

EFFET DE L'UTILISATION D'UN MELANGE D'ACIDES ORGANIQUES ET D'HUILES ESSENTIELLES MICRO ENCAPSULÉS SUR LES PERFORMANCES ET LE MICROBIOTE INTESTINAL DE POULETS DE CHAIR

Roche Ségolène ¹, Sary Kathleen ², Scott Peter ³ and Wilson Tim ³,

¹JEFO Europe, 2 rue Claude Chappe, Espace Performance La Fleuriaye, 44 481
CARQUEFOU, FRANCE (sroche@jefo.ca)

²JEFO Nutrition, 5020 avenue Jefe, SAINT-HYACINTHE, J2R 2E7, QC, CANADA

³Scolexia Animal and Avian Health, 16 Learmonth Street, Moonee Ponds, 3039 VICTORIA,
AUSTRALIE

RÉSUMÉ

Le microbiote intestinal est un élément clé de la santé intestinale et pourrait influencer les performances des volailles. L'objectif de l'étude est d'évaluer le microbiote intestinal et les performances de poulets de chair qui reçoivent un mélange d'acides organiques et d'huiles essentielles micro encapsulés AOm+HEm. Un total de 612 poussins Ross 308 d'un jour a été aléatoirement réparti en trois traitements (204 animaux chacun) de 12 répétitions : 1) Aliment + 100 ppm lasalocide (Contrôle); 2) Contrôle + 300 ppm AOm+HEm; et 3) Contrôle + 1500 ppm AOm+HEm. Le poids des oiseaux élevés en parquet et la consommation ont été mesurés hebdomadairement jusqu'à 28 jours d'âge. Les contenus caecaux à 14 et 28 j ont été prélevés puis les profils du microbiote ont été effectués par séquençage de l'ARNr 16S et analysés par le logiciel QIIME. L'analyse des données a été réalisée avec une ANOVA. Les poids des oiseaux de AOm+HEm 300 ppm et 1500 ppm sont significativement augmentés par rapport au contrôle à 21 j et à 28 j pour AOm+HEm 300 ppm. L'IC ne diffère pas entre les traitements ; cependant, il y a une tendance à l'amélioration de l'IC de 14 à 21 j pour AOm+HEm 300 ppm et 1500 ppm, tout comme de 21 à 28 j pour AOm+HEm 300 ppm. La richesse et l'uniformité du microbiote sont similaires pour tous les traitements dans les caeca à 14 et 28 j. Concernant la composition du microbiote, des modifications ont été observées. En particulier, à 28 j dans les caeca, avec AOm+HEm 300 ppm et 1500 ppm, l'abondance de bactéries de l'ordre des clostridiales a baissé, et avec AOm+HEm 1500 ppm, l'abondance relative de bactéries du genre *Lactobacillus* a fortement augmenté. En conclusion, la supplémentation de AOm+HEm sur des poulets de chair ne modifie pas la diversité du microbiote mais modifie sa composition ce qui pourrait expliquer les effets observés sur les performances zootechniques.

ABSTRACT

Performance and Intestinal Microbial Profile of Broiler Chickens Supplemented with a Blend of Protected Organic Acids and Essential Oils

