

EFFET DE TROIS PRODUITS PROBIOTIQUES SUR DES POULETS DE CHAIR SOUUMIS A UN CHALLENGE ENTERITE NECROTIQUE A *CLOSTRIDIUM* *PERFRINGENS*

Hofacre Charles¹, Raspoet Ruth², Auclair Eric², Rondel Elen², Gaydos TJ³, Kiros Tadele⁴

¹SOUTHERN POULTRY RESEARCH GROUP - 96 Roquemore Rd – GA 30607 ATHENS, USA

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

³Gaydos Technical Services, LLC, Dallas, Texas, USA

⁴PHILEO BY LESAFFRE - 7475 West Main Street- WI 53214 MILWAUKEE, USA

e.rondel@phileo.lesaffre.com

RÉSUMÉ

L'entérite nécrotique (EN), causée par *Clostridium perfringens* (CP) est une maladie bactérienne responsable de considérables pertes économiques, dues à son impact négatif sur la santé intestinale et le taux de survie en poulet de chair. Une des solutions à la disposition de l'industrie afin de prévenir les entérites nécrotiques est la supplémentation des aliments avec des probiotiques connus pour améliorer la santé et le bien-être animal. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de quatre produits administrés dans l'aliment (paroi de levure A : 250 g/t, et 3 probiotiques : B, C et D, à 5, 6,2 et 5,5 log CFU/g d'aliment, respectivement) sur la réduction des effets de CP (indice de consommation, poids vif, mortalité) dans des conditions de challenge entérite nécrotique. 3000 poussins d'un jour ont été assignés à 6 groupes de 10 cases par groupe et 50 poulets par case : i) un groupe contrôle négatif non inoculé (Nctrl) et un contrôle positif inoculé (Pctrl) ; (ii) 4 groupes traitement (A, B, C, D). Après administration d'un challenge *E. maxima* à J14, l'EN a été induite par ajout de CP dans l'eau de boisson à une dose de 1×10^8 CFU/mL à J18 et J19. L'évaluation a été effectuée sur 42 jours. A J35, les groupes traitements présentaient un poids vif plus élevé et un indice de consommation (IC) plus faible que les groupes Nctrl et Pctrl (10% et 16% en moyenne, respectivement). A J42, les groupes traités présentaient tous un IC significativement meilleur que le groupe Pctrl (1,81), avec l'IC ajusté le plus faible pour le groupe B (1,72). Les animaux des groupes A, B, C et D présentaient un poids vif plus élevé comparé à Pctrl. Les probiotiques n'ont cependant pas permis de réduire la mortalité. Le produit B, utilisé à la plus faible concentration dans l'aliment, a présenté des performances supérieures aux autres probiotiques testés.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of three probiotic products to control *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis in broilers

Necrotic enteritis (NE) caused by *Clostridium perfringens* (CP) is a devastating bacterial disease responsible for considerable economic losses, due to its negative impact on intestinal health and high mortality in broilers. To prevent NE, supplementing probiotic in feed has been considered as a solution, and seems to improve both bird health status and animal welfare. The present study aims at assessing the effect of four products administered in the feed (yeast fractions A: 250g/t, and 3 probiotic products: B, C and D at 5, 6.2 and 5.5 log CFU/g of feed, respectively) in reducing the effects of CP (feed conversion, body weight and mortality) in a moderate NE challenge. 3000 day-of-hatch chicks were assigned to six groups: (i) two control groups, negative control without NE challenge (Nctrl) and positive control (Pctrl) with NE challenge; (ii) four treated groups (A, B, C, D) with ten-replicate pens per group and 50 birds per pen. The trial lasted 42 days. After the administration of an *E. maxima* challenge at D14, NE was induced by adding CP to the water at dose 1×10^8 CFU/ml on d 18 and 19. On d 35, treated groups had lower FCR and heavier body weight than both Nctrl and Pctrl (10% and 16% on average respectively). At d 42, group B had the lowest mortality adjusted FCR (1.72) compared to D (1.76). Animals from groups A, B, C, D had higher body weight compared to Pctrl, although none of the probiotics was able to reduce mortality. Although probiotic B was used at the lowest concentration in feed it outperforms other probiotics products.

INTRODUCTION

Clostridium perfringens (CP) est une bactérie commensale du tube digestif des volailles avec la capacité de sporuler (Opengart, 2008), la rendant ainsi très résistante à une variété de conditions environnementales. Il n'est donc pas surprenant qu'elle soit communément retrouvée dans les litières, constituant ainsi un réservoir de contaminations potentielles. La période à risque de flambée des cas d'entérite nécrotique (EN), maladie causée par CP, s'échelonne ordinairement de 2 à 6 semaines d'âge (Hunter et al., 2019). La plupart des cas d'EN reste au stade subclinique, mais provoquent des dommages sur l'intestin de manière chronique (Wu et al., 2019), engendrant alors une mauvaise absorption des nutriments, une baisse du gain de poids et une baisse globale des performances (Elwinger et al., 1992). Certains facteurs, comme les infections à coccidies du genre *Eimeria*, favorisent la croissance de souches de CP toxigènes, à l'origine de lésions intestinales caractéristiques de la maladie (Timermont et al., 2011). Ces infections à CP sont responsables de pertes économiques considérables pour l'industrie, estimées à 6 milliards de dollars à l'échelle mondiale (Wade and Keyburn, 2015).

