

EFFET D'UN BIOTIQUE DE PRECISION SUR LES PERFORMANCES, LE MICROBIOME ET LA DURABILITE DE L'ELEVAGE DE POULES PONDEUSES

Umar Faruk Murtala¹, Segobola Phokela¹, Amaya Elkin¹, Blokker Britt¹, Jeay Lionel², Segura-Wang Maia¹, Gracia Marta Isabel³,

¹ DSM NUTRITIONAL PRODUCTS - Wurmisweg 576 - 4303 KAISERAUGST,

² DSM NUTRITIONAL PRODUCTS - 1 Bd d'Alsace - 68128 VILLAGE-NEUF,

³ IMASDE AGROALIMENTARIA, S.L. - C. Nápoles, 3 - 28224 POZUELO DE ALARCON

lionel.jeay@dsm-firmenich.com

RÉSUMÉ

L'efficacité d'un biotique de précision (BP) sur les performances zootechniques, le métabolisme du microbiome chez les poules pondeuses, ainsi que l'impact environnemental de leur élevage ont été évaluées. Des poules Isa Brown (210) ont été réparties en deux traitements (21 cages de 5 poules par traitement) dans un environnement contrôlé. Un aliment témoin a été comparé à un aliment supplémenté en BP à 900 g/t. Les aliments et l'eau ont été distribués *ad libitum* de 22 à 42 semaines d'âge. Tous les 28 jours, les performances zootechniques ont été relevées. À la fin de l'étude, les contenus des caeca et de l'iléon ont été prélevés pour un séquençage métagénomique afin d'analyser le microbiome. Les changements dans les profils fonctionnels ont été évalués à l'aide d'une analyse discriminante de Fisher et l'importance des différentes voies métaboliques a été évaluée à l'aide d'arbres de décision. L'empreinte environnementale a été évaluée à l'aide du calculateur Sustell™. Les données de performances ont été soumises à un test t de Student. Le BP a amélioré significativement le taux de ponte (95 % vs 90,9 %), la masse d'œuf (58,5 g vs 55 g) et l'indice de consommation (2,15 vs 2,27) par rapport au témoin. La taille des œufs a été également plus élevée avec le BP, entraînant une augmentation d'œufs XL (3,7 % contre 0,2 %). Dans les caeca, le BP a modulé les voies métaboliques bactériennes impliquées dans la fermentation des acides aminés et le métabolisme du carbone, en particulier la lysine, l'arginine, la biotine et le pyruvate. Dans l'iléon, le BP a modulé de manière significative les profils fonctionnels associés à la dégradation des acides gras et à plusieurs voies du métabolisme des acides aminés. Le BP a permis une réduction moyenne de 2 % dans les différentes catégories d'impact sur l'environnement. La supplémentation en BP à 900 g/t a amélioré les paramètres de production chez les poules pondeuses, induit un changement bénéfique dans le métabolisme bactérien dans les caeca et l'iléon et constitue donc une opportunité d'augmenter la productivité et la durabilité de l'industrie de la production d'œufs.

ABSTRACT

Effect of precision biotics on performance, microbiome and sustainability in laying hens.

The efficacy of a precision biotic (PB) on zootechnical performance, microbiome metabolism and environmental impact in laying hens was evaluated. 210 Isa Brown were allocated into two treatments (each with 21 cages of 5 hens) in a controlled environment. Control diet was compared to a diet supplemented with PB at 900 g/t. Feed and water were distributed *ad-libitum* from 22 to 42 weeks of age. Zootechnical performance were recorded every 28 days. At the end of the study, the contents of the caecum and ileum content were collected for metagenomic sequencing to analyze the microbiome. Shifts in functional profiles were assessed using Fisher's discriminant analysis and pathway importance was assessed using forest classifier. Environmental footprint was assessed by using Sustell™. Performance data was subjected to a student t-test. PB significantly increased laying rate (95% vs 90.9%), egg mass (58.5 g vs 55 g) and feed conversion ratio (2.15 vs 2.27) compared to control. Egg size was also higher with PB, leading to an increase in XL eggs (3.7% vs 0.2%). In the cecum, PB modulated the pathways involved in amino acid fermentation and carbon metabolism, in particular lysine, arginine, biotin and pyruvate. In the ileum, PB significantly modulated functional profiles associated with fatty acid degradation and several amino acid metabolism pathways. An average reduction of 2% in the different categories of environmental impact for PB was observed. PB supplementation at 900 g/t improves production parameters in laying hens, induces a beneficial change in microbial metabolism in the cecum and ileum and represents an opportunity to increase productivity and sustainability in the egg production industry.

