

EFFET DE L'ADMINISTRATION DE FRACTIONS DE LEVURES RICHES EN MANNANES ET β -GLUCANES (1,3 ET 1,6) SUR LA FLORE FECALE ET LES PERFORMANCES EN DINDES

Zampiga Marco¹, Sirri Federico¹, Rondel Elen², Manfreda Gerardo¹, Lucchi Alex¹, De
Cesare Alessandra³

¹UNIVERSITE DE BOLOGNE- Département des Sciences Agricoles et Alimentaires - Via del Florio
2, OZZANO DELL'EMILIA

²PHILEO BY LESAFFRE - 137 rue Gabriel Péri- 59700 MARCQ-EN-BAROEUL

³UNIVERSITE DE BOLOGNE- Département des Sciences Vétérinaires - Via Tolara di Sopra 50,
OZZANO DELL'EMILIA
e.rondel@phileo.lesaffre.com

RÉSUMÉ

L'administration de postbiotiques peut influencer positivement la performance et la santé des volailles en modulant la composition de la flore intestinale. L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets de la supplémentation avec des fractions de levures riches en mannanes et β -glucanes (1,3 et 1,6) sur les performances de production et la flore fécale de dindes. 1620 dindes femelles (BUT Big 6) d'un jour ont été aléatoirement divisées en 2 groupes expérimentaux (9 répétitions de 90 animaux) : CONT, recevant un aliment contrôle commercial, et TRT recevant l'aliment CONT supplémenté avec 500g/t de fractions de levures. Les échantillons fécaux ont été collectés à J21 et J85 (n=18 échantillons/groupe/période d'échantillonnage) et le microbiote analysé selon la méthode ARNr-16S. L'analyse du microbiote a révélé un effet intéressant attribuable au traitement. Les fèces des dindes TRT étaient caractérisées par une plus faible proportion de Gammaproteobacteria (principalement Enterobacteriaceae, dont *Klebsiella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia* et *Serratia*) à J21 (0,45% vs. 20,6% pour les groupes TRT et CONT respectivement, $p < 0.0001$) associée à une présence significativement plus importante de bactéries bénéfiques (i.e. *Lactobacillus* spp., *Clostridium bifermentans* et *Pediococcus acidilactici*). Les performances de croissance des groupes CONT et TRT ont été similaires jusqu'à 91 jours. Bien que le groupe TRT ait atteint un poids vif inférieur à l'abattage (9,508 vs. 9,658 kg ; $p < 0,05$) dû à des performances légèrement inférieures durant la phase de finition (92-106 jours), ces résultats indiquent que la supplémentation avec des fractions de levures induisent des effets positifs sur la composition de la flore fécale de dindes, promouvant une bonne santé intestinale, mais également l'importance de la dose d'additif à administrer afin d'optimiser les performances. En effet, les résultats préliminaires d'une seconde étude, au cours de laquelle le niveau de supplémentation a été ajusté en finition, indiquent une meilleure efficacité alimentaire sur le groupe supplémenté par rapport au groupe contrôle.

ABSTRACT

Effect of the dietary administration of a yeast fraction rich in mannan-oligosaccharides and β -glucans (1,3 and 1,6) on fecal microbiota and productive performance of turkeys

The dietary administration of postbiotic compounds is thought to positively affect productive efficiency and health of poultry by modulating the gut microbiota composition. The aim of this study was to investigate the effects of the dietary administration of a yeast fraction rich in mannan-oligosaccharides and β -glucans (1,3 and 1,6) on productive performance and fecal microbiota of turkeys. 1,620 one-d-old female poults (BUT Big 6) were randomly divided in 2 experimental groups (9 replicates of 90 birds/each): CONT, fed a commercial basal diet, and TRT receiving the CON diet supplemented with the feed additive (500 g/ton). Fecal samples were collected at 21 and 85 d (n=18 samples/group/sampling time) and microbiota analyzed using a 16S rRNA-seq-based approach. Microbiota analysis revealed interesting effects ascribed to the treatment. Feces from TRT turkeys were characterized by a lower abundance of Gammaproteobacteria (mainly Enterobacteriaceae including *Klebsiella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia* and *Serratia*) at 21 d (0.45 vs. 20.6%, for TRT and CONT group, respectively; $P < 0.001$) associated to a significantly greater amount of health promoting microorganisms at (i.e. *Lactobacillus* spp., *Clostridium bifermentans* and *Pediococcus acidilactici*). Growth performances of CON and TRT turkeys were similar till 91 d. Despite the fact that TRT group reached a lower body weight at slaughter (9,508 vs. 9,658 g; $P < 0.05$) due to slightly worsen productive performance during the last feeding phase (92-106 d), these results indicate that the dietary supplementation of the yeast fraction determines positive effects on fecal microbiota composition of turkeys promoting healthy gut conditions, but also highlight the importance of the dosage of the product to optimize performance. The preliminary results of a second study, which has seen an adjustment of the supplementation level, indeed shows a better feed efficiency on the supplemented group than the control.

