

EFFET DE *BACILLUS* SP. PB6 (ATCC PTA-6737) SUR LE MICROBIOTE CAECAL DES POULETS DE CHAIR DANS QUATRE ELEVAGES BELGES

E. N'guetta¹, K. Vermeulen¹, Steff Taelman², V. Van Hamme¹, A. Wealleans¹

¹KEMIN EUROPA NV - Toekomstlaan 42 - 2200 Herentals Belgique

²BIOLIZARD, Foreestelaan 88, 9000 Ghent, Belgique

Eric.nguetta@kemin.com

RÉSUMÉ

Les bénéfices des probiotiques appartenant aux *Bacillus* spp. pour les volailles, notamment ceux *Bacillus* sp. PB6 (ATCC PTA-6737), ont été mis en lumière par de nombreuses études au cours des deux dernières décennies. Ces dernières ont permis de comprendre certains des modes d'action qui expliquent les bénéfices de *Bacillus* sp. PB6 (PB6), tels que la production de métabolites secondaires à activité antibactérienne, la stimulation du système immunitaire, ou encore l'amélioration des performances. Cependant, les effets de ce probiotique sur le microbiote intestinal du poulet de chair n'ont pas encore été entièrement élucidés. L'objectif de cette étude était donc d'étudier l'effet d'une supplémentation via l'eau de boisson de PB6, apporté à la dose de 10^8 CFU/L, sur le microbiote caecal de poulets de chairs. Pour ce faire, un bâtiment contrôle (sans ajout de probiotique) et un bâtiment supplémenté avec *Bacillus* sp. PB6 ont été identifiés dans les considérés pour cette étude. Les échantillonnages ont été réalisés dans quatre élevages commerciaux situés dans le nord de la Belgique afin de tenir compte de la variabilité inter-élevage. La supplémentation avec *Bacillus* sp. PB6 s'est effectuée dès la réception des poussins (J0) jusqu'à l'abattage (J40). A l'âge de 10 jours et de 28 jours, 10 à 14 poulets mâles ont été euthanasiés par groupe afin de collecter les contenus caeaux pour l'analyse de microbiote après un séquençage de l'ARNr 16S. Les analyses de différences hiérarchiques d'abondance en fonction des traitements ont été faites en utilisant treeclimbR pour identifier les groupes taxonomiques d'intérêt, et EdgeR pour la réalisation des tests d'hypothèse. Les corrections post hoc ont été réalisées par la procédure de Benjamini-Hochberg avec un seuil de significativité statistique et biologique fixés à $\alpha = 0.05$ et $\text{LogFC} = |2|$, respectivement. L'ajout de *Bacillus* sp. PB6 a significativement modifié la composition de la flore caecale des animaux supplémentés en comparaison au groupe contrôle, notamment en termes d'abondance de certains variants de séquence d'amplicon à J10. Les effets observés sur le microbiote caecal des poulets de chair ont été plus importants en début d'essai, pendant que le microbiote était encore en cours de développement.

ABSTRACT

Effect of *Bacillus* sp. PB6 (ATCC PTA-6737) on the caecal microbiota of broiler chickens in four independent Belgian farms.

The benefits of *Bacillus* spp. probiotics in poultry, particularly those of *Bacillus* sp. PB6 (ATCC PTA-6737), have been highlighted in many studies over the past decades. Many of the modes of actions of *Bacillus* sp. PB6 (PB6) have been elucidated, notably the production of antibacterial secondary metabolites, the stimulation of the immune system and the improvement of growth performance. However, the effects of PB6 on the caecal microbiota of broiler chickens have not yet been fully investigated. The aim of this study was to determine the effect of the drinking water supplementation of PB6, at the dosage of 10^8 CFU/L, on the caecal microbiota of broiler chickens. Sampling was done in 4 commercial farms in the north of Belgium to account for inter-farm variability. PB6 was supplemented from day 0 till slaughter age at day 40. At the ages of 10 and 28 days, 10 to 14 randomly chosen male birds were euthanized and caecal content was collected to analyze the microbiota by 16S rRNA amplicon sequencing using Illumina Miseq platform. Hierarchical differential abundance analyses per treatment were performed using treeclimbR to identify taxa of interest across taxonomic levels and using edgeR for hypothesis testing. P-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method with thresholds for statistical and biological significance respectively set at $\alpha = 0.05$ and $\text{LogFC} = |2|$. The supplementation of PB6 to the drinking water of broilers significantly affected the cecal microbial composition as compared to control birds. The impact was highest in the beginning of the trial when the intestinal microbiome was still under development.