Plusieurs études ont examiné l'efficacité de différentes souches de *Bacillus spp.* à réduire les populations de CP dans l'intestin, les risques de développement d'EN et/ou à en atténuer les effets négatifs (Jayaraman et al., 2013, Schoster et al., 2013, Whelan et al., 2018). La capacité à sporuler des bactéries Gram positives du genre *Bacillus* en font des candidats probiotiques particulièrement intéressants pour l'industrie de la volaille, grâce à leurs capacités à résister aux processus de granulation et à l'environnement gastrique des animaux (Elshaghabe et al., 2017). Des études *in vivo* ont montré que les probiotiques à base de *Bacillus* permettaient la réduction des populations de CP, modulaient le microbiote intestinal et augmentaient les performances des animaux (Whelan et al., 2018, Xu et al., 2018). L'objectif de cette étude était donc d'évaluer les effets d'un probiotique à base de 3 souches de *Bacillus* pour réduire les effets négatifs d'une EN induite sur le poids vif, l'indice de consommation et la mortalité, en comparaison avec deux autres produits probiotiques et une paroi de levure.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

Trois mille (3000) poussins mâles d'un jour Ross x Ross ont été sexés au couvoir et envoyés à la station Southern Poultry Research Group (Athens, USA), où ils ont été vaccinés à l'aide d'un vaccin coccidiose commercial, au dosage recommandé par le fournisseur.

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.

Les pratiques effectuées sur les animaux étaient conformes au Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (FASS, 1999).

1.2. Design expérimental et traitements

Les 3000 oiseaux ont été assignés aléatoirement à l'un des 6 groupes (10 répétitions par groupe, 50 animaux par case) et placés dans des cases de 1,5 x 3 m (densité de 11 oiseaux/m²), contenant une litière à base de copeaux de bois. Lors de leur placement (J0), le poids vif du groupe a été mesuré. L'eau et l'aliment ont été distribués *ad libitum*.

Les aliments de type commercial, contenaient des matières premières communément utilisés aux USA, selon la segmentation suivante : démarrage de J0 à J14, distribué sous forme de miettes ; croissance de J14 à J35, distribué sous forme granulée ; et finition de J35 à J42, distribué sous forme granulée.

Les traitements incluaient : deux groupes contrôles, négatif (Nctrl) et positif (Pctrl) recevant l'aliment commercial de base, un groupe A recevant l'aliment de base supplémenté avec une paroi de levure à 250g/t, un groupe B recevant l'aliment de base supplémenté avec le probiotique B (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* agrémentés d'une technologie de germination accélérée (Go Technology®), Microsaf®, Phileo by Lesaffre) à 5 log CFU/g, un groupe C recevant l'aliment de base supplémenté avec le probiotique C (*Bacillus licheniformis*) à 6,2 log CFU/g, un groupe D recevant l'aliment de base supplémenté avec le probiotique D (*Bacillus subtilis*) à 5,5 log CFU/g. Les dosages de chaque probiotique correspondaient à ceux recommandés par les fournisseurs.

A l'exception du groupe Nctrl, tous les groupes ont été soumis à un challenge EN.

Le poids vif (PV) a été mesuré par case à J0, J14, J35 et J42. Les quantités d'aliments intégrées dans les mangeoires ont été enregistrées à J0, J14 et J35 (au début des phases démarrage, croissance et finition respectivement), et à la fin de chaque phase d'alimentation (J14, J35, J42), les quantités restantes ont été mesurées. L'ingestion quotidienne moyenne a été déduite de la soustraction entre ces deux valeurs. 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.

L'évaluation statistique des données a été réalisée avec le logiciel Statistix pour Windows (logiciel analytique, Tallahassee, FL). Tous les paramètres ont été soumis à un test de Student, considérant le traitement comme l'effet principal.

1.3. Challenge, échantillonnage et analyse

Le modèle de challenge EN consistait en l'administration du vaccin coccidiose à J0 et de la souche de *Clostridium perfringens* #6 (CP#6) via eau de boisson (Hofacre et al., 1998).