INTRODUCTION

Les efforts mondiaux visant à réduire l'utilisation des antibiotiques se sont intensifiés au cours de la dernière décennie. Des avancées significatives en biologie moléculaire et en bio-informatique ont permis une percée dans la compréhension scientifique du microbiome intestinal et de ses fonctions métaboliques (Glendinning et al., 2020 ; Sergeant et al., 2014). Les biotiques de précision (BP) constituent une catégorie d'ingrédients différente de celle des prébiotiques. Les prébiotiques sont des fibres insolubles, sans aucune valeur nutritive, et qui favorisent la croissance des bactéries, augmentant l'absorption des nutriments et modulant la réponse immunitaire. Les BP sont des glycanes synthétisés chimiquement avec des liaisons glycosidiques uniques qui interagissent avec les bactéries intestinales pour moduler des fonctions spécifiques du microbiome, telles que la production d'acide gras à chaîne courte et le métabolisme protéique (Geremia et al., 2016). L'action principale d'un BP passe par la modulation de l'abondance des voies métaboliques plutôt que par la modulation des taxons bactériens, c'est-à-dire des profils microbiens intestinaux (Walsh et al., 2021). Il a été démontré de manière concluante, chez l'homme et d'autres hôtes, que la variabilité des fonctions métaboliques du microbiome d'un individu à l'autre est bien moindre que celle de la composition taxonomique sous-jacente (The Human Microbiome Project Consortium, 2012). En d'autres termes, les voies agrégées des fonctions métaboliques essentielles du microbiome sont souvent fortement conservées d'un individu à l'autre, même lorsque l'abondance relative des différentes espèces microbiennes varie de façon significative (Jiang et al., 2016). Il a été constaté qu'un BP modulait l'abondance des gènes présents dans la communauté microbienne associée à la production de propionate, au métabolisme des acides aminés, à l'efficacité énergétique (Byrne et al., 2015 ; Rios-Covian et al., 2016) et réduit la production d'ammoniac intestinal, avec une amélioration observée des performances de croissance (Walsh et al., 2021). Les émissions d'ammoniac provenant des productions animales font l'objet d'un examen minutieux en raison de leur impact négatif sur la qualité de l'air, l'eutrophisation et l'acidification (terrestre, marine, eau douce), affectant la santé humaine et la santé de nombreux écosystèmes (Jiang et al., 2021).

L'objectif de la présente étude a été d'évaluer l'effet de la supplémentation en BP de poules pondeuses sur les performances zootechniques, le métabolisme bactérien et l'empreinte environnementale.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Aliments

Les poules pondeuses ont reçu un régime de base pendant 4 semaines de 18 à 21 semaines d'âge. Ce régime correspondait à l'aliment témoin de l'étude. Il répondait ou dépassait les exigences nutritionnelles recommandées par le NRC (1994). La composition des aliments était conforme à la FEDNA (2010). Les aliments sous forme de farine et l'eau ont été distribués *ad libitum*. Les régimes ont été calculés pour être isonutritifs : 2767 kcal/kg (AMEn), 17% de protéines brutes, 0,8% et 0,45% de lysine et de méthionine digestibles respectivement. Le calcium était de 3,8 % et le phosphore disponible de 0,38 %. Les régimes ont été préparés sans inclusion d'enzymes (à l'exception de phytase), d'acides organiques, de probiotiques ou de coccidiostats. Afin d'éviter toute contamination croisée, l'aliment témoin a été fabriqué en premier. Le deuxième régime a été supplémenté avec 0,9 kg/T de BP (Symphione™, DSM Nutritional Products). Ce BP est constitué de glycanes synthétisés chimiquement avec des liaisons glycosidiques uniques (Geremia et al., 2020).

1.2. Conditions d'élevage

Avant le début de l'étude, les poules ont été examinées pour détecter tout signe de maladie ou de blessure. Toute poule ne respectant pas un de ces critères a été retirée de l'étude. Au total, 210 poules pondeuses Isa Brown ont reçu un des 2 aliments de 22 à 42 semaines d'âge. Chaque traitement a été étudié avec 21 cages où logeaient 5 poules pondeuses (0.153 m²/poule). L'espace total a été divisé en 7 blocs pour tenir compte des variations environnementales. Toutes les cages étaient équipées de raccourcisseurs de griffes en tôle perforée, de perchoirs, d'une aire de picotage et d'un nichoir. Le bâtiment était équipé de lumières artificielles programmables, d'un chauffage électrique automatisé et d'une ventilation forcée. L'étude a été menée conformément aux recommandations de l'EFSA et au règlement (CE) n° 429/2008 de la Commission du 25 avril 2008, et approuvée par le comité d'éthique de la structure accueillant l'étude.