INTRODUCTION

Le microbiote intestinal, y compris celui des volailles, joue un rôle important dans le maintien de l'état de santé des animaux. Il contribue notamment à la bonne digestion des polysaccharides complexes, au développement muqueuses, à la production de certaines vitamines, à la régulation du transit, à la maturation du système immunitaire ou encore à la résistance à la colonisation du tractus digestif par les bactéries pathogènes (McFarland 2000; Buffie et Pamer, 2013). Ce dernier rôle constitue l'une des premières lignes de défense contre les invasions par les bactéries pathogènes de l'intestin. Tous les phyla dominants qui peuplent le microbiote contribuent au maintien de la santé intestinale (Buffie et Pamer, 2013). L'utilisation de *Bacillus* sp. PB6 (ATCC PTA-6737) comme probiotique chez les volailles est documentée par plusieurs études qui en démontrent les modes d'actions. Ces derniers incluent la stimulation du système immunitaire (Selvam et al., 2009; Foligné et al., 2012), la production de molécules antibactériennes (Teo et Tan, 2005; Aljumaah et al., 2020; Hussein et al., 2020b) et contribuent à l'amélioration de la croissance des animaux (Hussein et al., 2020a; Arif et al., 2021). Cependant, les informations concernant la modulation du microbiote des poulets de chair par *Bacillus* spp. restent incomplètes. L'objectif de cette étude était d'étudier l'effet d'une supplémentation avec *Bacillus* sp. PB6 (PB6) sur le microbiote caecal des poulets de chair.

1. MATERIELS ET METHODES

Des spores *Bacillus* sp. PB6 (CLOSTAT® HC SP Dry, Kemin Europa N.V, Herentals, Belgique) ont été ajoutées à l'eau de boisson des poulets de chair ROSS 308 à la dose de 10^8 CFU/litre. Quatre élevages commerciaux ont été échantillonnés avec un bâtiment contrôle et un bâtiment supplémenté dans chaque cas. La supplémentation en probiotique a été faite dès l'arrivée des animaux jusqu'à leur enlèvement (J40). Les animaux ont reçu les aliments commerciaux distribué en *ad libitum*. A J10 et J28, entre 10 et 14 poulets mâles ont été euthanasiés par groupe par dislocation cervicale pour le prélèvement des contenus caecaux.

1.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été effectuée à partir de 200 échantillons de contenus caecaux avec le kit DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Les échantillons d'ADN obtenus ont ensuite été envoyés pour séquençage des amplicons de l'ARN ribosomique 16S (Novogene, Cambridge, Royaume-Uni).

1.2. Séquençage de l'ARN ribosomique 16S

La région hypervariable V3-V4 du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S a été amplifiée à l'aide du jeu d'amorces spécifiques 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') / 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') (Yu et al., 2005). Les préparations pour les PCR contenaient 15 µl de Master Mix Phusion® High-Fidelity PCR New England Biolabs, Massachusetts, Etats-Unis), 0.2 µM de chaque amorce et 10 ng d'ADN cible. Chaque cycle d'amplification a consisté en une première étape de dénaturation à 98°C pendant 1 min, suivie de 30 cycles à 98°C (10 s), 50°C (30s) et 72°C (30 s) et d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 minutes. Les produits de la PCR ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (2%) et ont été purifiés en utilisant le kit Qiagen d'extraction sur gel (Qiagen, Hilden, Allemagne). Une banque a été générée en utilisant le kit NEBNext Ultra II DNA Library Prep (Cat No. E7645, New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. La qualité de la banque a été évaluée avec le fluorimètre Qubit 2.0 (Thermo Scientific, Massachusetts, Etats-Unis), Bioanalyser Agilent 2100 (Agilent, Californie, Etats-Unis). Finalement, la banque a été séquencée avec un séquenceur Illumina NovaSeq et 250 lectures (paired-end reads) ont été obtenues.