INTRODUCTION

Depuis 2006, les antibiotiques utilisés jusqu'alors en tant que facteurs de croissance ont été interdits en Union Européenne. Ceci, afin d'éviter l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, qui présentent un risque pour la santé humaine. Ce changement de réglementation a impliqué la recherche d'alternatives pour améliorer la santé et les performances de croissance des animaux. Les bénéfices de ces alternatives sur les performances pourraient, entre autres, être liés à des modifications du microbiote intestinal, participant à l'équilibre de celui-ci, et donc la santé de l'hôte. Dans ce cadre, les fractions de levures riches en mannanes et β -glucanes se sont révélées prometteuses dans de nombreuses études réalisées en poulet de chair. Elles permettraient de réduire les populations d'Entérobactéries pathogènes telles qu'*E. coli* (Morales-Lopez and Brufau, 2013), d'améliorer la réponse immunitaire (Shahir et al., 2014) ainsi que l'intégrité et la fonctionnalité du tube digestif (Pascual et al., 2020).

L'objectif de cette étude est donc de confirmer l'effet des fractions de levures sur les performances des dindes et la composition de leur microflore fécale via séquençage ARN ribosomique (ARNr) 16S.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

1620 dindonneaux femelles B.U.T. 6 d'un jour ont été étudiés, après avoir reçu au couvoir les vaccinations de routine (TRT). A 30 jours, les animaux ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle et l'entérite hémorragique.

La mortalité et la morbidité ont été mesurées quotidiennement, et les animaux morts ou malades ont été retirés de l'essai.

Aucun antibiotique n'a été utilisé durant toute la durée de l'expérimentation.

1.2. Design expérimental et traitements

A leur arrivée à la station expérimentale, les animaux ont été placés aléatoirement dans 18 cases grillagées ($n = 90/\text{case}$), dans un bâtiment conventionnel modifié. La litière composée des copeaux de bois n'a pas été remplacée en cours d'expérience. Les cases, correspondant chacune à une unité expérimentale, ont été assignées à l'un ou l'autre des deux traitements, avec 9 répétitions de 90 animaux par traitement. L'eau et l'aliment ont été distribués *ad libitum*.

Les traitements incluent : un aliment contrôle (CONT), ou l'aliment contrôle contenant une fraction de levure (TRT) (Safmannan®, Phileo by Lesaffre à 500g/t), provenant d'une souche exclusive

de *Saccharomyces cerevisiae* contenant minimum 20% de mannanes et 20% de β -glucanes. Ces aliments étaient de type commercial, formulés selon les recommandations du sélectionneur, et comportaient un aliment démarrage (0-16 jours) distribué sous forme de miettes, trois aliments croissance (17-35 jours, 36-56 jours, 57-77 jours) distribués sous forme granulée, et deux aliments finition (78-91 jours, 92-106 jours) distribués sous forme granulée. Les quantités d'aliments intégrées dans les mangeoires ont été enregistrées, et à la fin de chaque phase d'alimentation, les quantités restantes ont été mesurées. L'ingestion quotidienne moyenne a été déduite de la soustraction entre ces deux valeurs à 16, 35, 56, 77, 91 et 106 jours. Le poids vif (PV) par case a été également mesuré à ces mêmes âges. L'indice de consommation (IC) a été calculé en fonction des données de PV et de consommation d'aliment et corrigé de la mortalité, pour chaque traitement et chaque phase alimentaire. Après que la condition de distribution normale des données ait été vérifiée par un examen de la distribution de résidus, tous les paramètres zootechniques ont été soumis à un test de Student, considérant le traitement comme l'effet principal.

Récemment, à la suite de cet essai, une deuxième étude a été mise en place afin d'affiner le dosage des β -glucanes, pour permettre une modulation optimale du système immunitaire. Les dosages de la fraction de levure étaient les suivants : 500g/t durant les phases de démarrage et croissance 1, 250g/t durant les phases de croissance 2 et croissance 3, 125g/t durant les phases de finition 1 et finition 2. Les aliments ont été formulés comparativement à ceux de la première étude, et les paramètres zootechniques mesurés étaient identiques.

