 h). However at both ages, we observed two periods of low consumption (<5% of daily intake): a light one in the middle of the dark period (18:00-22:00), and a marked one in the middle of the light period (4:00-6:00) corresponding to the caecotrophy behaviour<sup>3</sup>. From 6:00 to 14:00, the intake increased till 13% (20g within two hours) at 46 days, and 65 to 70% of the total daily feed intake happened during dark period (12:00-2:00). Accordingly, we synchronized the peak of feed consumption of the R1 group which was dependent on the feed delivery (at 11:00) with that of the control group. Within

two hours after delivery, the intake of R1 group peaked at 42% (31g) and 33% (37g) of the daily feed intake ( $P<0.001$ ) respectively at 36 and at 46 days. At 36 d, the R1 rabbits consumed around 65% of their daily ration in 4 h (over 95% in 7 h) compared to 20% for AL1 group (36% in 7 h). Accordingly, R1 rabbits starved about 13 and 11 hours respectively at 36 and 46 days. The AL13 and R13 groups showed regular feed intake patterns, since they adapted rapidly to the 13 feed deliveries per day (Figure 17.A and B), since there were no refusals between each delivery after 2 days.



**Figure 17** : Feed intake patterns at 36d (figure A) and 46d (B) old, and faecal excretion patterns (hard faeces) at 37d (figure C) and 47d (figure D) old, according to the intake level (AL, *ad libitum* or R, -25 % restricted intake) and the feed delivery frequency (1 or 13 per day). (Trial 2)

#### IV.C. HARD FAECES EXCRETION PATTERN AND SOFT FAECES PRODUCTION

The overall excretion pattern of rabbits exhibited a circadian rhythm where high excretion was recorded during the dark period (7.1, 8.5, 11.4 and 8.1 % for AL1 AL13 R1 and R13) The faecal excretion pattern of AL13 and R13 was similar to that of control group (AL1), (Figures 17.C and 17.D) and did not change according to the age. On the contrary, the excretion pattern of R1 rabbits was significantly different from the 3 other groups. The period where no

excretion could be recorded lasted 12 h in R1 while it lasted less than 2 hours in the 3 other groups. Moreover, R1 excretion pattern evolved with the age with an increase of 75% of the faecal excretion around 17 h between 37 d and 47 d. No significant difference was underlined concerning the hard faeces:soft faeces ratio, or about the dry mass of soft faeces, even percentage of soft faeces:dry ingestion was not affected by feeding restriction (Table 19).

**Tableau 19** : Apparent fecal nutrient digestibility and caecotrophy production in the growing rabbits, according to feed intake level (AL, *ad libitum* or R, -25% restricted intake) and to feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 3)

| Item                                      | Groups             |                     |                    |                     | SEM               | P-value             |                  |                     |
|-------------------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------------|
|                                           | AL1                | AL13                | R1                 | R13                 |                   | Intake <sup>1</sup> | FDF <sup>1</sup> | Inter. <sup>1</sup> |
| ADFI, g/d <sup>4</sup>                    | 133.1              | 127.4               | 111.0              | 104.9               | 4.06 <sup>2</sup> | ND <sup>3</sup>     | ND <sup>3</sup>  | ND <sup>3</sup>     |
| Mean BW <sup>4</sup> , g                  | 1432 <sup>b</sup>  | 1439 <sup>b</sup>   | 1229 <sup>a</sup>  | 1314 <sup>a</sup>   | 20.7              | <0.001              | 0.083            | 0.12                |
| <i>Apparent fecal digestibility, %</i>    |                    |                     |                    |                     |                   |                     |                  |                     |
| OM                                        | 60.9 <sup>a</sup>  | 60.8 <sup>a</sup>   | 66.2 <sup>b</sup>  | 61.1 <sup>a</sup>   | 0.54              | <0.001              | <0.001           | <0.001              |
| Energy                                    | 62.5 <sup>a</sup>  | 62.7 <sup>a</sup>   | 67.7 <sup>b</sup>  | 63.2 <sup>a</sup>   | 0.51              | <0.001              | 0.002            | <0.001              |
| CP                                        | 77.0 <sup>a</sup>  | 78.9 <sup>ab</sup>  | 81.5 <sup>b</sup>  | 79.2 <sup>ab</sup>  | 0.46              | 0.003               | 0.85             | 0.006               |
| NDF                                       | 34.2 <sup>a</sup>  | 32.8 <sup>a</sup>   | 43.1 <sup>b</sup>  | 33.9 <sup>a</sup>   | 1.00              | <0.001              | <0.001           | 0.003               |
| ADF                                       | 25.9 <sup>a</sup>  | 23.6 <sup>a</sup>   | 35.6 <sup>b</sup>  | 25.2 <sup>a</sup>   | 1.15              | <0.001              | <0.001           | 0.008               |
| Hemicelluloses                            | 44.7 <sup>a</sup>  | 44.3 <sup>a</sup>   | 52.6 <sup>b</sup>  | 44.7 <sup>a</sup>   | 1.03              | 0.022               | 0.022            | 0.032               |
| Cellulose                                 | 35.9 <sup>b</sup>  | 24.7 <sup>a</sup>   | 47.1 <sup>c</sup>  | 26.8 <sup>a</sup>   | 2.09              | 0.008               | <0.001           | 0.046               |
| <i>Nutritive value</i>                    |                    |                     |                    |                     |                   |                     |                  |                     |
| DP, g/kg                                  | 101.7 <sup>a</sup> | 104.2 <sup>ab</sup> | 107.6 <sup>b</sup> | 104.5 <sup>ab</sup> | 0.60              | 0.004               | 0.85             | 0.006               |
| DE, MJ/kg                                 | 10.21 <sup>a</sup> | 10.25 <sup>a</sup>  | 11.06 <sup>b</sup> | 10.32 <sup>a</sup>  | 0.083             | <0.001              | 0.002            | <0.001              |
| DP:DE, g/MJ                               | 9.96 <sup>ab</sup> | 10.16 <sup>b</sup>  | 9.73 <sup>a</sup>  | 10.13 <sup>b</sup>  | 0.052             | 0.13                | 0.002            | 0.25                |
| <i>Caecotrophy (48-49 and 52-53d old)</i> |                    |                     |                    |                     |                   |                     |                  |                     |
| Soft faeces, dry mass, g                  | 16.55              | 23.06               | 18.18              | 17.23               | 1.029             | 0.37                | 0.19             | 0.070               |
| Soft faeces:DMI, %                        | 12.45              | 18.10               | 16.78              | 16.07               | 0.882             | 0.41                | 0.16             | 0.073               |
| Hard faeces:soft faeces                   | 3.19               | 2.06                | 2.81               | 2.94                | 0.180             | 0.56                | 0.18             | 0.086               |

<sup>1</sup>P levels for a bifactorial model, with effect of intake (AL vs. R) and feed delivery frequency (1 vs. 13).

<sup>2</sup>SEM calculated for AL1 and AL13 groups (only)

<sup>3</sup>ND: not determined,  $\sigma^2 = 0$

<sup>4</sup>Intake measured during the digestibility period, from 41 to 47d.

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)

#### IV. D. WHOLE DIGESTIVE TRACT EFFICIENCY

Significant interactions were detected between intake level and frequency of feed delivery for the digestibility of all nutrients (Table 19). Indeed, two weeks after limitation of the intake started, the digestive efficiency was sharply improved, but only for R1 group and for all nutrients considered: proteins (+3.5 points), energy (+5 points) and fibrous fractions. Accordingly in the R1 group, the digestible energy content of the diet was increased by about 8% (+5% for DP) compared to the 3 other groups. For a high feed delivery frequency,

limitation of the intake (R13 vs AL13) only slightly improved the digestibility. Globally, a fragmented feed delivery did not improve the digestive efficiency, and even tended to decrease the fibre digestibility (particularly for restricted groups). However a high frequency of feed delivery led to a higher DP:DE ratio (10.15 vs. 9.85,  $P=0.002$ ).

#### IV.E. GASTRIC DIGESTIVE PARAMETERS AND CAECAL BIOTOPE

Fragmented feed delivery increased acidity in *antrum* and *fundus* but decreased acidity in caecum (Table 20). Limitation of the intake significantly reduced the acidity of the caecal content (+0.15 units). Besides, the caecum weight (Table 20) was not modified by both studied factors, while its fresh content was increased by restriction, but only if the ration was given in one delivery (AL1 vs R1; significant interaction). With a high feed delivery frequency, the caecal content was lower (-20%) and its DM level was higher (+1.2 units), but only if rabbits are restricted (R1 vs R13).

**Tableau 20** : Physico-chemical parameters of stomach and caecum in 50 days old rabbits according to feed intake level (AL, *ad libitum* or R, -25 % restricted intake ) and to feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 3)

| Item              | Groups             |                   |                    |                   | SEM <sup>2</sup> | P-value <sup>1</sup> |        |        |
|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|------------------|----------------------|--------|--------|
|                   | AL1                | AL13              | R1                 | R13               |                  | Intake               | FDF    | Inter. |
| <i>Stomach pH</i> |                    |                   |                    |                   |                  |                      |        |        |
| Antrum            | 1.87 <sup>ab</sup> | 1.40 <sup>a</sup> | 2.39 <sup>b</sup>  | 1.53 <sup>a</sup> | 0.107            | 0.086                | <0.001 | 0.30   |
| Fundus            | 2.15 <sup>ab</sup> | 1.43 <sup>a</sup> | 3.02 <sup>b</sup>  | 1.61 <sup>a</sup> | 0.169            | 0.071                | <0.001 | 0.24   |
| <i>Caecum</i>     |                    |                   |                    |                   |                  |                      |        |        |
| Content mass, g   | 102 <sup>a</sup>   | 98 <sup>a</sup>   | 126 <sup>b</sup>   | 102 <sup>a</sup>  | 2.8              | 0.003                | 0.005  | 0.034  |
| Organ mass, g     | 28.4               | 27.4              | 25.7               | 27.0              | 0.65             | 0.24                 | 0.92   | 0.37   |
| pH                | 5.84 <sup>a</sup>  | 5.97 <sup>a</sup> | 5.92 <sup>a</sup>  | 6.17 <sup>b</sup> | 0.032            | 0.011                | 0.001  | 0.26   |
| Dry matter (%)    | 22.1 <sup>a</sup>  | 21.8 <sup>a</sup> | 22.4 <sup>ab</sup> | 23.6 <sup>b</sup> | 0.21             | 0.005                | 0.24   | 0.055  |

<sup>1</sup> P-value calculated with a bifactorial model, with effect of intake (AL vs. R) and effect of FDF (1 vs. 13).

<sup>2</sup> n = 12 rabbits per group

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)

#### IV.F. CAECAL BACTERIAL COMMUNITY: ACTIVITY, STRUCTURE AND DIVERSITY

A significant interaction was found for the global fermentative activity in the caecum (total VFA and ammonia). For instance, R1 rabbits had an ammonia production 1/3 over the three other groups. The VFA level was significantly lower (-25%) in R13 compared to the 3 other groups (Table 21), and was associated with a highest caecal pH (Table 20).

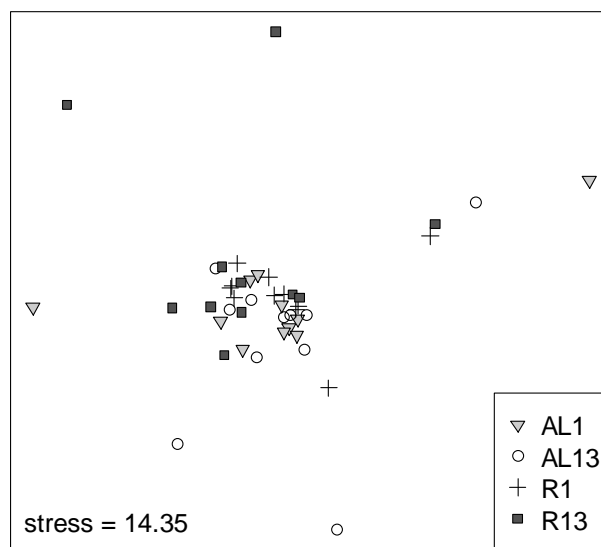
**Tableau 21** ; Caecal bacterial community activity and diversity in 50 days old rabbits, according to feed intake level (AL, *ad libitum* or R, -25 % restricted intake) and to feed delivery frequency (FDF, 1 or 13 per day) (Trial 3)

| Item                                           | Groups              |                    |                    |                    | SEM <sup>1</sup> | P-value <sup>3</sup> |        |        |
|------------------------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------------|--------|--------|
|                                                | AL1                 | AL13               | R1                 | R13                |                  | Intake               | FDF    | Inter. |
| Total VFA (mM)                                 | 85.9 <sup>b</sup>   | 85.7 <sup>b</sup>  | 92.4 <sup>b</sup>  | 67.1 <sup>a</sup>  | 2.04             | 0.046                | <0.001 | <0.001 |
| VFA (mol/100 mol)                              |                     |                    |                    |                    |                  |                      |        |        |
| Acetate, %                                     | 80.9 <sup>a</sup>   | 82.6 <sup>ab</sup> | 85.8 <sup>b</sup>  | 83.9 <sup>ab</sup> | 0.56             | 0.004                | 0.90   | 0.085  |
| Propionate, %                                  | 3.7                 | 3.4                | 3.3                | 3.8                | 0.12             | 0.93                 | 0.67   | 0.056  |
| Butyrate, %                                    | 15.0 <sup>c</sup>   | 14.9 <sup>bc</sup> | 10.6 <sup>a</sup>  | 11.2 <sup>ab</sup> | 0.50             | <0.001               | 0.77   | 0.32   |
| Butyrate/propionate                            | 4.01 <sup>bc</sup>  | 4.41 <sup>c</sup>  | 3.29 <sup>ab</sup> | 3.06 <sup>a</sup>  | 0.134            | <0.001               | 0.71   | 0.17   |
| NH <sub>3</sub> -N (mmol/L)                    | 9.3 <sup>a</sup>    | 7.6 <sup>a</sup>   | 15.1 <sup>b</sup>  | 10.1 <sup>a</sup>  | 0.56             | <0.001               | <0.001 | 0.050  |
| Bacterial Fibrolytic activity (µmol RS/g DM/h) |                     |                    |                    |                    |                  |                      |        |        |
| Carboxymethylcellulase                         | 12.1 <sup>a</sup>   | 14.3 <sup>ab</sup> | 21.3 <sup>b</sup>  | 11.6 <sup>a</sup>  | 1.178            | 0.30                 | 0.15   | 0.011  |
| Xylanase                                       | 50.5 <sup>ab</sup>  | 69.5 <sup>b</sup>  | 56.9 <sup>ab</sup> | 40.7 <sup>a</sup>  | 3.947            | 0.11                 | 0.81   | 0.024  |
| Pectinase                                      | 139.3 <sup>ab</sup> | 151.2 <sup>b</sup> | 100.9 <sup>a</sup> | 96.4 <sup>a</sup>  | 6.772            | <0.001               | 0.73   | 0.50   |
| Bacterial community diversity <sup>2</sup>     | 5.5                 | 5.5                | 5.5                | 5.3                | 0.079            | 0.77                 | 0.67   | 0.61   |

<sup>1</sup>n = 12 per treatment<sup>2</sup>modified Simpson index modified<sup>3</sup>P-value calculated with a bifactorial model, with effect of intake (AL vs. R) and feed delivery frequency (1 vs. 13).a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)

The fermentation pattern was globally not affected by the frequency of feed delivery, whereas the intake level significantly increased the acetate proportions and reduced the butyrate. Accordingly the butyrate:propionate ratio was sharply reduced by restriction.

In parallel, the bacterial fibrolytic activity remained unaffected, except pectinase (Table 21) that was impaired by about 1/3 by lowering the intake. No one of the caecal bacterial community characteristics was modified by considered factors, neither bacterial diversity (Table 21) nor structure (Figure 18) as expressed by non significant statistical results of ANOSIM-R (data not shown).



**Figure 18** : Effect of the feed intake level (AL, *ad libitum* or R, -25 % restricted intake) and of the feed delivery frequency (1 or 13 per day) on the bacterial community structure approached by a two-dimensional nMDS plot of the 44 CE-SSCP profiles (Trial 3). Stress gives the degree to which the display matched the proximities between CE-SSCP profiles. A stress <20% corresponds to a reliable display (Clarke 1993).

## V. DISCUSSION

Feed intake limitation has been proposed as an effective tool to reduced digestive trouble but also to increase feed efficiency and thus to reduce feed costs in young rabbits. This study investigated for the first time whether the positive effect of feed restriction on rabbit digestive health status was due to decrease of feed quantity ingested or to hours of fast induced by this feeding strategy. To answer this question we described for the first time feed intake and excretion patterns of rabbits according to feed intake level and frequency of feed delivery. We related these parameters to growth performance, nutritional digestibility, physiological and caecal microbial parameters.



To our knowledge, the feed intake and hard faeces excretion patterns were only described for rabbits fed freely where the lighting schedule is the main control factor (Horton et al. 1974). In agreement with Prud'hon et al. (1975), we confirmed that the feed intake was maximum at the beginning of the night for AL1 group and minimum in the middle of the light period. On the opposite, the intake pattern of restricted rabbits fed one time was never studied. In the present study, restricted rabbit fed once a day (R1), consumed around 44 % of the food in 2 h and 95 % in 7 h thus leading to 17 hours period without feed intake. This feed intake behaviour altered significantly the excretion pattern since in restricted rabbit fed once a day, 95 % of the excretion was achieved in half a day compared to freely fed rabbit which only presented 3 hours without excretion. On the contrary the restricted rabbits with 13 supplies had similar excretion pattern than *ad libitum* individuals. This result indicated that 13 supplies were sufficient to simulate freely fed intake rhythm. However, neither the feed delivery frequency nor the intake limitation affected the ratio of the quantity of hard to soft faeces excreted. Caecotrophy occurred mainly at the beginning of the light period, about 8 h after the period of high intake, as shown previously by Bellier et al. (1995).

As previously described (Perrier 1998; Boisot et al. 2003; Foubert et al. 2007; Bergaoui et al. 2008; Gidenne et al. 2009c), the feed intake limitation decreased ADG and improved G:F. The compensatory growth observed after the restriction period, once animals were fed freely, has already been reported for the growing rabbit, but with a various extent according to the length and/or the strength of the restriction. In 1998 (Perrier), showed that the highest was the restriction rate, the highest was the growth of animals fed *ad libitum* after restriction (up to +50% of daily mass gain compared to rabbits always fed *ad libitum*, for a restriction of -50%). Tumova et al. (2003) reported + 40% of growth after restriction compared to a control group continuously fed *ad libitum*. Recently, Gidenne et al. (2009c) showed an increase of the growth proportional to the level of restriction applied. Previous large scale studies demonstrated that an intake limitation after weaning reduce significantly the mortality or morbidity rate (Gidenne et al. 2009a; Gidenne et al. 2009d) for a restriction of at least -20% applied during three weeks. In our good health conditions (low mortality), we are not able to evidence an impact of our treatments on digestive health.

Previous study demonstrated that retention time of particles is increased of 50% for restricted rabbits, probably mainly in the mixing compartment including the caeco-colic fragment (Gidenne et al. 2009b). These observations could be linked with the improvement of the digestive efficiency shown for R1 group and that was also underlined in our previous study for animals restricted at -25% compared to *ad libitum* rabbits (Martignon et al. 2010). The

detailed measurement of digestibility validated this connection. Indeed whole digestive tract digestibility of each feed fraction: CP, fibrous and energy was improved by feeding restriction from 4.5 for CP to 11.5 for cellulose. Different results were published by Gidenne and Feugier (2009b) who did not observe significant improvement of whole tract digestive efficiency for feeding restriction from -20% to -40%, except for CP from -30% of restriction rate. Likewise, Diaz Arca et al. (1999) did not notice a better digestibility of the standard diet supplied for -40% and -60% of restriction, whatever nutrient considered. The beneficial effects of intake restriction on the whole digestive tract digestibility we emphasized disappeared since the feed delivery is fragmented in 13 supplies all along the day. This remark was true for all feed fractions considered. Nevertheless for cellulosic part the whole digestive tract efficiency was impaired for multiple feed deliveries compared to one daily delivery, irrespective of the quantity provided, so even for *ad libitum* feeding. In this way AL13 vs. AL1 showed a loss of 10.9 points of digestibility coefficient, and R13 vs. R1: -20.3 points of efficiency.

The caecal bacteria enzymatic activity did not show effect on bacterial fibrolytic enzymatic activity except on pectinase activity which is decreased of around 1/3 by restriction. Nevertheless, this modulation of the caecal bacteria fibrolytic activity did not lead to a modification of the caecal bacteria structure and diversity. On the contrary, Bennegadi et al. (2003) determined that a low fibre diet influencing the digestive microorganisms activity modified caecal bacterial community and archeal community. A study of the evolutions of the structure of this last community could be an interesting way of investigations for next experiments aiming at complete this one.

Contrary to our previous study (Martignon et al. 2010) no significant difference of stomacal pH was whatever part considered between restricted and not restricted rabbits. Moreover the staggering of feed supplies all along the day appeared to decrease pH in both parts. This can be explained by a production of acid in stomach which is not neutralized by the little quantity of food ingested.

In conclusion, this study allowed us to describe for the first time the ingestion and excretion patterns of rabbit submitted to feed intake limitation. A simulation of the intake of rabbits fed freely that is to say with supplies spread all along the day tended to decrease morbidity rate, whatever intake level considered. Moreover, a feed intake limitation at 75% of the amount ingested by fed freely rabbits led to a significant improvement of the digestibility coefficient of few nutrients, mainly CP, fibrous. Finally, the positive effect of restriction might be related to the hours of fast induced by this feeding strategy at least for nutrient digestibility but not for growth performance improvement. However due to good sanitary status of the experimental

rabbits, it was not possible to conclude definitively on the beneficial action of the intake limitation on digestive health although fragmented delivery along the day tends to decrease rabbits morbidity.

## VI. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Patrick Aymard, André Lapanouse, Jacques De Dapper and Jean De Dapper for their technical assistance in animal care (INRA Toulouse, UMR 1289 Tandem). Also, Laurent Cauquil, Béatrice Gabinaud, Rory Michelland, Muriel Ségura and Véronique Tartié for their help in sampling and Carole Bannelier for biochemical analyses (INRA Toulouse, UMR 1289 Tandem). The work of the staff at the Centre de Ressources, Génotypage et Séquencage of INRA Toulouse is gratefully considered

## VII. LITERATURE CITED

- Alstin, F., Nilsson, M., 1990. The Soxtec(R) hydrolysis system improves the official methods for determining total fat content. *Industries Alimentaires et Agricoles* 107, 1271-1274.
- Bellier, R., Gidenne, T., Vernay, M., Colin, M., 1995. In vivo study of circadian variations of the caecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* 73, 128-135.
- Bennegadi, N., Fonty, G., Millet, L., Gidenne, T., 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.
- Bergaoui, R., Kammoun, M., Ouerdiane, K., 2008. Effects of feed restriction on the performance and carcass of growing rabbits. In: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, WRSA Edition, Verona – Italy*, pp. 547-550
- Boisot, P., Licois, D., Gidenne, T., 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. In: *Proceedings "10èmes Journées de la Recherche Cunicole"*, Paris, France, pp. 267-370
- Clarke, K.R., 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 18, 117-143.
- Delbès, C., Godon, J.J., Moletta, R., 1998. 16S rDNA sequence diversity of a culture-accessible part of an anaerobic digester bacterial community. *Anaerobe* 4, 267-275.