The increasing concern about the use of antibiotics in poultry production has changed the ways in which producers manage the birds' overall health. Currently, alternative products are added in poultry feeds to prevent and control GI-tract infections that adversely affect performance. A study was conducted to determine the effects of a blend of protected organic acids and essential oils OAm+EOM in performance and intestinal microbiota of broiler chickens. A total of 612 Ross 308 day old chicks were randomly assigned to receive 3 treatments (each 204 animals) with 12 replicates: 1) basal diet + 100 ppm lasalocid (Control), 2) Control + OAm+EOM 300 ppm, and 3) Control + OAm+EOM 1500 ppm. Chickens were weight by pens and feed intake measured weekly until 28 days. On d 14 and 28, 1 bird from each pen was sacrificed to collect intestinal samples for microbiota analysis using high-throughput sequencing based on 16S rRNA genes and analyzed with QIIME software. The statistical analysis was made with ANOVA. The BW of birds in OAm+EOM 300 ppm and 1500 ppm at d 21 was significantly increased relative to control, as was the BW of birds in OAm+EOM 300 ppm at d 28. The FCR was not different between treatments; however, there was a trend towards improved FCR at d 21 in OAm+EOM 300 ppm and 1500 ppm, as well as at d 28 in OAm+EOM 300 ppm. Sequencing data at d 14 and 28 revealed retained complexity and overall structure of the cecal microbiota across treatments. At 28 days, in the ceca, a reduction of abundance of the *Clostridiales* order was observed with OAm+EOM 300 ppm and 1500 ppm, and an increase of the abundance of *Lactobacillus* species was found with OAm+EOM 1500 ppm. Overall, the supplementation of a blend of OAm+EOM had no adverse effect on the microbial diversity of the intestine and appears to offer benefits with respect to gut health and productivity in broiler chickens.

INTRODUCTION

La filière volaille est toujours à la recherche de moyens d'amélioration de sa rentabilité technico-économique. Des solutions alternatives ont été introduites dans les productions de volailles pour diminuer l'utilisation des molécules antibiotiques, pour aider au contrôle des maladies et pour améliorer les performances zootechniques. Le microbiote intestinal pourrait influencer les performances de croissance des volailles (Torok *et al.*, 2011 ; Stanley *et al.*, 2014). Il a été démontré qu'une combinaison d'acides organiques et d'huiles essentielles micro-encapsulés permettait de maintenir la population de *Clostridium spp.* à un niveau bas dans les caeca de poulets de 28 jours (Fravalo *et al.*, 2011). En particulier *C. perfringens*, pathogène d'importance pour la production de volaille, doit être contrôlé dans les caeca pour limiter les maladies. L'utilisation d'huiles essentielles réduit significativement le nombre d'oiseaux présentant des lésions nécrotiques dans le tube digestif. La croissance de *C. perfringens in vitro* a été inhibée par de faibles concentrations de thymol et cinnamaldehyde (Timbermont *et al.*, 2010). L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact selon deux niveaux de doses d'une solution à base d'acides organiques et d'huiles essentielles micro-encapsulés spécifiquement pour la volaille (AOm+HEm), sur les performances de croissance de poulets de chair et sur leur microbiote intestinal.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1 Dispositif et conduite d'élevage

Un total de 612 poulets mâles ROSS 308 d'un jour provenant d'un couvoir local a été réparti aléatoirement dans 3 traitements de 12 répétitions (204 animaux/traitement). Le bâtiment de type commercial était situé à Victoria en Australie. Les oiseaux ont été élevés sur litière, dans un bâtiment ancien de type dynamique transversal équipé de radiant gaz et refroidi par un système de brumisation. La densité était de 17 animaux par parquet de 1,56m², soit 11 animaux/m². La consigne de démarrage de température était de 32°C. Les programmes de lumière correspondaient aux recommandations des compagnies génétiques. Les aliments ont été formulés selon les niveaux commerciaux avec un profil blé/soja et contenaient du Lasalocide à 100 ppm. Le programme alimentaire se composait de 3 aliments : Démarrage de 0 à 12 j, croissance de 13 à 25 j et finition de 25j à l'abattage. Les trois traitements étaient les suivants : 1) Contrôle ; 2) Contrôle avec AOm+HEm à 300 ppm (AOm+HEm 300 ppm) ; et 3) Contrôle avec AOm+HEm à 1500 ppm (AOm+HEm 1500 ppm). La solution AOm+HEm étudiée était le Gallinat +, produit par Jefe Nutrition (5020 avenue Jefe, Saint-Hyacinthe, Canada).