L'assemblage des lectures a été effectué avec FLASH (Version 1.2.11, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Magoč et Salzberg, 2011). Le nettoyage des données et le contrôle qualité a été fait avec le logiciel fastp (Version 0.20.0). Les séquences chimères de PCR ont été détectées en utilisant Vsearch (Version 2.15.0) puis retirées (Haas et al., 2011). Le débruitage pour l'élimination des erreurs (denoising) a été réalisé avec le package R Dada2 avec le logiciel QIIME2 (Version QIIME2-202006) afin d'obtenir les Variants de séquence d'amplicon (ASV). Les ASV avec une abondance inférieure à 5 ont été éliminés (Li et al., 2020). L'assignation taxonomique a été effectuée avec la base de données Silva (v132, avec seuil d'identité de 97%). L'abondance absolue des ASV a été normalisée en utilisant le nombre de séquences de l'échantillon qui contenait le moins de séquences. Les ASV dont l'abondance totale était inférieure à 0,01 % du total des séquences ont été éliminés (Bokulich et al., 2013).

1.3. Analyse statistique

Les analyses d'abondance différentielle par traitement ont été effectuées avec treeclimbR et edgeR. TreeclimbR a permis l'identification des groupes taxonomiques d'intérêt et le contrôle des faux positifs, et EdgeR la réalisation des tests d'hypothèses. Les corrections post hoc ont été réalisées par la procédure de Benjamini-Hochberg avec un seuil de significativité statistique et biologique fixés à $\alpha = 0.05$ et LogFC = |2| (facteur de changement Log2), respectivement.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

6070 ASV ont été obtenus à partir des contenus caeaux. 24 ASV ont présenté une abondance différentielle en comparant les contenus caeaux des animaux du groupe contrôle par rapport à ceux supplémentés avec la souche PB6. Parmi ceux-ci, 2 ASV appartenant au genre *Bacteroides* étaient sous-représentés dans le groupe PB6 par rapport au contrôle (s_ASV1215 log2 FC -4.8; $p=0.002$, s_ASV1272 log2 FC -4.4; $p=0.018$). De même, l'ASV s_ASV595, qui appartient au genre *Lactobacillus*, était significativement moins abondant dans le groupe PB6 par rapport au contrôle (log2 FC -2.7; $p<0.001$). Une modification de -1.6 log2 FC ($p=0.032$) a été observée avec l'ASV s_ASV5748, qui a été attribué au genre *Subdoligranulum*. De plus, les poulets de chair du groupe contrôle ont présenté significativement plus d'ASV identifiés comme appartenant à *Bifidobacterium pullorum* dans leurs contenus caeaux en comparaison à animaux PB6. En plus de ces espèces, des augmentations d'abondance statistiquement significatives ont pu être notées pour des bactéries appartenant au genre des *Bacillus* (s_ASV655 log2 FC 1.7; $p=0.018$) et au groupe "*Clostridia_VadinBB60_group*" (s_ASV4503 log2 FC 1.8; $p=0.010$) (Figure 1A; **Error! Reference source not found.**). A 28 jours d'âge, seulement 6 ASV présentant une abondance différentielle ont pu être identifiés entre les 2 groupes (données non présentées). Les contenus caeaux des animaux PB6 ont montré une augmentation relative de l'abondance de *Bacteroides vulgatus* (log2 FC 3.2; $p=0.023$) et de l'ASV s_ASV720, qui appartient au genre *Streptococcus* (log2 FC 2.2; $p=0.014$), par rapport au contrôle. Par ailleurs, les contenus caeaux des poulets de chair ayant reçu le probiotique avaient une quantité plus importante de l'ASV s_ASV1215 (log2 FC -3.1;

$p=0.029$), qui a été identifié comme une espèce appartenant au genre *Bacteroides*, et de l'ASV s_ASV1379, qui appartient à la famille des *Oscillospiraceae* (log2 FC -1.7; $p=0.027$) (Figure 1B; Tableau 1).

Dans cette étude, l'utilisation de la souche PB6 a donc conduit à des changements significatifs de la composition du microbiote caecal des poulets de chair. Les conséquences de ces modifications restent à étudier. Toutefois, plusieurs études ont pu mettre en évidence des effets de PB6 sur les performances de croissance des poulets de chair et leur santé intestinale. Parmi celles-ci, suite à challenge avec *C. perfringens*, PB6 a favorisé la guérison des animaux en améliorant le score lésionnel au niveau de l'intestin ainsi que l'indice de consommation par rapport au contrôle. En outre, un impact sur les processus de fermentation caecale a pu être observé à travers une augmentation de la production d'acide acétique et d'acide butyrique par rapport au contrôle (Aljumaah et al., 2020). Dans des conditions de stress thermique, *Bacillus* sp. PB6 a amélioré le poids vif et l'indice de consommation de poulets de chairs tout en réduisant la quantité de clostridies et de colibacilles (Abdelqader et al. 2020). Il est donc possible que certains effets positifs de PB6 soient liés à des modifications du microbiote caecal ou intestinal. Néanmoins, dans le cadre de cette étude, il est important de noter que la méthode de séquençage utilisée (amplification de la région V3-V4/ Illumina Novaseq) a rarement permis une identification précise des ASV au niveau de l'espèce. De ce fait, la plupart des ASV présentant une abondance différentielle entre les deux groupes n'ont pu être identifiés qu'au niveau du genre. Cela constitue une difficulté supplémentaire dans la recherche des conséquences de ces modifications du microbiote.