1.3. Performances zootechniques

La production d'œuf a été enregistrée quotidiennement. Le taux de ponte (%), la consommation d'aliments (g/jour), la masse d'œufs et l'efficacité alimentaire (g d'aliments/g d'œufs) ont été calculées. À 4, 8, 12, 16 et 20 semaines d'essai, tous les œufs pondus au cours d'une période de 24 heures ont été collectés, pesés individuellement et classés commercialement (S, M, L, XL), où S < 52,5 g ; 52,5 g ≤ M < 62,5 g ; 62,5 g ≤ L < 72,5 g ; XL > 72,5 g.

1.4. Collecte d'échantillon

À 42 semaines d'âge, 1 poule par répétition a été sélectionnée aléatoirement, soit 21 poules par traitement. Le contenu caecal de chaque poule, prélevé de manière aseptique, a été placé immédiatement dans de la carboglace. Les

échantillons ont ensuite été congelés à -80 °C jusqu'au traitement ultérieur (isolement et séquençage de l'ADN).

1.5. Analyse du microbiome - Extraction de l'ADN, Séquençage et cartographie fonctionnelle

L'ADN microbien de l'échantillon de contenu cæcal a été extrait à l'aide du kit MagPure Stool DNA KF Kit B (Magen, Guangzhou, Chine). L'ADN a été quantifié par fluorimétrie (kit Qubit dsDNA BR Assay (Invitrogen, Shanghai, Chine)). Après extraction, l'ADN a ensuite été fragmenté de manière aléatoire, puis purifié. Les fragments de taille moyenne entre 200 et 400 pb ont été sélectionnés (kit Agencourt AMPure XP Medium), puis réparés à l'aide du End-Repair Mix et purifiés par la suite. L'ADN réparé a été combiné avec le A-Tailing Mix, puis les adaptateurs Illumina ont été ligaturés à l'ADN Adénylate 30 Ends, avant purification. Les produits ont été sélectionnés en fonction de la taille de l'insert. Plusieurs cycles d'amplification PCR ont été effectués. Après purification, la librairie a été qualifiée par le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent, Shanghai, Chine) et le système de PCR en temps réel ABI StepOnePlus. Enfin, les librairies qualifiées ont été séquencées sur la plateforme Illumina HiSeq (BGI, Wuhan, Chine). Le contrôle de qualité des séquences et la cartographie fonctionnelle ont été réalisés selon Bortoluzzi (2023).

1.6. Profil métagénomique fonctionnel

Un arbre de décision aléatoire a été construit avec l'objectif de discriminer les poules des 2 traitements en fonction de l'expression des voies métaboliques. Cet arbre de décision aléatoire a été construit sous R (R version 4.1.2) en utilisant le paquet "randomForest" (R version 4.7-1.1). Les principales réactions métaboliques microbiennes et les voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ont été identifiées en triant les numéros EC par "diminution moyenne de la précision" à l'aide d'un arbre de décision. KEGG est une base de données de référence pour l'analyse systématique des fonctions des gènes (Kanehisa et al., 2000). La nomenclature EC (EC est le sigle de la Commission des enzymes) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. Les gènes ont été annotés par ce numéro EC. Les données sur le nombre de gènes annotés par réaction ont été additionnées et regroupées puis normalisées en interne pour chaque échantillon KEGG Pathway. Tous ces éléments ont permis de faire le lien entre le gène codant pour une enzyme spécifique et l'implication de cette enzyme dans les voies métaboliques répertoriés dans KEGG. Le regroupement métagénomique fonctionnel a été effectué par analyse discriminante locale de Fisher (LFDA), et une représentation graphique de la similarité métagénomique a été obtenue en traçant chaque microbiome sur un plan bidimensionnel.

1.7. Statistiques pour les performances de croissance

Les calculs de puissance ont été effectués en supposant un test bilatéral avec une erreur de type I de 5 % ($\alpha=0,05$) et une erreur de type II de 20 % (puissance $1-\beta=0,8$) et ont estimé que 21 cages par traitement étaient suffisantes pour détecter des différences entre les groupes entre 22 et 42 semaines d'âge. La significativité statistique a été déclarée à $P\leq 0,05$, $0,05 < P \leq 0,10$ étant considéré comme une tendance. Aucune donnée n'a été manquante. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel SPSS (v. 27.0). Les paramètres de production ont été analysés à l'aide d'un modèle linéaire général (GLM). Les moyennes ont été séparées par le test de comparaison post-hoc de Tukey.