1.2 Données collectées

Il a été réalisé :

- Un enregistrement des performances zootechniques : suivi quotidien de la mortalité, pesée des animaux et suivi de la consommation en aliment hebdomadairement et par parquet.
- À 14 et 28 jours, un oiseau de chaque parquet a été prélevé aléatoirement pour nécropsie (dislocation cervicale) et échantillonnage. Les échantillons du contenu caecal et de la muqueuse de l'iléon (sur une section de 10 cm directement après le diverticule de Meckel, grattage de la muqueuse après retrait du contenu intestinal) ont été prélevés et conservés à -20°C jusqu'au traitement.

1.3 Isolement de l'ADN bactérien et préparation pour analyse

Afin de réaliser une analyse du microbiote, l'ADN bactérien a été extrait des échantillons de l'iléon et des caeca en utilisant un kit commercial (ADN Faecal BIOLINE ISOLATE), puis amplifié pour la région V3-V4 de l'ARNr 16S bactérien (New England Biolabs). Les amplicons ont été séquencés à haut débit sur un instrument Illumina MiSeq. Les échantillons ont été caractérisés en utilisant une moyenne d'au minimum 20 000 séquences par échantillon. Ensuite, les séquences ont été analysées en utilisant le logiciel QIIME (version 1.9 software), puis elles ont été regroupées en « Operational Taxonomical Units » (OTU) en utilisant l'algorithme Uclust avec un seuil de 97%. Les relations phylogénétiques des OTU identifiées ont été classées avec BLASTing (Tableau 2).

La diversité du microbiote a été définie par les indices de richesse, d'uniformité et de Shannon. La richesse représente le nombre d'espèces bactériennes. L'uniformité révèle les similitudes ou les différences en abondance pour chaque espèce. Plus l'uniformité du microbiote est faible, plus l'indice approche de zéro et à l'opposé, lorsque l'uniformité est élevée l'indice s'approche de 1. L'indice de Shannon a été calculé pour exprimer la diversité du microbiote. Si cette valeur est faible l'indice de Shannon est proche de zéro.

1.4 Analyse des données

Pour les données d'élevage, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur (Traitement) a été réalisée. En test *post hoc*, un test de Tukey a permis de comparer les moyennes 2 à 2, le seuil de significativité défini est 5%. Pour la diversité du microbiote, des analyses de variances ont été réalisées pour étudier d'une part l'effet âge pour l'indice de Shannon, et d'autre part, l'effet des traitements pour les indices de richesse et d'uniformité. Pour les abondances relatives des différents OTU, une analyse de variance à un facteur (Traitement) a été réalisée sur les données de 14 j et 28 j.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Performances zootechniques

Le poids vif était significativement augmenté à 21 j (52 g de plus pour AOm+HEm 300 ppm et 40 g pour AOm+HEm 1500 ppm) et à 28 j avec 50g de plus pour AOm+HEm 300 ppm que le régime contrôle (Tableau 1). Aucune différence significative n'a été observée pour les consommations d'aliment. L'IC était similaire entre les traitements de 0 à 7 jours et de 7 à 14 jours, et avait une tendance à l'amélioration de 14 à 21 jours de -0,07 pour AOm+HEm 300 ppm et 1500 ppm, et une tendance à l'amélioration de 21 à 28 jours de -0,09 pour AOm+HEm 300 ppm (Tableau 1). Ces résultats sont en accord avec les tendances décrites par Bozkurt *et al* (2012) sur l'amélioration des paramètres de production quand les acides organiques et les huiles essentielles sont utilisés en combinaison.

2.2. Microbiote

Un total de 144 échantillons, avec deux prélèvements intestinaux pour 36 oiseaux à 14 j et 28 j, a été analysé générant un total de 2,9 millions de séquences après le filtrage de qualité. Il n'y a pas eu de différence significative dans le nombre de lectures pour chacun des traitements, indiquant que les données pouvaient être utilisées pour comparer les communautés bactériennes entre les traitements. Les résultats concernant la muqueuse de l'iléon n'ont pas montré de différences statistiques en terme de diversité et d'abondance des espèces bactériennes aussi bien à 14 j qu'à 28 j. Par contre, différents effets ont été observés sur les résultats du microbiote des contenus caecaux.