CONCLUSION

L'ajout de *Bacillus* sp. PB6 à l'eau de boisson des poulets de chair a abouti à des changements significatifs de la composition du microbiote caecal en comparaison au contrôle. Les mécanismes par lesquels ce probiotique affecte le microbiote pourraient

impliquer la production de bactériocines et des interactions avec le système immunitaire. L'effet a été plus important en début de période d'élevage, pendant que le microbiote était encore en développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelqader, A., Abuajamieh, M., Hayajneh, F., & Al-Fataftah, A. R. (2020). Probiotic bacteria maintain normal growth mechanisms of heat stressed broiler chickens. *Journal of Thermal Biology*, 92, 102654.
- Aljumaah MR, Alkhulaifi MM, Abudabos AM., *J Poult Sci.* 2020 Jan 25;57(1):45-54
- Arif M, Akteruzzaman M, Tuhin-Al-Ferdous, Islam SS, Das BC, Siddique MP, Kabir SML., *Vet Anim Sci.* 2021 Nov 4;14:100216.
- Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, Mills DA, Caporaso JG., *Nat Methods.* 2013 Jan;10(1):57-9
- Buffie CG, Pamer EG., *Nat Rev Immunol.* 2013 Nov;13(11):790-801.
- Foligné B, Peys E, Vandenkerckhove J, Van Hemel J, Dewulf J, Breton J, Pot B., *Clin Nutr.* 2012 Dec;31(6):987-94
- Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, Ciulla D, Tabbaa D, Highlander SK, Sodergren E, Methé B, DeSantis TZ; Human Microbiome Consortium; Petrosino JF, Knight R, Birren BW., *Genome Res.* 2011 Mar;21(3):494-504
- Huang R, Soneson C, Germain PL, Schmidt TSB, Mering CV, Robinson MD., *Genome Biol.* 2021 May 17;22(1):15
- Hussein EOS, Ahmed SH, Abudabos AM, Aljumaah MR, Alkhulaifi MM, Nassan MA, Suliman GM, Naiel MAE, Swelum AA., *Animals (Basel).* 2020a Mar 18;10(3):507
- Hussein EOS, Ahmed SH, Abudabos AM, Suliman GM, Abd El-Hack ME, Swelum AA, N Alowaimier A., *Animals (Basel).* 2020b Apr 12;10(4):669
- Li M, Shao D, Zhou J, Gu J, Qin J, Chen W, Wei W., Chin J *Cancer Res.* 2020 Dec 31;32(6):755-767
- Magoč T, Salzberg SL., *Bioinformatics.* 2011 Nov 1;27(21):2957-63
- McFarland, L. V., 2000.. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12:193–207
- Selvam R, Maheswari P, Kavitha P, Ravichandran M, Sas B, Ramchand CN., *Indian J Biochem Biophys.* 2009 Feb;46(1):79-85.
- Teo AY, Tan HM., *Appl Environ Microbiol.* 2005 Aug;71(8):4185-90.

Figure 1. Analyse d'abondance différentielle des contenus caecaux des poulets de chair des bâtiments contrôle ou supplémentés avec *Bacillus* sp. PB6 via l'eau de boisson. Le volcano plot met en évidence les groupes taxonomiques dont l'abondance est différente pour les animaux supplémentés à 10 jours (A) et à 28 jours (B) d'âge. Une différence supérieure à 2 log₂ indique une différence biologique, tandis qu'une p-value < 0.05 indique une différence statistique d'abondance relative.