1.8. Empreinte environnementale de l'élevage

Les calculs d'analyse de cycle de vie (ACV) ont été réalisés grâce à l'outil SustellTM codéveloppé par Blonk Sustainability et Dsm-Firmenich. Les calculs sont effectués en suivant la méthode d'évaluation d'impact « Environmental footprint » (EF) 2.0, développée par la commission européenne (Fazio et al., 2018). Cet outil est certifié ISO 14040/44.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les effets de la supplémentation en biotique de précision sur les performances des poules pondeuses sont présentés dans le Tableau 1. Le BP supplémenté à 900 g/t a réduit la mortalité de 0,9% à 0%. Le BP a augmenté le gain de poids corporel à la fin de l'essai ($p=0,027$, 57g). Pendant la période évaluée (22-42 semaines d'âge), la supplémentation en BP à 900 g/t a significativement amélioré le taux de ponte ($p=0,004$, +4,1%), la masse d'œufs ($p<0,001$, +3,4g/jour) et l'indice de consommation ($p<0,01$, -0,12 point) par rapport au témoin. Les œufs XL ont également augmenté de 0,2 % à 3,7 % ($p=0,023$), par rapport au régime témoin. Les changements fonctionnels dans le microbiome cæcal et de l'iléon des poules pondeuses sont représentés dans les Figures 1 et 2. L'analyse discriminante locale de Fisher (LFDA) des profils fonctionnels (Figure 1) a montré une différence significative dans le profil de métabolisme du microbiome cæcal entre les poules pondeuses témoins et les poules pondeuses supplémentées en BP. En effet, les aires de la représentation graphique de la similarité métagénomique obtenue en traçant chaque microbiome sur un plan bidimensionnel ont été clairement distinctes. En ce qui concerne l'abondance des voies modulées par le BP dans les caeca (Figure 2), il a été observé que de nombreuses voies ont été enrichies en raison cette supplémentation. Le BP a modulé les voies impliquées dans la fermentation des acides aminés et le métabolisme du carbone, en particulier le pyruvate, la lysine, l'arginine et la biotine (Figure 2). La voie du pyruvate est la plus influencée par le BP dans les caeca, or il joue un rôle

central dans les voies clés du métabolisme énergétique (Louis et al, 2017). Les numéros des enzymes représentent l'enzyme la plus responsable du changement dans cette voie spécifique. Pour illustrer, l'enzyme avec le numéro EC 1.2.1.22 est une lactaldehyde dehydrogenase impliquée dans le métabolisme du pyruvate (Figure 2). Dans l'iléon, le BP a modulé de manière significative les profils fonctionnels associés à la dégradation des acides gras et à plusieurs voies du métabolisme des acides aminés (données non présentées). Les calculs d'analyse de cycle de vie (ACV), réalisés grâce à l'outil Sustell™, ont permis d'estimer les effets d'une supplémentation en biotique de précision à 900g/T sur l'évolution des critères d'empreinte environnemental. L'acidification (terrestre et d'eau douce) a été réduite de 1,86%. Les eutrophisations terrestres, marines et d'eau douce ont été réduites respectivement de 1,86 %, 1,84 % et 1,8 %. Le critère changement climatique (utilisation et transformation des terres) a été réduit de 1,8 %. En

prenant en compte les différentes catégories d'impact sur l'environnement, le biotique de précision a permis une réduction 2% de Kg CO₂ eq produit.

CONCLUSION

Dans les conditions de l'essai, la supplémentation en biotique de précision de l'alimentation de poules pondeuses à 900 g/t a amélioré significativement les performances en augmentant le taux de ponte, la masse d'œufs et le pourcentage d'œufs XL, et en réduisant l'indice de consommation. Le biotique de précision a induit un changement bénéfique du métabolisme microbien dans les caeca et l'iléon et représente donc une opportunité d'augmenter la productivité et la durabilité dans l'industrie de la production d'œufs. D'autres travaux sont en cours afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions de cette solution et d'en améliorer les effets.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bortoluzzi C., Tamburini I., Geremia J., 2023. Poult. Sci., (39), 1331–1338.
- Fazio S., Biganzoli F., De Laurentiis V., Zampori L., Sala S., Diaconu E., 2018. European Commission.
- FEDNA., 2010. ETSIA (Madrid Polytechnic University), Spain.
- Geremia J.M., Murphy A.V., Han S., Seigal B.A., Landry A., Sherry K., Panos S., Churchman D., O'connor A., 2016. WO 2016007778A1
- Glendinning L., Stewart R.D., Pallen M.J., Watson K.A., Watson M., 2020. Genome Biol., 21, 34.
- Jiang J., Stevenson D.S., Uwizye A., Tempio G., Sutton M.A., 2021. Biogeosciences., (18), 135–158.
- Jiang Y., Xiong X., Danska J., Parkinson J., 2016. Microbiome., (4), 2.
- Kanehisa M., Goto S., 2000. KEGG and genomes. Nucleic Acids Res. 28:27–30.
- Louis P., Flint H.J., 2017. Environ Microbiol., (19), 29–41.
- National Research Council., 1994. 9th Rev. Ed. National Academy Press., Washington DC. USA.
- Rios-Covian D., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilan C.G., Salazar N., 2016. Front. Microbiol., (7), 185.
- Sergeant M.J., Constantinidou C., Cogan T.A., Bedford M.R., Penn C.W., Pallen M.J., 2014. PLoS ONE., 9(4): e91941
- The Human Microbiome Project Consortium., 2012. Nature., (486), 207–214.
- Walsh M.C., Jacquier V., Schyns G., Claypool J., Tamburini I., Blokker B., Geremia J.M., 2021. Poult. Sci., (3), 100.