- Diaz Arca, F., Perez Alba, L.M., Perez Hernandez, M., 1999. Digestibility and energy retention by young rabbits fed different levels of intake. *Annales de Zootechnie* 48, 289-295.
- EGRAN, 2001. Technical note: Attempts to harmonise chemical analyses of feeds and faeces, for rabbit feed evaluation. *World Rabbit Science* 9, 57-64.
- European Union, 2003. Protection of Animals used for Experimental Purposes. Directive 86/609/EEC of 24th novembre 1986, amended 16th septembre 2003. In: *Official Journal of European Union*,
- Foubert, C., Boisot, P., Duperray, J., Guyonvarch, A., 2007. Comparaison de deux stratégies de rationnement alimentaire, via un accès restreint à l'eau de boisson, en conditions estivales et hivernales. In: *12èmes Journées de la Recherche Cunicole*, le Mans, France, pp. 119-122
- Gidenne, T., 2000. Recent advances in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Science* 8, 23-32.
- Gidenne, T., Bellier, R., Bouyssou, T., 1993. An Improved Technique for Cecal Cannulation in the Rabbit - Effect of Sampling Time After Feeding on Cecal VFA Pattern. *Annales de Zootechnie* 42, 163.
- Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S., 2009a. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3, 509-515.
- Gidenne, T., Feugier, A., 2009b. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal* 3, 501-508.
- Gidenne, T., Jehl, N., Segura, M., Michalet-Doreau, B., 2002. Microbial activity in the caecum of the rabbit around weaning: impact of a dietary fibre deficiency and of intake level. *Animal Feed Science and Technology* 92, 107-118.
- Gidenne, T., Lapanouse, A., 1997. Rate of passage in the rabbit digestive tract: influence of marker dosing time, ileal cannulation and marker type. *World Rabbit Science* , 5, 27-32.
- Gidenne, T., Lapanouse, A., 2000. Technical note : The measurement of soft faeces production is affected by the type of collar. *World Rabbit Science* 8, 41-42.
- Gidenne, T., Lebas, F., 2006. Feeding Behaviour in Rabbits. In: Bels, V. (Ed.) *Feeding in Domestic Vertebrates: from structure to behaviour*, pp. 179-194

- Gidenne, T., Murr, S., Travel, A., Corrent, E., Foubert, C., Bebin, K., Mevel, L., Rebours, G., Renouf, B., 2009c. Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau. Premiers résultats d'une étude concertée du réseau GEC. *Cuniculture Magazine* 36, 65-72.
- Gidenne, T., Travel, A., Murr, S., Oliveira, H., Corrente, E., Foubert, C., Bebin, K., Mevel, L., Rebours, G., Renouf, B., Gigaud, V., 2009d. Ingestion restreinte et mode de distribution de la ration. Conséquences sur le comportement alimentaire, la digestion et la qualité de la carcasse. In: ITAVI Editions, P. (Ed.) 13èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France, pp. 1-4
- Horton, B.J., Turley, S.D., West, C.E., 1974. Diurnal variation in the feeding pattern of rabbits. *Life Sciences* 15, 1895-1907.
- Larour, G., Jobert, J.-L., Balaine, L., Eono, F., Klein, M.-F., Ledein, T., Le Bouquin, S., Guittet, M., 2004. Etude des facteurs de risque de l'expression aiguë de l'entérococolite épizootique du lapin en engraissement. *Epidémiologie et santé animale* 45, 91-99.
- Lebas, F., 1979. Efficacité de la digestion chez la lapine adulte. Effet du niveau d'alimentation et du stade de gestation. *Ann. Biol. Bioch. Biophys.* 19, 969-973.
- Ledin, I., 1984. Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth, carcass composition and organ growth in rabbit. *Annales de zootechnie* 33, 33-50.
- Lever, M., 1977. Carbohydrate Determination with 4-Hydroxybenzoic Acid Hydrazide (PAHBAH): Effect of Bismuth on the Reaction. *Anal Biochem* 81, 21-27.
- Loisel, P., Harmand, J., Zemb, O., Latrille, E., Lobry, C., Delgenès, J.P., Godon, J.J., 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8, 720-731.
- Lovatto, P.A., Sauvant, D., Noblet, J., Dubois, S., Van Milgen, J., 2006. Effects of feed restriction and subsequent refeeding on energy utilization in growing pigs. *Journal of Animal Science* 84, 3329-3336.
- Martignon, M.H., Combes, S., Gidenne, T., 2010. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 156, 156-162.
- Martin, C., Michalet-Doreau, B., 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67, 407-413.

- Michelland, R.J., Combes, S., Monteils, V., Cauquil, L., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* 16, 61-65.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. StatFingerprints: A friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9, 1359-1363.
- Perez, J.M., Lebas, F., Gidenne, T., Maertens, L., Xiccato, G., Parigi-Bini, R., Dalle Zotte, A., Cossu, M.E., Carazzolo, A., Villamide, M.J., Carabaño, R., Fraga, M.J., Ramos, M.A., Cervera, C., Blas, E., Fernandez Carmona, J., Falcao E Cunha, L., Bengala Freire, J., 1995. European reference method for in-vivo determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Science* 3, 41-43.
- Perrier, G., 1998. Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse. In: *Proceedings "7èmes Journées de la Recherche Cunicole"*, Lyon, France, pp. 179-182
- Prud'hon, M., Chérubin, M., Goussopoulos, J., Carles, Y., 1975. Evolution, au cours de la croissance, des caractéristiques de la consommation d'aliments solide et liquide du lapin domestique nourri ad libitum. *Annales de zootechnie* 24, 289-298.
- R development Core Team, 2007. R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 142-160.
- Rantzer, D., Svendsen, J., Westrom, B., 1996. Effects of a strategic feed restriction on pig performance and health during the post-weaning period. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science* 46, 219-226.
- Sauvant, D., Perez, J.M., Tran, G., 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage: porc, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. 2ème édition revue et corrigée. INRA Editions, Paris, France.
- Tumova, E., Skrivanova, V., Skrivan, M., 2003. Effect of restricted feeding time and quantitative restriction in growing rabbits. *Archiv für Geflügelkunde* 67, 182-190.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74, 3583-3597.

- Verdouw, H., Van Echteld, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1977. Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research* 12, 399-402.
- Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.J., 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology* 2, 69-78.

## EFFET DE LA RESTRICTION ALIMENTAIRE SUR LA CROISSANCE D'ORGANES DIGESTIFS ET LYMPHOÏDES ET SUR LE COMPORTEMENT ALIMENTAIRE DES LAPINS EN ENGRAISSEMENT

---

**Article en préparation / Revue choisie pour soumission : Animal**

M.H. Martignon, M. Guinebretière, G. Postollec, D. Huonnic, E. Boilletot et V. Michel

Mots clés : lapins, restriction alimentaire, comportement alimentaire, organes lymphoïdes, tractus digestif.

### Résumé

Cette étude avait pour objectif de déterminer dans quelle mesure le comportement des lapins était influencé par la restriction alimentaire. Nous nous sommes aussi intéressés à la relation entre la restriction alimentaire et la santé digestive, donc à la croissance de certains organes lymphoïdes et digestifs. Au sevrage (28 jours), les animaux ont été partagés en 2 lots selon le niveau d'ingestion : restriction (-25 %, groupe R) vs. consommation *ad libitum* (groupe AL). L'essai comprenait 3 semaines de restriction de l'ingestion, suivies de 3,5 semaines pendant lesquelles les animaux des deux lots étaient nourris à volonté. Les longueurs du côlon et du cæcum n'ont pas été significativement modifiées pour les animaux restreints. Au contraire, la restriction a induit un délai de croissance pour l'intestin grêle (-31 cm,  $P=0,003$ ). Le développement de la rate, des plaques de Peyer et de l'appendice cæcal a été significativement affecté par le niveau d'ingestion. Principalement, la longueur et la masse de la rate ont été réduites de 1/6 ( $P=0,003$ ) et 1/3 ( $P=0,045$ ) pour les lapins R. Concernant l'activité alimentaire, pour le lot AL, elle était concentrée dans les 2 premières heures et les dernières heures de la période nocturne. Pour les lapins R, elle avait principalement lieu dans les 2 heures suivant la distribution (le matin), avec presque la totalité des lapins en train de manger. Leur activité alimentaire se poursuivait pendant environ 7 heures. Pour conclure, la restriction alimentaire a réduit la croissance de certains organes lymphoïdes et digestifs sans nuire à l'efficacité alimentaire. Les lapins R ont présenté un rythme d'ingestion dépendant du moment de distribution, alors que le profil d'ingestion des lapins AL suivait le rythme circadien. Ces modifications des habitudes alimentaires pourraient être considérées comme une altération du bien-être des animaux, cependant il a été antérieurement montré que cette stratégie d'alimentation améliorait significativement la santé des lapins en engraissement.





**THE EFFECT OF FEED INTAKE RESTRICTION  
ON THE GROWTH OF DIGESTIVE AND LYMPHOID ORGANS  
AND ON THE FEEDING BEHAVIOUR OF FATTENING RABBITS**

---

**Article in preparation / Journal chosen for submission: Animal**

M.H. Martignon<sup>1,2,3,4</sup>, M. Guinebretière<sup>5</sup>, G. Postollec<sup>1</sup>, D. Huonnic<sup>5</sup>, E. Boilletot<sup>1</sup>, V. Michel<sup>5,a</sup>

<sup>1</sup>Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Alimentation Animale, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

<sup>2</sup>INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup>Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>4</sup>ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France

<sup>5</sup>Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Epidémiologie et Bien-Etre Avicole et Cunicole, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

Keywords: Rabbits, feed restriction, feeding behaviour, lymphoid organs, digestive tract.



## I. ABSTRACT

This study aimed to determine how rabbits behaviour was influenced by feed intake restriction. We were also interested in the relation between feeding restriction and digestive health and studied therefore the growth of some lymphoid and digestive organs. At weaning (28 days old) animals were split into 2 groups according to the feed intake level: feed intake restriction (- 25 %, R group) vs. *ad libitum* consumption (AL group). The trial included 3 weeks of intake restriction followed by 3.5 weeks where animals of both groups were fed *ad libitum*. Lengths of caecum and colon were not significantly modified for R rabbits. On the contrary, restriction induced a delay in the growth of the small intestine (-31 cm,  $P=0.003$ ). The growth of spleen, Peyer's patches and caecal appendix was significantly affected by the feed intake level. Mainly, the length and mass of spleen were reduced by 1/6 ( $P=0.003$ ) and 1/3 ( $P=0.045$ ) for R rabbits. Concerning the feeding activity, in the AL group, it was focused on the 2 first hours and on the last hour of darkness. For R rabbits this happened mainly in the 2 hours following feed supply (in the morning), with almost all rabbits eating, and this feeding activity went on for about 7 hours. To conclude, feed restriction decreased the growth of some lymphoid and digestive organs without damaging feed efficiency. R rabbits expressed a feeding behaviour rhythm depending on supply time whereas AL rabbits feeding pattern was clearly following a circadian rhythm. These modifications of feeding habits may be considered as a damage of animals welfare, however this feeding strategy was previously shown to improve significantly the health of growing rabbits.



## II. INTRODUCTION

A study concerning antibiotics sale in France throughout 2008 underlined the fact that rabbits were the livestock the most exposed to antibiotics (Chevance and Moulin, 2009). Indeed, rabbits breeding represented 18.4 % of antibiotics sales, taking into account the duration of the treatment, the amount of antibiotics supplied and the mass of the treated population, whereas they only represented 0.5% of the national crude production (Office de l'élevage, 2008). Antibiotics are used to cure bacterial diseases and to prevent infections in breeding units and they can also be used as growth promoters. An abusive use of antibiotics is known to favour emergence of pathogenic microbiota resistant to antimicrobial treatments. As a consequence for humans, the consumption of animal products from breeding using a high level of antibiotics, appears being a source of contamination by resistant bacteria (Aubry-Damon et al., 2001). Thus, the use of antibiotics as growth promoters, corresponding to a long term administration in low quantities, has been forbidden in the European countries since early 2006 (European Union, 2003a) and new trends of veterinarian research are to find alternatives to this antibiotic use. One of the investigated fields concerns the animal feeding and more precisely the restriction of feed intake in rabbit breeding. Indeed, according to an epidemiological study carried out in a pool of French farms (Larour et al., 2004), the restriction of the feed intake of growing rabbits, compared to an *ad libitum* feeding, appeared being one of the breeding factors limiting the spread of Epizootic Rabbit Enteritis. Moreover, the efficiency of this feed restriction to improve the sanitary status of fattening rabbits was also demonstrated either during an experimental reproduction of Epizootic Rabbit Enteritis (Boisot et al., 2003) or at the time of spontaneous episodes of this disease (Gidenne et al., 2009) with at least -20% of feed restriction in both cases. In addition, in order to reduce the loss in growth and fattening of rabbits during digestive disease episodes, the restriction of the feed intake was pointed out as being an interesting economic feeding strategy as it increased feed efficiency (Gidenne et al., 2009). Although sometimes controversial when considering an animal welfare point of view, the feed intake restriction strategy is not unfavourable to the animals digestive system. After confirmation of the preventive ability of this feeding strategy against digestive diseases, this could even be an alternative to antibiotic use.

The effects of this feeding strategy were previously studied on muscles and meat quality (Xiccato, 1999) and reproduction performances (Hulot et al., 1982; Rommers et al., 2004) of rabbits. Most of the studies concerning feed intake restriction and improvement of the rabbit health status were turned to internal digestive modifications. Some of them dealt with effects

of this feeding strategy on nutrients digestibility and transit (Di Meo et al., 2007; Gidenne and Feugier, 2009). Others concerned the evolution of some physiological parameters in relation with feed quantity intake, such as intestinal enzymes activities and histometric measurements of the ileal mucosa (Martignon et al., 2010), caecal fermentative activity and caecal ecosystem traits (Gidenne and Feugier, 2009; Martignon et al., 2010). To our knowledge few studies had a global approach of interactions between feed intake restriction and the rabbits digestive health, growth and welfare. Animal welfare can be measured through animal behaviour, health and physiology. Therefore, the aim of this study was to determine the effects of the feed restriction on the welfare of fattening rabbits: (1) behaviour: especially their feeding behaviour. Indeed, we assumed that this feeding strategy could induce modifications of the feed intake rhythm compared to what was observed in rabbits fed *ad libitum*. Moreover a restriction of the feeding level could also either change the daily time spent in other activities than feeding or affect the repartition of the resting time over the nycthemeral period. This could also explain the improvement of the health status observed in the breeding units submitted to a feed intake restriction. (2) digestive and immune organs: the restriction of the feed intake decreases the post-weaning digestive troubles in rabbits (Gidenne et al., 2009). In this study, we wanted to assess if this beneficial effect was related to a potential capacity of the feed intake restriction first to modulate the growth of the digestive tract simultaneously with the body mass reduction observed, and secondly, to interfere with the development of lymphoid organs. Therefore, we investigated whether the feed intake restriction affected the growth of the digestive tract and of some lymphoid organs. (3) zootechnical performances and health status : in the continuity of studies previously quoted, we aimed at studying the impact of feed intake restriction on growth, morbidity and mortality. Moreover we observed the adaptability of restricted rabbits to an *ad libitum* feeding. Rabbits were restrictive fed during 3 weeks then skipped to an *ad libitum* feeding until slaughter. Thus we wanted to determine if they adopted an *ad libitum* way of feed or if they kept rhythms corresponding to restricted rabbits.

### III. MATERIAL AND METHODS

#### III.A. EXPERIMENTAL DESIGN AND ANIMALS

This study involved 432 hybrid commercial breed rabbits (Hycol®), which were produced at the Anses experimental farm at Ploufragan, France. Rabbits were 28 days old at weaning

when the trial began, and 72 days old at the end of the experiment, coinciding with the end of the fattening. They were allotted in 2 groups corresponding to two different types of feed intake level: a control group “AL” fed *ad libitum* vs. a group “R” for which the intake was limited to 75% of the voluntary feed intake. The R group was fed daily between 0830 h and 0900 h with a quantity of feed adjusted once a week according to the mean feed intake of the AL group during the week before. Simultaneously, AL groups feeding troughs were visited daily, even though they were fed once a week, to mimic the same situation as for the R group. The experiment was divided in two periods. The feeding program described above was applied to rabbits from the age of 28 up to 49 days which corresponded to the first period of the experiment. During the second period of the experiment, i.e. from 50 days old to the end of the experiment, both groups (R and AL) were fed *ad libitum*.

At weaning, rabbits of a same litter were randomly spread in cages and in both groups. Animals sex was not taken into account. Only rabbits weighing more than 510 g at 28 days were included in the experiment. Animals were handled according to the care of animals in experimentation, in agreement with the European legislation (European Union, 2003b).

**Tableau 22:** Ingredients of the experimental diet

| Ingredients                | Quantity, g.kg <sup>-1</sup> |
|----------------------------|------------------------------|
| Thin wheat bran            | 216                          |
| Sunflower 28/30            | 177                          |
| Dehydrated alfalfa 17 LP   | 177                          |
| Dehydrated sugar beet pulp | 137                          |
| Wheat middlings            | 65                           |
| Barley                     | 61                           |
| Apple marc                 | 28                           |
| Sugar cane molasses        | 21.6                         |
| Oats                       | 20                           |
| Rapeseed 00 34/35          | 20                           |
| Citrus pulp                | 20                           |
| Kaolin                     | 20                           |
| Grape pulp                 | 12                           |
| Soybean oil                | 12                           |
| Premix                     | 10                           |
| Lysine 50 Liq              | 2.2                          |
| Ci-choline 75% Liq         | 0.8                          |
| Methionine Liq             | 0.4                          |

Each cage contained 6 animals and the density was kept at 15 rabbits per m<sup>2</sup>. Each group of rabbits was equally assigned in one of the two rooms of the same building. Each room included 2 rows of 18 cages. Each row housed a group (AL or R). Water was available *ad libitum* for both groups throughout the experiment. The experimental diet (Table 22) was formulated to cover the nutritional requirements of the growing rabbit (Gidenne, 2000), and was provided in

feeder (48 cm of long). The breeding unit was kept at a temperature of 20 °C (± 2 °C) and under a 0900 h to 1900 h lighting schedule alternated with 14 h of darkness.



### III.B. FEEDING AND OTHERS ACTIVITIES, BEHAVIOURAL TRAITS

During the first period of this experiment (restriction period), four nycthemerons of video were recorded at 35, 37, 42 and 44 days of age. The first week of the experiment was not included in the behavioural study because it was considered as an adaptability period to solid feed, mother separation and a new environment. Only the first week of the second period was studied for behavioural traits, at 50 and 52 days of age, aiming at underlining the adaptability of previously restricted rabbits to a free access to food. Each camera filmed 1 or 2 cages. At each nycthemeron, 6 cages per group, equally shared in both rooms, were filmed. Cameras were moved along rows of cages, allowing to film 24 cages per group for the first period. The videos of the 50<sup>th</sup> and 52<sup>nd</sup> days recorded the same cages and rabbits (for focal sampling) than respectively at 35 and 44 days of age for comparison of their behaviour during restriction and *ad libitum* periods.

Instantaneous scans were carried out using all the video recordings to study the rabbits feeding and resting activities over 24 h. Activities were determined by instantaneous scans of 30 s at 30 min intervals, i.e. 48 video-scans per nycthemeron. At each video-scan, the number of rabbits eating (head in the feeding troughs or in front of, or chewing food) and resting (lying on belly or flank) were evaluated in the 6 cages filmed per group (AL and R). Results are given averaging the number obtained for the 24 cages considered per group for the restriction period and for the 6 cages per day and 12 cages observed at 50 days and 52 days for the R group and AL group, respectively.

One rabbit per cage was identified using a pen. It was followed over 24 h by focal sampling. In addition to frequency of meals and drinking behaviours, average duration of the meals and total meals durations were registered. This was performed at 35, 42, 50 and 52 days of age, i.e. 2 days per period. Our first observations by scan sampling showed high variations of eating activity in the course of a nycthemeron, therefore we decided to split the 24 h of focal observation into 2 phases: 1<sup>st</sup> phase from 0830 h to 2130 h (restricted rabbits feed consumption phase) and 2<sup>nd</sup> phase from 2130 h to 0830 h (phase of no feed intake for restricted rabbits).

### III.C. DIGESTIVE TRACT AND LYMPHOID TISSUES GROWTH

Eight rabbits per group were slaughtered by cervical dislocation at the end of the restriction period (49 days old) and at the end of the experiment (72 days old). Rabbits were taken off the cages not video taped. Digestive tract growth was compared between the restricted (R) and the

control rabbits (AL) by measurement of the lengths of the small intestine (including duodenal ampoula, without *sacculus rotundus*), caecum (including *sacculus rotundus* and caecal appendix) and colon (with rectum). The growth of some lymphoid tissues was also assessed considering spleen mass and length, caecal appendix mass and length, *sacculus rotundus* mass and Peyer's patches number and unit mass. These organs have various implications in the immune system. The caecal appendix is a primary lymphoid organ allowing the production and maturation of B lymphocytes in young rabbits. Moreover it is a secondary lymphoid organ inducing specific immune answers, just as Peyer's patches and *sacculus rotundus*. Spleen is a lymphoid organ linked to cell immunity

#### III.D. FEED INTAKE LEVEL AND GROWTH

Feed intake of the AL group was measured once a week throughout this trial, whereas feed intake of restricted rabbits (R) was determined every day during the first period of the experiment, then once a week during the second part, as for the control group (AL).

Rabbits were individually weighed at the weaning age, then at 49, 56 and 72 days. Daily mass gain (g/day/rabbit), feed intake (g/day/rabbit) and feed conversion ratio were determined for the first period (28-49 days old), during the first week of the second period (49-56 days old), for the remaining part of the second period (56-72 days old), for the whole second period (49-72 days old), and for the whole experiment (28-72 days old).

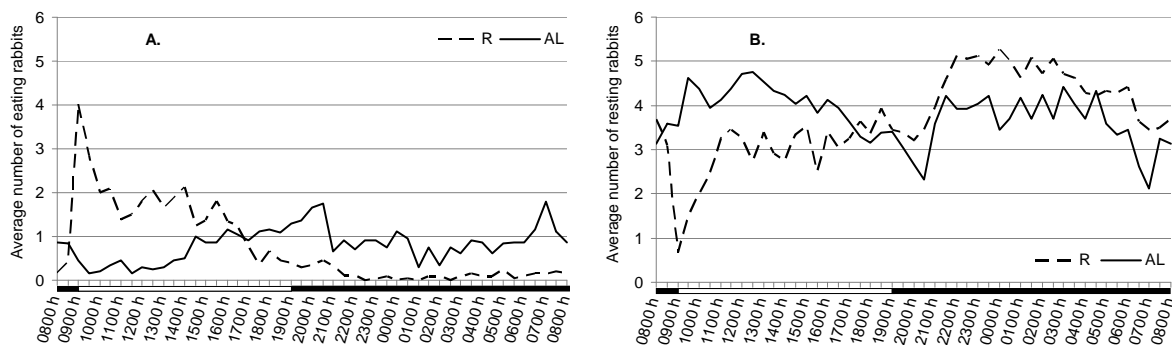
#### III.E. LESIONS AND HEALTH STATUS

All rabbits were individually examined at weaning (28 days old) and at the end of the first period (49 days old) and severity of body scratches, lesions and injuries were registered. The lesions score allowed determining if the restriction feed intake induced more aggressiveness than the *ad libitum* feeding. Following this aim, these physical conclusions were completed by attention paid to abnormal and/or aggressive behaviours during the scan or focal observations. Morbidity and mortality, implied in both welfare and feed restriction efficiency evaluations, were also checked daily.

#### III.F. STATISTICAL ANALYSES

All statistical analyses were performed using the R software version 2.9.2. The data concerning feed intake, growth and feed conversion ratio were analyzed using a mixed model

including the room effect as a random effect. The growth of the organs was analyzed by ANOVA, using a model including two effects (feed intake level and animal age) and considering their interaction. For behavioural data from scan sampling, data obtained for the 6 rabbits of the 6 cages per group observed per day (36 rabbits/group per day) were averaged for the 4 video-taped days of the restriction period. Concerning the second period (*ad libitum*), we looked if animals kept the activities rhythms they had during the first period (restriction) or if they spontaneously adopted feed intake and resting habits of *ad libitum* rabbits. The data collected from the AL group during two days of the second period were averaged, whereas both days recorded during the second period were considered separately for R rabbits. Data obtained by focal sampling for the 12 rabbits observed per period and per group were averaged. These data were analyzed by ANOVA using a model with two effects (feed intake level and phase of the day) and considering their interaction. Moreover, data were presented according to both periods.



**Figure 19** : Average number of rabbits eating (A-) and resting (B-) over 24 hours (lightening period □ and darkness period ■) during restriction period for restricted (R) and *ad libitum* fed (AL) rabbits

## IV. RESULTS

### IV.A. FEEDING BEHAVIOUR

During the first period (restriction), compared to rabbits fed freely, restricted rabbits showed a high feeding activity in a brief time (less than half a day) (Figure 19.A.). As a matter of fact, *ad libitum* rabbits had a feeding activity quite balanced along a nycthemeron with two moments of main feeding activity: during the first hour of the dark period (1.7 out of 6 rabbits eating, figure 19 A.) and 2 hours before the lightening period (2 out of 6 rabbits, figure 19.A.). The strongest feeding activity of the R group was observed during the first hour following the feed supply, with an average of 4 out of 6 rabbits eating (Figure 19.A.), even if it was

lightness. So, feeding activity of R rabbits implied almost two times more animals than for the AL group at the peak. During the first period, the total feeding activity duration and the number of meals of the AL rabbits were similar between both phases studied, whereas no feeding activity of R rabbits happened during the 1<sup>st</sup> phase of the nycthemeron (from 0830 h to 2130 h) (Table 23). At 1600 h, restricted rabbits had already eaten all the daily feed supplied. Nevertheless these rabbits continued visiting the feeding troughs until the next feed supply. That explained why restricted rabbits were still observed “eating” during the darkness period by scan sampling (Figure 19.A.), while only visiting the feeding troughs. The number of meals and the total duration spent to eat for the nycthemeron were lower for restricted rabbits compared to the AL rabbits by 1/3 ( $P=0.003$ ) and 1/4 ( $P<0.001$ ), respectively. Simultaneously we did not observe any significant variation of the number of drinks in both groups of rabbits (AL or R) during the first period (restriction) (Table 23).