1.3. Echantillonnage et analyse

72 fientes fraîches ont été échantillonnées dans les deux groupes d'animaux à deux périodes d'échantillonnage, à J21 ($n=36$, 18 échantillons/groupe) et J85 ($n=36$, 18 échantillons par groupe). Pour chaque échantillon, 0,5 à 2 g de fientes ont été collectés et transférés dans des tubes de plastique stériles et immédiatement congelés dans de l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à extraction de l'ADN.

Pour l'extraction d'ADN, 0,25g de fientes ont été mis en suspension dans 1 mL de tampon de lyse (500mM NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8,0, 50mM EDTA, 4% SDS, Roche) et homogénéisés 25 secondes à 6500 tr/min. Les échantillons ont ensuite été chauffés à 70°C pendant 15 min, puis centrifugés pour séparer l'ADN des débris cellulaires bactériens. Ce procédé a été répété avec un deuxième tampon de lyse. Les échantillons ont ensuite été soumis à une précipitation de 10 M v/v d'acétate d'ammonium (Sigma), suivi par de l'isopropanol (Sigma) et un lavage à 70% d'éthanol (Carlo Erba), puis remis en

suspension dans 100 μ L de 1X Tris-EDTA (Sigma). Les échantillons ont été traités par une RNase sans DNase (Roche) et incubés pendant une nuit à 4°C, avant d'être traités via le QIAmp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Les ADN extraits ont été analysés par spectromètre (Biospectrometer® Eppendorf) pour mesurer leur quantité et qualité et les préparer à leur référencement.

Les bibliothèques ont été préparées en suivant le protocole de préparation Illumina 16S Library, amplifiant les régions V3 et V4 de l'ARNr 16S afin d'obtenir un seul amplicon d'approximativement 460 bp. Le séquençage a été réalisé avec l'Illumina MiSeq en utilisant le kit MiSeq Reagent v2 500 cycles, caractérisé par une production maximale de 8,5 Gb.

Toutes les séquences ont été analysées en utilisant MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>). La classification taxonomique des données séquencées a été réalisée en appliquant la méthode Best Hit Classification et en utilisant la base de données RDP. Les valeurs moyennes de fréquence relative de l'abondance de chaque niveau taxonomique de chaque échantillon ont été comparées avec un test de Turkey-Kramer et les valeurs de p inférieures à 0,05% ont été considérées comme statistiquement significatives.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

1.1. Performances de production

Nous n'avons pas noté de différence significative sur le PV, l'IC ou la mortalité jusqu'à 91 jours entre le groupe contrôle et le groupe supplémenté. Cela n'est pas surprenant dans la mesure où les fractions de levures sont largement reconnues pour avoir un effet plus important chez les animaux élevés en conditions stressantes, notamment en conditions commerciales classiques, ou soumis à des challenges thermique (Sohail et al., 2013), immunitaires (Zhang et al., 2012) ou pathogènes (Fernandez et al., 2000). Cependant, le groupe TRT a atteint un poids vif légèrement inférieur à l'abattage (Tableau 1) dû à de moindres performances durant la phase de finition (92-106 jours). Ceci pourrait suggérer un dosage trop important de l'additif durant cette période. De nombreuses études (Guo et al., 2003 ; Pascual et al., 2020) ont reporté les effets immunomodulateurs des β -glucanes. Le système immunitaire étant prioritaire dans l'allocation des nutriments (Klasing, 2007), un dosage trop important pourrait sur-stimuler le système immunitaire au détriment de la croissance.

Lors de la seconde étude, les dosages en fraction de levures ont été ajustés pour permettre une modulation optimale du système immunitaire. Les niveaux de performance (Tableau 2) montrent que ce dosage a effectivement permis d'améliorer les performances des dindes supplémentées par rapport

aux animaux du groupe contrôle. L'IC a été significativement réduit de 0,04 point.

1.2. Analyse du microbiote fécal

Les analyses de microbiote réalisées lors du premier essai ont montré qu'à 21 jours, la quantité de Proteobacteria s'élevait à plus de 20% dans les fientes collectées dans le groupe CONT, alors qu'elle atteignait moins de 1% dans les fientes appartenant au groupe TRT (Graphe 1). L'âge de prélèvement correspondait à une période de transition alimentaire, avec changement de présentation de l'aliment, période à risque de prolifération de bactéries pathogènes. La quantité de Firmicutes (phylum prédominant dans les deux groupes) représentait une proportion plus importante (+25 points) dans le groupe TRT comparativement au groupe CONT ($p = 0.054$). Les autres phyla détectés étaient également plus représentés dans le groupe TRT (avec les Bacteroïdètes atteignant 4,41% (vs 1,98%, $p=0,849$) et les Actinobactéries atteignant 3,51% (vs 0,91%, $p=0,002$)).