Afin de favoriser la colonisation de CP dans le tube digestif, une solution contenant des oocystes d'*E. maxima* (20mL par case) a été pulvérisée dans les mangeoires à J14 en plus de la vaccination coccidiose à J0 (Tableau 1). La souche de CP#6 a préalablement été mise en culture pendant 15 heures à 37°C dans 500 mL de milieu de thioglycollate contenant 2% d'extrait de bœuf, atteignant la concentration de 1×10^8 CFU/mL. L'aliment et l'eau ont été retirés, pour tous les groupes, dont le groupe Nctrl, deux à trois heures avant l'administration de CP#6, à J18 et J19. Une quantité mesurée d'eau (environ 125 mL de CP#6 pour 75 mL d'eau) a été utilisée pour chaque case correspondant aux groupes challengés, avec une consommation dans les 30 min. Une fois cette solution consommée, l'eau et l'aliment ont été restitués dans les cases.

Afin de vérifier le succès du challenge EN, les scores lésionnels à EN ont été mesurés à J21. Les scores lésionnels ont été comparés via une analyse non paramétrique de Kruskal-Wallis.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

A J14, soit avant le challenge, aucune différence significative n'a été observée entre les lots sur tous les paramètres étudiés.

Les scores lésionnels, mesurés à J21, étaient significativement plus élevés pour tous les groupes challengés par rapport au groupe Nctrl, montrant le succès du challenge EN (Tableau 2). Aucun produit n'a cependant montré d'effet significatif sur ces scores lésionnels comparativement au groupe Pctrl.

Le poids vif du groupe Pctrl, inoculé avec *E. maxima* et CP a diminué significativement comparativement au groupe Nctrl, puisqu'à 35 jours, le groupe Pctrl présentait un poids vif inférieur de 70g (1,72 kg vs 1,65 kg, $p < 0,05$) (Tableau 3). La supplémentation avec tous les produits testés a conduit à l'augmentation significative du poids vif, non seulement comparativement au Pctrl mais également au Nctrl. De plus, l'ingestion par les animaux des groupes traités était supérieure à celle des animaux du groupe Pctrl sans pour autant atteindre celle des animaux des groupes Nctrl, résultant ainsi en une diminution significative de l'IC ajusté dans les groupes traités. Parmi ces traitements, les produits B et C présentaient les meilleurs IC (1,62 pour ces deux traitements vs 1,76 pour Pctrl, $p < 0,05$) et les meilleurs poids vifs (1,85 kg et 1,88 kg respectivement, vs 1,65 pour Pctrl, $p < 0,05$). A 42 jours, les groupes Nctrl et Pctrl présentaient des IC ajustés similaires (1,79 vs 1,81) mais une différence de poids vif de 90g (2,32 kg vs 2,23 kg, $p < 0,05$)

(Tableau 4). A cet âge, tous les traitements ont réduit significativement l'IC comparativement aux 2 groupes contrôle. Parmi les produits testés, le produit B a permis d'obtenir l'IC le plus faible comparativement au Pctrl (1,72 vs 1,81, $p < 0,05$), et était même significativement meilleur que celui obtenu avec le produit C (1,72 vs 1,76, $p < 0,05$). Les produits B et C présentaient le poids vif le plus élevé (2,41 kg et 2,43 kg respectivement). Le taux de mortalité n'est pas diminué avec les produits testés, en comparaison des groupes Nctrl et Pctrl. Toutefois le produit B a permis de le réduire légèrement, mais de manière non significative (8,2% vs 8,8%), par rapport aux autres produits.

Tous les produits ont démontré leur efficacité à réduire l'impact négatif (IC, poids vif) de l'EN, dans les conditions expérimentales du modèle utilisé ici, sur les poulets en améliorant les performances zootechniques. Ils ne permettent cependant pas de réduire la mortalité. Notre étude a également montré la capacité de certains produits testés ici à améliorer les performances zootechniques des animaux comparativement au groupe Nctrl, montrant des effets bénéfiques de la supplémentation de manière globale. Notre étude l'a également démontré puisque la majorité des produits amélioraient les performances comparativement au groupe Nctrl.

Le produit B a clairement montré un impact positif sur les performances des animaux, même supérieur à celui des autres probiotiques testés, alors qu'il présentait le dosage le plus faible. Il était également le seul à être basé sur une combinaison de trois souches de *Bacillus*, pouvant présenter une complémentarité de modes d'action, ainsi qu'une technologie d'accélération de la germination, pouvant expliquer sa meilleure capacité à impacter positivement les performances testées dans notre étude.

