

# Intérêt de l'utilisation d'acides organiques à chaîne courte en alimentation de lapins en engraissement : effets sur la santé digestive

C. ROMERO<sup>1</sup>, P.G. REBOLLAR<sup>1</sup>, A. DAL BOSCO<sup>2</sup>, C. CASTELLINI<sup>2</sup>, R. CARDINALI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Producción Animal, 28040 Madrid, Espagne

<sup>2</sup>Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Biologia Applicata, 06121 Perugia, Italie

**Résumé.** Ce travail a pour but d'évaluer l'effet d'une supplémentation alimentaire en acides formique et citrique sur les performances zootechniques, la mortalité, la hauteur des villosités jéjunales et le développement du tissu lymphoïde associé au tube digestif chez des lapereaux. Au total, 240 lapereaux ont été utilisés dont 50 ont été abattus pour le prélèvement des échantillons. La supplémentation en acides formique et citrique a augmenté de 9% la vitesse de croissance en fin d'engraissement (56-77j), a accru la longueur des villosités du jéjunum de 28%, a réduit de 18% l'aire des follicules lymphoïdes, et a eu un effet comparable à celui de la bacitracine dans la réduction de la mortalité (0,0 vs. 60%) suite à une infection expérimentale avec *E. coli* et *C. perfringens*.

**Abstract. Interest of the dietary inclusion of short-chain organic acids in the diets of fattening rabbits: effects on digestive health.** This work aimed at testing the effect of a dietary supplementation with formic and citric acids on growth performances, mortality, jejunal histology and development of intestinal lymphoid tissues in fattening rabbits. As a whole, 240 rabbits were used, from which 50 were slaughtered to excise the histological samples. Feeding formic and citric acids increased weight gain by 9% between 56 and 77 d old, and villi height by 28%, reduced the area of lymphoid follicles by 18%, and had a similar effect to that of bacitracin in reducing mortality rate (0.0 vs. 60%) subsequent to an experimental infection with *E. coli* and *C. perfringens*.

## Introduction

Les pathologies digestives post-sevrage constituent toujours la cause principale de morbidité et mortalité dans les élevages de lapins de chair (Rosell, 2003), et sont une contrainte majeure pour la filière cunicole européenne. L'antibiothérapie curative ou préventive a souvent été employée pour contrôler leur incidence et leur impact sur les coûts de production. Cependant, certaines molécules sont toxiques ou présentent des effets secondaires nuisibles à la croissance ou à la santé du lapin (Licois, 1996). En outre, l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance ainsi que le prix (Carabaño *et al.*, 2005) et les restrictions légales des produits autorisés encouragent la recherche d'alternatives dans l'alimentation des lapins en engraissement.

D'abord choisis comme agents de conservation alimentaire pour leur action antifongique, les acides organiques de chaîne courte pourraient potentiellement être utilisés comme une alternative aux antibiotiques de par leurs nombreuses propriétés bienfaitrices pour la santé digestive (Dibner et Buttin, 2002; Falcão-e-Cunha *et al.*, 2007). À ce jour, les acides organiques de chaîne courte sont capables d'inhiber, en conditions in-vitro, la croissance d'*Escherichia coli* et de *Clostridium perfringens* (Cherrington *et al.*, 1990; Skrivanova *et al.*, 2006). Ils pourraient réduire le taux de mortalité (Hollister *et al.*, 1990) et ils stimuleraient la prolifération cellulaire dans les villosités intestinales (Cardinali *et al.*, 2007).

Par ailleurs, des modifications des pratiques d'alimentation contribuent également à améliorer le statut sanitaire des animaux. Ainsi, une restriction alimentaire de 20% pendant les 19 jours suivant le sevrage permet de réduire le taux de mortalité dû à

des troubles digestifs (Gidenne *et al.*, 2003). Combiner l'inclusion alimentaire d'acides organiques avec les stratégies de restriction pourrait conduire à des effets synergiques favorables à la santé du lapin.