Dans le phylum des Firmicutes, la famille des Lactobacillaceae (Graphe 2) représentait une part significativement plus importante dans le groupe TRT que dans le groupe CONT (30,756% vs 19,271% respectivement, $p=0,037$) avec une prédominance du genre *Lactobacillus* (30,146% vs 19,124% ; $p=0,037$). Les bactéries appartenant à ce genre sont reconnues pour leurs effets bénéfiques sur l'hôte et largement utilisés comme probiotiques en volaille (Kalavathy et al., 2003 ; Jin et al., 1998). De même, la famille des Clostridiaceae était significativement plus représentée dans le groupe TRT (22,750 vs 9,154, $p=0,001$) dont les genres *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* et *Roseburia*. Ces bactéries sont productrices d'acides organiques permettant d'inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes (Apajalahti and Vienola, 2016 ; Louis et al., 2010).

Au sein du phylum des Actinobactéries, le genre *Bifidobacterium* était également significativement plus important dans le groupe TRT (0,371%) que dans le groupe CONT (3,182% ; $p<0,001$). Ce genre est également utilisé comme probiotique du fait de sa capacité à produire de l'acide lactique (Jung et al., 2008).

A l'inverse, la plus forte abondance de Proteobactéries dans les fientes des animaux appartenant au groupe CONT était majoritairement due à la famille des Enterobacteriaceae (12,874% vs 0,235% ; $p<0,001$) (Graphe 2), et notamment des genres *Klebsiella* (8,601% vs 0,053% ; $p<0,001$), *Acinetobacter* (7,370% vs 0,116% ; $p=0,001$), *Shigella* (2,817% vs 0,045% ; $p=0,029$), *Escherichia* (0,377% vs 0,077% ; $p=0,004$), *Enterobacter* (0,305% vs 0,007% ; $p<0,001$), et *Erwinia* (0,286% vs 0,003% ; $p<0,001$), dont la plupart peuvent être potentiellement responsables d'infections locales ou systémiques (Andra et al., 1998 ; Saif et al., 2003).

La présence de bactéries bénéfiques en proportions plus faibles chez les animaux du groupe CONT, associée à la présence significativement plus élevée de bactéries appartenant à la famille des Enterobacteriaceae démontre la plus grande fragilité du microbiote des animaux de ce groupe, qui pourrait être enclin à voir la prolifération de bactéries pathogènes en cas de stress.

A 85 jours, les quantités de Proteobacteries et Actinobacteries, non présentées ici, sont retrouvées dans des proportions comparables dans les deux groupes. A cet âge, la famille des Bacillaceae présentait un niveau significativement plus élevé dans le groupe TRT (2,061% vs 1,256% ; $p=0,043$). Les espèces dont l'abondance était supérieure à 1% et significativement plus élevées dans le groupe TRT comportaient entre autres de nombreuses espèces du genre *Lactobacillus*, ou encore *Clostridium bifermentans* et *Pediococcus acidilactici*.