**Tableau 23** : Characteristics of drinks and meals considering both periods of the study and according to feed intake level (AL, *ad libitum* vs. R, restricted) and to days part (from 0830 h to 2130 h: 1st phase and from 2130 h to 0830 h: 2nd phase)

|                                   | 1 <sup>st</sup> phase |                       | 2 <sup>nd</sup> phase |                        | SEM*     | P level |        |        |
|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------|---------|--------|--------|
|                                   | AL                    | R                     | AL                    | R                      |          | Intake  | Phase  | Inter. |
| <i>First period (Restriction)</i> | <i>n=12</i>           | <i>n=12</i>           | <i>n=12</i>           | <i>n=12</i>            |          |         |        |        |
| Number of drinks                  | 25 <sup>bc</sup>      | 33 <sup>c</sup>       | 22 <sup>b</sup>       | 5 <sup>a</sup>         | 1.9      | NS      | <0.001 | <0.001 |
| Number of meals                   | 21 <sup>b</sup>       | 27 <sup>b</sup>       | 20 <sup>b</sup>       | 0 <sup>a</sup>         | 1.8      | 0.003   | <0.001 | <0.001 |
| Average of meals duration         | 00:04:57 <sup>b</sup> | 00:06:47 <sup>b</sup> | 00:04:56 <sup>b</sup> | 00:00:00 <sup>a</sup>  | 00:00:27 | 0.003   | <0.001 | <0.001 |
| Total meals duration              | 01:42:14 <sup>b</sup> | 02:30:09 <sup>c</sup> | 01:35:04 <sup>b</sup> | 00:00:00 <sup>a</sup>  | 00:08:14 | <0.001  | <0.001 | <0.001 |
| <i>Second period (fed freely)</i> | <i>n=12</i>           | <i>n=12</i>           | <i>n=12</i>           | <i>n=12</i>            |          |         |        |        |
| Number of drinks                  | 20 <sup>b</sup>       | 32 <sup>c</sup>       | 16 <sup>b</sup>       | 8 <sup>a</sup>         | 1.5      | NS      | <0.001 | <0.001 |
| Number of meals                   | 20 <sup>a</sup>       | 36 <sup>b</sup>       | 18 <sup>a</sup>       | 12 <sup>a</sup>        | 1.7      | 0.038   | <0.001 | <0.001 |
| Average of meals duration         | 00:03:53 <sup>a</sup> | 00:06:06 <sup>b</sup> | 00:04:26 <sup>a</sup> | 00:04:50 <sup>ab</sup> | 00:00:14 | 0.002   | NS     | 0.028  |
| Total meals duration              | 01:15:35 <sup>a</sup> | 03:22:20 <sup>b</sup> | 01:16:46 <sup>a</sup> | 00:54:51 <sup>a</sup>  | 00:09:26 | <0.001  | <0.001 | <0.001 |

\* SEM: standard error of the mean

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model holding both factors: intake level and phase)

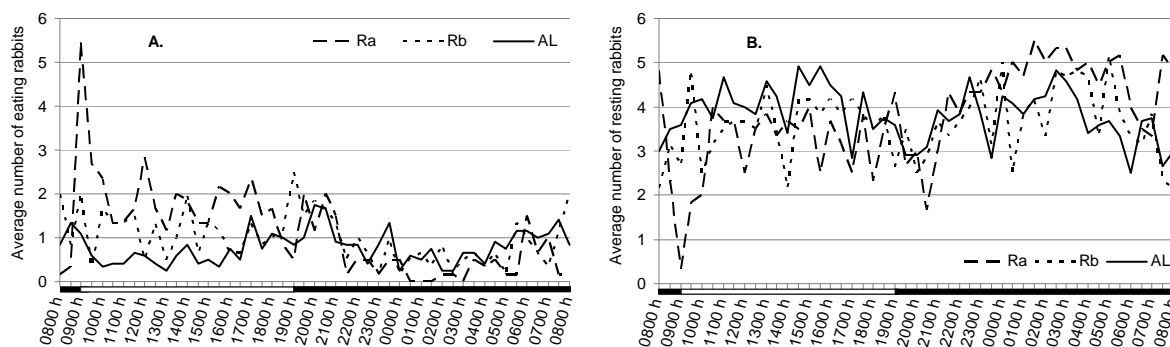
When R rabbits were fed freely (second period, observations realized during the first week), we observed that their circadian eating activity was significantly higher than that of the AL group, considering meals number (48 vs. 38,  $P=0.038$ , table 23) and total meals duration (04:17:25 vs. 02:32:33,  $P<0.001$ , table 23). Moreover, considering the whole first week of the second period, we observed that the R rabbits still expressed the main part of their feeding activity during the 1<sup>st</sup> phase of the nycthemeron (36 vs. 12 meals,  $P<0.001$ ), as they did throughout the first period (restriction), whereas AL rabbits showed an activity equally shared between both phases (Table 23). Scan sampling data (Figure 20.A.) showed that at the first nycthemeron of freely supply (50 days old) 5.5 R rabbits were found eating around 0900 h,

which was the feed supply time during the first period. Two days later, the eating rabbits pattern was more balanced throughout the nycthemeron, i.e. getting closer to the AL group pattern.

#### IV.B. RESTING BEHAVIOUR

Rabbits resting activity patterns evolved in parallel with the eating activity, whatever the group considered (Figure 19.B. and 20.B.). Indeed, the peak of AL rabbits feeding activity, occurring at the beginning of darkness (Figure 19.A. and 20.A.), was simultaneous to a drop of the resting activity (Figure 19.B. and 20.B.), likewise what happened for R rabbits around 0900 h (Figure 19.B.) corresponding to a peak of eating activity (Figure 19.A.).

Moreover during the first period (Figure 19.A.) and at 50 days of age (rabbits fed *ad libitum*, figure 20.A.), R rabbits showed the lowest number of feedings at darkness. Simultaneously, we observed that around 5 out of 6 R rabbits were resting throughout the darkness time during the first period (Figure 19.B.), likewise at 50 days (Figure 20.B.).



**Figure 20** : Average number of rabbits eating (A-) and resting (B-) over 24 hours (lightening period □ and darkness period ■) once rabbits were fed freely for restricted rabbits just after *ad libitum* feed supply (Ra), 2 days after *ad libitum* feed supply (Rb) and for *ad libitum* rabbits (AL).

#### IV.C. DIGESTIVE TRACT AND LYMPHOID TISSUES GROWTH

Results given in table 24 showed that the restriction did not significantly interfere with the caecum and colon growth at the end of the restriction period (49 days old). Nevertheless, the small intestine length of R rabbits was significantly smaller (-31 cm) than that of the AL rabbits ( $P=0.003$ ) at the end of this period. All lymphoid tissues were affected by the feed intake level (R vs. AL, for the first period), except for the *Sacculus rotundus* mass, which was only age-dependent ( $P<0.001$ , table 24). The R rabbits spleens were 1/6 less long and 1/3 less heavy than what measured for the AL spleens ( $P=0.003$  and  $0.045$ , respectively). Unit masses

of Peyer patches decreased of almost 1/6 with feed restriction ( $P=0.006$ ), whereas their number was not significantly influenced.

**Tableau 24** : Digestive tract and lymphoid tissues growth according to the age (49 or 72 days old) and to the intake level (AL, *ad libitum* vs. R, restricted)

|                               | 49 days old        |                    | 72 days old        |                    | SEM*  | P level |        |        |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|---------|--------|--------|
|                               | AL<br>n=8          | R<br>n=8           | AL<br>n=8          | R<br>n=8           |       | Intake  | Age    | Inter. |
| <b>Digestive tract length</b> |                    |                    |                    |                    |       |         |        |        |
| Small intestine, cm           | 233.1 <sup>b</sup> | 201.9 <sup>a</sup> | 293.1 <sup>c</sup> | 293.8 <sup>c</sup> | 7.70  | 0.021   | <0.001 | 0.017  |
| Caecum, cm                    | 44.4 <sup>ab</sup> | 40.4 <sup>a</sup>  | 48.8 <sup>b</sup>  | 48.8 <sup>b</sup>  | 1.04  | NS      | 0.001  | NS     |
| Colon, cm                     | 94.4 <sup>a</sup>  | 91.3 <sup>a</sup>  | 116.3 <sup>b</sup> | 116.9 <sup>b</sup> | 3.01  | NS      | <0.001 | NS     |
| <b>Lymphoid tissues</b>       |                    |                    |                    |                    |       |         |        |        |
| Spleen                        |                    |                    |                    |                    |       |         |        |        |
| Length, cm                    | 5.9 <sup>ab</sup>  | 4.8 <sup>a</sup>   | 6.4 <sup>b</sup>   | 5.5 <sup>ab</sup>  | 0.18  | 0.002   | 0.062  | NS     |
| Mass, g                       | 1.32 <sup>a</sup>  | 0.85 <sup>a</sup>  | 2.25 <sup>b</sup>  | 1.41 <sup>ab</sup> | 0.140 | 0.007   | 0.003  | NS     |
| Caecal appendix               |                    |                    |                    |                    |       |         |        |        |
| Length, cm                    | 9.5 <sup>a</sup>   | 8.6 <sup>a</sup>   | 12.1 <sup>b</sup>  | 11.5 <sup>b</sup>  | 0.33  | 0.08    | <0.001 | NS     |
| Mass, g                       | 5.66 <sup>b</sup>  | 3.86 <sup>a</sup>  | 3.88 <sup>a</sup>  | 3.98 <sup>a</sup>  | 0.205 | 0.013   | 0.015  | 0.006  |
| Sacculus rotundus             |                    |                    |                    |                    |       |         |        |        |
| Mass, g                       | 1.65 <sup>a</sup>  | 1.43 <sup>a</sup>  | 9.74 <sup>b</sup>  | 9.22 <sup>b</sup>  | 0.748 | NS      | <0.001 | NS     |
| Peyer patch                   |                    |                    |                    |                    |       |         |        |        |
| Number                        | 5.9 <sup>ab</sup>  | 4.9 <sup>a</sup>   | 6.0 <sup>ab</sup>  | 7.5 <sup>b</sup>   | 0.27  | NS      | 0.004  | 0.009  |
| Unit mass, g                  | 0.17 <sup>a</sup>  | 0.14 <sup>a</sup>  | 0.26 <sup>b</sup>  | 0.23 <sup>b</sup>  | 0.010 | 0.006   | <0.001 | NS     |

\* SEM: standard error of the mean

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model holding both factors: intake level and age)

At the end of the experiment (72 days old), including 3.5 weeks of feeding *ad libitum* after the period of restriction, the R group animals showed a length of digestive tract similar to that of the AL group with less than 1 cm of difference whatever the considered organ (Table 24). Most of the delays of growth of lymphoid tissues observed at the end of the first period in R rabbits remained unchanged till the end of the experiment. At the opposite, the caecal appendix mass of the AL rabbits showed a decrease of about 1/3 between 49 and 72 days of age ( $P < 0.001$ ), which was not noticed in the R group.

#### IV.D. FEED INTAKE AND GROWTH

Over the first period (restriction), the feed intake of the R group rabbits (-36% compared to the control AL group) was slightly over the restriction rate of -25% we expected (Table 25). During the first week of the second period, the R group rabbits showed an over intake of 26% compared to control ( $P=0.03$ ), nevertheless no significant difference was underlined between feed intakes of both groups after the first week of the second period until the end of the experiment or throughout the whole experiment. We did not observe significant differences of

daily mass gain between groups, whatever period considered. We did not measure a feed efficiency improvement with the restriction strategy throughout the experiment.

**Tableau 25** : Growth and intake pattern of the young rabbits, according to the intake level

|                                       | AL    | R     | SEM*  | P level         |
|---------------------------------------|-------|-------|-------|-----------------|
| <b>Feed intake (g/day/rabbit)</b>     |       |       |       |                 |
| Days 28 to 49 (n=72)                  | 116.3 | 74.1  | 2.52  | ND <sup>‡</sup> |
| Days 49 to 56 (n=72)                  | 162.5 | 205.9 | 2.77  | 0.030           |
| Days 56 to 72 (n=72)                  | 151.1 | 165.1 | 1.33  | NS              |
| Days 49 to 72 (n=72)                  | 154.6 | 177.5 | 1.62  | 0.08            |
| Days 28 to 72 (n=72)                  | 136.3 | 128.2 | 0.71  | NS              |
| <b>Live mass (g)</b>                  |       |       |       |                 |
| Day 28 (n=432)                        | 593   | 593   | 2.19  | NS              |
| Day 49 (n=432)                        | 1763  | 1433  | 9.83  | NS              |
| Day 56 (n=416)                        | 2095  | 1934  | 7.25  | 0.048           |
| Day 72 (n=416)                        | 2686  | 2571  | 8.72  | 0.090           |
| <b>Daily mass gain (g/day/rabbit)</b> |       |       |       |                 |
| Days 28 to 49 (n=432)                 | 55.7  | 40.0  | 0.45  | NS              |
| Days 49 to 56 (n=416)                 | 47.1  | 71.6  | 0.75  | NS              |
| Days 56 to 72 (n=416)                 | 36.9  | 39.8  | 0.33  | NS              |
| Days 49 to 72 (n=416)                 | 40.0  | 49.5  | 0.37  | NS              |
| Days 28 to 72 (n=416)                 | 47.5  | 45.0  | 0.19  | 0.085           |
| <b>Feed conversion ratio</b>          |       |       |       |                 |
| Days 28 to 49 (n=72)                  | 2.09  | 1.86  | 0.019 | NS              |
| Days 49 to 56 (n=72)                  | 3.45  | 2.92  | 0.045 | NS              |
| Days 56 to 72 (n= 72)                 | 4.12  | 4.17  | 0.044 | NS              |
| Days 49 to 72 (n=72)                  | 3.87  | 3.62  | 0.038 | NS              |
| Days 28 to 72 (n=72)                  | 2.87  | 2.85  | 0.010 | NS              |

\* SEM: standard error of the mean

<sup>‡</sup> ND: not determined,  $\sigma^2 = 0$

#### IV.E. LESIONS AND HEALTH STATUS

Whatever the group considered, no severe lesions (just a few scratched ears) were found at the end of the first period. Moreover, no aggressive behaviour was observed during the scan or focal observations. No more abnormal behaviours were noticed in restricted group than in *ad libitum* group (personal observation). No morbidity and mortality were observed.

### V. DISCUSSION

#### V.A. FEED INTAKE RESTRICTION AND BEHAVIOUR

In good agreement with Horton *et al.* (1974), our data show that the feeding patterns of rabbits fed freely are function of the circadian rhythm. For instance, Prud'hon *et al.* (1975) have noticed that rabbits fed *ad libitum* showed the maximum level of consumption during the last hour of light. Similarly to our data, previous authors registered a period of low consumption in the middle of the lightening period and another one in the course of the darkness which tends to disappear with the age (Jolivet *et al.*, 1983; Prud'hon *et al.*, 1975). Unlike rabbits fed *ad*

*libitum*, which feed intake pattern depended on the circadian rhythm, we observed that, in restricted rabbits, the feed intake rhythm was function of the feed supply time. This explains why our two groups were desynchronized, as we supplied feed to the restricted group of rabbits in the morning, i.e. during a low consumption time for the *ad libitum* group. Gidenne *et al.* (2009) and Gidenne and Feugier (2009) noticed that rabbits restricted at -40% needed 6 to 7 hours to eat feed quantity supplied, and 7 to 8 hours in case of a -30% restriction, these observations were consistent with our results where the rabbits required around 7 hours to eat the whole amount of feed distributed with a -36% restriction. After two days fed *ad libitum*, previous restricted rabbits presented a feed intake pattern close to *ad libitum* rabbits. We are not able to assert that the modification of the intake rhythm R vs AL has to be considered as a damage of animal welfare.

Around 40 drinks and 40 meals sequences per nycthemeron were counted in our study for rabbits fed *ad libitum*, with an average of 2 h 53 min devoted daily to the eating activity. Previous observations on young rabbits (Prud'hon *et al.*, 1975) concluded to 22 to 41 drinks and 35 to 44 meals per day. A previous study also registered the daily duration devoted to the eating activity for adult rabbits, up to 2 h 15 min (Prud'hon *et al.*, 1972). So our results match those of Prud'hon *et al.* (1972, 1975). We have also observed that the resting activity decreased simultaneously when intensive eating activity was performed. This suggests a transfer of activity.

#### V.B. FEED INTAKE RESTRICTION AND MATURATION OF THE GUT AND SOME LYMPHOID ORGANS

Maturation of the digestive tract of rabbits was already studied in 1972 (Lebas and Laplace). They underlined an increase of the indicators of maturation (length and mass) of the small intestine, caecum and colon between 3 and 11 weeks of age. Caecum length (excluding caecal appendix) was 2.7 times higher at 9 weeks old than at weaning. Similarly, the small intestine developed quickly until 9 weeks of age: its length was doubled. At 7 and 9 weeks of age, length measurements of this organ were close to our data, i.e. around 2.4 and 3.2 m, respectively (Lebas and Laplace, 1972). The colon length was also increased by 2.5 times in this study, with registrations close to our results: 97 and 113 cm at 7 and 9 weeks old, respectively. Moreover, we demonstrated a significant delay of the small intestine growth due to the restriction. Even if this feeding strategy (feed restriction of -36%) interfered with part of the rabbit digestive tract growth, it appeared being a mode of feed supply economically



interesting in breeding units as it did not significantly affect zootechnical performances, i.e. it damaged neither the feed efficiency, nor the growing performance.

Lebas and Laplace (1972) showed that the caecal appendix traits were age dependent. Thus, this lymphoid organ length was 9.2 and 11.6 cm at 7 and 8 weeks (Lebas and Laplace, 1972). These are close to our observations. Their mass data (at 7 weeks: 4.15 g and at 8 weeks: 6.26 g, Lebas and Laplace, 1972) did not corroborate the remark we did from the measurements we obtained, i.e. the significant decrease between both ages for *ad libitum* rabbits. Contrary to what was first hypothesized, feed intake restriction cannot explain this feeding strategy ability to improve health status in breeding units, since it had not significant effect on the studied lymphoid organs. Although the organs, we focused on, are implied in various levels of immune answers.

#### V.C. FEED INTAKE, GROWTH, FEED EFFICIENCY AND HEALTH STATUS OF RESTRICTED FATTENING RABBITS

We observed a difference between the restriction rate of -25% initially planned and the restriction rate of -36% finally applied. This is due to our method of determination of the quantity of feed which has to be supplied. In fact there was a 1 week gap between the period of voluntary feed intake of AL rabbits taken into account for the calculation of the amount of feed to be distributed to the R rabbits and the time when it was effectively given to them.

In this study, the restriction of the feed intake on R rabbits did not affect significantly their growth performance during the first period of the experiment (restriction). It is certainly why we did not notice any compensatory growth once these restricted rabbits were fed *ad libitum* during the second period. Besides, this phenomenon of compensatory growth was emphasized only by few scientists such as Tumova *et al.* (2003) who observed a daily mass gain of +40% for previously restricted rabbits, immediately after the end of restriction, compared to a control group fed *ad libitum*, and by Gidenne *et al.* (2009) who have shown recently a proportional increase of the compensatory growth level with the restriction rate applied (from -10% up to -40%). The restriction rates applied in these experiments were close to ours in this assay.

No significant feed efficiency improvement was underlined due to restriction in this experiment, whereas it has been reported in previous studies. Indeed, in collective fattening experiments, Gidenne *et al.* (2009) and Martignon *et al.* (2010) underlined an improvement of the feed efficiency of 9 and 4%, respectively, with a restriction rate of 30 %. The same

restriction rate applied in a digestibility study, involving rabbits caged individually, showed an evolution of the feed conversion ratio of -10 % (Gidenne and Feugier, 2009). In spite of an efficient restriction rate higher than those of these experiments, we did not underline a significant improvement of feed efficiency.

We did not observe either aggressiveness due to feeding restriction or more lesions in the restricted group. No increase of abnormal behaviours was noticed because of restriction. Contrary to previous authors, for instance Gidenne et al. (2009) who observed Epizootic Rabbit Enteritis, the rabbits we studied did not have digestive troubles, even in the *ad libitum* group. Therefore, we were not able to demonstrate the feeding restriction efficiency.

## VI. CONCLUSION

We have emphasized that a feeding restriction modified the eating rhythm in growing rabbits. Indeed the voluntary feed consumption depended on the circadian rhythm for rabbits fed *ad libitum*, whereas the eating activity of the restricted animals (-36% of voluntary feed intake) was exclusively function of the time of the feed distribution (one distribution per day). Once the rabbits were fed *ad libitum* after a period of restriction, the feed intake pattern of the previous restricted rabbits looked like becoming the consumption rhythm of rabbits fed *ad libitum*. In previous studies, feed intake restriction was noticed as being economically interesting, because improving digestive efficiency of growing rabbits. Nevertheless, this way of feeding was often a controversial breeding strategy as modifying feeding rhythm of rational rabbits breeding units. On the one hand, feed intake restriction is usually put into practice in breeding units in order to effectively prevent fattening rabbits morbidity. Moreover, this feeding strategy was previously underlined by scientists as being able to decrease rabbits morbidity and mortality after weaning without using antibiotics, even if we did not see this phenomenon because of the good health status of our animals. On the other hand, we did not show any increase of aggressiveness between individuals fed restricted. Thus we can conclude that this feeding strategy should be considered as an interesting way of reducing antibiotics distribution in rabbiteries although we showed it disturbed the feed intake rhythm. This could be avoided if feed distribution for restricted rabbits occurred the hour before the darkness period. Future assays should confirm this and its efficiency to prevent digestive disorders.

## VII. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Florence Marie and all the staff of the “Service Expérimental Avicole et Cunicole” (Anses Ploufragan) for their technical contribution to animal care; also Anne Jourden for her assistance in video recording analyses.

## VIII. REFERENCES

- Aubry-Damon, H., Grenet, K., Ndiaye Sall, P., Cordeiro, E., Rigaud, E., Valenciano, M., Liénard, M., Delzescaux, D., Descenclos, J-C. and Andremont, A. 2001. Résistance aux antibiotiques des bactéries commensales isolées chez les éleveurs de porcs.
- Boisot, P., D. Licois, and T. Gidenne. 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (eel) chez le lapin en croissance. In: Proceedings "10<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole", Paris, France. p 267-370.
- Chevance, A., and A. Moulin. 2009. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008.
- Di Meo, C., F. Bovera, S. Marono, N. Vella, and A. Nizza. 2007. Effect of feed restriction on performance and feed digestibility in rabbits. *Ital. J. Anim. Sci.* 6: 765-767.
- European Union, 2003a. Règlement du parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux. *Journal Officiel L268* du 18.10.2003 page 29.
- European Union. 2003b. Protection of animals used for experimental purposes. Directive 86/609/eec of 24th novembre 1986, amended 16th septembre 2003, *Official Journal of European Union*.
- Gidenne, T. 2000. Recent advances in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Science* 8: 23-32.
- Gidenne, T., S., Combes, A., Feugier, N., Jehl, P., Arveux, P., Boisot, C., Briens, E., Corrent, H., Fortune, S., Montessuy, and S., Verdelhan. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3: 509-515.
- Gidenne, T., and A. Feugier. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal* 3: 501-508.
- Horton, B. J., S. D. Turley, and C. E. West. 1974. Diurnal variation in the feeding pattern of rabbits. *Life Sci.* 15: 1895-1907.

- Hulot, F., J. C. Mariana, and F. Lebas. 1982. Establishment of puberty (folliculogenesis and ovulation) in the doe-rabbit. Effect of rationing the diet. *Reproduction Nutrition Development* 22: 439-453.
- Jolivet, E., Y. Reyne, and J. Teyssier. 1983. Methodological approach to the circadian pattern of food intake in the growing domestic rabbit. *Reproduction Nutrition Development* 23: 13-24.
- Larour, G. J-L., Jobert, L., Balaine, F., Eono, M-F., Klein, T., Ledein, S., Le Bouquin, and M., Guittet. 2004. Etude des facteurs de risque de l'expression aiguë de l'entérococolite épizootique du lapin en engraissement. *Epidémiologie et santé animale* 45: 91-99.
- Lebas, F., and J. P. Laplace. 1972. Mensurations viscérales chez le lapin. 1) croissance du foie, des reins et des divers segments intestinaux entre 3 et 11 semaines d'âge. *Ann. Zootech.* 21: 37-47.
- Martignon, M. H., S. Combes, and T. Gidenne. 2010. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 156: 156-162.
- Office national interprofessionnel de l'élevage et de ses productions. 2008. Le marché des produits laitiers, carnés et avicoles en 2008.
- Prud'hon, M., Y. Carles, J. Goussopoulos, and P. F. Koehl. 1972. Enregistrement graphique des consommations d'aliments solide et liquide du lapin domestique nourri *ad libitum*. *Ann. Zootech.* 21: 451-460.
- Prud'hon, M., M. Chérubin, J. Goussopoulos, and Y. Carles. 1975. Evolution, au cours de la croissance, des caractéristiques de la consommation d'aliments solide et liquide du lapin domestique nourri *ad libitum*. *Ann. Zootech.* 24: 289-298.
- Rommers, J. M., R. Meijerhof, J. P. T. M. Noordhuizen, and B. Kemp. 2004. The effect of level of feeding in early gestation on reproductive success in young rabbit does. *Animal reproduction science* 81: 151-158.
- Tumova, E., V. Skrivanova, and M. Skrivan. 2003. Effect of restricted feeding time and quantitative restriction in growing rabbits. *Arch. Geflügelkd.* 67: 182-190.
- Xiccato, G. 1999. Feeding and meat quality in rabbits: A review. *World Rabbit Science* 7: 75-86.