Ce travail présente les résultats de deux études menées pour évaluer l'effet d'une supplémentation alimentaire en acides formique et citrique sur les performances zootechniques, le taux de mortalité, la hauteur des villosités jéjunales et le développement des follicules du tissu lymphoïde associé au tube digestif chez des lapereaux en engraissement rationnés.

## 1. Matériel et méthodes

Deux expériences (Exp. 1 et Exp. 2) ont été menées respectivement à l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche et à l'Università di Perugia, en accord avec les Principes Internationaux pour la Recherche Biomédicale et les Animaux.

### 1.1. Aliments

Tous les aliments témoins distribués dans ce travail, ainsi que l'eau de boisson, étaient exempts d'antibiotiques et anticoccidiens.

*Expérience 1:* Un aliment témoin (T) a été conçu pour satisfaire les besoins nutritionnels de lapereaux en croissance (28-56 jours; 11,0 MJ ED/kg MS, 18,8% MS protéines brutes, 15,6% MS amidon, 35,6% MS NDF et 1,0% MS lysine). L'addition de 150 ppm de bacitracine de zinc et 120 ppm de colistine à l'aliment témoin a été à l'origine du régime B. Enfin, la supplémentation de l'aliment témoin avec un mélange d'acides formique et citrique microencapsulés (0,4%) et 120 ppm de colistine a donné lieu à l'aliment A.

*Expérience 2:* Deux aliments témoins (T1 & T2) ont été formulés et distribués selon l'âge des lapins: pour T1 de 28 à 55 jours (11,1 MJ ED/kg MS, 18,9% MS protéines brutes, 15,7% MS amidon, 35,9% MS NDF et 1,0% MS lysine) et pour T2 de 56 à 77 jours (11,8 MJ ED/kg MS, 19,1% MS protéines brutes, 17,9% MS amidon, 34,7% MS NDF et 1,0% MS lysine). Deux aliments A1 & A2 ont résulté de l'addition du mélange d'acides formique et citrique aux régimes T1 & T2, à raison de 0,4% dans l'aliment T1, et 0,2% dans l'aliment T2.

### 1.2. Animaux et procédure expérimentale

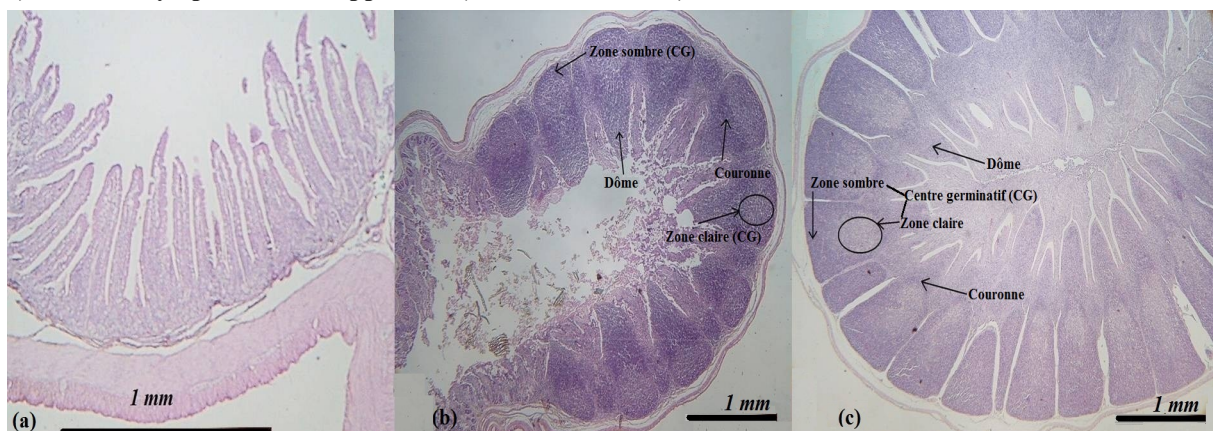
Au total pour chacune des 2 études, 120 lapereaux Néozélandais x Californien ont été sevrés à 28 jours et logés individuellement jusqu'à la fin de l'étude (56 et 77 jours pour l'Exp. 1 et 2, resp.). Sur la base des données d'ingestion volontaire habituellement enregistrées aux stations expérimentales où furent menées ces deux études, une quantité d'aliment correspondant approximativement au 80% de l'*ad libitum* fut quotidiennement distribuée à chaque lapin, du sevrage jusqu'aux 56j d'âge. Dans l'Exp. 1, les 120 lapereaux ont été répartis en trois groupes uniformes (40 lapereaux par groupe) auxquels ont été assignés respectivement les trois régimes

