

EFFETS D'EXTRAITS DE PEPINS DE RAISINS SUR LES PERFORMANCES DE REPRODUCTION DES POULES REPRODUCTRICES DE SOUCHE CHAIR

Barbe Alix¹, Mellouk Namya¹, Ramé Christelle¹, Grandhayé Jérémy¹, Staub Christophe², Cirot Marine², Venturi Eric², Petit Angélique¹, Anger Karine³, Chahnamian Marine³, Rat Christophe³, Delaveau Joël³, Mairiel François⁴, Riva Antonella⁴, Froment Pascal¹, Dupont Joëlle¹

¹INRA, UMR085 Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements PRC - 37380 NOUZILLY,

²INRA, Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfasière UEPAO - 37380 NOUZILLY

³INRA, Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours UEPEAT – 37380 NOUZILLY

⁴INDENA – 37095 TOURS
joelle.dupont@inra.fr

RÉSUMÉ

Les poules reproductrices de type chair, sélectionnées pour une croissance rapide, alimentées à volonté, présentent un engraissement excessif entraînant des problèmes de fertilité dont des ovulations multiples et une mauvaise qualité de coquille. Pour éviter ces effets délétères, une restriction alimentaire est pratiquée en élevage. Cependant, cette pratique alimentaire est source de stress et génère de l'agressivité. Afin de réduire l'engraissement et le stress oxydatif, les extraits végétaux riches en polyphénols tels que les Extraits de Pépins de Raisins (EPR) ont été envisagés dans notre étude comme complément alimentaire. Ainsi, 4 groupes ont été constitués : témoin (A), supplémenté avec 0,5% (B) ou 1% (C) d'EPR dès 4 semaines et supplémenté avec 1% dès l'éclosion (D). Nous montrons que la supplémentation en EPR diminue significativement le nombre d'œufs doubles et augmente la taille des œufs alors qu'elle n'affecte ni le nombre d'œufs pondus, ni leur poids. D'autre part, cette supplémentation améliore l'élasticité de la coquille alors qu'elle n'a aucun effet sur différents paramètres de fertilité.

ABSTRACT

The breeding hens fed ad libitum and selected for rapid growth, exhibit excessive fattening leading to fertility problems including multiple ovulations and poor shell quality. To avoid these deleterious effects, a food restriction is practiced in breeding. However, this food practice is a source of stress and generates aggressive behaviors. To reduce fattening and oxidative stress, plant extracts rich in polyphenols such as grape seed extract (EPR) were considered in our study as a dietary supplement. Thus, four groups were constituted: control (A), supplemented with 0.5% (B) or 1% (C) of EPR from 4 weeks and supplemented with 1% from birth (D). We show that supplementation with EPR significantly decreases the number of double eggs and increases the size of the eggs while it does not affect the quantity of eggs laid. On the other hand, this supplementation improves the elasticity of the shell while it has no effect on different fertility parameters.

INTRODUCTION

L'élevage intensif des poules reproductrices de type chair est issu d'une sélection génétique drastique tournée vers la recherche d'une croissance de plus en plus rapide et vers l'amélioration de l'efficacité alimentaire. Une alimentation à volonté de ces animaux entraîne un fort engraissement ainsi qu'une maturité sexuelle plus précoce. Il en résulte également des problèmes d'ovulations multiples, une baisse de fertilité des poules et une moins bonne qualité des œufs (Heck *et al.*, 2004).

Une restriction alimentaire permet de résoudre en partie ces différents problèmes. Il a déjà été démontré que la restriction alimentaire permettait d'augmenter la fertilité, comparé à un régime *ad libitum* (Yu *et al.*, 1992). De plus, le stress oxydatif, problème récurrent en élevage, entraîne aussi des perturbations du développement de l'embryon. L'équilibre oxydatif est nécessaire pour les mécanismes de lutéinisation et d'implantation chez les Mammifères mais joue également un rôle dans l'ovulation (Ruder *et al.*, 2009).