### PARTIE 3 - LA RESTRICTION ALIMENTAIRE PEUT ELLE RENFORCER LA RESISTANCE DU LAPIN A UN PATHOGENE DIGESTIF ?

---

La littérature indique que la restriction alimentaire permet d'améliorer la résistance du jeune lapin lors d'une reproduction expérimentale d'un épisode d'EEL (Boisot et al., 2003), maladie pour laquelle il est toujours impossible d'identifier le pathogène responsable, et qui ne provoque pas d'inflammations ou de fortes lésions intestinales. Aussi, il est important de vérifier, à l'aide d'un autre modèle pathologique, clairement identifié et qui touche l'intestin grêle et le cæcum, si le contrôle du niveau d'ingestion peut présenter un effet favorable.

Nous avons donc choisi de mettre au point un modèle basé sur une reproduction expérimentale de colibacillose à pathogénicité modérée. Il s'agit de simuler une dégradation de l'état sanitaire, sans atteindre un fort taux de mortalité. Nous détaillerons ci-après notre modèle, qui utilise une souche d'*Escherichia coli* peu pathogène : O128:C6 (Camguilhem et Milon, 1989; Milon et al., 1990). La souche *E. coli* O128:C6 est rhamnose, sucrose, raffinose et dulcitol positif et sorbose négatif (Camguilhem et Milon, 1989). Ces auteurs ont aussi déterminé *in vitro* qu'elle possède la capacité d'adhérer aux villosités intestinales des lapereaux (8 jours) et des lapins en croissance (6 semaines) par l'expression à sa surface d'une petite protéine, l'adhésine 32K, aussi impliquée dans les mécanismes d'adhésion diffuse (Milon et al., 1990). De plus, cette souche exerce un effet protecteur contre la souche O103 très pathogène (Milon et al., 1992).



## REPONSE DIGESTIVE DES JEUNES LAPINS A UNE INOCULATION EXPERIMENTALE DE COLIBACILLOSE AVEC ESCHERICHIA COLI O128:C6, SELON LE NIVEAU D'INGESTION

---

**Article en préparation / Revue choisie pour soumission : Veterinary Microbiology**

M.H. Martignon, D. Licois, C. Burel, E. Reperant, G. Postollec, T. Gidenne, C. Valat

Mots clés : lapins, *Escherichia coli* O128:C6, écosystèmes bactériens de l'iléon et du cæcum, niveau d'ingestion, histométrie iléale, haptoglobine

### Résumé

Cette étude avait pour but dans un premier temps d'investiguer l'impact de colibacilles entéropathogènes (EPEC) sur le tractus digestif du lapin et dans un second temps de déterminer l'effet de la restriction sur l'infection. Les lapins ont été divisés en 4 lots (n=45/lot) selon deux facteurs (l'infection (témoins non infectés (C) vs. infectés (I)) et le niveau d'ingestion) à deux niveaux chacun. Le niveau d'ingestion était *ad libitum* (C100 et I100) vs. restreint à -25 % de l'ingéré volontaire (C75 et I75). L'infection a été mise en place à 31 jours d'âge (3 jours après le sevrage) par inoculation orale de la souche O128:C6 d'*Escherichia coli* ( $2,2 \cdot 10^8$  CFU/animal). Les diarrhées ont été observées entre le jour 3 et le jour 6 post inoculation (pi), le taux de morbidité le plus important a été enregistré 4 jours pi. Le pic d'excrétion dans les échantillons fécaux est retardé pour les animaux *ad libitum*, il a été détecté à D4 et D6 pour les lapins restreints et *ad libitum*, respectivement. Le pic d'infection, correspondant au plus au niveau d'*E. coli* dans le cæcum, au taux sérique d'haptoglobine le plus élevé et à l'effet de l'infection le plus marqué sur la structure de la communauté bactérienne iléale, a été observé à 5 jours pi, alors que la structure de la biocénose cæcale n'a pas été perturbée. Simultanément, le pH cæcal et la diversité bactérienne iléale ont été réduits. Pour les lapins *ad libitum* infectés mais pas pour les lapins restreints. De plus, les deux rapports : hauteur des villosités/profondeur des cryptes et surface des villosités/surface des cryptes de l'iléon ont été significativement réduites par l'infection. Aucun effet significatif de la restriction alimentaire n'a été détecté sur la structure microbienne intestinale, la diversité bactérienne et la morphométrie de l'iléon. Toutefois, une légère diminution de la variabilité



des profils bactériens a été observée à la fin de l'expérience pour les lapins restreints infectés. En conclusion, les effets de l'infection ont été plus significatifs au niveau de l'iléon que du cæcum et la restriction alimentaire semblerait stabiliser l'écosystème bactérien après une infection.

DIGESTIVE RESPONSE OF YOUNG RABBITS TO AN EXPERIMENTAL  
INOCULATION OF COLIBACILLOSIS WITH ESCHERICHIA COLI O128:C6,  
ACCORDING TO THE FEED INTAKE LEVEL

---

Article in preparation / Journal chosen for submission: **Veterinary Microbiology**

M.H. Martignon<sup>1,2,3,4</sup>, D. Licois<sup>5</sup>, C. Burel<sup>1</sup>, E. Reperant<sup>1</sup>, G. Postollec<sup>1</sup>, T. Gidenne<sup>2,3,4</sup>, C.  
Valat<sup>1,a</sup>

<sup>1</sup> Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Alimentation Animale, BP 53, F-22440  
Ploufragan, France

<sup>2</sup> INRA, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-  
31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup> Université de Toulouse, INPT ENSAT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion  
Ecosystème et Métabolisme, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>4</sup> ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-  
31076 Toulouse, France

<sup>5</sup> INRA, UR 1282, IASP bât. 213, 37380 Nouzilly, France

Keywords: rabbits, *Escherichia coli* O128:C6, caecal and ileal bacterial ecosystems, feed  
intake level, ileal histometry, haptoglobin



## I. ABSTRACT

This study aimed firstly to investigate the impact of Enteropathogen *Escherichia coli* (EPEC) on the rabbit digestive tract and secondly to determine the effect of feed restriction on the infection. Rabbits were divided into 4 groups (n = 45/group) considering two factors (infection: Control (C) vs Infected (I) and feed intake level) at two levels. The feed intake level was *ad libitum* (C100 and I100) vs. restricted at -25% of the voluntary feed intake (C75 and I75). The infection was carried out at 31 days old (3 days post weaning) by oral inoculation of *Escherichia coli* O128:C6 ( $2.2 \times 10^8$  CFU/animal). Diarrheas were observed between 3-6 days post infection (pi), the higher number of morbid animals was recorded 4 days pi. The peak of *E. coli* excretion in fecal samples is delayed for *ad libitum* rabbits, it was observed at D4 and D6 for restricted and *ad libitum* rabbits respectively. The peak of infection corresponding to the higher level of *E. coli* in caecum, the higher level of haptoglobin in serum and the higher effect of the infection on the ileal bacterial community structure was observed at 5 days pi, whereas the caecal biocenosis structure was not disturbed. At the same time, the caecal pH and the ileal bacterial diversity were decreased in *ad libitum* infected rabbits but not in restricted rabbits. Moreover, both ratios: *villus* height/crypt depth and *villus* area/crypt area of ileum were significantly reduced by the infection. No significant effect of feed restriction was detected, on the intestinal microbial structure, on the bacterial diversity and on the ileal morphometry but a slight decrease of the variability of bacterial profiles was observed at the end of the experiment for infected restricted rabbits. In conclusion, the effects of the infection were more significant on the ileum than on the caecum and feeding restriction seems to stabilize the bacterial ecosystem after the infection.



## II. INTRODUCTION

Digestive disorders have been emphasized as the most prevalent cause of mortality for growing rabbits. In addition to mortality, they can induce high economic losses by weak growth, bad feed conversion and veterinary costs. Mortality rate in French growing rabbit breeding units has been registered averaging 8.9 % between 2003 and 2008 (Lebas 2005a; Lebas 2005b; Azard et al. 2006; Lebas 2008; Lebas 2009). Colibacillosis are one of the main bacterial causes of pathologies for growing rabbits. *E. coli* involved in rabbit digestive troubles are enteropathogenic (REPEC). They have properties of attaching to the epithelial brush borders (ileum, caecum and colon) inducing villus atrophy (Peeters et al. 1985; Peeters 1988; Licois et al. 1991) and specific digestive lesions, namely attaching and effacing lesions (Frankel et al. 1998 ). According to an epidemiological survey running from 1982 to 1986, enteropathogenic *E. coli* was found in 31.4% of diarrheic rabbits (Peeters 1987). Significance of clinical signs and disease consequences depend on the *E. coli* strain implied (Peeters et al. 1988). *E. coli* strain O128:C6 is known to be weakly pathogenic, inducing more often growth delay, low digestive troubles and no mortality (Camguilhem et al. 1989; Milon et al. 1990; Milon et al. 1992). However the sensitivity to REPEC is rather reduced after 6 weeks old and consequently pathogenicity is reduced in adult rabbits (Licois et al. 1992). The specific sensitivity of the young rabbit concerning digestive disorders is thus probably linked to the incomplete maturation of its digestive and immune systems. In addition, weaning is a critical period for young rabbits which tend to over eat (Foubert et al. 2007). Previous studies emphasized the positive impact of feeding restriction on sanitary health status of young rabbits affected by spontaneous or experimental episodes of Epizootic Rabbit Enteropathy "ERE" (Boisot et al. 2003; Gidenne et al. 2003) but the effect of the restriction on the gut bacterial ecosystems of rabbits infected by enteropathogenic *E. coli* was not studied.

The purposes of this study were: 1- to investigate the impact of enteropathogenic *E. coli* O128:C6 on growing rabbit digestive tract characteristics and particularly on the caecal and ileal ecosystems, 2- to determine the effect of a feed restriction on the rabbit resistance to a REPEC experimental inoculation considering bacteriological, morphometrical and immunological parameters.

### III. MATERIAL AND METHODS

#### III.A. EXPERIMENTAL DESIGN AND ANIMALS

The study was carried out with 180 hybrid commercial breed rabbits (Hycol®) coming from the Anses experimental farm at Ploufragan, France. After weaning at 28 days old, rabbits were identified and divided into 4 groups (C100: uninfected, fed *ad libitum* C75: uninfected feed intake reduced at -25% of the voluntary intake, I100: infected fed *ad libitum* and I75: infected and feed intake reduced). Rabbits were randomly caged (nine rabbits per cage) with a mean initial live weight of  $588 \pm 48$  g (Table 28). At D0, rabbits, aged 31 days, were infected by oral inoculation of *E. coli* O128:C6 ( $2.2 \times 10^8$  CFU/animal). Animals were housed in two separated rooms, one for healthy rabbits and the other for infected rabbits. In each room, half of the rabbits were fed to voluntary feed intake level whereas the other half was restricted fed with a free access to water. The experimental diet (Table 26) was formulated to cover the nutritional requirements of the growing rabbit (Gidenne 2000). No antibiotics were provided during the experiment. The restricted groups were fed daily between 1000 h and 1100 h with a quantity of feed adjusted twice a week

according to the average intake of C100. The breeding units were kept at a temperature of 20 °C ( $\pm 2$  °C) and under a 0900 h to 1900 h lighting schedule alternated with 14 h of darkness. Animals were handled and sacrificed according to the care of animals in experimentation, in agreement with European legislation (European Union 2003). Rabbits were sacrificed by cervical dislocation then killed by slitting throats.

**Tableau 26 : Ingredients of the experimental diet**

| Ingredients                | Quantity, g.kg <sup>-1</sup> |
|----------------------------|------------------------------|
| Thin wheat bran            | 216                          |
| Sunflower 28/30            | 177                          |
| Dehydrated alfalfa 17 LP   | 177                          |
| Dehydrated sugar beet pulp | 137                          |
| Wheat middlings            | 65                           |
| Barley                     | 61                           |
| Apple marc                 | 28                           |
| Sugar cane molasses        | 21.6                         |
| Oats                       | 20                           |
| Rapeseed 00 34/35          | 20                           |
| Citrus pulp                | 20                           |
| Kaolin                     | 20                           |
| Grappe pulp                | 12                           |
| Soybean oil                | 12                           |
| Premix                     | 10                           |
| Lysine 50 Liq              | 2.2                          |
| Ci-choline 75% Liq         | 0.8                          |
| Methionine Liq             | 0.4                          |

#### III.B. INTAKE LEVEL, GROWTH AND SANITARY STATUS

Feed intake of *ad libitum* groups was measured twice a week throughout this trial. Simultaneously, the live mass of all animals was determined. Feed intake of restricted rabbits was measured every day at the same time as feed supply. Morbidity and mortality were

checked daily. Morbid rabbits (Bennegadi et al. 2001) were observed prostrated, bloated and/or showing diarrhea. In addition, animals without visible digestive troubles, but showing a severe growth delay (<20g/d for *ad libitum* rabbits and <10g/d for restricted groups) were counted as morbid.

### III.C. SAMPLING PROCEDURE IN ILEUM AND CAECUM AND CAECAL PH MEASUREMENT

Faecal samples were collected for 24 h ending at 1000 h of D-2, D2, D4, D6 and D11, using containers put under the cages. So each analyzed sample corresponded to one pool of faecal excretions of rabbits of the same group (5 pools/group).

At D-2, D5 and D11, 5 rabbits of each group were sampled. Sacrificed rabbits were selected according to their health status; indeed unhealthy rabbits were preferentially selected. Simultaneously after killing blood samples were collected for inflammation analysis. At D5, ileal segments (15 cm prior ileo-caecal junction) were sampled immediately for histological analysis. Caecal pH was measured rapidly using a glass electrode with a consolidated head and jellified electrolytes (N92136, Fisher Bioblock Scientific). The caecal content was sampled for further bacterial culture. Caecal and ileal contents were also sampled to perform bacterial studies.

### III.D. HISTOMETRIC ANALYSIS

Ileal segments were rinsed with a saline solution of NaCl (9 g/l), then opened longitudinally and immersed in buffered formalin for 12 to 24 h. They were stored in 90% ethanol before analysis according to the method of Goodlad et al. (1991). Samples were stained with Feulgen reagent. Firstly, *villi* and crypts were carefully separated under a dissecting microscope. Secondly, the preparations were mounted between slide and strip with a few drops of an aqueous agent for microscopy. The length and surface area of *villi* and crypts (20 of each sample) as well as the ratio of *villus* height compared to crypts depth and of *villus* area to crypts area, were measured using an optical microscope (Nikon Eclipse E600), a camera (Sony XC77E) and an image analysis software (Visilog 6, Noesis).

### III.E. SERUM HAPTOGLOBIN MEASUREMENT

Serum was isolated from blood samples. Serum haptoglobin concentration was measured using the kit Phase<sup>TM</sup> Haptoglobin (AbCys, Paris, France) following the manufacturer's



instructions. Optical density was read at 620 nm on a microplate reader Sunrise (Tecan, AES Chemunex). This measurement was converted in concentration (mg/ml) using a calibration curve.

### III.F. CULTURE OF GRAM- BACILLUS

Fresh faecal samples (15g) and caecal samples (1g) were diluted ( $10^{-1}$ ) in pepton water. The samples were serially 10-fold diluted in trypton salt and 3 dilutions of each sample were plated on Mac Conkey n°3 (CM0115B, Oxoid, England) agar medium for Gram- bacillus numeration. Purple colonies were counted after incubation at 37°C for 24h. The bacterial concentration in the original sample was calculated. The results are expressed as CFU/g  $\pm$  sd (standard deviation) from 5 cages per group. Serotyping of 15 of all the bacteria colonies growing on Mac Conkey plates was performed using an *E. coli* O128 coagglutination reagent (LDA22, Ploufragan, France).

### III.G. ANALYSIS OF CAECAL AND ILEAL BACTERIAL COMMUNITIES BY CE-SSCP

#### III.G.1. DNA extraction

Total DNA was extracted from about 180- 200 mg of each sample using the QIAamp® DNA stool mini-kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. An additional step was added with lysozyme (Sigma, France) at 30°C during 10 min to allow G+ bacterial lysis after heat denaturation. Extracted DNA was loaded on a 1% agarose gel to check its quality.

#### III.G.2. PCR for all bacteria

For the total microflora analysis, DNA was amplified from 1  $\mu$ l of extracted DNA solution, and added to the PCR mix containing 40.5  $\mu$ l of highly purified water, 5  $\mu$ l of PfuUltra™ II Fusion buffer 10X, 1  $\mu$ l of dNTP (10mM), 1  $\mu$ l of each primer and 0.5  $\mu$ l of Taq PfuUltra™ II Fusion (Stratagene). The targeting DNA sequence of the V3 region of DNA 16S was used for total bacteria recognition with already published primers. Primer w49 (ACGGTCCAGACTCCTACG) was labeled with a 5' – 6 FAM fluorescent dye. Primer w104 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC) was labeled with a 5'HEX fluorescent dye. These primers are specific for the bacterial community (Peu et al. 2006). The mix was run for 2min at 94°C, followed by 25 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 61°C, 30 sec at 72°C, and finally 10 min at

72°C. PCR reactions were performed using a G-storm thermocycler. After amplification, 5 µl of the amplified product (200pb) were run on a horizontal 2% agarose gel in TBE 1X, with a DNA ladder of 100pb size in order to check PCR products (Ozyme, Montigny Le Bretonneux, France). Gels were gel red (Interchim, France) stained during 20 min and the images were captured under UV illumination by a video system using the vision capt1 software.

One µl of the diluted PCR product was mixed with 18.5 µl of formamide (GeneScan-Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 0.5 µl of the internal standard labeled with 6-carboxy-X-rodamine (Rox HD 400 , Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). After a denaturing step at 95°C during 10 min, the mix was quickly cooled on ice during 10 min before loading. Capillary electrophoresis was run at 32°C under 15kV on an AbiPrism Genetic Analyser 3100 Avent (Applied Biosystems)

### III.G.3. Data analysis: Diversity index and structure of communities

The Simpson diversity index was estimated as previously described by Michelland et al. (2010). It summarized a complex community represented in a molecular fingerprint pattern in a single value by taking into account the number of species (number of peaks) and their relative abundance (area under each peak). The study of the structure of the bacterial communities involved the analysis of the size of the various peaks throughout the CE-SSCP profiles and was achieved using StatFingerprints version 1.3 (Michelland et al. 2009).

### III.H. STATISTICAL ANALYSIS

All quantitative variables (live mass, feed intake, mass gain, feed conversion ratio, diversity, histometric measurements, ceecal pH, serum haptoglobin) were analysed according to a linear model (ANOVA) including two effects: infection and intake level, and considering their interaction. All parameters were also analysed using a model with only one factor (groups) and four levels: C100, C75, I100, I75. These quantitative variables were analysed using R software (version 2.7.2). Profiles of bacterial communities of groups were compared using pairwise ANOSIM. The variability within each group was assessed using pairwise “Maximum method” procedures. These methods of analysis are included in the “Statfingerprints” application from R software (version 1.3) (Michelland et al. 2009). Quantitative variable (morbidity) was analysed using the CATMOD procedure of SAS (SAS online guide). Differences were considered significant at  $P < 0.05$  and they were discussed at  $P < 0.1$ .

## IV. RESULTS

### IV.A. DIGESTIVE HEALTH OF GROWING RABBITS

No mortality was observed during the experiment whatever the treatment. Before inoculation, almost any morbidity was registered, whatever the group considered (Table 27). In the four days following inoculation, morbidity rate increased significantly for infected rabbits ( $P = 0.002$ , Table 27) compared to uninfected animals, reaching 1/8 and 1/3 of animals from groups I100 and I75 respectively ( $P < 0.001$ ). At this time, morbidity was mainly due to a delay of growth. Simultaneously, morbidity of control animals remained small (from 0 to 5%) throughout the experiment. Peaks of infection appeared between 4 and 7 days post-inoculation, with the highest level of clinical symptoms (diarrhea, prostration and/or bloating) spread out over D4 and D5 (data not shown). At this time, morbidity reached 48% for I75 and was highly significantly different between infected and uninfected animals ( $P < 0.001$ , Table 27). Seven days post-inoculation, the difference of morbidity was similar among groups, although the infected rabbit morbidity rate was higher than 0% (morbidity rate of the uninfected rabbits,  $P = 0.03$ ). Concerning the whole post-inoculation period (from D0 to D11), the morbidity rate raised up to 1/2 for infected rabbits ( $P < 0.001$ ) As opposed to infection, the intake level was not significantly involved in changes of the morbidity rate.

### IV.B. FEED INTAKE PATTERN AND GROWTH OF YOUNG RABBITS

The intake limitation from the age of 28 up to 42 days was over the restriction level initially planned (-38% vs. -25%). Before infection, a feed intake restriction of -31% led to a significant growth reduction of 43% ( $P < 0.001$ ), inducing a lower live mass for restricted rabbits (-6%,  $P < 0.001$ ) at inoculation time (Table 28). Throughout the experiment, feed intake restriction was linked to a significant reduction of daily mass gain reaching -69% from D0 to D4 ( $P < 0.001$ ). Consequently, at the end of the experiment, restricted rabbits were 23% lighter than rabbits fed *ad libitum* ( $P < 0.001$ ). From D4 to D7 and in the last 4 days of the experiment, voluntary feed intake appeared being decreased respectively by 13% ( $P = 0.06$ ) and 12% ( $P = 0.02$ ) for infected rabbits (C100 vs. I100), while their growth was 30% lower (Table 28). Infection appeared also to damage rabbit growth, mostly in the four first days of infection (-28%,  $P < 0.001$ , Table 28) which were characterized by a high level of morbidity due to low daily mass gains.

