

EFFET DE 2 *BACILLUS* SUR LES PERFORMANCES ET LE SCORE LESIONNEL DE POULETS LORS D'UN CHALLENGE ENTERITE NECROTIQUE

Barbé Florence¹, Sacy Audrey¹, Demey Vanessa¹, Chevaux Eric¹, Castex Mathieu¹,
Lumpkins Brett², Mathis Greg²

¹Lallemand SAS, 19 rue des Briquetiers, 31702 BLAGNAC, FRANCE

²Southern Poultry Feed and Research Inc., 96 Roquemore Road, GA 30607 ATHENS, USA

fbarbe@lallemand.com

RÉSUMÉ

L'entérite nécrotique (EN) est une maladie bactérienne multifactorielle principalement observée chez le poulet et qui coûte à l'industrie avicole jusqu'à 6 milliards de dollars par an. L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet de 2 souches de *Bacillus* (*B. pumilus* : BP et *B. subtilis* : BS) sur les performances et les lésions intestinales de poulets soumis à un challenge EN induit par *Clostridium perfringens* (CP). Des poussins ont été randomisés en 5 groupes de 10 cages (8 oiseaux/cage, 80 oiseaux/groupe) pendant 28 jours : 1) témoin négatif (NC), 2) témoin positif (PC), 3) antibiotique (ATB, virginiamycine, 20 g/tonne), 4) BP (5e8 ufc/kg), 5) BS (2e8 ufc/kg). A J14, tous les oiseaux ont été co-inoculés oralement avec *E. maxima* et challengés avec CP (sauf NC) à J19, 20 et 21. A J21, le degré de lésions intestinales (0 : normal – 3 : sévère) a été mesuré sur 30 oiseaux/groupe (3 oiseaux/cage). La moyenne des lésions et les performances (poids vif : PV, gain moyen quotidien : GMQ, indice de consommation : IC) à chaque temps ou période ont été analysées par ANOVA. Le pourcentage d'oiseaux dans chaque catégorie de lésions a été analysé par le test Khi2. La mortalité a été analysée par le test de Kaplan-Meier. Le challenge a induit une infection moyenne à sévère, caractérisée par des performances inférieures (PC vs NC : -22 % GMQ 0_28, P=0.01; +31 % IC 0_28, P<0.01), une augmentation de la mortalité (+20 %, P=0.001) et un taux plus élevé de lésions sévères (+1.3, P<0.001). Alors que le PV et le GMQ étaient similaires entre tous les groupes challengés, BP et BS ont amélioré l'IC par rapport à PC (-9 % vs PC, P<0.01), ATB étant intermédiaire (-5 % vs PC, P<0.01). La mortalité était similaire entre les groupes challengés avec une réduction numérique pour ATB (-31 %), BP (-13 %) et BS (-25 %) par rapport à PC. La sévérité des lésions apparaît atténuée par ATB (-46 %) et BP (-49 %), et dans une moindre mesure par BS (-28 %) vs PC (P<0.001). En conclusion, les 2 souches de *Bacillus* testées dans cette étude ont atténué les effets négatifs de l'EN chez les poulets à un niveau comparable à celui de l'antibiotique.

ABSTRACT

The positive impact of two *Bacillus*-based products on broiler performance and lesion scoring during necrotic enteritis-induced challenge.