CONCLUSION

Dans cette étude, un challenge EN (CP+*E. maxima*) a été appliqué avec succès, comme semblent le montrer les indicateurs de cette étude, c'est-à-dire une diminution du poids vif et une augmentation de l'IC. Les différents produits testés ont tous montré leur efficacité à réduire l'impact de l'inoculation sur ces mêmes paramètres. Le probiotique B, présentant le dosage en CFU/g d'aliment le plus faible et comprenant 3 souches différentes, a été le plus efficace pour améliorer les performances mesurées dans cette étude sur les animaux challengés. Ces résultats obtenus en conditions expérimentales suggèrent un potentiel intéressant d'application sur le terrain en vue d'améliorer la gestion de l'EN.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Elshaghabe F.M.F, Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C., Panwar H., 2017. *Front. Microbiol.*, 8, 1-15
- Elwinger, K., Schneitz, C., Berndtson, E., Fossum, O., Teglöf, B., and Engstöm, B., 1992. *Acta Vet. Scand.* 33, 369–378.
- Hofacre, C.L., Froyman R., Gautrias B., George B., Goodwin M.A., and Brown J., 1998. *Avian Diseases* 42:579-584.
- Hunter J.G., Wilde S., Tafoya A.M., Horsman J., Yousif M., Diamos A.G., Roland K.L., Mason H.S., 2019. *PeerJ* 7:e6600
- Jayaraman S., Thangave G., Kurian H., Mani R., Mukkali R., Chirakka H., 2013. *Poult. Sci.*, 92, 370-374
- Opengart K., Saif Y.M., Fadley A.M, Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E., 2008. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa (2008), pp. 872-879
- Santoso U., Tanaka K., Ohtani S., 1995. *Br. J. Nutr.*, 74, 523-529
- Schoster A., Kokotovic B., Permin A., Pedersen P.D., Dal Bello F., Guardabassi L., 2013. *Anaerobe*, 20 (2013), pp. 36-41
- Xu S., Lin Y., Zeng D., Zhou M., Zeng Y., Wang H., Zhou Y., Zhu H., Pan K., Jing B., Ni X., 2018. *Sci. Rep.*, 8, 1744.
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Van Immerseel, F., 2011. *Avian Pathol.* 40, 341–347
- Wade B. and Keyburn A., 2015. *World Poultry* 31: 16-17.
- Whelan R.A., Doranalli K., Rinttil T., Vienola K., Jurgens G., Apajalahti J., 2018. *Poult. Sci.*, pp. 1-14
- Wu Y., Zhen W., Geng Y., Wang Z., Guo Y., 2019. *Sci Rep* 9(1):10256

Tableau 1. Description des principaux événements

Age	Description des événements
0	Pesée de l'aliment démarrage Vaccination coccidiose Allocation des animaux par case Pesée des animaux par case
14	Administration de 20mL <i>E.maxima</i> par case dans les mangeoires (sauf groupe Nctrl) Pesée des restes de l'aliment démarrage Pesée des animaux par case
18	Challenge avec CP (sauf groupe Nctrl) dans l'eau après retrait de l'eau et l'aliment pendant 2-3h
19	Challenge avec CP (sauf groupe Nctrl) dans l'eau après retrait de l'eau et l'aliment pendant 2-3h
35	Pesée des animaux par case Pesée des restes de l'aliment croissance
42	Pesée des animaux par case Pesée des restes de l'aliment finition Fin de l'étude

Tableau 2. Scores lésionnels à EN à J21

Groupe	Score lésionnel EN
Contrôle négatif (Nctrl)	0,00 b
Contrôle positif (Pctrl)	0,63 a
Paroi de levure A (250 g/t)	0,40 a
Probiotique B (5 log CFU/g)	0,63 a
Probiotique C (6,2 log CFU/g)	0,47 a
Probiotique D (5,5 log CFU/g)	0,57 a

Tableau 3. Performances à J35

Groupe	Ingestion (g/jour)	IC ajusté	Poids vif (kg)
Contrôle négatif (Nctrl)	138,44 a	1,74 a	1,72 c
Contrôle positif (Pctrl)	131,17 c	1,76 a	1,65 d
Paroi de levure A (250 g/t)	132,09 bc	1,62 b	1,84 ab
Probiotique B (5 log CFU/g)	136,31 ab	1,62 b	1,85 a
Probiotique C (6,2 log CFU/g)	135,14 abc	1,62 b	1,88 a
Probiotique D (5,5 log CFU/g)	134,64 abc	1,65 b	1,80 b

Tableau 4. Performances à J42

Groupe	Ingestion (g/jour)	IC ajusté	Poids vif (kg)	Mortalité (%)
Contrôle négatif (Nctrl)	189,92 a	1,79 a	2,32 c	5,4 b
Contrôle positif (Pctrl)	179,59 b	1,81 a	2,23 d	8,8 ab
Paroi de levure A (250 g/t)	179,20 b	1,73 bc	2,40 ab	13,0 a
Probiotique B (5 log CFU/g)	186,48 ab	1,72 c	2,41 a	8,2 ab
Probiotique C (6,2 log CFU/g)	184,39 ab	1,74 bc	2,43 a	11,4 a
Probiotique D (5,5 log CFU/g)	182,91 ab	1,76 b	2,34 bc	9,6 ab