**Tableau 27** : Effects of infection (control, C vs. infected, I) and intake level (*ad libitum*, 100 vs. restricted, 75) on morbidity<sup>1</sup> in the young rabbit

|           | Groups            |                   |                    |                    | P value   |        |       |
|-----------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------|--------|-------|
|           | C100              | C75               | I100               | I75                | Infection | Intake | Inter |
| D-3 to D0 | 1/45              | 0/45              | 0/45               | 0/45               | NS        | NS     | NS    |
| D0 to D4  | 1/40 <sup>a</sup> | 1/40 <sup>a</sup> | 5/40 <sup>a</sup>  | 14/40 <sup>b</sup> | 0.002     | NS     | NS    |
| D4 to D7  | 1/40 <sup>a</sup> | 0/40 <sup>a</sup> | 15/40 <sup>b</sup> | 19/40 <sup>b</sup> | <0.001    | NS     | NS    |
| D7 to D11 | 0/30              | 0/30              | 8/30               | 5/30               | 0.025     | NS     | NS    |
| D0 to D11 | 2/45 <sup>a</sup> | 1/45 <sup>a</sup> | 21/45 <sup>b</sup> | 25/45 <sup>b</sup> | <0.001    | NS     | NS    |

<sup>1</sup>Morbidity: prostrated and bloated rabbits and showing diarrhea and/or presenting growth delay in comparison with rabbits of the same group

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)

**Tableau 28** : Growth and intake pattern of the young rabbit according to infection (control, C vs. infected, I) and intake level (*ad libitum*, 100 vs. restricted, 75)

|                           | Groups            |                    |                    |                    | SEM <sup>1</sup>  | P value <sup>2</sup> |                 |                 |
|---------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
|                           | C100<br>(n=5)     | C75<br>(n=5)       | I100<br>(n=5)      | I75<br>(n=5)       |                   | Infection            | Intake          | Inter.          |
| <i>D-3 to D0</i>          |                   |                    |                    |                    |                   |                      |                 |                 |
| Initial number of rabbits | 45                | 45                 | 45                 | 45                 |                   |                      |                 |                 |
| Live mass D-3, g          | 585               | 594                | 582                | 590                | 3.6               | 0.64                 | 0.23            | 0.99            |
| Feed intake, g/d/rabbit   | 58.4              | 40.1               | 61.4               | 41.1               | 1.77 <sup>3</sup> | ND <sup>4</sup>      | ND <sup>4</sup> | ND <sup>4</sup> |
| Mass gain, g/d/rabbit     | 44.9 <sup>b</sup> | 25.5 <sup>a</sup>  | 48.8 <sup>b</sup>  | 24.3 <sup>a</sup>  | 1.14              | 0.36                 | <0.001          | 0.09            |
| <i>D0 to D4</i>           |                   |                    |                    |                    |                   |                      |                 |                 |
| Initial number of rabbits | 40                | 40                 | 40                 | 40                 |                   |                      |                 |                 |
| Live mass D0, g           | 716 <sup>b</sup>  | 671 <sup>a</sup>   | 724 <sup>b</sup>   | 661 <sup>a</sup>   | 5.0               | 0.92                 | <0.001          | 0.32            |
| Feed intake, g/d/rabbit   | 88.0              | 44.0               | 79.8               | 44.0               | 2.47 <sup>3</sup> | ND <sup>4</sup>      | ND <sup>4</sup> | ND <sup>4</sup> |
| Mass gain, g/d/rabbit     | 49.5 <sup>c</sup> | 18.2 <sup>a</sup>  | 35.2 <sup>b</sup>  | 12.8 <sup>a</sup>  | 1.38              | <0.001               | <0.001          | 0.006           |
| <i>D4 to D7</i>           |                   |                    |                    |                    |                   |                      |                 |                 |
| Initial number of rabbits | 40                | 40                 | 40                 | 40                 |                   |                      |                 |                 |
| Live mass D4, g           | 914 <sup>b</sup>  | 744 <sup>a</sup>   | 867 <sup>b</sup>   | 712 <sup>a</sup>   | 8.8               | <0.001               | <0.001          | 0.48            |
| Feed intake, g/d/rabbit   | 113.2             | 58.7               | 98.4               | 58.7               | 3.99 <sup>3</sup> | ND <sup>4</sup>      | ND <sup>4</sup> | ND <sup>4</sup> |
| Mass gain, g/d/rabbit     | 55.5 <sup>c</sup> | 38.8 <sup>a</sup>  | 48.5 <sup>bc</sup> | 40.7 <sup>ab</sup> | 1.40              | 0.31                 | <0.001          | 0.08            |
| <i>D7 to D11</i>          |                   |                    |                    |                    |                   |                      |                 |                 |
| Initial number of rabbits | 25                | 25                 | 25                 | 25                 |                   |                      |                 |                 |
| Live mass D7, g           | 1102 <sup>c</sup> | 858 <sup>a</sup>   | 1017 <sup>b</sup>  | 842 <sup>a</sup>   | 12.7              | 0.002                | <0.001          | 0.03            |
| Live mass D11, g          | 1368 <sup>c</sup> | 1060 <sup>a</sup>  | 1236 <sup>b</sup>  | 1007 <sup>a</sup>  | 18.1              | <0.001               | <0.001          | 0.08            |
| Feed intake, g/d/rabbit   | 131.8             | 88.8               | 115.8              | 84.5               | 3.74 <sup>3</sup> | ND <sup>4</sup>      | ND <sup>4</sup> | ND <sup>4</sup> |
| Mass gain, g/d/rabbit     | 64.3 <sup>c</sup> | 47.4 <sup>ab</sup> | 54.4 <sup>b</sup>  | 41.8 <sup>a</sup>  | 1.38              | <0.001               | <0.001          | 0.33            |
| <i>D0 to D11</i>          |                   |                    |                    |                    |                   |                      |                 |                 |
| Feed conversion ratio     | 1.91              | 1.86               | 2.11               | 1.98               | 0.033             | 0.007                | 0.099           | NS              |

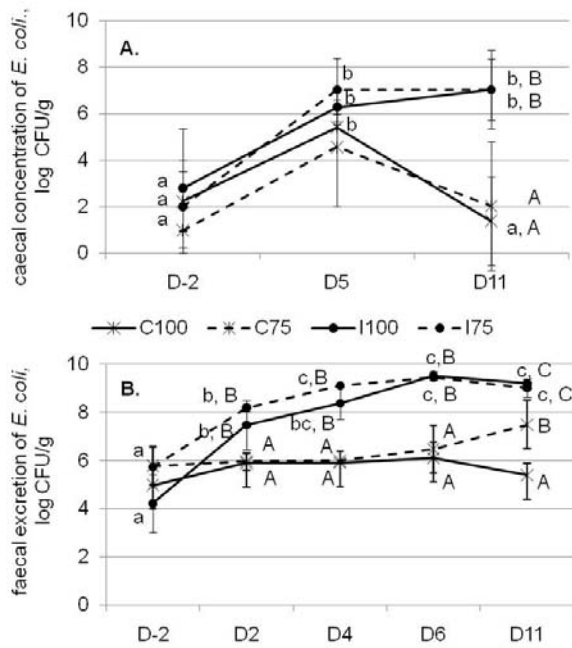
<sup>1</sup>SEM = standard error of the mean

<sup>2</sup>P levels for a bifactorial model, with effect of contamination (control, C vs. infected, I) and of intake (*ad libitum*, AL vs. restricted, R).

<sup>3</sup>SEM calculated for C100 and I100 groups (only)

<sup>4</sup>ND: not determined,  $\sigma^2 = 0$  for restricted rabbits

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)



**Figure 21** : Evolution of the concentration of *E. coli* in caecal content (n = 5/day/group) and faeces (n = 5/day/group) throughout the experiment, according to infection (control, C vs. infected, I) and intake level (*ad libitum*, 100 vs. restricted, 75).

a, b, c: within a group, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ ); A, B, C: within a day, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)

**Tableau 29** : Effects of infection (control, C vs. infected, I) and intake level (*ad libitum*, 100 vs. restricted, 75) on caecal and ileal bacterial diversity<sup>3</sup>

|               | Groups        |              |               |              | SEM <sup>1</sup> | P value <sup>2</sup> |        |        |
|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|------------------|----------------------|--------|--------|
|               | C100<br>(n=5) | C75<br>(n=5) | I100<br>(n=5) | I75<br>(n=5) |                  | Infection            | Intake | Inter. |
| <b>Ileum</b>  |               |              |               |              |                  |                      |        |        |
| D-2           | 5.68          | 5.46         | 5.52          | 5.14         | 0.145            | 0.43                 | 0.31   | 0.80   |
| D5            | 6.01          | 6.10         | 5.45          | 5.59         | 0.126            | 0.04                 | 0.61   | 0.92   |
| D11           | 5.99          | 5.61         | 5.62          | 5.67         | 0.156            | 0.68                 | 0.65   | 0.53   |
| <b>Caecum</b> |               |              |               |              |                  |                      |        |        |
| D-2           | 3.99          | 4.35         | 4.34          | 4.27         | 0.139            | 0.64                 | 0.63   | 0.47   |
| D5            | 4.15          | 4.33         | 3.84          | 3.95         | 0.093            | 0.06                 | 0.43   | 0.85   |
| D11           | 4.17          | 4.22         | 4.28          | 4.18         | 0.114            | 0.91                 | 0.92   | 0.77   |

<sup>1</sup>SEM = standard error of the mean

<sup>2</sup>P levels for a bifactorial model, with effect of contamination (control, C vs. infected, I) and of intake (*ad libitum*, AL vs. restricted, R).

<sup>3</sup>modified Simpson index modified (Michelland et al. 2010)

**Tableau 30** : Effects of infection (control, C vs. infected, I) on ileal and caecal bacterial community structure.

|               | Not infected<br>(n=10) |                | Infected<br>(n=10) |                |
|---------------|------------------------|----------------|--------------------|----------------|
|               | P value                | R <sup>1</sup> | P value            | R <sup>1</sup> |
| <b>Ileum</b>  |                        |                |                    |                |
| D-2 vs. D5    | 0.01                   | 0.425          | 0.01               | 0.444          |
| D5 vs. D11    | NS                     | /              | 0.03               | 0.080          |
| D-2 vs. D11   | 0.02                   | 0.255          | 0.02               | 0.165          |
| <b>Caecum</b> |                        |                |                    |                |
| D-2 vs. D5    | NS                     | /              | NS                 | /              |
| D5 vs. D11    | NS                     | /              | NS                 | /              |
| D-2 vs. D11   | NS                     | /              | NS                 | /              |

<sup>1</sup>R: Degree of proximity (Ramette 2007)

At the end of the experiment, *ad libitum* infected rabbits showed a delay of 10% of live mass compared to *ad libitum* uninfected rabbits. No one of these damaging effects of infection on zootechnical parameters was attenuated by feeding restriction. On the contrary, growth delay due to infection was accentuated by feeding restriction leading to a decrease of -26% of live mass at the end of the experiment. Infection induced a damage on feed efficiency of 9% ( $P=0.007$ ), and restriction did not significantly improve feed conversion ratio.

#### IV.C. BACTERIOLOGICAL ANALYSIS

Figure 21 shows total *E. coli* concentration in caecal content (Figure 21.A) and faecal excretion (Figure 21.B) at different times. Before inoculation no colony of isolated *E. coli* belonged to O128 serogroup. This observation remained true for control group samples until the end of the experiment. On the contrary, all isolated *E. coli* were identified as O128 serogroup in samples from infected rabbits.

The variability (standard deviation) before inoculation (29 days old) was 2.01 log CFU/g ( $n=20$ ), illustrating that some rabbits did not shelter *E. coli* while others housed up to 4.82 log CFU/g. From D-2 to D5, all groups showed an increase of caecal *E. coli* concentration without significant effect of infection (average 5.8 log CFU/g, on D5) (Figure 21.A.). After D5, the level of bacteria for both infected groups was stabilized around 7 log CFU/g while the caecal *E. coli* concentration of both control groups decreased to around 2 log CFU/g ( $P<0.001$ ). Feeding restriction did not significantly modify *E. coli* level in rabbit caecal contents. Similarly, the average concentration of *E. coli* in faecal samples, which was  $5.18 \pm 1.24$  log CFU/g for the 4 groups at D-2, increased for both inoculated rabbits. The peaks of *E. coli* excretion in fecal samples were observed at D4 ( $P<0.001$  for I75,  $n=5$ ) and D6 ( $P<0.001$  for I100,  $n=5$ ) respectively, without significant effect of feeding restriction.

#### IV.D. BACTERIAL COMMUNITIES STRUCTURE DIVERSITY AND VARIABILITY

Intake level did not significantly modify the diversity of the bacterial communities of ileum and caecum (Table 29). No difference was underlined on diversity of bacterial communities considering the age, whatever group and organ considered. Because of infection at D5, the diversity of ileal and caecal bacterial communities tended to decrease, respectively of 0.54 points ( $P=0.04$ ) and 0.35 points ( $P=0.06$ ). Infection (Table 30) and feed intake restriction (data not shown) did not have a significant effect on the caecal bacterial community structure. On the contrary, the ileal bacterial structure showed a significant disruption between D-2 and

D5 (Table 30). Nevertheless a significant change of the ileal bacterial ecosystem in uninfected rabbits was also noticed between D-2 and D5, probably corresponding to the effect of the age of animals (Table 30). The effect of the infection should be added to the effect of the age in infected animals as the degree of similarity (R) was higher. The ileal bacterial structure of uninfected rabbits came back to the pre-disruption balance from D11, whereas at D11 the ileal bacterial structure of infected rabbits was still significantly different from D-2.

No significant ( $P < 0.05$ ) effect of feed restriction was shown on the variability of ileal profiles within each of infected groups (I100 and I75). Nevertheless at D11, the ileal bacterial community structure within I75 tended to be less variable than within I100 ( $P = 0.097$ ,  $n = 5$ ), whereas at D-2, the variability of ileal bacterial structure intra I75 group tended to be higher than I100 ( $P = 0.088$ ,  $n = 5$ ).

#### IV.E. CAECAL PH MEASUREMENTS

At the peak of infection (D5), infected rabbits fed *ad libitum* showed a decrease of pH ( $P = 0.003$ ) compared to D-2 measurement. This was not observed for infected restricted rabbits. Uninfected restricted rabbits had a pH increasing between D-2 and D5, whereas no significant change of pH for C100 group was noticed (Table 31).

**Tableau 31** : Effects of infection (control, C vs. infected, I) and intake level (*ad libitum*, 100 vs. restricted, 75) on inflammatory and on few parameters of digestive organs: ileal mucosa histometric parameters, caecal pH

|                                         | Groups                 |                        |                       |                        | SEM <sup>1</sup> | P value <sup>2</sup> |        |        |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|----------------------|--------|--------|
|                                         | C100<br>(n=5)          | C75<br>(n=5)           | I100<br>(n=5)         | I75<br>(n=5)           |                  | Infection            | Intake | Inter. |
| <b>Ileum</b>                            |                        |                        |                       |                        |                  |                      |        |        |
| <i>Histometric parameters (D5)</i>      |                        |                        |                       |                        |                  |                      |        |        |
| Villus height, $\mu\text{m}$            | 305.73 <sup>b</sup>    | 303.35 <sup>b</sup>    | 228.82 <sup>ab</sup>  | 208.33 <sup>a</sup>    | 13.427           | <0.001               | 0.5748 | 0.6644 |
| Villus area, $\mu\text{m}^2$            | 31790                  | 31189                  | 27441                 | 21677                  | 2113.4           | 0.107                | 0.445  | 0.542  |
| Crypt depth, $\mu\text{m}$              | 76.82                  | 66.44                  | 78.07                 | 77.85                  | 1.926            | 0.092                | 0.1538 | 0.1579 |
| Crypt area, $\mu\text{m}^2$             | 1819                   | 1353                   | 1822                  | 1922                   | 99.3             | 0.157                | 0.358  | 0.148  |
| Villus height / crypt depth             | 4.00 <sup>b</sup>      | 4.54 <sup>b</sup>      | 2.96 <sup>a</sup>     | 2.71 <sup>a</sup>      | 0.211            | <0.001               | 0.6218 | 0.1571 |
| Villus area / crypt area                | 17.99                  | 22.53                  | 16.16                 | 11.80                  | 1.499            | 0.037                | 0.9757 | 0.111  |
| <b>Caecum</b>                           |                        |                        |                       |                        |                  |                      |        |        |
| <i>pH</i>                               |                        |                        |                       |                        |                  |                      |        |        |
| D-2                                     | 5.86 <sup>a</sup>      | 6.01 <sup>ab, A</sup>  | 6.18 <sup>b, B</sup>  | 6.10 <sup>ab</sup>     | 0.044            | 0.02                 | 0.68   | 0.15   |
| D5                                      | 5.81 <sup>ab</sup>     | 6.22 <sup>b, B</sup>   | 5.63 <sup>a, A</sup>  | 6.12 <sup>b</sup>      | 0.066            | 0.07                 | <0.001 | 0.58   |
| <b>Serum</b>                            |                        |                        |                       |                        |                  |                      |        |        |
| <i>Haptoglobin concentration, mg/ml</i> |                        |                        |                       |                        |                  |                      |        |        |
| D-2                                     | 0.095 <sup>a, A</sup>  | 0.163 <sup>ab, A</sup> | 0.199 <sup>b, A</sup> | 0.130 <sup>ab, A</sup> | 0.0127           | 0.09                 | 0.96   | 0.003  |
| D5                                      | 0.221 <sup>a, AB</sup> | 0.215 <sup>a, AB</sup> | 1.215 <sup>b, B</sup> | 1.560 <sup>b, B</sup>  | 0.1574           | <0.001               | 0.33   | 0.31   |
| D11                                     | 0.351 <sup>B</sup>     | 0.268 <sup>B</sup>     | 0.787 <sup>AB</sup>   | 0.726 <sup>A</sup>     | 0.1026           | 0.03                 | 0.70   | 0.95   |

<sup>1</sup>SEM = standard error of the mean

<sup>2</sup>P levels for a bifactorial model, with effect of contamination (control, C vs. infected, I) and of intake (*ad libitum*, AL vs. restricted, R).

a, b, c: within a row, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ , for a monofactorial model: effect of groups)  
A, B, C: within a column, means without a common superscript differ ( $P < 0.05$ )

#### IV.F. ILEUM HISTOMETRIC MEASUREMENTS

No significant effect of intake level was noticed concerning ileum histometric measurements (Table 31). Similarly, infection did not significantly modify crypts characteristics and *villus* area. Nevertheless, infection significantly damaged *villus* height (-28%,  $P<0.001$ ). Likewise both ratios: *villus* height/crypt depth and *villus* area/crypt area were significantly reduced by the infection, by 1.44 ( $P<0.001$ ) and 6.28 ( $P=0.04$ ) respectively, i.e. around 1/3 for both.

#### IV.G. HAPTOGLOBIN MEASUREMENTS

During the experiment, the serum haptoglobin concentration was not related to the feed intake level (Table 31). The serum haptoglobin concentration in uninfected rabbits rose with the age (between D-2 and D11) by 270% ( $P=0.009$ ) and by 64% ( $P=0.02$ ) for C100 and C75 respectively (Table 31). The level of haptoglobin measured in serum was significantly higher at the peak of infection (D5) for both infected groups compared to measures before infection (D-2), 6 times ( $P=0.02$ ) and 12 times ( $P<0.001$ ) for I100 and I75 respectively. Between the peak of infection and the end of the experiment, the serum haptoglobin concentration decreased by 35% and by 53% for I100 ( $P=0.02$ ) and I75 ( $P<0.001$ ) groups respectively.

### V. DISCUSSION

No mortality was observed in our experimental conditions. This result was consistent with previous publications (Camguilhem et al. 1989; Milon et al. 1990; Milon et al. 1992; Skřivanová et al. 2009) referencing *E. coli* strain O128:C6 as a weakly pathogenic strain inducing weight loss, sometimes diarrhea without any mortality.

Regarding the emergence of clinical signs (animal prostrated, bloated and/or showing diarrhea) and the impact on the bacterial microbiota, a delay between the peak of infection at D4-D5 pi and the peak of faecal *E. coli* excretion at D6 pi was observed. In comparison with Skřivanová et al. (2009) experiment, the peak of excretion (D9/D6) seemed to be able to be delayed when the inoculation is delayed (38 days old/31days old), the levels of excretion and infection depended on maturity of the digestive system (Foubert et al. 2007).

Histometric results of this experiment were consistent with the phenomenon of attaching and effacing associated with REPEC. This leads to a destruction of absorptive epithelial cells and *villus* atrophy (Peeters et al. 1985; Peeters 1988; Licois et al. 1991). Therefore digestive and



resorptive intestinal capabilities were reduced, which induced diarrhea, bad feed conversion, growth delay and mortality (Peeters 1988).

Except a little decrease of pH measurement for I100, we noticed few of variation of this parameter which is consistent with observations of a previous study concerning *E. coli* O103 inoculation. We concluded to a good relationship between the serum haptoglobin concentration and the infection, as underlined by Georgieva et al. (2009).

Regarding the diversity and the richness of the gut bacterial ecosystem, no significant difference was observed in caecal bacterial community structure and diversity. These results confirmed previous works (Combes et al. 2009) illustrating any modification of structure, richness and density of total bacterial community from caecum, also from faecal sampling during an experimental reproduction of epizootic rabbit enteropathy (ERE). However, the effect of infection was observed on ileal bacterial community five days after inoculation and on both structure and diversity. This result was in agreement with previous conclusions which underlined that in growing rabbits, EPEC mostly colonized the distal part of the digestive tract: ileum, caecum and colon (Cantey et al. 1981; Peeters et al. 1984; Peeters 1988), whereas, in suckling rabbits, the whole small and large intestines were colonized by EPEC (Coussement et al. 1984; Peeters et al. 1984; Peeters 1988). However, the resilience of the ileal bacterial community structure (Allison et al. 2008; Antonopoulos et al. 2009) is observed 5 days after the infection.

Obviously, the body weight was reduced according to the restriction duration. Therefore after 3, 7, 10 and 14 days of restriction averaging -38%, we observed respectively 7.5%, 18%, 20% and 21% of body weight loss. Similarly after 14 days with an effective restriction rate of around -30%, Martignon et al. (2010) observed a significant rabbit growth delay of 17%. Also Gidenne et al. (2009) on a large scale study determined that around 20 days of a feed intake control of -40% induced a decrease of -20% of restricted rabbit body weights. The observation of restricted rabbit's lower masses at the end of restriction periods was due to a smaller daily mass gain with feed intake control compared to *ad libitum* feeding. Digestive feed efficiency was not significantly improved by feed intake regulation. Few previous studies emphasized that feed restriction significantly reduced the feed conversion ratio (Gidenne et al. 2009; Martignon et al. 2010)

After inoculation, most of growth results (daily mass gain and body weight) for infected rabbits fed restricted were worse than for infected *ad libitum* rabbits. Boisot et al. (2003) concluded that for infected rabbits, a feeding restriction of -40% significantly reduced morbidity and mortality during an experimental reproduction of ERE. The worse feed

efficiency observed for restricted rabbits infected by *E. coli* O128:C6 can be explained by the added negative effects of infection and restriction on daily mass gain. Comparing rabbits suffering from ERE, Boisot et al. (2003) underlined a better growth for restricted than for *ad libitum* rabbits, without any significant difference of feed conversion ratio.

No significant effect of feed restriction was detected, on the intestinal microbial structure, on the bacterial diversity and on the ileal morphometry but a slight decrease of the variability of bacterial profiles was observed at the end of the experiment for infected restricted rabbits.

## VI. CONCLUSION

In conclusion, the effects of the infection were more significant on the ileum than on the caecum and feeding restriction seems to stabilize the bacterial ecosystem after the infection. The tendencies observed ask to be confirmed with a higher number of individuals, mainly about the effect of feeding restriction on the stabilization of the structure of the ileal bacterial community consecutively to an infection.

## VII. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Alain Milon (ENV Toulouse), who provided the strain of *E. coli* O128:C6 we used. We also thank the “Service d’Elevage et d’Expérimentation en Pathologie Aviaire” staff of Anses involved in this experiment, that is to say M. Amelot, L. Le Moal, T. Le Coq, D. Courtois and M. Morvan. Moreover the technical help of F. Lalande (HQPAP, Anses) is gratefully considered. And we take L. Gordon assistance into consideration with gratitude.

## VIII. REFERENCES

- Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11512-11519.
- Antonopoulos, D.A., Huse, S.M., Morrison, H.G., Schmidt, T.M., Sogin, M.L., Young, V.B., 2009. Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation. *Infection and Immunity* 77, 2367-2375.
- Azard, A., Lebas, F., 2006. Productivité des élevages cynicoles professionnels en 2005 - Résultats de RENALAP et RENACEB. *Cuniculture Magazine* 33, 92-96.

- Bennegadi, N., Gidenne, T., Licois, D., 2001. Impact of fibre deficiency and sanitary status on non-specific enteropathy of the growing rabbit. *Animal Research* 50, 401-413.
- Boisot, P., Licois, D., Gidenne, T., 2003. Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. In: Proceedings "10èmes Journées de la Recherche Cunicole", Paris, France, pp. 267-370
- Camguilhem, R., Milon, A., 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 743-747.
- Cantey, J.R., Inman, L.R., 1981. Diarrhea due to *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit. The Peyer's patch as the initial site of attachment and colonization. *Journal of Infectious Diseases* 143, 440-446.
- Coussement, W., Ducatelle, R., Charlier, G., Okerman, L., Hoorens, J., 1984. Pathology of experimental colibacillosis in rabbits. *Journal of Veterinary Medicine Series B- Infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health* 31, 64-72.
- European Union, 2003. Protection of Animals used for Experimental Purposes. Directive 86/609/EEC of 24th novembre 1986, amended 16th septembre 2003. In: Official Journal of European Union,
- Foubert, C., Boisot, P., Duperray, J., Guyonvarch, A., 2007. Comparaison de deux stratégies de rationnement alimentaire, via un accès restreint à l'eau de boisson, en conditions estivales et hivernales. In: 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, le Mans, France, pp. 119-122
- Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B., Knutton, S., 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology* 30, 911-921.
- Georgieva, T., Penchev Georgiev, I., Tanev, S., Vachkov, A., Petrov, V., Eckersall, P. D., Sotirov, L., Lazarov, L., Christov, T.S., Nikolov, J., 2009. Variations of acute phase protein (haptoglobin, fibrinogen and ceruloplasmin) concentrations in weaning rabbits after experimental infection with *E. coli*. *Revue de Médecine Vétérinaire* 160, 133-139.
- Gidenne, T., 2000. Recent advances in rabbit nutrition: Emphasis on fibre requirements. A review. *World Rabbit Science* 8, 23-32.
- Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S., 2009. Feed restriction strategy in the

- growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3, 509-515.
- Gidenne, T., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, H., Montessuy, S., Verdelhan, S., 2003. Un rationnement alimentaire quantitatif post-sevrage permet de réduire la fréquence des diarrhées, sans dégradation importante des performances de croissance : résultats d'une étude multi-site. In: Proceedings "10èmes Journées de la Recherche Cunicole", Paris, France, pp. 29-32
- Gidenne, T., Licois, D., 2005. Effect of a high fibre intake on the resistance of the growing rabbit to an experimental inoculation with an enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. *Animal Science* 80, 281-288.
- Lebas, F., 2005a. Productivité des élevages cuniques professionnels en 2004 - Résultats de RENALAP et RENACEB. *Cuniculture Magazine* 32, 100-101.
- Lebas, F., 2005b. Productivité et rentabilité des élevages cuniques professionnels en 2003. *Cuniculture Magazine* 32, 14-17.
- Lebas, F., 2008. Performances moyennes des élevages cuniques en 2007 - Présentation rapide des résultats RENACEB et RENALAP. *Cuniculture Magazine* 35, 39-44.
- Lebas, F., 2009. Performances moyenne des élevages cuniques en France - Résultats de RENACEB pour l'année 2008. *Cuniculture Magazine* 36, 93-94.
- Licois, D., Guillot, J.F., Mouline, C., Reynaud, A., 1992. Susceptibility of the Rabbit to an Enteropathogenic Strain of *Escherichia-Coli* 0103 - Effect of Animals Age. *Annales De Recherches Veterinaires* 23, 225-232.
- Licois, D., Reynaud, A., Federighi, M., Gaillard-Martinie, B., Guillot, J.F., 1991. Scanning and transmission electron microscopic study of adherence of *Escherichia coli* O103 enteropathogenic and/or enterohemorrhagic strain GV in enteric infection in rabbits. *Infection and Immunity* 59, 3796-3800.
- Martignon, M.H., Combes, S., Gidenne, T., 2010. Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Effects of age and short-term intake limitation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* 156, 156-162.
- Michelland, R.J., Combes, S., Monteils, V., Cauquil, L., Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., 2010. Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* 16, 61-65.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. StatFingerprints: A friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* 9, 1359-1363.