2.2.1. Diversité du microbiote caecal

La diversité du microbiote défini par l'indice de Shannon pour l'ensemble des traitements était significativement plus élevée à 28 j qu'à 14 j ($P < 0.01$) (Données non montrées). Le microbiote caecal n'a pas montré de différences statistiques entre les traitements aussi bien à 14 jours qu'à 28 jours, pour les indices d'uniformité et de richesse (Figure 1).

Dans l'étude de Danzeisen *et al.* (2011), les indices de diversité (Chao1, Shannon et Simpson) avaient augmenté avec l'âge des oiseaux, ce qui suit les mêmes évolutions que l'augmentation de la diversité de 14 et 28 jours dans notre étude. Par ailleurs, les présents résultats indiquent que AOm+HEm 300 ppm ou 1500 ppm n'ont pas d'effet non-désiré sur la diversité du microbiote. Stanley *et al.* (2013) a souligné suite à son étude sur la variabilité du microbiote, que le développement d'un bon microbiote dès le jeune âge est primordial pour permettre à l'oiseau de répondre aux maladies et ainsi améliorer la survie.

2.2.2. Abondance des espèces du microbiote caecal

Des différences d'abondance d'OTU ont été identifiées entre le contrôle et les traitements AOm+HEm, à 14j, avec 19 OTU et à 28 j, avec 26 OTU. Pour chaque OTU, un ratio a été calculé à partir de l'abondance de chacun des traitements par rapport au contrôle. Un ratio supérieur à 1 indique une abondance plus importante pour le traitement et un ratio inférieur à 1, une abondance plus faible pour le traitement. Lorsque les ratios des 2 traitement par rapport au contrôle sont affectés dans le même sens, l'OTU concerné est présenté dans les résultats.

À 14 j, les bactéries présentes en plus grande abondance avec les traitements AOm+HEm 300 ppm et 1500 ppm par rapport au régime contrôle étaient des genres *Ruminococcus* et *Lactobacillus*, et en moins grande abondance du genre *Faecalibacterium* et de la famille des *Ruminococcaceae* (Figure 2a). Pour AOm+HEm 300 ppm, on notait également une augmentation de bactéries des genres *Blautia*. Avec AOm+HEm 1500 ppm, des bactéries appartenant au genre *Eubacterium* et aux familles *Ruminococcaceae* et *Lachnospiraceae* présentaient une plus grande abondance, et des bactéries non classifiées du phylum des *Tenericutes* présentaient une diminution (Figure 2a, Tableau 2).

À 28 j, les principales différences détectées dans les caeca des oiseaux avec les traitements AOm+HEm 300 ppm et 1500 ppm par rapport au régime contrôle étaient liées à une réduction de bactéries de l'ordre des *Clostridiales* et à une augmentation de l'abondance de *Lactobacillus* (Figure 2b, Tableau 2). Ainsi, des bactéries proches du genre *Blautia* et de la famille des *Ruminococcaceae* avaient une moindre abondance, tandis que plusieurs espèces du genre *Lactobacillus* avaient obtenu une plus grande abondance. Par ailleurs, la dose de 1500 ppm a entraîné une augmentation d'abondance d'un plus grand nombre de bactéries du genre *Lactobacillus*, et des augmentations plus importantes des bactéries de l'espèce *L. salivarius*, montrant un effet différent en fonction de la dose (Figure 2b).

Avec AOm+HEm 300 ppm, 2 OTU de l'ordre des *Clostridiales* baissent dans les caeca à 28 j, or certaines bactéries de l'ordre des *Clostridiales* sont connues pour avoir des effets néfastes sur la santé des animaux et contribuer à un contexte de dysbiose. Cette modification de microbiote pourrait être en lien avec l'amélioration du poids à 28 j, et la tendance de l'amélioration de l'IC de 21 à 28 j.