Les polyphénols sont connus pour réduire l'engraissement et pour leurs propriétés antioxydantes. Les extraits végétaux sont aujourd'hui utilisés comme complément alimentaire chez l'humain, en raison de leur forte concentration en polyphénols antioxydants. Dans une étude précédente, nous avons étudié les effets *in vitro* des EPR (Extraits de Pépin de Raisin) et de leur principal composé phénolique, la proanthocyanidine sur les cellules ovariennes humaines. Nous avons observé une augmentation de la progestérone. *In vivo*, les EPR ont déjà été utilisés comme supplémentation chez la poule reproductrice afin de tester l'effet sur la fonction immunitaire et les performances de croissance (Ali Rajput *et al.*, 2017). Cependant, leurs effets sur les performances de reproduction n'ont jamais été évalués.

Dans notre étude, nous avons envisagé l'utilisation d'EPR en supplémentation alimentaire afin de réduire l'engraissement des poules reproductrices, diminuer le stress oxydatif tout en améliorant la fertilité des animaux.

Dans un premier temps, les effets des EPR sur la viabilité des cellules et la sécrétion de progestérone ont été étudiés *in vitro* sur les cellules ovariennes (cellules de la granulosa) de poule. Dans un deuxième temps, les effets de concentrations différentes d'EPR, appliquées à 2 stades de croissance, ont été évalués sur la fertilité et mortalité embryonnaire, ainsi que la production et la qualité des œufs.

1. MATERIELS ET METHODES

Le protocole mis en place a reçu un avis favorable par le comité d'éthique (CEEA VdL, n°019) sous le numéro APAFIS #10237-201706151202940 v3.

1.1. Protocole *in vitro*

Des cellules de la granulosa des follicules F1, F2 et F3/4, issues de plusieurs poules Cobb 500, ont été collectées et mises en culture dans un milieu composé de DMEM + 10 % SVF (sérum de veau fœtal) supplémenté avec des antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Après 24h de culture, le milieu est changé pour un milieu sans sérum. Les cellules sont ensuite stimulées avec 0, 0,01, 0,1, 1, 50 et 100 µg/ml d'EPR pendant 24h. La viabilité a été évaluée par le kit CCK8 (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et la sécrétion de progestérone par un dosage ELISA comme décrit précédemment (Canepa *et al.*, 2008).

1.2. Protocole *in vivo*

Trois cent vingt-quatre poussins femelles de type chair (Cobb500) âgés de un jour ont été élevés au sein de l'Unité Expérimentale du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (UE PEAT). Les animaux ont été répartis en groupes homogènes de 12 individus dans 27 parquets de 3m².

1.3. Les régimes alimentaires

De l'éclosion à la 4^{ème} semaine (période Démarrage), tous les animaux sont alimentés à volonté avec le régime témoin ou EPR incorporé à 1% dans l'aliment. A partir de la 4^{ème} semaine (période de Croissance), tous les animaux sont restreints selon les courbes du fournisseur. Le lot supplémenté en EPR 1% depuis la naissance reste supplémenté à la même concentration (D, 5 parquets, n= 72) tandis que les animaux du lot témoin sont séparés en 3 lots : témoin (A, 8 parquets, n=92), supplémentés en EPR à 0,5% (B, 7 parquets, n=80) ou à 1% (C, 7 parquets, n=80) dans l'aliment. La croissance s'achève à la 18^{ème} semaine, la pré-ponte s'étend de 18 à 21 semaines et la ponte, de 21 à 40 semaines. La quantité d'aliment donnée a été ajustée toutes les semaines par rapport à la croissance des animaux de 3 parquets de référence. Les EPR sont conditionnés sous forme de poudre et mélangés ensuite à l'aliment habituel, selon les concentrations décrites précédemment. La composition des EPR a été évaluée par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) et spectrophotométrie UV-visible. Il en ressort une teneur à plus de 90% en proanthocyanidines.