- Milon, A., Esslinger, J., Camguilhem, R., 1990. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and hela-cells. *Infection and Immunity* 58, 2690-2695.
- Milon, A., Esslinger, J., Camguilhem, R., 1992. Oral vaccination of weaned rabbits against enteropathogenic *Escherichia coli*-like *E. coli* O103 infection: use of heterologous strains harboring lipopolysaccharide or adhesin of pathogenic strains. *Infection and Immunity* 60, 2702-2709.
- Mircheva Georgieva, T., Penchev Georgiev, I., Tanev, S., Vachkov, A., Petrov, V., Eckersall, P.D., Sotirov, L., Lazarov, L., Christov, T.S., Nikolov, J., 2009. Variations of acute phase protein (haptoglobin, fibrinogen and ceruloplasmin) concentrations in weaning rabbits after experimental infection with *E.coli*. *Revue de médecine Vétérinaire* 160, 133-139.
- Peeters, J.E., 1987. Etiology and pathology of diarrhoea in weanling rabbits. In: Auxilia, T. (Ed.) *Rabbit production systems including welfare.*, vol. Report n°EUR10983. Commission of the European Communities, pp. 127-137
- Peeters, J.E., 1988. Recent advances in intestinal pathology of rabbits and further perspectives. In: 4th World Rabbit Congress, Budapest, Hungary, pp. 293-308
- Peeters, J.E., Charlier, G., Raeymaekers, R., 1985. Scanning and transmission electron microscopy of attaching effacing *Escherichia coli* in weanling rabbits. *Veterinary Pathology* 22, 54-59.
- Peeters, J.E., Geeroms, R., Orskov, F., 1988. Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infection and Immuninty* 56, 1442-1448.
- Peeters, J.E., Pohl, P., Okerman, L., Devriese, L., 1984. Pathogenic properties of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *J. clin. Microb.* 84, 34-39.
- Peu, P., Brugere, H., Pourcher, A.M., Kerouredan, M., Godon, J.J., Delgenes, J.P., Dabert, P., 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3578-3585.
- Ramette, A., 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 142-160.
- Skrivanová, E., Molatová, Z., Skrivanová, V., Marounek, M., 2009. Inhibitory activity of rabbit milk and medium-chain fatty acids against enteropathogenic *Escherichia coli* O128. *Veterinary Microbiology* 135, 358-362.

# DISCUSSION GENERALE



## I. DE NOMBREUX PARAMETRES ONT ETE EXPLORES EN RELATION AVEC LA RESTRICTION ALIMENTAIRE

Notre approche « multicritères » permet d'une part une vision globale de l'influence de la restriction alimentaire sur les animaux, et d'autre part, une prospection des fonctions des animaux potentiellement modifiées.

Afin d'obtenir une vision globale de l'effet de la régulation du niveau d'ingestion sur les animaux, pour chacune des expériences réalisées, les paramètres zootechniques (ingestion, croissance et indice de consommation) ont été mesurés ou calculés. Aussi, le comportement alimentaire des lapins en engraissement a été observé et analysé.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la fonction de digestion dans sa globalité par une mesure de la digestibilité des aliments par l'ensemble du tube digestif, en mettant en relation les nutriments ingérés et excrétés, en fonction de la stratégie d'alimentation employée.

Puis nous avons considéré certains paramètres internes des fonctions de digestion et immunitaire. Nous avons relevé des paramètres pour les différents segments digestifs, mais de façon plus ciblée sur l'iléon et surtout le cæcum, principales cibles des troubles digestifs.

### I.A. EVOLUTION DE LA CROISSANCE ET DE L'EFFICACITE DIGESTIVE EN RAPPORT AVEC LA RESTRICTION ALIMENTAIRE

De manière générale, et ainsi qu'attendu, la **croissance est réduite**, dans des proportions souvent proches du taux de restriction appliqué (Tableau 32). Ceci avait déjà été souligné par Gidenne et al. (2009), mais n'apparaît pas dans la totalité des expériences de rationnement, en premier lieu peut-être pour des raisons de composition de l'aliment, mais aussi en lien avec l'état sanitaire des animaux, ou encore du fait d'une importante variabilité inter-individuelle de l'efficacité alimentaire. La plupart de nos expériences présentent une **efficacité alimentaire améliorée** (de 4 à 6 %) au cours de la période de restriction (Tableau 32). Nous avons également trouvé une **meilleure digestibilité des aliments** pour les animaux restreints, pour la **fraction protéique, la fraction énergétique et les fibres**.



**Tableau 32** : Récapitulatif des modifications observées lors des expériences de ce travail de thèse, chez des lapins soumis tout d'abord à une restriction alimentaire puis à une alimentation *ad libitum*, comparés à des lapins nourris uniquement *ad libitum*.

| Thématique de l'expérience |                             | Physio. dig. <sup>1</sup> |     | Physio. dig. <sup>2</sup> |     | Comportement |    |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----|---------------------------|-----|--------------|----|
| 1- Restriction             | Temps de restriction        | 25j                       |     | 24j                       |     | 28j          |    |
|                            | Taux de restriction         | -28%                      |     | -29%                      |     | -36%         |    |
|                            | Vitesse de croissance       | -24%                      | *** | -26%                      | *** | -19%         | NS |
|                            | Poids en fin de restriction | -17%                      | *** | -17%                      | *** | -19%         | NS |
|                            | Efficacité alimentaire      | -4%                       | *   | -6%                       | *** | -11%         | NS |
| 2- <i>Ad libitum</i>       | Croissance                  | /                         | /   | +24%                      | *** | +24%         | NS |
|                            | Poids final                 | /                         | /   | -8%                       | *** | -4%          | NS |

<sup>1</sup>Etude expérimentale – Partie 1 – Digestive physiology and hindgut bacterial community of the young rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): effects of age and short-term intake limitation.

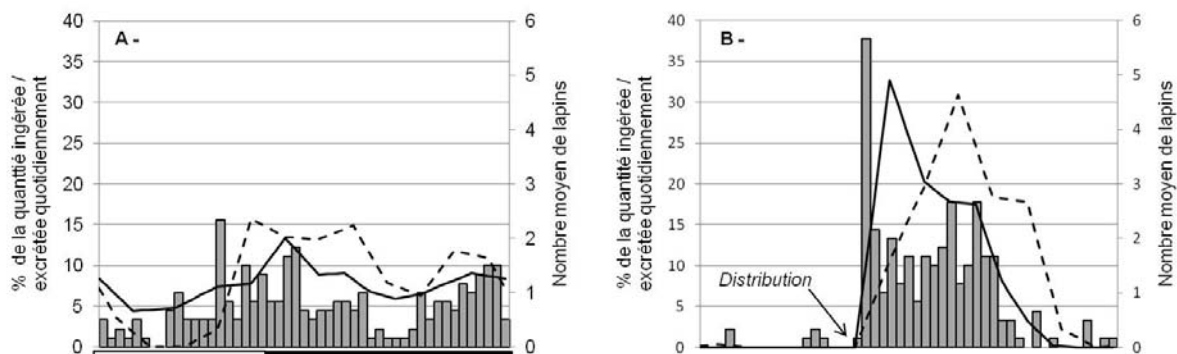
<sup>2</sup>Etude expérimentale – Partie 2 – Control of feeding behaviour in the young rabbit: impact of restriction and frequency of feed delivery on digestive physiology, health and growth.

Lorsque les animaux restreints passent à une alimentation libre, ils présentent une **croissance compensatrice, avec un gain de poids environ 25% supérieur** à ceux alimentés à volonté. Ce phénomène a déjà été souligné par plusieurs auteurs (Perrier, 1998; Gidenne et al., 2003; Foubert et al., 2008; Gidenne et al., 2008; Gidenne et al., 2009a) qui ont observé une croissance compensatrice proportionnelle au taux de restriction appliqué précédemment. Cependant, même si la période de nutrition à volonté permet de rattraper un peu la différence de poids existant en fin de période de restriction (de 17% à 19% en fonction du taux de restriction, tableau 32), le **retard de croissance n'est généralement pas totalement compensé** (Tableau 32).

L'intérêt économique de la restriction alimentaire a été estimé à partir des données enregistrées lors des deux essais ayant intégré la période d'alimentation *ad libitum* précédant l'enlèvement (comportement et le second de physiologie digestive). Les résultats montrent une diminution de 0,23 €/lapin du coût alimentaire (prix moyen de l'aliment en 2008 : 0.260 €/kg d'aliment, (Lebas, 2009)). Ainsi, en élevage cunicole, réduire le niveau alimentaire est une stratégie possédant un réel intérêt économique, puisqu'en plus de limiter le développement de la morbidité et mortalité post-sevrage, elle permet de réduire les dépenses d'aliment pour une même production de viande.

## I.B. COMPORTEMENT ET BIEN-ETRE DU LAPIN SOUMIS A UNE RESTRICTION ALIMENTAIRE

Le **rythme d'ingestion** des lapins restreints est totalement synchronisé avec le **moment de la distribution de la ration**, tandis que celui des lapins nourris à volonté est synchronisé (avec beaucoup de variabilité individuelle) par le cycle nyctéméral de la lumière (Figure 22). Ainsi, la totalité de l'aliment distribué est ingérée dans les 7 heures en moyenne suivant la distribution d'aliment. Déjà **1/3 de la quantité distribuée est ingérée en 2 heures** (à 46 jours d'âge des lapins).



**Figure 22** : Evolution nyctémérale (jour □ et nuit ■) du nombre moyen d'animaux observés à la mangeoire (▯, à 44 jours d'âge), de la proportion d'aliment ingérée (—, à 46 jours d'âge) et de la proportion de fèces excrétée (- -, à 47 jours d'âge) par rapport aux quantités quotidiennes distribuées et excrétées chez les animaux nourris *ad libitum* (A) et restreints(B)

La distribution unique d'une ration en quantité restreinte n'induit pas une augmentation de l'agressivité des animaux lors des repas. **Aucune compétitivité à la mangeoire** n'a été observée, même dans les premières heures après la distribution alors que tous les animaux ont un fort appétit et viennent s'alimenter. Il s'organise une sorte de "roulement" pour l'accès à la mangeoire. Pour autant, même sans être en train de s'alimenter, certains des animaux pourraient défendre l'accès à la mangeoire à leurs congénères comme une propriété. Mais ce comportement de dominance n'apparaît pas pendant la période de restriction chez le jeune lapin. Cette absence de compétitivité et d'agressivité est une information importante, puisque dans le cas inverse cela pourrait constituer un argument en défaveur de la pratique de la restriction alimentaire en élevage pour des raisons de bien-être animal. Cette non-compétitivité semble principalement liée au comportement alimentaire du lapin, qui effectue de nombreux repas dans la journée (Prud'hon et al., 1972). Cela pourrait trouver son origine dans la faible capacité de stockage de l'estomac chez le lapereau, qui ne permet pas des repas de grande ampleur au plan quantitatif.

Nous nous sommes aussi intéressés à la consommation d'eau des animaux. Pour des raisons techniques nous n'avons pas pu réaliser une mesure de consommation par cage, et nous n'avons donc pas pu réaliser d'analyses statistiques. Néanmoins, à titre indicatif, il apparaît que les animaux restreints boivent 11 % d'eau en plus que les animaux *ad libitum*. Nous formulons l'hypothèse qu'il s'agit probablement d'un comportement de compensation chez l'animal en état de "faim". Puis, en alimentation libre, aucune différence de consommation d'eau n'est identifiée. A l'inverse, une étude récente (Ben Rayana et al., 2009) a mesuré la consommation d'eau en fonction du niveau d'ingestion. Après une restriction de 80 % pendant 3 semaines, les animaux sont alimentés à volonté jusqu'à 77 jours. Sur l'ensemble de cette période, les auteurs constatent une consommation d'eau légèrement moindre pour le lot restreint. La restriction alimentaire semble donc moduler la consommation d'eau des animaux, mais des études complémentaires pourraient permettre de déterminer dans quelle mesure.

En ce qui concerne le profil d'excrétion des lapins, la restriction (Figure 22 B-) induit **une longue phase de très faible excrétion fécale** (Figure 22 A-). On pourrait penser que cette longue période de faible excrétion pourrait être concomitante à la mise en place d'une cæcotrophie prolongée. Toutefois, **aucune augmentation de la quantité de cæcotrophes produite** n'a été mise en évidence en relation avec le rationnement, et comme nous n'avons pas réalisé de suivi précis du comportement de cæcotrophie, nous ne pouvons pas retenir cette hypothèse.

#### I.C. IMPACT D'UNE INGESTION RESTREINTE SUR QUELQUES FONCTIONS DIGESTIVES, INFLAMMATOIRES ET IMMUNITAIRES

La restriction alimentaire induit un **retard de développement de certains organes impliqués dans la fonction de digestion**. Ainsi, nous avons relevé un retard de 13,4%, pour **l'intestin grêle**, après 28 jours de restriction. De même, la plupart des **organes intervenant dans la fonction immunitaire**, auxquels nous nous sommes intéressés (**la rate, l'appendice cæcal et les plaques de Peyer**) présentent un **développement réduit** après une période de restriction (Tableau 33). Celui-ci est lié à la baisse de croissance des animaux pour la rate, mais l'appendice cæcal présente une réduction de croissance plus importante que le retard de croissance des animaux restreints (Tableau 33). Ainsi, notre approche "anatomique" de la

fonction immunitaire ne permet pas d'expliquer la diminution des troubles digestifs observée lors d'un rationnement.

**Tableau 33:** Effet de la restriction alimentaire sur la croissance de certains organes lymphoïdes.

|                         | Effet de la restriction | P value |
|-------------------------|-------------------------|---------|
| <i>Rate</i>             |                         |         |
| Longueur                | -18,6 %                 | 0.003   |
| Poids                   | -35,6 %                 | 0.045   |
| Poids relatif           | -0.02 points            | NS      |
| <i>Appendice caecal</i> |                         |         |
| Longueur                | -9,5 %                  | NS      |
| Poids                   | -31,8 %                 | 0,002   |
| Poids relatif           | -0.07 points            | 0.023   |
| <i>Plaques de Peyer</i> |                         |         |
| Nombre                  | -16,9 %                 | NS      |
| Poids unitaire          | -17,6 %                 | 0.063   |

D'autre part, nos résultats confirment le dosage de l'haptoglobine sérique comme étant un bon marqueur de l'inflammation "chronique" chez le lapin (Georgieva et al., 2009; Kimsé, 2009). En effet, alors qu'à l'autopsie, aucun des lapins morbides (diarrhée) au pic d'infection ne présentait d'inflammation du tube digestif visible macroscopiquement, nous avons enregistré un triplement de la concentration en haptoglobine sérique

**Tableau 34 :** Effet de la restriction alimentaire sur les paramètres de physiologie digestive étudiés

|                      |           |                      |             |
|----------------------|-----------|----------------------|-------------|
| Estomac              |           | pH antrum            | ↑           |
|                      |           | pH fundus            | ↑           |
| Cæcum                | Biotope   | pH                   | NS          |
|                      |           | Eh                   | ↓           |
|                      |           | MS                   | NS ou ↑     |
|                      |           | Activité bactérienne | AGV         |
|                      | Biocénose | NH <sub>3</sub>      | NS ou ↑     |
|                      |           | AEB                  | ↓ pectinase |
|                      |           | Densité              | NS          |
|                      |           | Diversité            | NS          |
|                      |           | Structure            | NS          |
|                      | Iléon     | Morphométrie         | NS          |
| Activité enzymatique |           | NS                   |             |

Nos approches « physico-chimique » et « morphométrique » réalisées sur certains segments digestifs n'ont pas non plus mis en évidence un effet marqué de la restriction; excepté sur les pH stomacaux et le potentiel rédox (Tableau 34). Pour ce dernier toutefois, la différence observée n'est pas suffisante pour que la modification paraisse biologiquement

significative. La variabilité observée des résultats peut s'expliquer par les effectifs différents impliqués dans les deux expériences prises en considération.

## II. ANALYSE CRITIQUE DE LA METHODOLOGIE

### II.A. DIFFICULTES A ATTEINDRE UN NIVEAU PRECIS DE CONTROLE DE L'INGESTION

Un taux unique de restriction de -25% a été choisi pour l'ensemble du travail. Néanmoins, une application précise de ce taux nécessite une connaissance non moins précise du niveau d'ingestion des animaux témoins dans nos conditions d'expérience. Or, la grande variabilité du comportement d'ingestion chez le jeune lapin rend difficile l'obtention d'un niveau élevé de précision pour définir une courbe d'ingestion de référence. Ainsi, lors de nos expériences nous constatons souvent un taux de restriction légèrement supérieur à celui préconisé. Ceci est dû au décalage allant de 2 jours à 1 semaine, en fonction de l'expérience considérée, entre la période de calcul de l'ingéré des lapins *ad libitum* (témoins) et la distribution de la quantité restreinte aux animaux rationnés. Ainsi, le taux de restriction réellement étudié au cours de nos expériences s'échelonne de -28 à -40 %. Toutefois, l'efficacité de cette stratégie d'alimentation étant démontrée vis-à-vis de la mortalité pour une restriction d'au moins 20 % et en ce qui concerne la morbidité pour un taux de restriction de -40 et -30 % (Gidenne et al., 2009b), la totalité de nos protocoles appliquent des taux se trouvant dans ces limites et donc en mesure de suivre les objectifs fixés, à savoir : étudier les mécanismes expliquant l'effet favorable de la restriction sur la santé digestive et l'efficacité alimentaire.

### II.B. IMPACT DES CONDITIONS EXPERIMENTALES POUR REDEMONTRER L'EFFET FAVORABLE D'UNE INGESTION RESTREINTE SUR LA FREQUENCE DES TROUBLES DIGESTIFS

La plupart de nos expériences avaient pour but principal d'analyser la réponse physiologique du lapin en situation de restriction, en utilisant une approche « multicritères » sur un nombre limité d'animaux. Ainsi, nos conditions expérimentales ne permettaient pas d'évaluer la réponse "sanitaire" ou zootechnique qui nécessite un nombre très élevé d'animaux. De plus, les lapins de nos installations expérimentales (INRA, Toulouse et Anses, Ploufragan) ont présenté un bon état sanitaire (mortalité comprise entre 0% et 8,6 % tous lots confondus). Ce qui, associé au nombre limité d'animaux par lot (maximum 108 lapins/lot), correspond à un faible nombre de cas d'animaux malades ou morts, et donc au plan statistique il n'est pas possible de mettre en évidence un effet significatif de la restriction alimentaire contre les troubles digestifs.

Par ailleurs, au cours du challenge infectieux à colibacillose, le choix d'une souche d'*E. coli* peu pathogène était judicieux pour reproduire un « stress » digestif se manifestant surtout par une croissance détériorée. Cependant, l'inoculation de la souche O128:C6 ne nous a pas permis de mettre en évidence des différences significatives de morbidité et/ou de mortalité en fonction du niveau d'ingestion, sachant que le nombre d'animaux par lot (4) était limité dans l'essai en raison de la configuration des installations expérimentales (2 cellules confinées : saine et contaminée) contenant chacune deux lots (témoin et d'animaux restreints).

#### II.C. UN SUIVI DIFFICILE DE LA REMISSION DES ANIMAUX SUITE A UN EPISODE DE COLIBACILLOSE

Au cours du protocole reproduisant un épisode de colibacillose, des prélèvements post-mortem d'échantillons étaient réalisés, principalement au pic d'infection, dans le but principal d'analyser les biocénoses cæcale et iléale. Aussi, les lapins morbides étaient préférentiellement échantillonnés. De ce fait, il n'était pas possible de suivre les signes cliniques afin de comparer la vitesse de rémission des animaux en fonction de leur niveau d'ingestion.

#### II.D. UN NECESSAIRE COMPROMIS ENTRE LES CONTRAINTES EXPERIMENTALES ET LES QUESTIONS SCIENTIFIQUES A RESOUDRE

Les résultats zootechniques obtenus lors de l'étude du comportement des lapins soumis à restriction ne montrent pas de différence significative entre les animaux, malgré des écarts parfois importants (Tableau 25, page 134). En effet, afin de compenser l'effet salle, l'expérience étant réalisée dans deux salles contenant chacune les deux lots, l'analyse statistique est pratiquée sur un modèle mixte prenant pour effet aléatoire l'effet salle. Dans ces conditions, il y a plus de chances d'accepter l'hypothèse d'absence de différence significative, alors que celle-ci existe, que de mettre en évidence une différence qui n'existe pas.

#### II.E. QUELQUES PARAMETRES COMPLEMENTAIRES SERAIENT A ETUDIER

Bien que la restriction alimentaire favorise un état sanitaire stable et satisfaisant au cours de l'engraissement (Gidenne et al., 2009b), les mesures concernant les fonctions immunologiques que nous avons réalisées ne sont qu'une toute première approche, qu'il conviendrait de poursuivre. Ainsi, la mesure de la longueur de certains organes du système immunitaire (rate et tissu lymphoïde associé au tractus gastro-intestinal : Plaques de Peyer,

appendice cæcal, et *sacculus rotundus*) et de leur masse n'est pas suffisante pour connaître l'interaction système immunitaire-niveau d'ingestion. Il serait judicieux d'analyser l'activité de ces organes sachant qu'ils sont impliqués à différents niveaux de la réponse immunitaire. L'appendice cæcal est un organe lymphoïde primaire impliqué dans la production et la maturation des lymphocytes B chez le jeune lapereau. Il est aussi un organe lymphoïde secondaire induisant la réponse immunitaire spécifique, comme le sont les Plaques de Peyer et le *sacculus rotundus*. La rate est un organe lymphoïde secondaire entrant en action dans l'immunité cellulaire. Une étude de paramètres immunologiques tels que la numération lymphocytaire intraépithéliale, et de la *lamina propria*, des interférons gamma et de certaines interleukines (Fortun-Lamothe et Boullier, 2007), nous aurait permis d'approfondir la relation immunité-niveau d'ingestion, ces paramètres témoignant de l'activité du système immunitaire.

Nous avons réalisé un dosage des IgG au cours du challenge infectieux et de l'étude du comportement. Néanmoins, étant donné le jeune âge des animaux (au maximum 49 jours) lors des prélèvements et le faible délai post-infection (11 jours), les valeurs n'atteignaient pas la limite de détection de la méthode utilisée (immunodiffusion radiale).