Avec AOm+HEm 1500 ppm, la baisse des 2 OTU de l'ordre des *Clostridiales* est toujours observées à 28 j dans les caeca. Cependant une forte augmentation de bactéries du genre *Lactobacillus* dont *L. salivarius* est observée avec cette dose.

Bien que les lactobacilles soient connues pour jouer un rôle de régulateur dans le tube digestif en produisant de grandes quantités d'acide lactique et acétique amenant à une réduction du pH (Bjerrum *et al.*, 2006), *L. salivarius* a été associé à des performances zootechniques moindre (IC) (Mignon-Grasteau *et al.*, 2015). Ainsi, l'abondance plus importante de lactobacilles dans les caeca avec AOm+HEm 1500 ppm par rapport à la dose de 300 ppm pourrait expliquer l'absence d'effet sur les performances zootechniques.

CONCLUSION

Dans cette étude, il a été montré que l'utilisation de la solution à base d'acides organiques et d'huiles essentielles (AOm+HEm) modifiait l'abondance de certaines bactéries, avec une diminution de bactéries de l'ordre des clostridiales et une augmentation des lactobacilles à 28 jours dans les contenus de caeca. Ces modifications d'abondance en bactéries se sont effectuées en parallèle avec une amélioration des performances seulement avec la dose de 300 ppm. Cette étude a permis d'améliorer des paramètres de productivité en réponse à l'utilisation de AOm+HEm à 300 ppm en parallèle d'une modification de l'abondance des bactéries du microbiote caecal. Avec 1500 ppm, la disparition de l'effet bénéfique du mélange sur les performances zootechniques pourrait être liée à une abondance trop importante de lactobacilles.

REMERCIEMENTS

Les auteurs aimeraient remercier la collaboration et l'expertise de Dr Robert Moore (RMIT

University, GPO Box 2476, Melbourne VIC 3001 Australia).

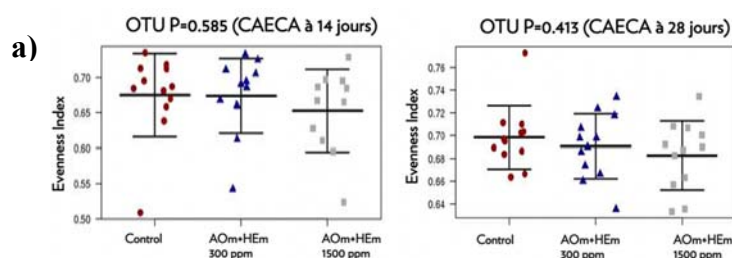
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bjerrum L., R.M., Engberg, T.D. Leser, B.B. Jensen, K. Finster, K.P. Pedersen, 2006. Poultry Science 85 : 1151-1164
- Bozkurt M., K.Kucukyilmaz, A. Catli, M. Cinar, M. Cabuk and A. Alcicek, 2012. Archiv Fur Geflugelkunde Vol 76 (2) : 81-87
- Danzeisen J.L., H.B. Kim, R.E. Isaacson, Z.J. Tu, T.J. Johnson, 2011. PLoS ONE 6(11) : e27949
- Fravalo P., P. Kabore, L. Lahaye, R. Gauthier, J.C. Bodin, F. Respondek, J.M. Fairbrother, A. Letellier, 2011. Proceeding European Poultry Conference
- Mignon-Grasteau S., A. Narcy, N. Rideau, C. Chantry-Darmon, M.-Y. Boscher, N. Sellier, M. Chabault, B. Konsak-Ilievski, E. Le Bihan-Duval, I. Gabriel. 2015. PLoS ONE 10(8) : e0135488
- Stanley D., M.S. Geier, R.J. Hughes, S.E. Denman, R.J. Moore, 2013. PLoS ONE 8(12): e84290
- Stanley D., R. J. Hughes, R. J. Moore, 2014. Applied Microbiology and Biotechnology 98 (10) : 4301-4310
- Timbermont L., A. Lanckriet, J. Dewulf, N. Nollet, K. Schwarzer, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, F. Van Immerseel, 2010. Avian Pathology. 39(2) : 117-214
- Torok V., R. Hughes, L. Mikkelsen, R. Perez-Maldonado, K. Balding, R. MacAlpine, N. Percy, K. Ophel- Keller, 2011. Applied Environmental. Microbiology Vol 77 (17) : 5868-587