Necrotic Enteritis (NE) is a multifactorial bacterial disease mainly observed in broilers and costing the poultry industry up to US\$ 6 billion per year in control measures and productivity losses. The aim of this study was to investigate the effect of 2 *Bacillus* strains (*B. pumilus* : BP and *B. subtilis* : BS) on the performance and intestinal lesions of broilers submitted to NE challenge induced by *Clostridium perfringens* (CP). 1 day old male Cobb 500 chicks were randomly allocated to 5 groups replicated in 10 cages (8 birds/cage, 80 birds/group) during 28 days: 1) negative control (NC), 2) positive control (PC), 3) antibiotic (ATB, virginiamycin, 20 g/ton feed), 4) BP (5e8 cfu/kg), 5) BS (2e8 cfu/kg). On d14, all birds were orally co-inoculated with *E. maxima* and all birds, except NC, were additionally challenged with CP on d19, 20 and 21. Birds' body weight (BW) and feed refusals were recorded on d0, 14, 21 and 28. On d21, 3 birds randomly selected from each cage (30 birds/group) were examined for the degree of NE intestinal lesions (0: normal – 3 : severe). Performance data were analyzed at each time point or period by one-way ANOVA. The average of NE lesions per group was analyzed by one-way ANOVA, while the percentage of birds inside each category of NE lesions was analyzed by Khi2 test. The NE-related mortality was analyzed by Kaplan-Meier test. The challenge successfully induced moderate to heavy NE infection characterized by lower performance (PC vs NC: -22% ADG 0_28, P=0.01; +31% FCR 0_28, P<0.01), increased NE-related mortality (+20% on the whole period, P=0.001) and higher level of severe NE lesions (+1.3, P<0.001). Whereas BW and ADG were similar between all challenged groups, BP and BS improved FCR compared to PC (-9% vs PC, P<0.01), with ATB being intermediate (-5% vs PC, P<0.01). NE-related mortality was not significantly different between the challenged groups despite numerical reduction in ATB (-31%), BP (-13%) and BS (-25%) vs PC. The severity of NE lesions was alleviated by ATB (-46%) and BP (-49%), and at lesser extent by BS (-28%) vs PC (P<0.001). In conclusion, the 2 strains of *Bacillus* tested in this study mitigated the negative effects of NE in broilers at a comparable level of magnitude as the antibiotic.

INTRODUCTION

L'entérite nécrotique (EN) est une infection bactérienne multifactorielle principalement observée chez le poulet et qui coûte à l'industrie avicole jusqu'à 6 milliards de dollars par an (Abd El-Hack *et al.*, 2022). L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet de 2 souches de *Bacillus* sur les performances et les lésions intestinales de poulets soumis à un co-challenge EN induit par *Clostridium perfringens* (CP) et *Eimeria maxima*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental

L'essai a été réalisé à Southern Poultry Feed and Research, Inc. (Athens, USA). 400 poussins Cobb 500 d'un jour ont été répartis aléatoirement en 5 groupes, comprenant 10 cages chacun (8 oiseaux/cage, 80 oiseaux/groupe) : 1) témoin négatif (NC), 2) témoin positif (PC), 3) antibiotique (ATB, virginiamycine, 20 g/tonne d'aliment), 4) BP (*Bacillus pumilus*, EffiXience, NCIMB 30362, Lallemand, 5e8 ufc/kg d'aliment), 5) BS (*Bacillus subtilis*, PB6, 2e8 ufc/kg d'aliment). La période expérimentale a duré 28 jours et les animaux ont reçu un aliment poulet démarrage sans antibiotique sur toute la période. Le challenge EN a consisté en des inoculations orales successives d'agents pathogènes : à j14 avec *Eimeria maxima* (tous les groupes, ~5,000 oocystes) et à j19, 20 et 21 avec *Clostridium perfringens* (tous les groupes sauf le groupe 1, 10⁸ ufc/oiseau/j). La souche de CP est un isolat d'un cas clinique d'EN, positif pour les toxines alpha et net B. Ce modèle expérimental impliquant la coccidiose (*Eimeria*) comme facteur prédisposant du développement de l'entérite nécrotique a été publié précédemment (Shojadoost *et al.*, 2012). Tous les poussins ont donc été challengés avec *E. maxima* et ceux des groupes 2, 3, 4 et 5 ont en plus été challengés avec CP.

1.2. Paramètres mesurés

Le poids vif (PV) et les refus alimentaires ont été enregistrés aux jours 0, 14, 21 et 28 par cage. A j21, 3 oiseaux ont été sélectionnés aléatoirement dans chaque cage (soit 30 oiseaux/groupe) et examinés pour déterminer le degré de lésions intestinales liées à l'EN (0 : normal – 3 : grave). La mortalité liée à l'EN a aussi été enregistrée au sein de chaque parc sur chacune des périodes (0_14, 14_21, 21_28) et sur les périodes cumulées (14_28, 0_21, 0_28).