### III. QUELQUES PISTES POUVANT EXPLIQUER L'EFFICACITE DE LA REGULATION DU NIVEAU D'INGESTION POUR AMELIORER L'ETAT SANITAIRE

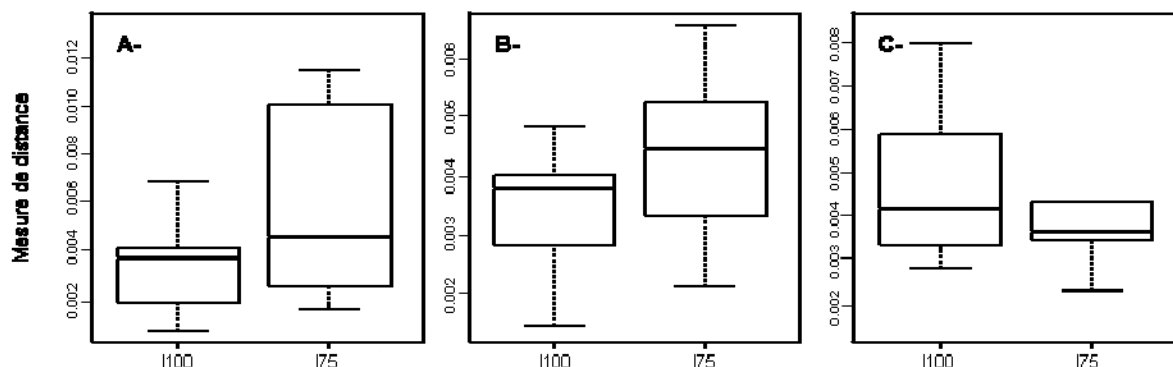
Les expériences mises en place et leurs résultats nous ont permis d'émettre quelques hypothèses quant aux raisons de l'efficacité de la restriction alimentaire sur la santé digestive du jeune lapin.

#### III.A. UNE EFFICACITE QUI NE SERAIT PAS LIEE A LA PERIODE DE JEUNE INDUITE

La mise en place d'une restriction alimentaire couplée à une distribution répartie tout au long de la journée tendrait à améliorer l'état sanitaire des lapins en engraissement. Ainsi, l'efficacité de la restriction alimentaire serait principalement liée au fait de réduire la quantité d'aliment ingéré, et pas au vide intestinal observé lors de la distribution unique d'une ration restreinte. Ces conclusions seraient à confirmer avec un effectif étudié plus conséquent.

#### III.B. UNE STABILISATION DE LA COMMUNAUTE BACTERIENNE APRES UNE PERTURBATION

Lors d'une reproduction d'un épisode de colibacillose à *E. coli* O128:C6, la **structure de la communauté bactérienne iléale** (Figure 23 C-) tend à être **plus stable** pour les lapins restreints comparés aux animaux nourris à volonté, une fois le pic d'infection passé, c'est-à-dire **après une perturbation importante** (Figure 23 B-).



**Figure 23:** Boîtes à moustaches représentant la variabilité intra groupe des structures des communautés bactériennes iléales des animaux infectés, alimentés à volonté (I100) ou restreints (I75), à J-2 (A-,  $P=0.088$ ), à J5=pic d'infection (B-,  $P=0.164$ ) et à J11 (C-,  $P=0.097$ ).

Au cours du challenge infectieux, nous avons montré que la modification importante de la structure de la communauté bactérienne iléale observée au pic d'infection pour les lots infectés ( $P=0,01$  ;  $R=0,444$  ; tableau 30 page 156) n'était pas uniquement due à l'infection, puisque les lapins non inoculés présentaient eux aussi une modification importante de la structure de la communauté bactérienne ( $P=0,01$  ;  $R=0,425$  ; tableau 30, page 156). Cette perturbation chez les animaux témoins, peut être liée au sevrage (ayant eu lieu une semaine plus tôt) ; en effet le stress engendré par le sevrage induit une perturbation de la structure de la communauté bactérienne (Castillo et al., 2007). Ces différences de structures entre les animaux inoculés et non inoculés ne sont plus observées à J11, il y a donc un retour à l'état d'équilibre. Cet état d'équilibre n'est pas différent de celui observé à J-2 pour les animaux non infectés alors que les animaux infectés adoptent un nouvel état d'équilibre significativement différent de celui observé à J-2. Cette capacité à revenir à un nouvel état d'équilibre s'apparente au phénomène de résilience reposant sur l'idée que les populations adoptent un « équilibre dynamique » qui ne cesse d'évoluer dans le temps, leur conférant ainsi une capacité à résister ou à récupérer face à une perturbation.

La restriction alimentaire seule n'induit pas de modification significative de la structure des communautés bactériennes iléales et cœcales. Ainsi l'activité fibrolytique semble être favorisée. Une approche par familles principales de bactéries (*Bacteroides*, *Firmicutes*) et non plus par une vision globale de la communauté bactérienne pourrait donc être intéressante afin



de déterminer une éventuelle modification de l'activité des écosystèmes caecal et iléal, et de mettre à jour un lien entre l'amélioration de l'état sanitaire lors d'une restriction alimentaire et une modification de l'équilibre des communautés bactériennes cœcales ou iléales.

Par ailleurs, l'étude de la variabilité entre les profils bactériens iléaux a permis de mettre en évidence des différences entre les traitements. En effet, avant l'infection avec *E. coli* O128:C6, la variabilité de la **structure de la communauté bactérienne iléale** est plus élevée chez les animaux restreints que chez les animaux nourris *ad libitum* (Figure 23 A). **Cependant après l'infection**, une fois le pic d'infection passé (Figure 23 B-), cette **structure tend à recouvrer une stabilité plus importante (J11)** chez les lapins restreints comparés aux animaux nourris à volonté (Figure 23 C-). La restriction alimentaire dès le sevrage favoriserait donc la stabilisation de la structure de la communauté bactérienne iléale après le stress engendré par l'infection.

Par ailleurs, il faut souligner que l'application d'une stratégie de restriction semble peu efficace pour améliorer le statu sanitaire du lapin lors de l'infection par un colibacille modérément pathogène. En revanche, cette même stratégie est efficace dans le cas d'une infection par un inoculum de l'EEL (Boisot et al., 2003). L'analyse comparée des mécanismes pathologiques de ces deux modèles et de la réaction différentielle du lapereau en situation de restriction ou non mérite donc d'être approfondie.

### III.C. INDUIRE LA FAIM STIMULERAIT CERTAINES HORMONES

La restriction alimentaire est connue pour induire une modification de l'équilibre hormonal et métabolique chez la femme (Bringer et al., 1998). Ainsi, l'hypothèse d'une modulation, par cette stratégie d'alimentation, de la sécrétion d'hormones intervenant sur l'activité du système immunitaire est à approfondir. En effet, sur un cycle de 24h, la distribution d'une ration restreinte induit une période de forte ingestion à laquelle succède une longue période de jeûne. Ces fluctuations ont pour conséquence de stimuler la production et la sécrétion de certaines hormones. Ainsi, après une période de forte ingestion, ce sont les hormones anorexiques, induisant la sensation de satiété, qui entrent en jeu (leptine, obéstatine...). A l'inverse, lors d'une période de jeûne, le taux de ghréline, hormone oréxique circulante, est élevé (Garweg et al., 2005), stimulant l'appétit.

La ghréline est connue pour induire une augmentation de la croissance, du dépôt de gras et de la motricité gastro-intestinale (Van der Lely et al., 2004). Mais la totalité des fonctions de cette hormone n'est pas connue. Toutefois, des récepteurs GHS-R, fixant la ghréline ont été identifiés sur certaines cellules du système immunitaire de l'homme et/ou de la souris, telles que les lymphocytes T et B, la rate, le thymus, et les neutrophiles (Hattori, 2009), aussi une modulation de la fonction lymphocytaire par cette hormone a été démontrée (chez la souris, (Xia et al., 2004). De plus, elle supprime l'expression de certaines cytokines (Xia et al., 2004). Aussi, cette hormone, sécrétée lors du jeûne, réduit le phénomène d'inflammation du tractus digestif lié à un épisode diarrhéique chez la souris (Gonzalez-Rey et al., 2006). Une prospection de la réponse hormonale, ciblant ces quelques hormones, lors d'une restriction alimentaire permettrait de confirmer leur modulation par la restriction. Ainsi, la ghréline pourrait être impliquée dans le phénomène de croissance compensatrice observé lors de l'alimentation *ad libitum* des lapins précédemment restreints et dans l'activation et/ou la modulation du système immunitaire. Par ailleurs, la restriction alimentaire a été montrée capable de modérer l'intensité de la réponse inflammatoire systémique, lors d'une inflammation non digestive (Matsuzaki et al., 2001).

### III.D. UNE ALIMENTATION COUVRANT LES BESOINS DES ANIMAUX SANS EXCES

Nous avons calculé, pour les animaux nourris *ad libitum*, l'ingestion relative au poids vif des animaux au cours des essais de physiologie digestive, d'une part sur les 2 premières semaines d'essai et d'autre part sur la dizaine de jours suivants. Ainsi, nous observons pour les deux périodes une diminution de l'ingestion relative dans le temps : pour la première expérience successivement :  $98,96 \pm 4,06$  puis  $92,91 \pm 3,57$  g/j/lapin/kg de poids vif (n=16,  $P < 0,001$ ) et pour la seconde expérience successivement :  $91,07 \pm 4,49$  puis  $89,09 \pm 3,17$  g/j/lapin/kg de poids vif (n=12,  $P = 0,035$ ). Cette observation corrobore l'hypothèse d'un comportement d'ingestion boulimique juste après le sevrage avancée par Foubert et al. (2007).

Afin de préserver le bien-être animal, il serait possible d'argumenter en défaveur des pratiques de rationnement, puisqu'elles ne permettraient pas de couvrir les besoins des animaux. De fait, les lapins restreints présentent seulement une croissance ralentie, en comparaison des animaux nourris *ad libitum*. De plus, en s'intéressant à l'ingestion relative au poids métabolique au cours de nos essais, nous observons que les animaux *ad libitum* présentent une augmentation de l'ingestion plus rapide que l'augmentation des besoins énergétiques : pour le premier essai, entre 28 et 42 jours :  $565 \pm 23,9$  g/j/lapin/kg de poids

métabolique, puis de 42 à 52 jours :  $591 \pm 22,8$  g/j/lapin/kg de poids métabolique (  $n=16$ ,  $P<0,001$ ) et pour le second essai : entre 28 et 42 jours :  $516 \pm 28,7$  g/j/lapin/kg de poids métabolique, puis de 42 à 53 jours :  $565 \pm 21,3$  g/j/lapin/kg de poids métabolique ( $n=12$ ,  $P<0,001$ ). Ainsi, la restriction alimentaire pourrait être considérée comme une régulation "forcée" de niveau d'ingestion, à priori trop élevé lorsque l'animal est nourri à volonté.

### III. E. CAS DE LA RELATION TROUBLES DIGESTIFS ET RESTRICTION ALIMENTAIRE DANS D'AUTRES FILIERES DE PRODUCTION

En élevage porcin, les résultats sont plus contradictoires, peut-être à cause de la transition lait-aliment sec au sevrage, plus brutale pour le porcelet que pour le lapereau. Ainsi, le porcelet présente souvent une courte période d'anorexie correspondant à cette transition. Un contrôle sévère de l'ingestion au cours de la première semaine post-sevrage (moins de 1 kg ingéré) est identifié comme un facteur prédisposant aux diarrhées post-sevrages (Madec et al., 1998; Laine et al., 2008). Au contraire, Laine et al. (2008) référencent des études montrant un effet bénéfique de cette stratégie pour réduire l'incidence et la sévérité des diarrhées post-sevrages chez le porc. Dans la filière avicole, aucune étude à notre connaissance ne s'est tournée vers la relation restriction-santé digestive, bien que cette stratégie d'alimentation semble réduire la fréquence des maladies métaboliques (Nataraju et al., 2007 ; Lippens et al., 2009).

CONCLUSIONS  
&  
PERSPECTIVES



Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis d'améliorer nos connaissances des effets de la restriction alimentaire sur quelques paramètres de la physiologie et du comportement du lapereau. Ainsi, nous avons pu analyser plusieurs hypothèses concernant l'influence de cette stratégie d'alimentation sur les mécanismes de digestion et de préservation vis à vis des troubles digestifs post-sevrages.

Nous avons déterminé que l'efficacité alimentaire, et la digestion des protéines, de l'énergie et des fibres de l'aliment sont améliorées chez l'animal rationné. L'analyse du comportement des animaux soumis à un contrôle de leur niveau d'ingestion a permis de souligner que le bouleversement de comportement alimentaire n'entraîne pas d'agressivité et/ou de compétition entre les animaux. Nous avons mis en évidence que le rythme d'ingestion, fonction du rythme nyctéméral pour les animaux *ad libitum*, est exclusivement lié au moment de distribution de l'aliment pour les animaux restreints. En revanche, l'analyse de quelques paramètres de physiologie digestive permet de mettre en avant quelques hypothèses pour expliquer comment la restriction alimentaire améliore la santé digestive. Ainsi, nous observons chez l'animal restreint et touché par un pathogène (modèle *E. coli*) que le symbiote semble revenir à un état stable plus rapidement. Ceci pose la question de la stabilité du symbiote digestif, renforcé par une stratégie d'ingestion limitée. Il semble également que le "statut" inflammatoire de l'animal restreint diffère de celui alimenté à volonté. Néanmoins, l'application d'une stratégie de restriction ne semble pas efficace pour améliorer la résistance du lapin en croissance infecté par un colibacille entéropathogène, alors que cette même stratégie est efficace dans le cas d'une infection par un inoculum de l'EEL. L'analyse comparée de ces deux pathogénies et de la réaction différentielle du lapereau en situation de restriction ou non mérite donc d'être approfondie.

En perspectives, afin de poursuivre les recherches sur les interactions entre la quantité et la qualité de l'aliment, il serait judicieux de mettre en place des variations de la valeur nutritive, en énergie par exemple, de l'aliment distribué, afin de tester l'efficacité d'une restriction énergétique sur l'état sanitaire des animaux en engraissement. Cette étude a été débutée par Gidenne et al. (2009a), en comparant des aliments à concentration énergétique différente, et rationnés ou non. Les premiers résultats indiquent que réduire la quantité d'aliment ingéré, mais sans réduire l'ingéré énergétique, semble avoir peu d'effet sur la santé digestive des animaux. Ainsi, il semble a priori difficile, à la fois de préserver simultanément la santé et les performances de croissance des lapereaux. Dans la continuité de nos travaux, il faudrait aussi s'intéresser à la stabilisation de la communauté bactérienne digestive d'animaux restreints ou suite à un stress, une perturbation. Aussi, il serait pertinent d'approfondir nos

connaissances par l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, ciblant certaines espèces (*Bacteroides*, *Firmicutes*) ou certaines activités (fibrolytique, cellulolytique) de la communauté bactérienne. Il s'agirait de prendre en considération l'ensemble de la communauté bactérienne dans différents organes digestifs (iléon, cæcum, côlon) tant au plan de l'identification des populations que de leur activité. Pour finir, il serait judicieux d'explorer la variation des teneurs sanguines en molécules impliquées dans les défenses immunitaires de l'organisme (interleukines, interférons gamma et numération lymphocytaire intraépithéliale et de la *lamina propria*) et en certaines hormones circulantes dont la production et la sécrétion sont liées à l'état de faim ou de satiété de l'individu (ghréline).

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**





- Barone, R. (1984). Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome 3, Splanchnologie 1, Appareil digestif, Appareil respiratoire. Paris, France, Vigot Eds.
- Barone, R., C. Pavaux, P. C. Bilin et P. Cuq (1973). Atlas d'anatomie du lapin. Paris, France, Masson and C<sup>ie</sup>.
- Bautista, A., H. Drummond, M. Martinez-Gomez et R. Hudson (2003). Thermal benefit of sibling presence in the newborn rabbit. *Developmental Psychobiology* 43(3): 208-215.
- Belenguer, A., J. Balcells, J. A. Guada, M. Decoux et E. Milne (2005). Protein recycling in growing rabbits: contribution of microbial lysine to amino acid metabolism. *British Journal of Nutrition* 94(5): 763-770.
- Bellier, R., T. Gidenne, M. Vernay et M. Colin (1995). In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* 73(1): 128-135.
- Ben Rayana, A., S. Lengliz, M. Hamida et R. Bergaoui (2009). Effets de la restriction hydrique et de la restriction alimentaire sur les performances zootechniques des lapereaux en croissance. 13<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France.
- Bennegadi, N., G. Fonty, L. Millet, T. Gidenne et D. Licois (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(1): 23-32.
- Bergaoui, R., M. Kammoun et K. Ouerdiane (2008). Effects of feed restriction on the performance and carcass of growing rabbits. Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Verona – Italy, WRSA Edition.
- Bernadac, R. D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiology* 4(11): 430-435.
- Boisot, P., D. Licois et T. Gidenne (2003). Une restriction alimentaire réduit l'impact sanitaire d'une reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique (EEL) chez le lapin en croissance. Proceedings 10<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France.
- Boulahrouf, A., G. Fonty et P. Gouet (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.
- Bringer, J., P. Lefebvre et E. Renard (1998). Endocrine and metabolic consequences of food restriction. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 33(4): 243-247.
- Bruni, A., V. M. Quinton, T. M. Widowski (2008). The effect of feed restriction on belly nosing behaviour in weaned piglets. *Applied Animal Behaviour Science* 110(1-2): 203-215.
- Calas, A., J. F. Perrin, C. Plas et P. Vanneste (1997). Précis de physiologie, Doin.
- Camguilhem, R. et A. Milon (1989). Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. *Journal of Clinical Microbiology* 27(4): 743-747.
- Carey, M. C., D. M. Small et C. M. Bliss (1983). Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Physiology* 45: 651-677.
- Castillo, M., S. M. Martín-Orúe, M. Nofrarías, E. G. Manzanilla et J. Gasa (2007). Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Veterinary Microbiology* 124(3-4): 239-247.
- Cavani, C., L. Bianconi et G. F. Urrai (1991). Distribuzione automatizzata e frazionata degli alimenti nel coniglio in accrescimento: 1. Influenza della modalità di distribuzione e del livello alimentare. Proceedings IX Congresso ASPA, Rome, Italy.
- Cheeke, P. R. (1987). Digestive physiology. *Rabbit Feeding and Nutrition*. T. J. Cunha. Londres, Royaume-Uni, Academic Press Inc.
- Chevance, A. et A. Moulin (2009). Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008.
- Corring, T. et A. Rérat (1983). A survey of enzymatic digestion in simple-stomached animals. Digestion and absorption of nutrient. H. B. e. Y. Schutz. Bern, Suisse, Hans Huber: 9-26.

- Cortez, S., H. Brandeburger, E. Greuel et A. Sundrum (1992). Investigations of the relationships between feed and health status on the intestinal flora of rabbits. *Tierarztl. Umsch.* 47: 544-549.
- Coureaud, G., L. Fortun-Lamothe, H.-G. Rödel, R. Monclus et B. Schall (2008). Le lapereau en développement : données comportementales, alimentaires et sensorielles sur la période naissance-sevrage. *INRA Productions Animales* 21(3): 231-238.
- Davies, R. R. et J. A. Davies (2003). Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice* 6(1): 139-153.
- De Blas, C. et G. G. Mateos (1998). Feed formulation. The nutrition of the rabbit. C. De Blas and J. Wiseman. Wallingford, UK, CABI Publishing. Chapter 13: 241-254.
- De Blas, J. C., E. Pérez, M. J. Fraga, M. Rodriguez et G. J.F. (1981). Effect of diet on feed intake and growth of rabbits from weaning to slaughter at different ages and weights. *Journal of Animal Science* 52(6): 1225-1232.
- Drummond, H., E. Vazquez, S. Sanchez-Colon, M. Martinez-Gomez et R. Hudson (2000). Competition for milk in the domestic rabbit: Survivors benefit from littermate deaths. *Ethology* 106(6): 511-526.
- Eiben, C., K. Kustos, G. Virag et Z. Szendro (2001). Effect of different feed restrictions during rearing on reproduction performance in rabbit does. *World Rabbit Science* 9(1): 9-14.
- Erickson, R. H. et Y. S. Kim (1990). Digestion and absorption of dietary protein. *Annual Review of Medicine* 41(133-139).
- FAO (2009). Data on agricultural production, livestock primary, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Faure, J., J. D. Vincent et C. Bensch (1965). Sur des relations observées entre sommeil, rythmes alimentaires et état hormonal. *Biologie Générale*
- FAWC (1992). Farm Animal Welfare Council updates the five freedoms. *Veterinarian Records* 17: 357.
- Ferrando, R., N. Henry, M. Klur et J. P. Mégard (1972). Teneur en azote et en acides aminés des cæcotrophes et autre fèces des lapin à collier recevant ou non des antibiotiques dans leur rations. *Ann. Nutr. Alim.* 26: 189-196.
- Fioramonti, J. et Y. Ruckebusch (1974). La motricité cæcale chez le Lapin. 3) Dualité de l'excrétion fécale. *Annales de Recherches Vétérinaires* 7: 281-295.
- Forsythe, S. J. et D. S. Parker (1985). Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit caecum. *Journal of Applied Bacteriology* 58(4): 363-369.
- Fortun-Lamothe, L. et S. Boullier (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): 1-18.
- Fortun-Lamothe, L. et T. Gidenne (2000). The effect 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. et T. Gidenne (2008). Filière cunicole française et systèmes d'élevage. *Productions Animales* 21(3): 219-220.
- Foubert, C., P. Boisot, J. Duperray et A. Guyonvarch (2007). Comparaison de deux stratégies de rationnement alimentaire, via un accès restreint à l'eau de boisson, en conditions estivales et hivernales. 12<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, le Mans, France.
- Foubert, C., J. Duperray et A. Guyonvarch (2008). Intérêt d'un aliment fibreux concentré en énergie chez le lapin de chair rationné. *Journée Nationale du lapin de chair*. Pacé, ITAVI Editions: 1-8.
- Froy, O. (2007). The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28(2-3): 61-71.
- Garcia, J., J. C. De Blas, R. Carabaño et P. Garcia (1995). Effect of type of lucerne hay on caecal fermentation and nitrogen contribution through caecotrophy in rabbits. *Reproduction Nutrition Development* 35(3): 267-275.