Tableau 1. Poids moyen et IC des poulets pour le régime Contrôle, 300 ppm et 1500 ppm de AOm+HEm. Les valeurs distinctes par une lettre (a,b) sont significativement différentes ($P<0,05$) ($n=12$)

Traitements	Poids moyen (kg)				Indice de consommation			
	7 j	14 j	21 j	28 j	1-7 j	7-14 j	14-21 j	21-28 j
Contrôle	0,153	0,446	0,944 a	1657 a	0,632	1,136	1,330	1,719
SD	0,005	0,017	0,033	0,050	0,083	0,118	0,106	0,127
AOm+HEm 300 ppm	0,153	0,453	0,996 b	1707 b	0,635	1,139	1,261	1,627
SD	0,007	0,012	0,018	0,060	0,101	0,091	0,080	0,090
P-value	$P>0,1$	$P>0,1$	0,001	0,048	$P>0,1$	$P>0,1$	0,087	0,06
AOm+HEm 1500 ppm	0,153	0,444	0,984 b	1683 ab	0,605	1,147	1,259	1,656
SD	0,005	0,019	0,001	0,002	0,064	0,122	0,061	0,126
P-value	$P>0,1$	$P>0,1$	0,014	$P>0,1$	$P>0,1$	$P>0,1$	0,063	$P>0,1$

Figure 1. Diversité du microbiote caecal à 14 j et 28 j selon les indices de diversité : uniformité « Evenness » **a)** et richesse « Richness » **b)** pour le régime contrôle, 300 ppm ou 1500 ppm de AOm+HEm (chaque point représente un animal)



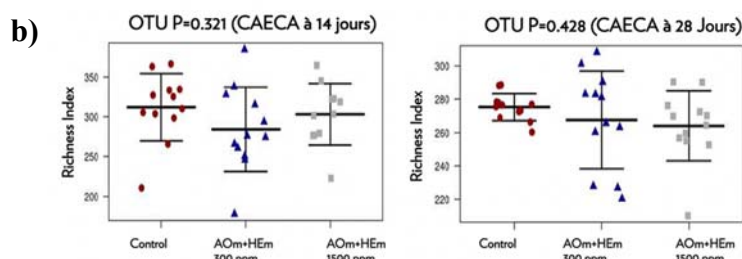


Figure 2. Abondance relative des OTU dissemblables entre le contrôle et les régimes 300 ppm ou 1500 ppm de AOm+HEm à 14 jours **a)** et à 28 jours **b)**. Les valeurs distinctes par une lettre (a,b,c) sont significativement différentes ($P < 0,05$)