1.4. Mesure de la production et de la qualité des œufs

De la 23^{ème} semaine à la 40^{ème} semaine, les œufs de chaque parquet ont été collectés 2 fois par jour, comptés et pesés. Les œufs cassés et les œufs doubles ont été dénombrés. A la 26^{ème} et 33^{ème} semaine, les œufs ont été caractérisés (poids, longueur et largeur).

La résistance, l'épaisseur et l'élasticité (module de Young, exprimé en N/mm²) de la coquille ont été évaluées à l'aide d'un Instron (Instron type 5543, UK527, Hahn *et al.*, 2017). Après casse des œufs, le jaune et le blanc ont été pesés séparément. Les coquilles ont été séchées puis pesées.

1.5. Mesures de la fertilité et de la mortalité embryonnaire

La semence de 48 coqs (Cobb500) a été collectée et regroupée pour former un unique pool. Les poules ont été inséminées 2 fois, à la 28^{ème} semaine et à la 33^{ème} semaine. Une concentration de 200 millions de spermatozoïdes a été utilisée. Les œufs ont ensuite été collectés tous les jours pendant 3 semaines et mis en incubation tous les 7 jours. Les œufs clairs, la mortalité embryonnaire précoce (M1) et tardive (M2) ont été évalués par mirage au 7^{ème} et 14^{ème} jour d'incubation et cassage des œufs. Le pourcentage de fertilité a été calculé à l'aide du ratio du nombre d'œufs fertiles sur le nombre d'œufs incubés. L'éclosabilité a été calculée avec le nombre de poussins éclos divisé par le nombre d'œufs incubés. L'éclosabilité des œufs fertiles a été calculée à partir du nombre de poussins nés divisé par le nombre d'œufs fertiles.

1.6. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne par groupe $\pm$ SEM. Un test ANOVA a été réalisé pour comparer les moyennes des caractéristiques des œufs. Les logiciels StatView (version 4.5) et SAS ont été utilisés.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Partie *in vitro*

Avec des concentrations croissantes d'EPR, nous observons une diminution significative de la viabilité cellulaire à partir de 50 μ g/mL. A l'inverse, la sécrétion de progestérone augmente de façon constante (figure 1). Sur les cellules de granulosa de truie, des extraits de rooibos et de ginkgo, riches en polyphénols, inhibent la prolifération et favorise l'apoptose (Stochmalova *et al.*, 2018).

2.2. Partie *in vivo* : Effet de la supplémentation sur la quantité et la qualité des œufs pondus

La ponte commence à la 23^{ème} semaine. Le premier groupe à pondre est le groupe D, le groupe témoin entre en ponte 3 jours plus tard. Nous n'observons pas d'effet des EPR sur la masse des œufs (lot A : 36,25 g $\pm$ 1,34, lot B : 37,32 g $\pm$ 1,58, lot C : 36,33 g $\pm$ 1,49, et lot D 34,55 g $\pm$ 1,71) ni sur le nombre d'œufs pondus par poulet par semaine (lot A : 59,35 $\pm$ 2,12, lot B : 59,5 $\pm$ 2,4, lot C : 57,86 $\pm$ 2,26, et lot D : 54,6