expérimentaux (T, B ou A). Après une semaine d'adaptation (35j d'âge), cinq lapins par régime ont été sacrifiés, et tous les lapins restants ont été inoculés oralement avec une dose de  $10^9$  UFC d'*Escherichia coli* O103 et *Clostridium perfringens* type A. À 56 jours, cinq autres lapins ont été sacrifiés. Sur chaque lapin sacrifié, un échantillon de 6 cm sur la partie centrale du jéjunum, ainsi que la plaque de Peyer caudale de l'iléon et l'appendice, sont prélevés.

Dans l'Exp. 2, les 120 lapereaux ont été répartis uniformément en deux groupes (60 par groupe) et chaque groupe a reçu un des deux régimes (T1 puis T2, ou A1 puis A2). Les lapins ont été engraisés jusqu'à l'âge de 77 jours. À 56 et 77 jours d'âge, cinq lapins par groupe ont été sacrifiés pour effectuer les mêmes prélèvements que ceux de l'Exp. 1.

Tous les échantillons de tissus ont été placés et fixés dans une solution neutre (pH 7.2) de formaldéhyde 10%, puis déshydratés avec des solutions à concentration croissante d'éthanol, enchâssés en paraffine, coupés au microtome (6  $\mu$ m) et teints à l'hématoxyline/éosine. Des images numériques (Figure 1a, b et c) des coupes ont été prises et observées avec un microscope optique à grossissement 40x.

**Figure 1. a) Villosités jéjunales. b) Follicules lymphoïdes de la plaque de Peyer caudale de l'iléon. c) Follicules lymphoïdes de l'appendice (observations à 40x).**



### 1.3. Paramètres contrôlés

Dans les Exp. 1 et 2, des contrôles hebdomadaires des performances de croissance et consommation ont été réalisés. La mortalité est contrôlée quotidiennement. De même, sur les sections observées au microscope, la hauteur de 30 villosités jéjunales, l'aire des tissus lymphoïdes et le nombre de follicules de l'appendice ont été mesurés.

### 1.4. Analyses chimiques

Celles-ci (MS, cendres, N Dumas, amidon enzymatique, ADF et ADL) furent réalisées sur les aliments, conformément aux procédures de l'Association of Official Analytical Chemists (2000). La teneur de NDF fut déterminée selon la méthode de Mertens (2002).

### 1.5. Analyses statistiques

Les données des performances ont été analysées suivant un plan complètement randomisé avec le régime alimentaire comme effet principal et en utilisant la procédure GLM de SAS. La même analyse a été conduite pour les déterminations histologiques en incluant l'effet de l'âge et son interaction avec l'aliment. Les résultats de mortalité ont été analysés en employant des modèles linéaires généralisés, avec la procédure GENMOD de SAS et en assumant une distribution binomiale. La fonction de lien a été la transformation logit,  $\ln [\mu/(1-\mu)]$ , où  $\mu$  était la valeur moyenne du taux de mortalité. L'aliment a été considéré comme variable explicative. Toutes les moyennes ont été comparées à l'aide d'un test F

protégé de Fisher, et les différences ont été considérées significatives pour  $P < 0,05$ .

## 2. Résultats

Dans l'Exp. 1, l'effet du régime n'a été significatif sur aucune des performances étudiées (valeurs moyennes de 3,46 et 1218 g pour l'IC 28-56j et le poids vif à 56j, resp.). Par contre, le taux de mortalité a atteint 60,0% pour les lapins du régime témoin (aucune perte avant inoculation et taux de mortalité de 37,1, 11,4 et 11,4% pour les périodes 35-42j, 42-49j et 49-56j, resp.), alors qu'aucun des lapins alimentés avec les

régimes B ou A est mort malgré l'infection expérimentale (Tableau 1). L'IC économique, qui incorpore l'aliment consommé par les lapins qui sont morts avant la fin de l'expérience, en est un reflet (4,94, 3,46 et 3,58 pour les régimes T, B et A, resp.).