Tableau 1. Effet de la supplémentation en biotique de précision sur les performances zootechniques de poules pondeuses âgées de 22 à 42 semaines (140 jours) : n = 21 répétitions par traitement, de 22 à 42 semaines

Traitement	Témoin	BP	Ecart-type	p-value
Poids vif initial (g)	1,691	1,689	15,6	0,9252
Poids vif final (g)	1,825 b	1,879 a	18,8	0,0485
Gain de poids (g)	133 b	190 a	17,3	0,027
Taux de ponte (%)	90,9 b	95,0 a	0,94	0,0038
Poids d'œufs (g)	60,6	61,5	0,4	0,1095
Masse d'œufs (g/poule/j)	55,0 b	58,4 a	0,62	0,0004
Ingéré (g/j)	124,5	125,6	1,49	0,6123
IC (g/g)	2,27 b	2,15 a	0,027	0,0047
Mortalité (%)	0,9	0	0,68	0,3475
Œufs S (%)	1,5	1,7	0,72	0,8452
Œufs M (%)	69	61,3	3,99	0,1839
Œufs L (%)	29,3	33,2	4,03	0,4948
Œufs XL (%)	0,2 b	3,7 a	1,04	0,0225

a-b Différence significative entre les traitements ($p < 0.05$)

Figure 1. Analyse discriminante locale de Fisher (LFDA) des profils fonctionnels démontrant des groupes distincts dans le cæcum (à gauche) et l'iléon (à droite) en fonction de l'aliment distribué : n = 21 par traitement

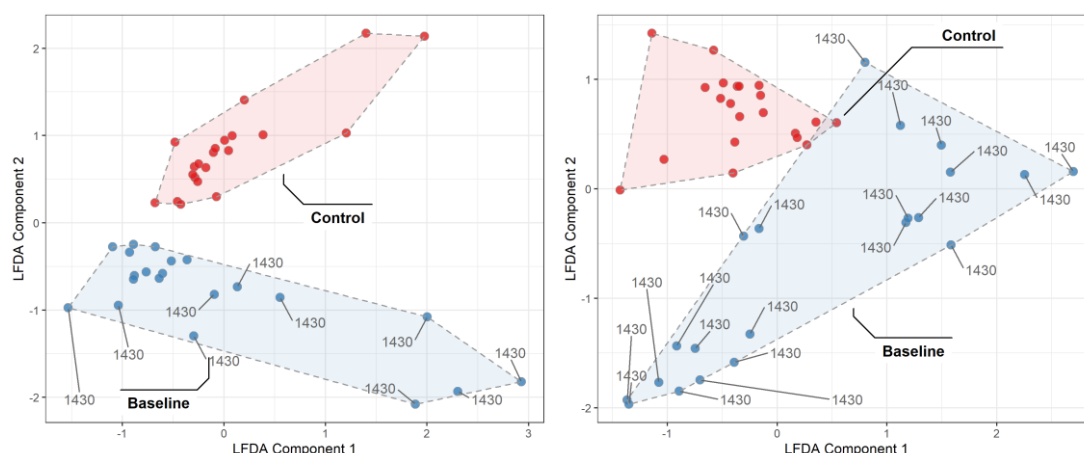


Figure 2. Importance des voies KEGG dans le microbiome des poules supplémentées en BP par rapport au Témoin dans le caecum. Les enzymes (points étiquetés) ont été mises en correspondance avec les voies KEGG (barres horizontales) : n = 21 par traitement