$\pm$ 2,56). Cependant, nous constatons un effet significatif sur le taux d'ovulation double ($p = 0,025$). En effet, le nombre d'œufs doubles est significativement diminué pour les 3 groupes supplémentés. De plus, à la 26^{ème} semaine, nous observons un effet significatif sur certaines caractéristiques, notamment la longueur et la largeur ($p < 0,0001$) de l'œuf, et l'élasticité de la coquille ($p < 0,05$). Plus précisément, les œufs des 3 lots supplémentés sont à la fois plus longs (lot B : 54,79 mm $\pm$ 0,42, lot C : 55,33 mm $\pm$ 0,26, et lot D 54,84 mm $\pm$ 0,27) et plus larges (lot B : 42,01 mm $\pm$ 0,29, lot C : 41,74 mm $\pm$ 0,23, et lot D 41,72 mm $\pm$ 0,3) que les œufs du groupe témoin (longueur 50,79 mm $\pm$ 0,5 et largeur 38,09 mm $\pm$ 0,4), sans que le poids ne soit modifié. Les œufs des lots B et C ont également une élasticité de coquille plus importante que les témoins ($p = 0,0017$). La proportion de jaune et d'albumen par rapport au poids de l'œuf n'est pas modifiée avec la supplémentation. A la 33^{ème} semaine, un effet sur le poids du jaune ($p = 0,031$) et de l'albumen ($p = 0,013$) est observé. Le poids de l'albumen est plus élevé pour les groupes supplémentés (lot A : 35,1 g $\pm$ 0,46, lot B : 37,08 g $\pm$ 0,43, lot C : 36,95 g $\pm$ 0,56, et lot D : 37 g $\pm$ 0,48). La proportion d'albumen est également plus élevée pour les lots B et C comparé au témoin ($p = 0,005$). Le profil ne suit pas les résultats obtenus sur le poids de l'albumen pour lequel les lots B et D étaient supérieurs. Cela signifie que la composition du blanc a pu être modifiée. Le poids du jaune est plus élevé pour le groupe D comparé au groupe C, mais il n'y a pas de différence avec le groupe témoin (18,46 g $\pm$ 0,18). De plus, les œufs des lots B et D sont plus longs ($p = 0,004$). Les œufs des lots B et D montrent une élasticité significativement plus importante ($p < 0,0001$) (tableau 1). Un effet bénéfique des polyphénols des feuilles d'Eucalyptus a déjà été démontré. Avec une concentration de 0.8 g/kg, l'épaisseur de la coquille était augmentée (Chen *et al.*, 2018). Dans une autre étude, une supplémentation de 4% de moût de raisin n'affecte ni la quantité des œufs, ni l'épaisseur de coquille mais induit une augmentation du poids de l'œufs (Kara *et al.*, 2015).

2.3. Effet de la supplémentation sur la fertilité

Nous avons calculé le pourcentage d'œufs clairs, la mortalité embryonnaire précoce et tardive, l'éclosabilité et le pourcentage de fertilité. Il n'y a pas d'effet significatif de la supplémentation sur l'ensemble de ces paramètres. Cependant, il semblerait que les EPR aient tendance à diminuer l'éclosabilité des œufs fertiles ($p = 0,069$). Les EPR pourraient avoir un effet délétère sur l'éclosabilité. Une étude montre qu'une supplémentation en vitamine E ou en polyphénols à une concentration de 0,008 ou 0,004 g/kg n'impactait pas ni l'éclosabilité, ni la fertilité (Koedijk *et al.*, 2015).

CONCLUSION

Les résultats *in vitro* montrent qu'une concentration élevée d'EPR a un effet délétère sur la viabilité cellulaire mais permet une augmentation de la sécrétion de progestérone. Ainsi, une concentration moyenne de 10 µg/mL permet d'augmenter la production de progestérone tout en maintenant la viabilité des cellules.

In vivo, les EPR n'ont pas d'effet sur la quantité d'œufs pondus, mais à la 26^{ème} semaine, la qualité des œufs est meilleure pour les œufs des lots supplémentés. Notamment, une supplémentation à partir de la croissance permet d'augmenter l'élasticité de la coquille. Les EPR jouent également un rôle important dans l'ovulation car nous constatons une diminution significative d'œufs doubles pour tous les lots supplémentés.