Dans l'Exp. 2 et sur la période 56-77 j, l'inclusion alimentaire des acides a amélioré, par rapport au régime T, le GMQ (43,9 vs. 48,0 g,  $P=0,019$ ) qui, sur l'ensemble de l'expérience (28-77 j), serait ( $P=0,065$ ) plus élevé de 5%. Aucune différence significative n'a été décelée pour la mortalité entre les deux régimes expérimentaux (11,8% en moyenne).

**Tableau 1. Résultats de mortalité après inoculation expérimentale à 35j (Exp. 1) ou non (Exp. 2)**

Exp. 1	Régime <sup>1</sup>			Probabilité
	T	B	A	
28-35j*	0,0 (0/35)	0,0 (0/35)	0,0 (0/35)	1,00
35-56j	60,0 (21/35)	0,0 (0/35)	0,0 (0/35)	<0,001
28-56j	60,0 (21/35)	0,0 (0/35)	0,0 (0/35)	<0,001
Exp. 2	T		A	Probabilité
28-56j*	3,6 (2/55)		9,1 (5/55)	
56-77j	5,4 (3/55)		5,4 (3/55)	1,00
28-77j	9,1 (5/55)		14,5 (8/55)	0,37

\*Exp. 1: le nombre initial de lapins était de 40 mais il était déjà prévu d'en sacrifier 5 aux 35j. Exp. 2: le nombre initial de lapins était de 60 dont 5 ont été sacrifiés aux 56j.

**Tableau 2. Effet de la supplémentation en bacitracine et colistine ou en acides formique et citrique et colistine sur l'histologie jéjunale et le développement des tissus lymphoïdes intestinaux de lapereaux expérimentalement inoculés à 35 jours avec  $10^9$  UFC d'*Escherichia coli* et *Clostridium perfringens*. (Exp. 1)**

Régime <sup>1</sup> (R)	T		B		A		ETM n=5	Probabilités		
	35	56	35	56	35	56		R	Âge	RxÂge
Âge, j										
Hauteur villosités jéjunales, $\mu\text{m}$	599 <sup>c</sup>	595 <sup>c</sup>	575 <sup>c</sup>	683 <sup>b</sup>	589 <sup>c</sup>	790 <sup>a</sup>	16,9	<0,001	<0,001	<0,001
Plaque de Peyer iléale caudale										
Aire folliculaire, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	62	96	54	85	54	65	7,5	0,011	<0,001	0,10
Aire plaque, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	790	1464	544	2167	650	1852	335	0,92	0,024	0,72
Appendice										
Aire folliculaire, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	50	111	58	125	63	112	11,2	0,18	<0,001	0,17
Nombre de follicules	37,2	38,4	37,6	35,4	36,0	38,4	1,33	0,62	0,67	0,22

**Tableau 3. Effet de la supplémentation en acides formique et citrique sur l'histologie jéjunale et le développement des tissus lymphoïdes intestinaux de lapereaux, en absence d'antibiotiques et anticoccidiens. (Exp. 2)**

Régime <sup>1</sup> (R)	T		A		ETM n=5	Probabilités		
	56	77	56	77		R	Âge	R x Âge
Âge, j								
Hauteur villosités jéjunales, $\mu\text{m}$	662 <sup>b</sup>	806 <sup>a</sup>	817 <sup>a</sup>	798 <sup>a</sup>	28	<0,001	<0,001	<0,001
Plaque de Peyer iléale caudale								
Aire folliculaire, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	96	122	81	114	11	0,049	<0,001	0,57
Aire plaque, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	1468	1620	1798	1376	322	0,90	0,71	0,43
Appendice								
Aire folliculaire, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	112 <sup>c</sup>	219 <sup>a</sup>	118 <sup>c</sup>	178 <sup>b</sup>	17,5	0,002	<0,001	<0,001
Nombre de follicules	39,8	38,0	38,8	40,8	1,44	0,54	0,94	0,21