1.3. Analyses statistiques

Le gain moyen quotidien (GMQ), l'ingéré et l'indice de consommation technique (IC, avec le poids des oiseaux morts/retraités) ont été calculés par parc sur

chacune des périodes (0_14, 14_21, 21_28) et sur les périodes cumulées (14_28, 0_21, 0_28). Les données de performance ont ensuite été analysées à chaque temps ou période par ANOVA à un facteur (groupe). Les moyennes par groupe des lésions intestinales liées à l'EN ont été analysées par ANOVA à 1 facteur (groupe) et les pourcentages d'oiseaux par groupe dans chaque catégorie de lésions ont été analysés par le test Khi2. La mortalité liée à l'EN a été analysée par le test de Kaplan-Meier. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS Statistics 26.0 (IBM). Le niveau de significativité a été fixé à 5 % ($P \leq 0.05$) et les tendances statistiques ont été prises en compte pour $0.05 < P \leq 0.1$. Les données sont présentées sous forme de tableaux ou d'histogrammes avec les moyennes et écart-types pour chaque groupe. Les différences significatives et les tendances statistiques sont indiquées par des lettres différentes entre chaque groupe.

2. RESULTATS

2.1. Performances zootechniques

Les données de performances par période pour les 5 groupes sont présentées dans le Tableau 1. Le challenge EN dégrade les performances, avec un PV final (j28) et un GMQ sur la période totale (0_28) similaires entre tous les groupes challengés (PC vs NC : -22% GMQ 0_28, $P=0.01$; +31% IC 0_28, $P<0.01$), tandis que BP et BS améliorent l'indice de consommation (IC 0_28), comparés à PC (BP et BS : -9% vs PC, $P<0.01$), le groupe antibiotique (ATB) étant intermédiaire (ATB : -5% vs PC, $P<0.01$). La dégradation du GMQ et de l'indice par le challenge commence à j14 et se poursuit sur toute la période expérimentale. Aucune différence significative n'a été notée entre les groupes pour l'ingéré.

2.2. Lésions liées à l'entérite nécrotique

La moyenne des lésions intestinales liées à l'entérite nécrotique pour les 5 groupes est présentée en Figure 1 et le pourcentage correspondant en Figure 2. Le challenge induit un niveau plus élevé de lésions sévères liées à l'EN comparé à NC qui ne présente aucune lésion (+1.3, $P<0.001$) et leur gravité est atténuée par ATB (0.70: -46%) et BP (0.67: -49%), et dans une moindre mesure par BS (0.93: -28%) vs PC ($P<0.001$). ATB, BP et BS présentent un pourcentage de score 1 inférieur (respectivement 50.0%, 40.0% et 43.3%) à celui de PC (66.7%) et un pourcentage de score 2 inférieur (respectivement 10.0%, 13.3% et 20.0%) à celui de PC (26.7%). Une absence de score 3 est par ailleurs notée pour ATB et BP ($P<0.001$). En conséquence, ATB, BP et BS présentent un pourcentage de score 0 supérieur (respectivement 40.0%, 46.7% et 33.3%) à celui de PC (3.3%).

2.3. Mortalité liée à l'entérite nécrotique

La mortalité liée à l'entérite nécrotique par période pour les 5 groupes est présentée en Figure 3. La mortalité liée à l'EN commence à j20 et est significativement augmentée par le challenge (0_28 : +20.0% sur toute la période, $P < 0.01$) et numériquement réduite par ATB (13.8%), BP (17.5%) et BS (15.0%) (0_28 : -31%, -13% et -25%, respectivement vs PC). Il semble qu'il y ait peu de correspondance entre la moyenne des lésions intestinales et la mortalité liées à l'EN : 1) la mortalité liée à l'EN la plus faible observée sur la période totale (0_28) pour le groupe antibiotique (ATB : 13.8%) ne se traduit pas par le plus faible niveau de lésions intestinales (ATB : 0.70), 2) BS présente par ailleurs un niveau de lésions intestinales plus élevé numériquement (0.93 vs 0.67, NS) mais une mortalité liée à l'EN plus faible numériquement (15.0% vs 17.5%, NS) que BP.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Deux publications récentes ont démontré un effet positif de la souche BP testée dans la présente étude sur les performances zootechniques, l'immunité et la santé intestinale de poulets de chair (Bilal *et al.*, 2021a) et sur la maturation du microbiote intestinal (Bilal *et al.*, 2021b). Cependant, l'effet de cette souche de *Bacillus* sur les performances des poulets dans un contexte d'entérite nécrotique (EN) n'avait jamais été investigué auparavant. L'objectif de cette étude était ainsi de comparer l'effet de cette souche de *Bacillus* à celui d'une souche de *B. subtilis* reconnue pour son effet positif dans un contexte d'EN (Ningsih *et al.*, 2023). Un objectif additionnel était de comparer l'effet de ces 2 souches de *Bacillus* à celui d'un antibiotique (utilisé ici comme témoin positif) sur les performances et les lésions intestinales de poulets soumis à un challenge EN induit par *Clostridium perfringens* (CP). La maladie provoque des lésions macroscopiques principalement au niveau de l'intestin grêle, et moins fréquemment sur d'autres organes (foie et reins), pouvant induire des niveaux élevés de mortalité (50%) (Riva & Monjo, 2021 ; Shini & Bryden, 2021). CP est le principal agent étiologique de l'EN, produisant des toxines responsables de la formation des lésions nécrotiques intestinales (Keyburn *et al.*, 2008). Plusieurs facteurs prédisposants peuvent favoriser la colonisation et la prolifération de CP : la modification du microbiote intestinal, la rupture de l'intégrité physique de l'épithélium intestinal et l'altération du système immunitaire (Riva & Monjo, 2021 ; Shini & Bryden, 2021). Par ailleurs, la coccidiose (une maladie parasitaire du tractus intestinal des volailles causée par des protozoaires coccidiens de l'espèce *Eimeria*) est considérée comme l'un des principaux facteurs prédisposants aux épidémies de NE : CP et *Eimeria* agissent de manière synergique dans l'induction des lésions typiques de l'EN (Collier *et al.* 2008; Hermans & Morgan, 2003; Kaldhusdal *et al.*, 2016; Williams *et al.*, 2005). La période à risque pour le développement