- Garweg, C., F. Scholtes, J. Gerard et C. Wahlen (2005). [Ghrelin and obesity]. *Revue Medicale de Liege* 60(1): 35-40.
- Georgieva, T., I. Penchev Georgiev, S. Tanev, A. Vachkov, V. Petrov, P. D. Eckersall, L. Sotirov, L. Lazarov, T. S. Christov et J. Nikolov (2009). Variations of acute phase protein (haptoglobin, fibrinogen and ceruloplasmin) concentrations in weaning rabbits after experimental infection with *E. coli*. *Revue de Médecine Vétérinaire* 160(3): 133-139.
- Gidenne, T. (1987). Influence de la teneur en lignines des aliments sur la composition des digesta et la production de cæcotrophes chez le lapereau. *Annales de zootechnie* 36: 85-90.
- 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. (1993). Measurement of the rate of passage in restricted-fed rabbits: effect of dietary cell wall level on the transit of fibre particles of different sizes. *Animal Feed Science and Technology*. 42: 151-163.
- 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 Productions Animales* 9(4): 243-254.
- Gidenne, T. (1997). Caeco-colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science* 51(1-3): 73-88.
- Gidenne, T. (2003). Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* 81(2-3): 105-117.
- Gidenne, T., P. Aymard, C. Bannelier, S. Combes et L. Lamothe (2009a). Interaction entre la stratégie de restriction et la concentration énergétique de l'aliment: impact sur la croissance et la santé du lapin. Premiers résultats. . 13<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole Le Mans.
- Gidenne, T., S. Combes, A. Feugier, N. Jehl, P. Arveux, P. Boisot, C. Briens, E. Corrent, H. Fortune, S. Montessuy et S. Verdelhan (2009b). Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3(4): 509-515.
- Gidenne, T. et A. Feugier (2009). Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal* 3(4): 501-508.
- Gidenne, T., A. Feugier, N. Jehl, P. Arveux, P. Boisot, C. Briens, E. Corrent, H. Fortune, S. Montessuy et S. Verdelhan (2003). Un rationnement alimentaire quantitatif post-sevrage permet de réduire la fréquence des diarrhées, sans dégradation importante des performances de croissance : résultats d'une étude multi-site. *Proceedings 10<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France.*
- Gidenne, T. et L. Fortun-Lamothe (2002). Feeding strategy for young rabbits around weaning: A review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Science* 75(2): 169-184.
- Gidenne, T., J. Garcia, F. Lebas et D. Licois (2010a). Nutrition and feeding strategy: interactions with pathology. *Nutrition of the rabbit - 2<sup>nd</sup> edition*. C. d. B. a. J. Wiseman, CABI.
- Gidenne, T., V. Kerdiles, N. Jehl, P. Arveux, C. Briens, B. Eckenfelder, H. Fortune, S. Montessuy, G. Muraz et S. Stephan (2001). Effet d'une hausse du ratio fibres digestibles/protéines sur les performances zootechniques et l'état sanitaire du lapin en croissance : résultats préliminaires d'une étude multi-site. 9<sup>èmes</sup> Journées e la Recherche Cunicole, Paris, France.
- Gidenne, T. et F. Lebas (1984). Evolution circadienne du contenu digestif chez le lapin en croissance. Relation avec la cæcotrophie. *Proceedings the 3<sup>rd</sup> World Rabbit Congress, Rome, WRSA publ.*
- Gidenne, T. et F. Lebas (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. et F. Lebas (2005). Le comportement alimentaire du lapin. Proceedings 11<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France.
- Gidenne, T. et F. Lebas (2006). Feeding Behaviour in Rabbits. Feeding in Domestic Vertebrates: from structure to behaviour. V. Bels: 179-194.
- Gidenne, T., F. Lebas et L. Fortun-Lamothe (2010b). Feeding behaviour in rabbits. Nutrition of the rabbit - 2<sup>nd</sup> Edition. C. D. B. a. J. Wiseman, CABI.
- Gidenne, T. et D. Licois (2005). Effect of a high fibre intake on the resistance of the growing rabbit to an experimental inoculation with an enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. Animal Science 80(3): 281-288.
- Gidenne, T., L. Mirabito, N. Jehl, J. M. Perez, P. Arveux, A. Bourdillon, C. Briens, J. Duperray et E. Corrent (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., S. Murr, A. Travel, E. Corrent, C. Foubert, K. Bebin, L. Mevel, G. Rebours et B. Renouf (2008). Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau - Premiers résultats d'une étude concertée du réseau GEC. Journée Nationale ITAVI - Elevage du lapin de chair, Pacé, France.
- Gidenne, T., S. Murr, A. Travel, E. Corrent, C. Foubert, K. Bebin, L. Mevel, G. Rebours et B. Renouf (2009c). Effets du niveau de rationnement et du mode de distribution de l'aliment sur les performances et les troubles digestifs post-sevrage du lapereau. Premiers résultats d'une étude concertée du réseau GEC. Cuniculture Magazine 36: 65-72.
- Gidenne, T., A. Travel, S. Murr, H. Oliveira, E. Corrente, C. Foubert, K. Bebin, L. Mevel, G. Rebours, B. Renouf et V. Gigaud (2009d). Ingestion restreinte et mode de distribution de la ration. Conséquences sur le comportement alimentaire, la digestion et la qualité de la carcasse. 13<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France.
- Gondret, F., F. Lebas et M. Bonneau (2000). Restricted feed intake during fattening reduces intramuscular lipid deposition without modifying muscle fiber characteristics in rabbits. Journal of Nutrition 130(2): 228-233.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny et M. Delgado (2006). Therapeutic Action of Ghrelin in a Mouse Model of Colitis. Gastroenterology 130(6): 1707-1720.
- Gouet, P. et G. Fonty (1979). Changes in the digestive microflora of holoxenic rabbits from birth until adulthood. Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique 19(3 A): 553-566.
- Guarner, F. et J. R. Malagelada (2003). Gut flora in health and disease. Lancet 361: 512-519.
- Hattori, N. (2009). Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. Growth Hormone & IGF Research 19(3): 187-197.
- Hocking, P. M., M. H. Maxwell, M. A. Mitchell (1999). Welfare of food restricted male and female turkeys. British Poultry Science 40(1): 19-29.
- Hoover, W. H. et R. N. Heitmann (1972). Effects of dietary fiber levels on weight gain, cecal volume and volatile fatty acid production in rabbits. Journal of Nutrition 102: 375-380.
- Hörnigke, H. et F. Batsch (1977). Caecotrophy in rabbits. A circadian function. Journal of Mammalogy 58: 240-242.
- Hudson, R., A. Bilko et V. Altbäcker (1996). Nursing, weaning and the development of independent feeding in the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Zeitschrift für Säugertierkunde 61: 39-48.
- Hudson, R. et H. Distel (1982). The pattern of behaviour of rabbits pups in the nest. Behaviour 79: 255-271.
- Hulot, F., J. C. Mariana et F. Lebas (1982). Establishment of puberty (folliculogenesis and ovulation) in the doe-rabbit. Effect of rationing the diet. Reproduction Nutrition Development 22(3): 439-453.
- Jentzer Azard, A. (2009). Réseau de fermes de références cunicoles - Programme CUNIMIEUX - Résultats de la campagne 2007-2008.

- Jilge, B. (1974). Soft faeces excretion and passage time in the laboratory rabbit. *Laboratory Animal* 8: 337-346.
- Jilge, B. (1982). Monophasic and diphasic patterns of the circadian caecotrophy rhythm of rabbits. *Laboratory Animals* 16(1): 1-6.
- Jilge, B. (1993). The ontogeny of circadian rhythms in rabbit. *Journal of Biological Rhythms* 8(3): 247-260.
- Jolivet, E., Y. Reyne et J. Teyssier (1983). Methodological approach to the circadian pattern of food intake in the growing domestic rabbit. *Reproduction Nutrition Development* 23(1): 13-24.
- Jordan, D., G. Gorjanc et I. Stuhec (2008). Effect of gnawing wood as environmental enrichment on behaviour of individually housed growing rabbits. *Archiv für Geflügelkunde* 72(4): 181-187.
- Kimsé, M. (2009). Caractérisation de l'écosystème cæcal et santé digestive du lapin : contrôle nutritionnel et interactions avec la levure probiotique *Saccharomyces Cervisiae*, Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse. PhD/Doctorat.
- Laine, T. M., T. Lyytikäinen, M. Yliaho et M. Anttila (2008). Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50(21): (18 June 2008).
- Lanning, D., X. Zhu, S. K. Zhai et K. L. Knight (2000). Development of the antibody repertoire in rabbit: gut-associated lymphoid tissue, microbes and selection. *Immunology Review* 175(214-228).
- Larour, G., J.-L. Jobert, L. Balaine, F. Eono, M.-F. Klein, T. Ledein, S. Le Bouquin et M. Guittet (2004). Etude des facteurs de risque de l'expression aiguë de l'entérococolite épizootique du lapin en engraissement. *Epidémiologie et santé animale* 45: 91-99.
- Lebas, F. (2000). Vitamins in rabbit nutrition. *World Rabbit Science* 8(4): 185-194.
- Lebas, F. (2001). Entérococolite : situation en juin 2001. *Cuniculture Magazine* 28: 183-188.
- Lebas, F. (2009). Performances moyenne des élevages cunicoles en France - Résultats de RENACEB pour l'année 2008. *Cuniculture Magazine* 36: 93-94.
- Lebas, F., P. Coudert, H. De Rochambeau et R. G. Thébault (1996). Le lapin : élevage et pathologie. FAO, Rome.
- Lebas, F. et J. P. Laplace (1974). Sur l'excrétion fécale chez le lapin. *Annales de zootechnie* 23: 577-581.
- Ledin, I. (1984). Effect of restricted feeding and realimentation on compensatory growth, carcass composition and organ growth in rabbit. *Annales de zootechnie* 33(1): 33-50.
- Leng, E. et H. Hörnicke (1975). Tagesrhythmische Unterschiede in der Zusammensetzung des Blinddarminhalts von Kaninchen. *Zeitung Versuchstierk* 17: 285-299.
- Licois, D. (1986). La maladie de Tyzzer. *Annales de la Recherche Vétérinaire* 17: 363-386.
- Licois, D. (2007). Etude in vivo de la fraction surnageante de l'inoculum TEC4, inoculum utilisé pour la reproduction expérimentale de l'Entéropathie Epizootique du Lapin. 12<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans, France.
- Licois, D., R. Dewrée, P. Coudert, H. Vindevogel et D. Marlier (2003). Essais de reproduction expérimentale de l'entéropathie épizootique du lapin (EEL) avec des inoculums originaires de Belgique et des Pays-Bas et avec des souches bactériennes isolées de ces inoculums ainsi que de TEC2 et TEC3 (inoculums de l'INRA). 10<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France.
- Licois, D., J. F. Guillot, C. Mouline et A. Reynaud (1992). Susceptibility of the Rabbit to an Enteropathogenic Strain of *Escherichia-Coli* 0103 - Effect of Animals Age. *Annales De Recherches Veterinaires* 23(3): 225-232.
- Licois, D. et D. Marlier (2008). Pathologies infectieuses du lapin en élevage rationnel. *INRA Productions Animales* 21(3): 257-268.
- Licois, D., M. Wyers et P. Coudert (2005). Epizootic Rabbit Enteropathy: experimental transmission and clinical characterization. *Veterinary Research* 36(4): 601-613.

- Lincoln, D. W. (1974). Suckling: a time-constant in the nursing behaviour of the rabbits. *Physiology and Behavior* 13(5): 711-714.
- Lippens, M., E. Delezie, L. Maertens, G. Huyghebaert, 2009. Influence of feed texture and early quantitative feed restriction on performance, growth development and carcass composition of two broiler strains. *Archiv fur Geflugelkunde* 73, 29-40.
- Madara, J. L. et J. S. Trier (1987). Functional morphology of the mucosa of the small intestine. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. L. R. Johnson. New-York, USA, Raven Press.
- Madec, F., N. Bridoux, S. Bounaix et A. Jestin (1998). Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine* 35(1): 53-72.
- Maertens, L., J. M. Aerts et D. L. De Brabander (2005). Effect of a diet rich in n-3 fatty acids on the performances and milk composition of does and the viability of their progeny. 11<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France, ITAVI.
- Maertens, L., F. Lebas et Z. Szendro (2006). Rabbit milk: a review of quantity, quality and non dietary affecting factors. *World Rabbit Science* 14: 205-230.
- Maertens, L. et M. J. Villamide (1998). Feeding systems for intensive production. The nutrition of the rabbit. C. De Blas and J. Wiseman. Wallingford, United Kingdom, CABI Publishing: 255-271.
- Mage, R. (1998). Immunology of Lagomorphs. *Handbook of Vertebrate Immunology*. A. Press: 223-260.
- Manal, A. F., M. A. Tony et O. H. Ezzo (2010). Feed restriction of pregnant nulliparous rabbit does: consequences on reproductive performance and maternal behaviour. *Animal reproduction science* 120(1): 179-186.
- Marlier, D., R. Dewrée, V. Delleur, D. Licois, C. Lassence, A. Poulipoulis et H. Vindevogel (2003). Description des principales étiologies des maladies digestives chez le lapin européen (*Oryctolagus cuniculus*). *Annales de Médecine Vétérinaire* 147: 385-392.
- Marlier, D., R. Dewrée, C. Lassence, D. Licois, J. Mainil, P. Coudert, L. Meulemans, R. Ducatelle et H. Vindevogel (2006). Infectious agents associated with epizootic rabbit enteropathy: Isolation and attempts to reproduce the syndrome. *The Veterinary Journal* 172(3): 493-500.
- Marounek, M., S. J. Vovk et E. Skrivanová (1995). Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. *British Journal of Nutrition* 73(3): 463-469.
- Martinsen, T. C., K. Bergh et H. L. Waldum (2005). Gastric juice: A barrier against infectious diseases. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 96(2): 94-102.
- Marty, J. et M. Vernay (1984). Absorption and metabolism of the volatil fatty acids in the hindgut of the rabbit. *British Journal of Nutrition* 51(265-277).
- Matsuzaki, J., M. Kuwamura, R. Yamaji, H. Inui et Y. Nakano (2001). Inflammatory responses to lipopolysaccharide are suppressed in 40% energy-restricted mice. *Journal of Nutrition* 131(8): 2139-2144.
- Merlet, F., J. Puterflam, J. M. Faure, P. M. Hocking, M. S. Magnusson, M. Picard (2005). Detection and comparison of time patterns of behaviours of two broiler breeder genotypes fed ad libitum and two levels of feed restriction. *Applied Animal Behaviour Science* 94(3-4): 255-271.
- Metzger, S., Z. Szendro, M. Bianchi, I. Hullár, H. Fébel, L. Maertens, C. Cavani, M. Petracci, I. Radnai et E. Biró-Németh (2009). Effect of energy restriction in interaction with genotype on the performance of growing rabbits: II. Carcass traits and meat quality. *Livestock Science* 126(1-3): 221-228.
- Michelland, R. J., S. Combes, V. Monteils, L. Cauquil, T. Gidenne et L. Fortun-Lamothe (2010). Molecular analysis of the bacterial community in digestive tract of rabbit. *Anaerobe* 16(2): 61-65.

- Millman, S. T., I. J. H. Duncan (2000). Effect of male-to-male aggressiveness and feed-restriction during rearing on sexual behaviour and aggressiveness towards females by male domestic fowl. *Applied Animal Behaviour Science* 70(1): 63-82.
- Milon, A., J. Esslinger et R. Camguilhem (1990). Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and hela-cells. *Infection and Immunity* 58(8): 2690-2695.
- Milon, A., J. Esslinger et R. Camguilhem (1992). Oral vaccination of weaned rabbits against enteropathogenic *Escherichia coli*-like *E. coli* O103 infection: use of heterologous strains harboring lipopolysaccharide or adhesin of pathogenic strains. *Infection and Immunity* 60(7): 2702-2709.
- Mirabito, L., P. Galliot, C. Souchet, V. Pierre (1999). Logements des lapins en engraissement en cage de 2 ou 6 individus : étude du budget-temps. *Proceedings 8èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris, France.*
- Monteils, V., L. Cauquil, S. Combes, J. J. Godon et T. Gidenne (2008). Potential core species and satellite species in the bacterial community within the rabbit caecum. *FEMS Microbiology Ecology* 66(3): 620-629.
- Moreau, H., Y. Gargouri, D. Lecat, J. L. Junien et R. Verger (1988). Purification characterization and kinetic properties of the rabbit lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 960: 286-293.
- Nataraju, O.R., K.S.P. Kumar, B. Umakantha, H.N.N. Murthy, B.S.V. Reddy, 2007. Effect of variation in dietary profile and early feed restriction on performance of male broiler chickens. *Environment and Ecology* 25, 610-616
- Office de l'élevage (2008). Le marché des produits laitiers, carnés et avicoles en 2008, Office national interprofessionnel de l'élevage et de ses productions
- Orengo, J. et T. Gidenne (2007). Feeding behaviour and caecotrophy in the young rabbit before weaning: An approach by analysing the digestive contents. *Applied Animal Behaviour Science* 102(1-2): 106-118.
- Ouhayoun, J., B. Poujardieu et D. Delmas (1986). Influence des conditions d'élevage et du rationnement sur la vitesse de croissance du lapin entre 11 et 20 semaines. 2) Composition corporelle. *Proceedings 4<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Paris, Fr.*
- Padilha, M. T. S., D. Licois, T. Gidenne, B. Carré et G. Fonty (1995). Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reproduction Nutrition Development* 35(4): 375-386.
- Parigi-Bini, R., G. M. Chiericato et D. Lanari (1974). I mangimi grassati nel coniglio in accrescimento. Digeribilità ed utilizzazione energetica. *Rivista de Zootecnia e Veterinaria* 2: 193-202.
- Peeters, J. E., R. Geeroms et F. Orskov (1988). Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infect. Immun.* 56(6): 1442-1448.
- Penney, R. L., G. E. Folk, R. P. Galask et C. R. Petzold (1986). The microflora of the alimentary tract of rabbits in relation to pH, diet and cold. *Journal of Applied Rabbit Research* 9(4): 152-156.
- Perrier, G. (1998). Influence de deux niveaux et de deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchères de la carcasse. *Proceedings 7<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole, Lyon, France.*
- Postollec, G., E. Boilletot, R. Maurice, V. Michel (2006). The effect of housing system on the behaviour and growth parameters of fattening rabbits. *Animal Welfare* 15(2): 105-111.
- Postollec, G., E. Boilletot, R. Maurice, V. Michel (2008). The effect of pen size and an enrichment structure (elevated platform) on the performances and the behaviour of fattening rabbits. *Animal Welfare* 17(1): 53-59.
- Prud'hon, M., Y. Carles, J. Goussopoulos et P. F. Koehl (1972). Enregistrement graphique des consommations d'aliments solide et liquide du lapin domestique nourri *ad libitum*. *Annales de zootechnie* 21(3): 451-460.



- Prud'hon, M., M. Chérubin, Y. Carles et J. Goussopoulos (1975a). Effets de différents niveaux de restriction hydrique sur l'ingestion d'aliments solides par le lapin. *Annales de zootechnie* 24(2): 299-310.
- Prud'hon, M., M. Chérubin, J. Goussopoulos et Y. Carles (1975b). Evolution, au cours de la croissance, des caractéristiques de la consommation d'aliments solide et liquide du lapin domestique nourri *ad libitum*. *Annales de zootechnie* 24(2): 289-298.
- Ramirez, M., L. Amate et A. Gil (2001). Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Human Development* 65 Suppl.: S95-S101.
- Rommers, J. M., R. Meijerhof, J. P. T. M. Noordhuizen et B. Kemp (2004). The effect of level of feeding in early gestation on reproductive success in young rabbit does. *Animal reproduction science* 81(1-2): 151-158.
- Ruckebusch, Y. et J. Fioramonti (1976). Sur le déterminisme de la cæcotrophie chez le lapin. Congrès international cunicole, Dijon, France.
- Sanderson, J. D. et D. A. Vanderweele (1975). Analysis of feeding patterns in normal and vagotomized rabbits. *Physiology and Behavior* 15(3): 357-364.
- Scapinello, C., T. Gidenne et L. Fortun-Lamothe (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(4): 423-432.
- Schlögl, W., K. Lange et H. Schlüter (1978). Der Einfluss der Futterungintensität auf die Mastleistung und Schlachtkörperqualität beim Jungmastkaninchen. *Zuchtungskunde* 50: 401-411.
- Seitz, K. (1997). Untersuchungen zum Säugeverhalten von Hauskaninchen-Zibben sowie zu Milchaufnahme, Lebendmasseentwicklung und Verlustgeschehender Jungtiere, Universität Giessen. Thesis.
- Selzer, D. (2000). Vergleichende Untersuchungen zum Verhalten von Wild- und Hauskaninchen unter verschiedenen Haltungbedingungen, Universität Giessen. Thesis.
- Sirotek, K., M. Marounek, V. Rada et V. Benda (2001). Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria. *Folia Microbiology* 46(1): 79-82.
- Snipes, R. L. et H. Snipes (1997). Quantitative investigation of the intestines in eight species of domestic mammals. *International Journal of Mammalian Biology* 62(6): 359-371.
- Thomson, A. B. R., C. Schoeller, M. Keelan, L. Smith et M. T. Clandinin (1993). Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 71: 531-555.
- Tumova, E., V. Skrivanová, L. Zita, M. Skrivan et A. Fucikova (2004). The effect of restriction on digestibility of nutrients organ growth and blood picture in broiler rabbits. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, Pueblo, Mexico.
- Van der Lely, A. F., M. Tschöp, M. L. Heiman et E. Ghigo (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin (vol 25, pg 426, 2004). *Endocrine Reviews* 25(5): 866-866.
- Wright, E. M., M. G. Martin et E. Turk (2003). Intestinal absorption in health and disease - Sugars. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 17(6): 943-956.
- Xia, Q., W. Pang, H. Pan, Y. Zheng, J. S. Kang et S. G. Zhu (2004). Effects of ghrelin on the proliferation and secretion of splenic T lymphocytes in mice. *Regulatory Peptides* 122(3): 173-178.
- Xiccato, G. (1999). Feeding and meat quality in rabbits: a review. *World Rabbit Science* 7(2): 75-86.

## ABSTRACT

---

Societal expectations are moving towards healthy food from sustainable farming systems. In rabbit industry, control of digestive diseases requires the use of curative or preventive antibiotics. The search for alternatives to the use of antibiotics in rabbit breeding is thus crucial to improve sustainability of this production. Strategies for limiting the amount of feed ingested are one possible solution to this problem, since they improve the digestive resistance of young rabbits.

This thesis aims to study the mechanisms underlying this positive effect of restriction strategies, and also to analyze the feeding behaviour of restricted rabbit in relation to their welfare. This objective is divided into two parts. The first part aims to determine which characteristic of feeding restriction limits the digestive disorders in fattening. The second part deals with the biological parameters potentially influenced by this feeding strategy. The parameters considered are related to several areas of biology: enzymology, histometry, digestive bacterial ecosystem

A reduction of feed intake of -25% reduced growth, but significantly improved digestive efficiency (4 to 6% between 28 and 50 days old) of fattening rabbits which can be explained by a higher protein digestibility (4.5%), energy (5.3%) and fibres (NDF: 8.9%, ADF: 9.7%, hemicellulose 7.9%, cellulose: 11.5%). However, the structure, diversity and density of the caecal bacterial community are little changed in the healthy animal fed restricted. Changes in eating behaviour were highlighted during this work. Thus, the rhythm of intake, depending on the circadian rhythm in rabbits fed *ad libitum*, is function of the feed distribution time for restricted animals. After 18 days of restriction, rabbits ingest in 2 hours the third of the quantity supplied, and the entire amount within 10 hours. No aggression or competition was observed between animals.

Several hypotheses could explain the effectiveness of this strategy on digestive health in young rabbit. Thus, the results obtained during the reproduction of colibacillosis (*Escherichia coli* O128: C6) suggest a stabilization of the ileal ecosystem after infection. On the other hand, the main activity of bacterial communities of caecum would be modulated, even if for this model a limited intake moderately modified the sanitary status. Finally, the alternation of periods of satiety and hunger may stimulate the release of hormones (e.g. ghrelin) that could modulate immune function.

In perspective, it would be appropriate to study more precisely the functions related to immune or endocrine status. In addition, a deeper study of the caecal bacterial community by targeting some species could provide additional informations on the interactions between intake and digestive symbiote, and on a comparative approach of the two pathogenic models: EPEC vs. REE.

**Key-words:** digestive physiology, digestive pathology, intake behaviour, rabbits, nutrition, feeding restriction

## RESUME

---

Les attentes sociétales s'orientent vers une consommation saine, et provenant de systèmes agricoles durables. En filière cunicole, la maîtrise des pathologies digestives nécessite le recours à l'antibiothérapie curative ou préventive. La recherche d'alternatives à l'utilisation d'antibiotiques en élevages cunicoles est donc primordiale pour augmenter la durabilité de cette production. Les stratégies de limitation de la quantité d'aliment ingérée sont une des solutions possibles à ce problème, puisqu'elles améliorent la résistance du jeune lapin aux troubles digestifs.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier les mécanismes sous-jacents à cet effet favorable des stratégies de rationnement, et aussi d'analyser le comportement alimentaire du lapin restreint en relation avec son bien-être. Cet objectif se scinde en deux parties étudiées. La première partie a pour but de déterminer quelle caractéristique de la restriction alimentaire limite les troubles digestifs en engraissement. La seconde partie s'intéresse aux paramètres biologiques potentiellement influencés par cette stratégie d'alimentation. Les paramètres considérés sont reliés à plusieurs domaines de biologie : enzymologie, histométrie, écosystème bactérien cæcal.

Une restriction de l'ingéré de -25% réduit la croissance mais améliore significativement l'efficacité digestive (de 4 à 6% entre 28 et environ 50 jours d'âge) des lapins en engraissement, qui peut s'expliquer par une plus forte digestibilité des fractions protéique (4,5%), énergétique (5,3%) et fibreuses (NDF : 8,9%, ADF : 9,7%, hémicelluloses : 7,9%, cellulose : 11,5%). Cependant, la structure, la diversité et la densité de la communauté bactérienne cæcale sont peu modifiées chez l'animal restreint sain. Des modifications du comportement alimentaire ont été soulignées au cours de ce travail. Ainsi, le rythme d'ingestion, fonction du rythme nyctéméral pour les lapins nourris à volonté, est dépendant du moment de distribution de l'aliment pour les animaux restreints. Après 18 jours de restriction, les lapins ingèrent un tiers de la quantité qui leur est distribuée en 2 heures, et la totalité en moins de 10 heures. Mais aucune agressivité ou compétition n'a été observée entre les animaux restreints.

Plusieurs pistes peuvent expliquer l'efficacité de cette stratégie d'alimentation sur la santé digestive du lapereau. Ainsi, les résultats obtenus au cours de la reproduction d'une colibacillose (*Escherichia coli* O128:C6) suggèrent une stabilisation de l'écosystème iléal par la restriction alimentaire après l'infection. D'autre part, au niveau cæcal l'activité des communautés bactériennes serait modulée, même si pour ce modèle, l'effet d'une ingestion limitée semble faible sur le statut sanitaire. Enfin, l'alternance de périodes de satiété et de périodes de faim stimule la libération sanguine d'hormones (ghréline notamment) qui pourraient moduler la fonction immunitaire.

En perspectives, il serait pertinent d'étudier plus précisément les fonctions liées au statut immunitaire ou endocrinologique. De plus, l'étude plus approfondie de la communauté bactérienne cæcale, en ciblant certaines espèces, pourrait apporter un complément d'informations sur les interactions entre ingestion et symbiote digestif et lors d'une approche comparée de 2 modèles pathogènes : EPEC vs. EEL.

**Mots clés** : physiologie digestive, pathologie digestive, comportement d'ingestion, lapin, nutrition, restriction alimentaire