<sup>1</sup>Pour l'Exp. 1, T: aliment témoin. B: aliment témoin avec 150 ppm de bacitracine et 120 ppm de colistine. A: aliment témoin avec un mélange d'acides formique et citrique (0,4%) et 120 ppm de colistine. Pour l'Exp. 2, T: aliment témoin. A: aliment témoin avec un mélange d'acides formique et citrique (0,4% 28-55j et 0,2% 56-77j).

L'interaction entre le régime alimentaire et l'âge a été notée ( $P < 0,001$ ) pour la hauteur de villosités du jéjunum dans les deux expériences conduites (Tableaux 2 et 3). Ainsi, dans l'Exp. 1, aucune différence significative n'a été retrouvée avant l'inoculation (588  $\mu\text{m}$  en moyenne) alors que, 21

jours plus tard, les villosités des lapins ayant reçu l'aliment A étaient les plus longues (790  $\mu\text{m}$ ), suivies de celles de animaux alimentés avec le régime B (683  $\mu\text{m}$ ) et finalement les villosités du groupe témoin dont la hauteur (595  $\mu\text{m}$ ) ne s'était pas significativement accrue par rapport à celle mesurée à 35 jours (599

µm). Dans l'Exp. 2, dans des conditions terrain, les lapins recevant l'aliment supplémenté en acides formique et citrique ont présenté à 56 jours des villosités dont la hauteur (817 µm) était comparable à celle retrouvée à 77 jours pour les lapins des deux régimes (802 µm). Par contre, les villosités des lapins témoin étaient, à 56 jours, un 18% plus courtes qu'à 77 jours (662 vs. 806 µm,  $P < 0,001$ ).

Dans les deux expériences (Tableaux 2 et 3), l'aire des follicules de la plaque de Peyer a été affectée par le régime alimentaire (Exp. 1: 79,0 vs. 69,7 vs. 59,4 x  $10^3 \mu\text{m}^2$ ,  $P=0,011$  pour les lapins recevant l'aliment T, B et A, resp., et Exp. 2: 109 vs. 97,5 x  $10^3 \mu\text{m}^2$ ,  $P=0,049$  pour les régimes T et A) et l'âge (Exp. 1: 81,9 vs. 56,8 x  $10^3 \mu\text{m}^2$ ,  $P < 0,001$  à 56 et 35 jours, resp., et Exp. 2: 118 vs. 88,4 x  $10^3 \mu\text{m}^2$ ,  $P < 0,001$  à 77 et 56 jours). Par contre, seul l'effet de l'âge est significatif pour l'aire totale des plaques de Peyer et seulement pour l'Exp. 1 (1828 vs. 661 x  $10^3 \mu\text{m}^2$ ,  $P=0,024$ , à 56 et 35 jours, resp.). De même, l'aire folliculaire de l'appendice double entre 35 et 56 jours ( $P < 0,001$ ). Dans l'Exp. 2, l'aire des follicules de l'appendice a aussi augmenté entre 56 et 77 jours, mais moitié moins avec le régime A comparé au témoin ( $P < 0,001$ ). Enfin, le nombre de follicules lymphoïdes de l'appendice n'a été affecté par aucune des variables explicatives (37,2 et 39,3, en moyenne, pour les Exp. 1 et 2, resp.).

### 3. Discussion

L'effet de la supplémentation alimentaire en acides formique et citrique sur la vitesse de croissance n'est significatif qu'en fin d'engraissement (56-77j, Exp. 2). Même si des augmentations du gain de poids ont été rapportées chez des porcs (Partanen, 2001) avec la supplémentation en acides organiques, Dibner et Buttin (2002) ont signalé que les effets des acides organiques sur les performances manquent généralement de reproductibilité. Par contre, des réductions du taux de mortalité, lorsque celui-ci était élevé pour les lapins témoins, ont été parfois observées (Hollister *et al.*, 1990). Dans l'Exp. 2, la faible mortalité observée, peut-être en raison de la stratégie de restriction (Gidenne *et al.*, 2003), n'est pas réduite par la supplémentation en acides organiques.