de l'EN se situe autour de 3 semaines d'âge, lorsque les anticorps maternels commencent à disparaître de la circulation sanguine du poulet (Keyburn *et al.*, 2013). Les effets du challenge dans la présente étude (challenge coccidien oral à j14, suivi de 3 jours consécutifs de challenge CP à j19, 20 et 21) se sont traduits par une induction réussie d'une infection EN modérée à sévère, caractérisée par une dégradation des performances (réduction du GMQ et augmentation de l'IC) et une augmentation de la mortalité et du niveau de lésions sévères liées à l'EN. En comparant les 2 probiotiques (BP et BS) au groupe antibiotique (PC), il a été noté : 1) une amélioration de l'indice de consommation 0_28 (-9% vs PC), ATB étant intermédiaire (-5% vs PC), 2) une réduction numérique du niveau de mortalité liée à l'EN, 3) une atténuation des conséquences du challenge sur l'intégrité intestinale (significativement moins de lésions). Les 2 souches de *Bacillus* testées dans cette étude ont ainsi atténué les effets négatifs de l'entérite nécrotique chez les poulets de chair sur les performances, la mortalité et les lésions intestinales à un niveau similaire ou meilleur que l'antibiotique. Dans un contexte d'EN en poulet de chair, les probiotiques représentent une alternative intéressante aux antibiotiques promoteurs de croissance (AGP) (Adhikari *et al.*, 2020; Caly *et al.*, 2015; Hofacre *et al.*, 2018; Khaliq *et al.*, 2020; Rajput *et al.*, 2020). Parmi les probiotiques, les souches de *Bacillus* les plus documentées sont *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. amyloliquefaciens* ou leur combinaison. Plusieurs espèces du genre *Bacillus* présentent en effet une activité anti-CP, par la production de bactériocines inhibant la prolifération de CP (Bizani & Brandelli, 2002 ; Riva & Monjo, 2021; Sandvang *et al.*, 2021). L'absence apparente de correspondance entre la moyenne des lésions intestinales et la mortalité liée à l'EN peut s'expliquer par le fait que la mortalité n'est pas toujours positivement corrélée aux lésions intestinales, notamment dans le cas d'EN subclinique, associant des lésions intestinales à une réduction de performance sans mortalité (Dierick *et al.*, 2021 ; Goo *et al.*, 2023). D'autres études ont aussi démontré une faible corrélation négative entre le niveau de lésions et le degré de sévérité de l'infection (Conway *et al.*, 2003 ; He *et al.*, 2022 ; Idris *et al.*, 1997). En analysant conjointement les performances de croissance sur la période de challenge 14_21 (GMQ) et la moyenne des lésions intestinales à j21, le concept d'oiseaux sensibles, résistants et tolérants aux *Eimeria*, présenté par Blake (2017) pourrait s'appliquer aux oiseaux des groupes PC (témoin positif), BP et BS, respectivement. Les oiseaux sensibles sont caractérisés par un gain de poids plus faible et un score de lésions élevé (PC : GMQ 14_21 : 23.7 g/oiseau/j ; moyenne lésions : 1.30). Les oiseaux résistants et tolérants présentent un GMQ plus élevé que les oiseaux sensibles (BP et BS : GMQ 14_21 : 25.8 et 24.8 g/oiseau/j, respectivement), mais une différence de lésions moyennes (plus bas pour les résistants : BP : 0.67, plus haut pour les tolérants :