CONCLUSION

Les fientes des dindes appartenant au groupe TRT ont montré une plus grande abondance de microorganismes bénéfiques (i.e. différentes espèces de *Lactobacillus*, ainsi que *Clostridium bifermentans* et *Pediococcus acidilactici*) comparativement au groupe contrôle, à 21 jours comme à 85 jours. De plus, à 21 jours, une proportion beaucoup plus faible de Protéobactéries (i.e. *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter* et *Erwinia*) n'a pas été retrouvée chez les animaux du groupe supplémenté. Ces résultats indiquent que la supplémentation avec des fractions de levures induit des effets positifs sur la composition de la flore fécale de dindes. Dans cette étude, elles permettent à la fois une réduction des populations potentiellement néfastes pour l'hôte et une augmentation des populations bénéfiques, promouvant une bonne santé intestinale. La promotion et/ou le maintien d'un microbiote équilibré est important. En effet, un microbiote fragilisé, c'est-à-dire avec une moindre capacité à absorber les stress liés aux conditions d'élevage, pourrait entraîner des surcoûts liés à des hausses d'utilisation d'antibiotiques et des baisses de performances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Andra O., Jesus J.H., Duarte C., 1998. IVCVM, 1-4
Apajalahti J., Vienola K., 2016. Anim. Feed Sci. Technol., 221, 323-330
Fernandez F., Hinton M., Van Gils B., 2000. Avian. Pathol., 29, 575-581.
Guo Y., Ali R.A., Qureshi M.A., 2003. Immunopharmacol Immunotoxicol., 25, 461-472
Jin L., Ho Y. Abdullah N., Jalaludin S., 1998. Poult. Sci., 77, 1259-1265
Jung S.J., Houde R., Baurhoo B., Zhao X., Lee B.H., 2008. Poult. Sci., 87, 1694-1699
Kalavathy R., Abdulah N., Jalaludin S., Ho Y.W., 2003. Br. Poult. Sci., 44, 139-144
Klasing K.C., 2007. Br. Poult. Sci., 48, 525-537
Louis P., Young P. Holtrop G., Flint H.J., 2010. Environ Microbiol., 12, 304-314
Morales-Lopez R., Brufau J., 2013. Br. Poult. Sci., 54, 247-251
Pascual A., Pauletto M., Giantin M., Radaelli G., Ballarin C., Birolo M., Zomeno C., Dacasto M., Bortoletti M., Vascellari M., Xiccato G., Trocino A., 2020. J. Animal Sci. Biotechnol., 11, 40.
Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E., 2003. Diseases of Poultry p.849
Shahir M.H., Sharifi M., Afsarian O., Mousavi S.S., 2014. J. Vet. Res. 60, 79-84
Sohail M.U., Ijaz A., Younus M., Shabbir M.Z., Kamran Z., Ahmad S., Anwar H., Yousaf M.S., Ashraf K., Shahzad A.H., Rehman H., 2013. J. of Appl. Poult. Res., 22, 485-491.
Zhang S., Liao B., Li X., Li L., Ma L., Yan X., 2012. Br. J. Nutr., 107, 858-866

Tableau 1. Performances de production de l'étude #1 (1-106 jours)

	1-106 jours		
	p	groupe CONT	groupe TRT
Poids vif (g/animal)	0,02	9,658 ± 35,3 a	9,508 ± 43,2 b
Ingestion (kg/animal)	0,66	22,44 ± 0,11	22,36 ± 0,14
Indice de consommation*	0,07	2,341 ± 0,01	2,366 ± 0,01
Mortalité	0,73	1,11 ± 0,02	0,86 ± 0,02

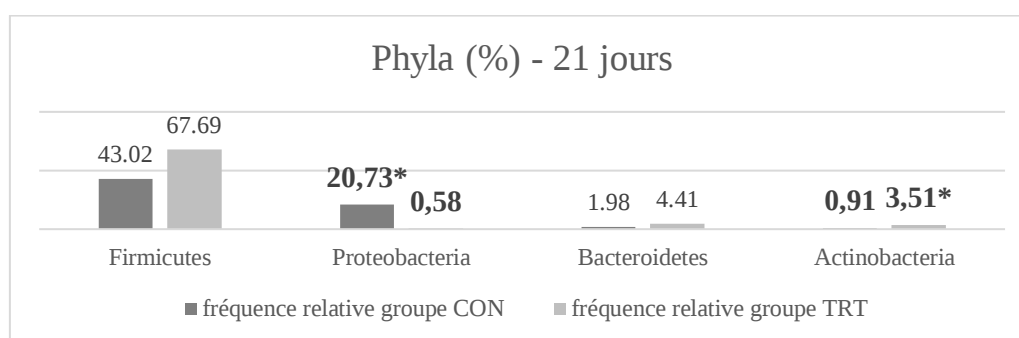
* corrigé sur la mortalité

Tableau 2. Performances de production de l'étude #2 (1-107 jours)

	1-107 jours		
	p	groupe CONT	groupe TRT
Poids vif (g/animal)	0,36	10,437	10,516
Ingestion (kg/animal)	0,53	23,69	23,56
Indice de consommation*	0,01	2,313 b	2,272 a
Mortalité	0,73	1,73	1,36

* corrigé sur la mortalité

Graph 1. Phyla dont les valeurs moyennes d'abondance est $\geq 0,1\%$ dans au moins l'un des groupes – 21 jours.
Les valeurs en gras se réfèrent aux phyla dont les valeurs moyennes d'abondance sont significativement différentes entre les deux groupes ($p \leq 0,005$)



Graph 2. Familles dont les valeurs moyennes d'abondance est $\geq 1\%$ dans au moins l'un des groupes - 21 jours
Les valeurs en gras se réfèrent aux phyla dont les valeurs moyennes d'abondance sont significativement différentes entre les deux groupes ($p \leq 0,005$)