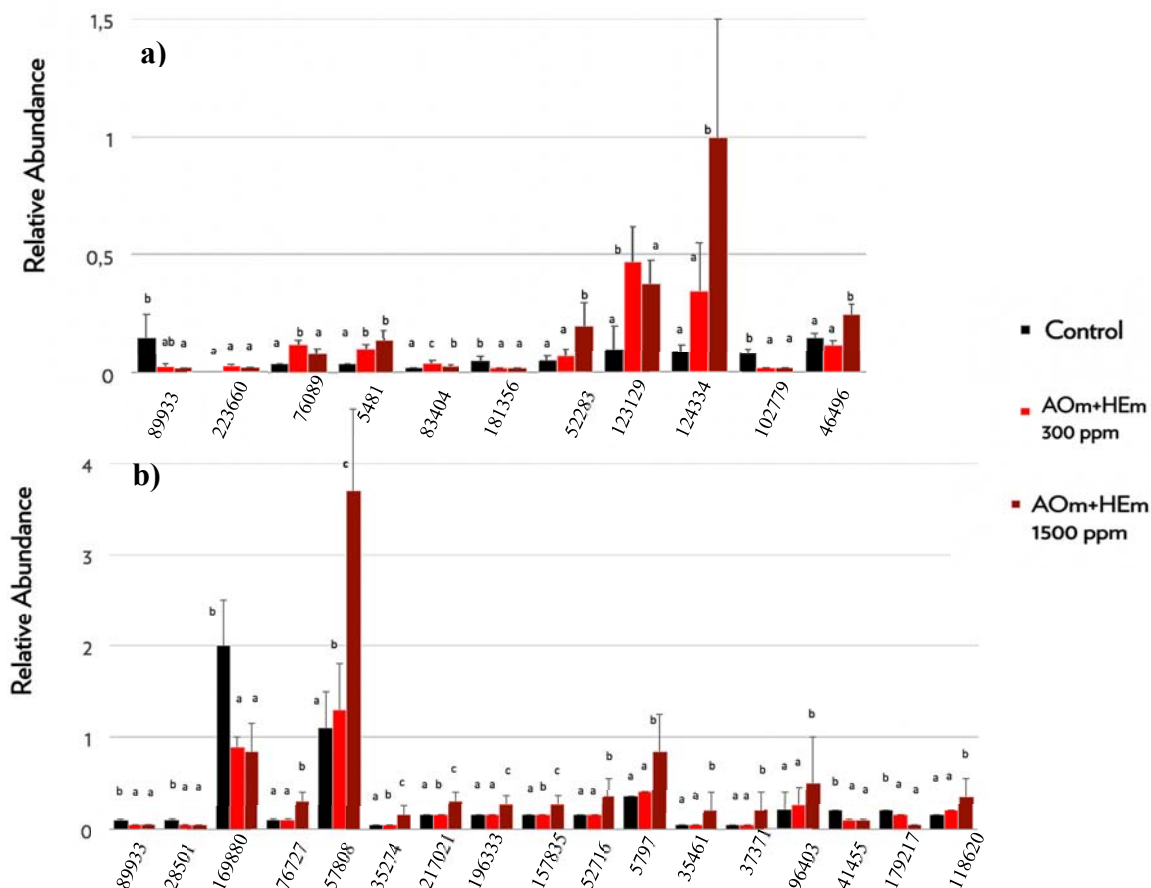


Tableau 2 : Relation phylogénique entre l'OTU et l'identité

OTU	Identité
89933	P_TENERICUTES_O_RF39
223660	P_PROTEOBACTERIA_F_ENTEROBACTERIACEAE
76089	P_FIRMICUTES_G_RUMINOCOCCUS
5481	P_FIRMICUTES_G_RUMINOCOCCUS
83404	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS
181356	P_FIRMICUTES_G_FAEALIBACTERIUM
52283	P_FIRMICUTES_G_EUBACTERIUM
123129	P_FIRMICUTES_G_BLAUTIA
124334	P_FIRMICUTES_F_RUMINOCOCCACEAE
102779	P_FIRMICUTES_F_RUMINOCOCCACEAE
46496	P_FIRMICUTES_F_LACHNOSPIRACEAE
28501	P_FIRMICUTES_O_CLOSTRIDIALES
169880	P_FIRMICUTES_O_CLOSTRIDIALES
76727	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSSALIVARIUS
57808	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSSALIVARIUS
35274	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSSALIVARIUS
217021	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSSALIVARIUS
196333	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSSALIVARIUS
157835	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSSALIVARIUS
52716	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSREUTERI
5297	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSHELVETICUS
35461	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSHELVETICUS
37371	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS_S_LACTOBACILLUSCAPILLATUS
96403	P_FIRMICUTES_G_LACTOBACILLUS
41455	P_FIRMICUTES_G_FAEALIBACTERIUM
179217	P_FIRMICUTES_F_CATABACTERIACEAE
118620	P_ACTINOBACTERIA_G_BIFIDOBACTERIUM_S_BIFIDOBACTERIUMSAECUL