Dans les deux expériences, les villosités du jéjunum des lapins nourris les régimes A ont été plus longues. Ce résultat avait déjà été observé chez le lapin (Cardinali *et al.*, 2007) et dans d'autres espèces (Dibner et Buttin, 2002). Des villosités plus longues peuvent être avantageuses au lapin du fait d'un agrandissement de la surface d'absorption (Sakata, 1987). Par ailleurs, l'acide formique et l'acide citrique auraient des activités bactéricides face à des bactéries responsables de lésions sur la muqueuse jéjunale (Cherrington *et al.*, 1990; Skrivanova *et al.*, 2006). Ce sont précisément les propriétés antimicrobiennes des acides organiques qui pourraient expliquer le contrôle de l'hypertrophie des tissus lymphoïdes, après infection avec un pathogène. Ainsi, la plaque de Peyer et l'appendice, en tant qu'agrégats de tissu lymphoïde

du système immunitaire digestif, réagissent aux antigènes atteignant la surface des muqueuses digestives (Dasso et Howell, 1997).

### Conclusion

Les résultats de ce travail montrent qu'une supplémentation alimentaire en acides formique et citrique exerce une action trophique sur les villosités de la muqueuse jéjunale et contrôle l'hypertrophie du tissu lymphoïde intestinal chez des lapereaux en engraissement. En plus, ces acides organiques ont eu un effet comparable à celui de la bacitracine dans la réduction du taux de mortalité, suite à une infection expérimentale avec des bactéries pathogènes.

### Références

- Association of Official Analytical Chemists, 2000. Official methods of analysis. 17<sup>th</sup> Edition. Arlington, VA.
- Carabaño R., Rebollar P.G., Gómez-Conde M.S., Chamorro S., García J., de Blas C. 2005. Nuevas tendencias en la alimentación de conejos: influencia de la nutrición sobre la salud intestinal. *Curso FEDNA*, Espagne, pp. 113-129.
- Cardinali R., Rebollar P.G., Dal Bosco A., Cagiola M., Crotti S., Scicutella N., Rutili D., Castellini C. 2007. Integrazione alimentare di acidi organici ed oli essenziali microincapsulati nel controllo delle infezioni enteriche del coniglio. *Giornate di Conigliicoltura ASIC*, Italie, p. 137.
- Cherrington C.A., Hinton M., Chopra I. 1990. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 69-74.
- Dasso J., Howell M.D. 1997. Neonatal appendectomy impairs mucosal immunity in rabbits. *Cell. Immunol.* 182, 29-37.
- Dibner J.J., Buttin P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J. Appl. Poult. Res.* 11, 453-463.
- Falcão-e-Cunha L., Castro-Solla L., Maertens L., Marounek M., Pinheiro V., Freire L., Mourão J.L. 2007. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Sci.* 15, 127-140.
- 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. *10<sup>èmes</sup> JRC, France*, pp. 29-32.
- Hollister A., Cheeke P.R., Robinson K.L., Patton N.M. 1990. Effects of dietary probiotics and acidifiers on performance of weanling rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.* 13, 6-9.
- Licois D. 1996. Risques associés à l'utilisation des antibiotiques chez le lapin. *World Rabbit Sci.* 4, 63-68.
- Mertens D.R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. Assoc. Off. Chem. Int.* 85, 1217-1240.
- Partanen K. 2001. Organic acids: their efficacy and modes of action in pigs. *Gut Environment of Pigs. Nottingham University Press, Nottingham, RU.*
- Rosell J.M. 2003. Technical note: Health status of commercial rabbitries in the Iberian peninsula. A practitioners study. *World Rabbit Sci.* 11, 157-169.
- Sakata T. 1987. Effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Brit. J. Nutr.* 58, 95-103.
- Skrivanova E., Marounek M., Benda V., Brezina P. 2006. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinari Medicina* 51, 81-88.