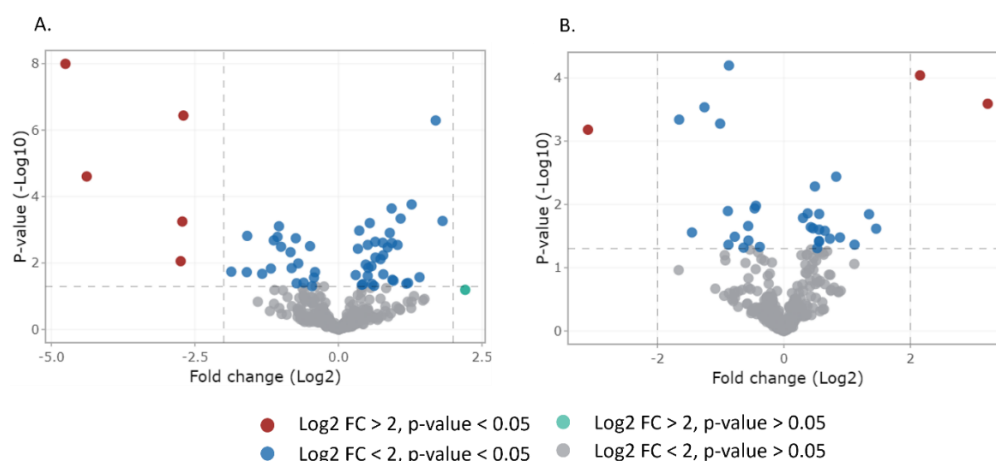


Tableau 1. 24 ASV présentant une abondance différente à 10 jours d'âge dans les caecaux des poulets de chair supplémentés avec *Bacillus* sp. PB6 par rapport au contrôle.

Jour 10						
Groupe taxonomique			Abondance relative (%)		Log2 FC	P-value ajustée
Phylum	Genre	Espèce	Contrôle	PB6		
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium pullorum</i>	1.353	0.177	-2.700	0.000
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	s_ASV1215	3.537	0.151	-4.754	0.002
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	s_ASV1272	0.550	0.023	-4.383	0.018
Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	s_ASV595	0.083	0.014	-2.719	0.000
Firmicutes	<i>Subdoligranulum</i>	s_ASV5748	0.723	0.236	-1.589	0.032
Firmicutes	<i>Blautia</i>	s_ASV1869	0.917	0.346	-1.126	0.036
Firmicutes	<i>Deffluviitaleaceae_UCG-011</i>	s_ASV4040	0.051	0.024	-1.061	0.032
Firmicutes	<i>Merdibacter</i>	s_ASV814	0.288	0.157	-1.035	0.021
Firmicutes		s_ASV3711	0.131	0.066	-1.000	0.039
Firmicutes		s_ASV5300	0.288	0.350	0.339	0.033
Firmicutes	<i>Negativibacillus</i>	s_ASV5324	0.445	0.558	0.362	0.039
Firmicutes	<i>CHKCI001</i>	s_ASV2372	0.136	0.178	0.510	0.042
Firmicutes	<i>Incertae Sedis</i>	s_ASV1347	1.576	2.141	0.546	0.026
Firmicutes	<i>Incertae Sedis</i>	s_ASV1301	0.169	0.242	0.641	0.038
Firmicutes	Eubacterium_coprostanoligenes_group	s_ASV1661	0.146	0.211	0.772	0.018
Firmicutes	<i>Butyricicoccus</i>	<i>Butyricicoccus pullicaecorum</i>	0.480	0.784	0.856	0.036
Firmicutes		s_ASV3618	0.169	0.311	0.894	0.036
Firmicutes	<i>Anaerostipes</i>	<i>Anaerostipes butyraticus</i>	0.255	0.493	0.926	0.039
Firmicutes	<i>Clostridia_vadinBB60_group</i>	s_ASV4550	0.137	0.270	0.930	0.028
Firmicutes	<i>ASF356</i>	s_ASV4111	0.048	0.092	1.029	0.011
Firmicutes		s_ASV1409	0.806	1.620	1.083	0.036
Firmicutes	<i>Clostridia_vadinBB60_group</i>	s_ASV4581	0.101	0.237	1.274	0.038
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	s_ASV655	0.388	1.173	1.693	0.018
Firmicutes	<i>Clostridia_vadinBB60_group</i>	s_ASV4503	0.019	0.062	1.813	0.010

Les changements supérieurs à 2 Log2 sont indiqués en gras. CTRL: Contrôle, PB6: *Bacillus* sp. PB6 ; Log2 FC: facteur de changement Log2.