Sur les paramètres de fertilité, les EPR ont un effet délétère sur l'éclosabilité des œufs fertiles. L'équilibre oxydatif dans l'ovaire est complexe et s'organise autour d'une balance régulière entre production de ROS et antioxydants. Le mécanisme de dominance permettant l'obtention du follicule pré-ovulatoire s'effectue grâce à une augmentation de la production de ROS. Enfin, le follicule pré-ovulatoire produit des ROS nécessaires à l'ovulation (Behrman *et al.*, 2001). La supplémentation diminue le stress oxydatif, perturbant ainsi les mécanismes dans

l'ovaire. Cependant, l'effet semble survenir après l'ovulation et probablement pendant le développement embryonnaire. Une étude préliminaire a permis de doser le statut antioxydant total dans le jaune d'œuf. A la 26^{ème} semaine, une diminution significative a été observée pour tous les lots supplémentés ($n=5$, $p < 0,05$). Cependant, le dosage est en cours pour évaluer le stress oxydatif à la 33^{ème} semaine. La concentration en polyphénol et en cholestérol sera également évaluée. Il a déjà été démontré qu'un important niveau de polyphénol d'huile d'olive améliorait la qualité des acides gras du jaune d'œuf et diminuait le cholestérol (Laudadio *et al.*, 2015). De plus, des cellules de granulosa des 4 groupes ont été collectées, mises en culture et stimulées par IGF-1 (Insulin Growth Factor) et LH (Luteinizing Hormone). La sécrétion de progestérone dans le milieu de culture et les voies de signalisation sont en cours d'étude. Enfin, les stéroïdes comme la testostérone, la progestérone et l'androsténone dans le jaune sont actuellement en cours d'analyse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'aide du financement PREVADI financé par la région Centre Val de Loire (convention 2016-00108493)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Behrman HR., 2001. J Soc Gynecol Investig., 8, S40-S42.
 Canépa S., 2008. Cahier des Techniques de l'INRA. 64, 19-30.
 Hahn EN., 2017. J The R Soc Interface., 14 (126).
 Heck A., 2004. Br Poult Sci., 45 (5), 695-703.
 Kara K., 2015. J Appl Anim Res. 44 (1), 303-310.
 Koedijk RM., 2015. ZooTecnica Intern. 26, 194-197
 Laudadio V., 2015. Lipids Health Dis., 7, 14-5.
 Mellouk N., 2018. Reproduction., 155 (4), 321-331.
 Ali Rajput S., 2017. Toxins. 9 (11), 371.
 Ruder EH., 2009. Curr Opin Obstet and Gynecol., 21, 219-222.
 Stochmalova A., 2018. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl.), 102 (2), e550-e557.
 Yu MW., 1992. Poult Sci. 71 (10), 1750-1761.

Figure 1. Effets *in vitro* des EPR sur la viabilité et la sécrétion de progestérone des cellules de granulosa.