BS : 0.93). Les oiseaux sensibles (PC : GMQ bas, beaucoup de lésions) et résistants (BP : GMQ élevé, peu de lésions) ont donc respectivement le moins bon et le meilleur profil, alors que les animaux potentiellement tolérants (BS : GMQ élevé, bcp de lésions) peuvent devenir « super excréteurs » d'oocystes dans l'environnement. Ayant des performances satisfaisantes, ces animaux représentent une population à risque non identifiable aisément, qu'il faudrait donc limiter autant que possible. Dans cette étude, la concentration en IL10 (cytokine anti-inflammatoire, Arendt *et al.*, 2019) n'a pas été analysée et aurait permis de discriminer et confirmer le profil de ces 3 groupes (teneur en IL10 élevée pour les animaux sensibles et résistants, et faible pour les animaux tolérants) (Boulton *et al.*, 2017). De manière générale, aucune différence n'a été observée entre les 2 souches de *Bacillus* dans cette étude, excepté une valeur de lésions pour le groupe BS intermédiaire entre PC et BP/ATB (effet numérique NS). En conclusion, cette étude confirme l'intérêt de ces 2 souches de *Bacillus* dans la prévention des effets négatifs de l'entérite nécrotique chez les poulets de chair sur les performances, la mortalité et les lésions intestinales, à un niveau similaire de l'antibiotique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El-Hack M.E., El-Saadony M.T., 2022. Poultry Sci., (101), 101590
 Adhikari P., Kiess A., 2020. J. Appl. Poult. Res., (29), 515-534
 Arendt M., Elissa J., 2019. Vet. Immunol. Immunopathol., (218), 109934
 Bilal M., Si W., 2021a. Poultry Sci., (100), 100871
 Bilal M., Achard C., 2021b. Microorganisms, (9), 1899
 Bizani D., Brandelli A., 2002. J. Applied Microbiol., (93), 512-519
 Blake D., 2017, 5th Intestinal Health Scientific Interest Group (IHSIG), Bangkok, Thailand
 Boulton K., Nolan M., 2017, 68th Annual Meeting of the European Association for Animal Production (EAAP), Tallinn, Estonia
 Caly D.L., D'Inca R., 2015. Front. Microbiol., (6), 1336
 Collier C.T., Hofacre C.L., 2008. Vet. Immunol. Immunopathol., (122), 104-115
 Conway D.P., McKenzie M.E., 1990. Avian Pathol., (19), 489-496
 Dierick E., Ducatelle R., 2021. Poultry Sci., (100), 100806
 Goo D., Choi J., 2023. Front. Physiol., (14), 1269398
 He W., Goes E.C., 2022. Front. Physiol., (13), 788592
 Hermans P.G., Morgan K.L., 2003. Res. Vet. Sci., (74), 19
 Hofacre C.L., Smith J.A., 2018. Poultry Sci., (97), 1929-1933
 Idris A.B., Bounous D.I., 1997. Avian Dis., (41), 388-391
 Kaldhusdal M., Benestad S.L., 2016. Avian Pathol., (45, 3), 271-274
 Keyburn A.L., Boyce J.D., 2008. PLoS Pathog., (4, 2), e26
 Keyburn A.L., Portela R.W., 2013. Vet. Res., (44), 108
 Khaliq A., Zeng D., 2020. AMB Expr., (10), 50
 Ningsih N., Respati A.N., 2023. Poultry Sci., (102), 102923
 Rajput D.S., Zeng D., 2020. AMB Expr., (10), 220
 Riva S., Monjo T.P., 2021. J. Vet. Med. Animal Sci., (4, 1), 1051
 Sandvang D., Skjoet-Rasmussen L., 2021. Poultry Sci., (100), 100982
 Shini S., Bryden W.L., 2021. Anim. Prod. Sci.
 Shojodoost B., Vince A.R., Prescott J.F., 2012. Vet Res., (43), 74
 Williams R.B., 2005. Avian Pathol., (34, 3), 159-180