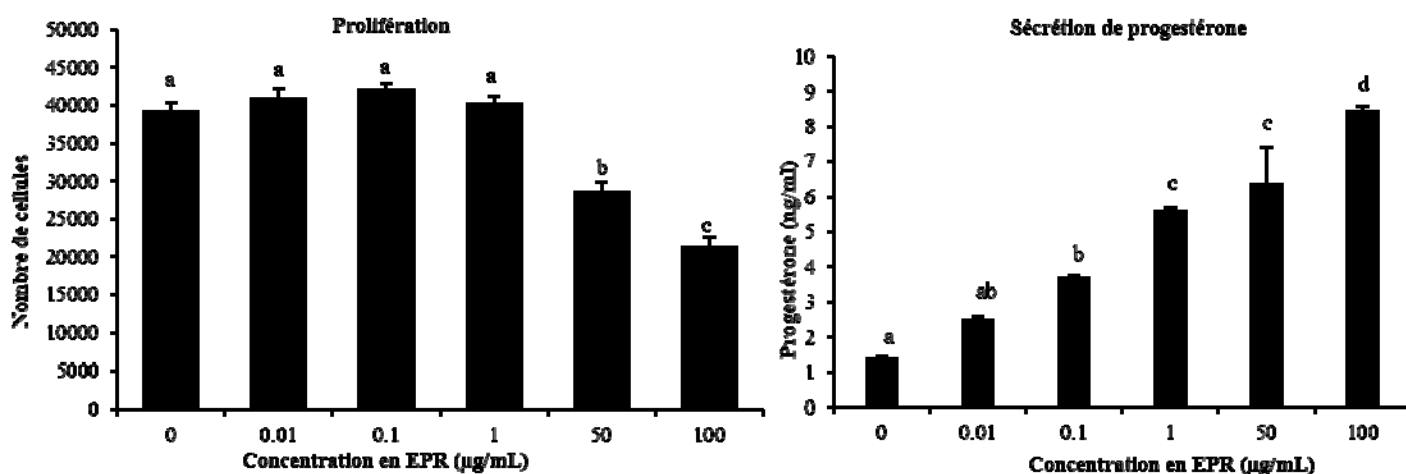


Tableau 1. Effet de la supplémentation en EPR sur le poids et la taille des oeufs et sur la qualité de la coquille à 26 et 33 semaines (n=30 oeufs analysés par régime et par semaine)

Semaine 26					
Régime	A	B	C	D	P-value
Poids de l'œuf (g)	52.37 ± 0.57	54.31 ± 1	54.28 ± 0.68	53.39 ± 0.95	0.16
Poids du jaune (g)	14.02 ± 0.15	14.35 ± 0.23	14.39 ± 0.21	14.13 ± 0.24	0.31
Poids du blanc (g)	30.27 ± 0.43	31.12 ± 0.84	31 ± 0.53	30.51 ± 0.63	0.63
Longueur (mm)	50.79 ± 0.5 ^a	54.79 ± 0.42 ^b	55.33 ± 0.26 ^b	54.84 ± 0.27 ^b	< 0.0001
Largeur (mm)	38.09 ± 0.40 ^a	42.01 ± 0.29 ^b	41.74 ± 0.23 ^b	41.72 ± 0.3 ^b	< 0.0001
Epaisseur (mm)	0.319 ± 0.01	0.322 ± 0.01	0.322 ± 0.004	0.312 ± 0.01	0.55
Résistance (N/mm ^{3/2})	486.01 ± 7.7	481.05 ± 8.66	470.37 ± 10.78	463.17 ± 11.14	0.3
Elasticité (N/mm ²)	16640 ± 357.55 ^a	18748 ± 510.1 ^b	18659 ± 450.15 ^b	17738 ± 507.53 ^{a, b}	0.002
Semaine 33					
Régime	A	B	C	D	P-value
Poids de l'œuf (g)	63.84 ± 0.51	63.98 ± 0.4	63.28 ± 0.67	64.69 ± 0.53	0.36
Poids du jaune (g)	18.46 ± 0.18 ^{a, b}	18.36 ± 0.17 ^{a, b}	17.92 ± 0.29 ^a	18.84 ± 0.17 ^b	0.03
Poids du blanc (g)	35.1 ± 0.46 ^a	37.08 ± 0.43 ^b	36.95 ± 0.56 ^b	37 ± 0.48 ^b	0.013
Longueur (mm)	56.66 ± 0.25 ^a	58.16 ± 0.29 ^b	57.39 ± 0.26 ^{a, b}	57.75 ± 0.34 ^b	0.0035
Largeur (mm)	44.47 ± 0.22	44.21 ± 0.14	44.41 ± 0.2	44.83 ± 0.2	0.11
Epaisseur (mm)	0.34 ± 0.004	0.33 ± 0.005	0.33 ± 0.004	0.312 ± 0.005	0.19
Résistance (N/mm ^{3/2})	453.2 ± 8.62	463.4 ± 8.46	455.3 ± 11.13	469.71 ± 11.45	0.65
Elasticité (N/mm ²)	17652 ± 295.25 ^a	19687 ± 276 ^b	18634 ± 226 ^c	19565 ± 220 ^b	< 0.0001