Tableau 1. Poids vif, gain moyen quotidien et indice de consommation par période pour les 5 groupes

Paramètre – moyenne (écart-type)	Jour ou période	NC	PC	ATB	BP	BS	Valeur p
Poids vif (PV, g)	0	45.5 (1.1)	45.5 (1.2)	45.1 (1.2)	45.5 (1.1)	45.3 (0.9)	NS
	14	202.9 (23.7)	220.0 (32.5)	218.1 (28.5)	213.6 (34.7)	209.7 (26.7)	NS
	21	457.9 (59.8) a	388.6 (43.6) ab	405.6 (48.7) ab	392.0 (55.4) ab	383.7 (47.4) b	0.05
	28	794.5 (166.7)	704.3 (155.2)	717.4 (127.5)	752.5 (125.3)	680.8 (126.1)	NS
Gain moyen quotidien total (GMQ, g/oiseau/j)	0_14	11.2 (1.7)	12.6 (2.3)	12.4 (2.0)	12.0 (2.5)	11.7 (1.9)	NS
	14_21	35.1 (5.9) a	23.7 (1.7) b	26.5 (3.9) b	25.8 (4.0) b	24.8 (4.0) b	<0.001
	21_28	51.3 (10.2)	38.9 (15.7)	39.4 (11.9)	45.5 (14.7)	41.3 (15.2)	NS
	14_28	41.1 (7.0) a	28.3 (5.4) b	30.4 (5.4) b	31.9 (4.7) b	29.8 (6.0) b	0.001
	0_21	19.2 (2.8) a	16.3 (2.1) b	17.1 (2.4) b	16.6 (2.6) b	16.0 (2.3) b	0.1
	0_28	24.4 (3.8) a	19.2 (3.6) b	20.0 (3.1) b	20.3 (2.4) b	19.2 (2.9) b	0.01
Indice de consommation technique (IC, avec le poids des oiseaux morts/retirés)	0_14	2.23 (0.19)	2.18 (0.41)	2.20 (0.21)	2.23 (0.38)	2.14 (0.23)	NS
	14_21	1.46 (0.10) a	2.05 (0.06) b	1.88 (0.08) c	1.92 (0.12) c	1.94 (0.17) c	<0.001
	21_28	1.44 (0.15) a	2.71 (1.50) c	2.25 (0.72) bc	1.93 (0.83) ab	1.91 (0.56) ab	<0.1
	14_28	1.45 (0.12) a	2.15 (0.39) c	2.00 (0.28) bc	1.84 (0.18) b	1.89 (0.25) b	<0.001
	0_21	1.76 (0.14) a	2.11 (0.20) b	2.03 (0.11) b	2.06 (0.16) b	2.03 (0.15) b	0.001
	0_28	1.65 (0.14) a	2.16 (0.38) c	2.06 (0.23) bc	1.96 (0.12) b	1.96 (0.19) b	<0.01

Figure 1. Moyenne des lésions intestinales liées à l’entérite nécrotique pour les 5 groupes à j21 (a, b, c : P<0.001)

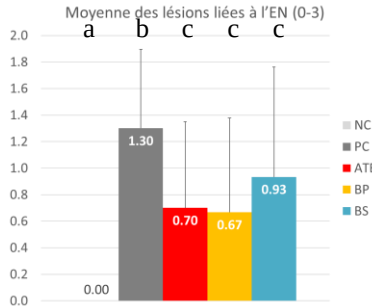


Figure 2. Pourcentage d’oiseaux dans les différentes catégories de lésions intestinales liées à l’entérite nécrotique pour les 5 groupes à j21 (a, b, c : P<0.001)

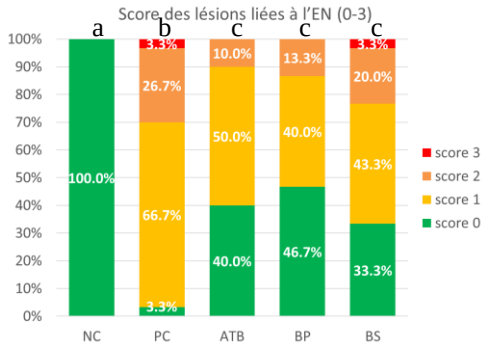


Figure 3. Mortalité liée à l’entérite nécrotique par période pour les 5 groupes (a, b : P<0.01)

