

ÉVALUATION EX VIVO DES CAPACITES ANTIMICROBIENNES DES GLYCERIDES D'ACIDE LAURIQUE GRACE AUX FLUIDES GASTRO-INTESTINAUX.

Vieco-Saiz Nuria¹, Michel Virginie¹, Mellouk Amine¹, Lemâle Olga², Goossens Tim³, Consuegra Jessika¹

¹ADISSEO FRANCE S.A.S. Department of R&I in Monogastric Animal Nutrition - 20 rue Prosper Monnet - 69190, SAINT FONS, FRANCE,

²ADISSEO NL B.V. - Ruisvoorn 5 - 4941 SB RAAMSDONKSVEER, THE NETHERLANDS,

³ADISSEO BELGIUM - Hoogveld 93 - 9200 DENDERMONDE, BELGIUM

Jessika.consuegra@adisseo.com

RÉSUMÉ

Les glycérides d'acide laurique (GLA) sont largement utilisés comme additifs alimentaires pour améliorer la santé. L'un de leurs modes d'action est l'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives. Cette étude visait à évaluer l'activité antimicrobienne ex vivo en utilisant les fluides du tractus gastro-intestinal (GIT) d'animaux recevant une alimentation supplémentée en GLA. À cette fin, des échantillons ont été prélevés dans le contenu du tractus gastro-intestinal de deux groupes des poulets, recevant un régime standard avec ou sans supplémentation en GLA. Les fluides gastro-intestinaux ont été extraits et testés pour leur activité antimicrobienne contre *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* APEC. Les résultats ont révélé que les fluides intestinaux des animaux recevant des GLA présentaient une activité antimicrobienne contre les bactéries gram-positives et gram-négatives. Plus précisément, la croissance d'*E. faecalis* a été significativement réduite par les fluides GIT provenant du jabot, de l'iléon et du cæcum, tandis que seuls les liquides cæcaux présentaient une activité antimicrobienne contre *E. coli* APEC. L'étude suggère que les GLA ont un double mode d'action, inhibant directement les bactéries gram-positives dans l'ensemble du GIT et indirectement les bactéries Gram-négatives dans le caecum, probablement en induisant un changement dans le microbiote vers la production de métabolites antimicrobiens.

ABSTRACT

Ex vivo evaluation of the antimicrobial properties of lauric acid glycerides in gastrointestinal fluids.

Glycerides of lauric acid (GLA) are widely used as a feed additive to enhance health. One mode of action is the antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. This study aimed to assess *ex vivo* antimicrobial activity of gastrointestinal tract (GIT) fluids from animals receiving a GLA-supplemented feed. To this end, samples were obtained from GIT contents of two groups of birds, receiving standard diet with or without GLA supplementation. GIT fluids were extracted and tested for antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* APEC. The findings revealed that the GIT fluids from animals receiving GLA exhibited antimicrobial activity against both gram-positive and Gram-negative bacteria. Specifically, *E. faecalis* growth was significantly reduced by the GIT fluids from crop, ileum, and caeca, while only cecal fluids presented antimicrobial activity against *E. coli* APEC. GLA supplementation changed as well intestinal microbial population. The study suggests that GLA have a dual mode of action, directly inhibiting Gram-positive bacteria throughout the GIT and indirectly inhibiting Gram-negative bacteria in the ceca, possibly by inducing a shift in the microbiota towards the production of antimicrobial metabolites.

INTRODUCTION

L'acide laurique est un agent antimicrobien avec une activité *in vitro* puissante contre les bactéries gram-positives (G+) mais plus faible contre les bactéries gram-négatives (G-) (Lieberg, 2006). La combinaison de l'acide laurique avec les glycérols génère des glycérides d'acide laurique (GLA) qui augmentent l'activité antimicrobienne de l'acide laurique jusqu'à 200 fois selon la bactérie (Peterson, 2012). Ils altèrent la membrane phospholipidique bactérienne, grâce à sa nature amphiphile, ainsi, les bactéries G+ y sont plus sensibles en raison de leur membrane cellulaire monocouche lipidique caractéristique (Jackman et al., 2020). Les GLA sont amplement utilisés comme additif en nutrition animale. Grâce à leur activité antimicrobienne, les GLA sont capables de prévenir les infections bactériennes intestinales, favorisant ainsi la résilience des animaux aux pathogènes, leur permettant d'être plus performants (Fortuoso et al., 2019). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne *ex vivo* du GLA en utilisant les fluides gastro-intestinaux de poulets de chair recevant une alimentation supplémentée en GLA.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et design expérimental

Au total, cinquante poulets de chair mâles Ross 308 d'un jour ont été placés dans un groupe Contrôle, recevant un régime standard à base de maïs et de blé. Cinquante autres poulets de chair ont reçu le même régime alimentaire supplémenté avec GLA (FRAC12, Adisseo NL) à une dose commercialement pertinente de 3 kg/tonne. Les deux régimes sont identiques nutritionnellement. Les animaux ont été élevés jusqu'à 28 jours d'âge en condition standard. Les animaux sont placés en parquet collective de 50 animaux soit un parquet par régime.

1.2. Echantillonnage et évaluation de l'activité antimicrobienne

A 28 jours d'âge, des échantillons digestifs des contenus du jabot, de l'iléon et des caeca de 36 poulets par régime (sélectionnés sur la base du poids moyen de leur groupe) ont été prélevés en vue d'une évaluation antimicrobienne. Un sous-échantillon de caeca a été effectué afin d'étudier le microbiote avant la mise en œuvre du protocole d'extraction des fluides par centrifugation. Ensuite, les fluides gastro-intestinaux (GIT) ont été évalués à l'aide de tests de concentration minimale inhibitrice (CMI) suivant le protocole standard du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) sur les souches *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Escherichia coli* DSM 103262, un *E. coli* pathogène pour l'aviaire (APEC). Les CMI ont été réalisées en tripliquât technique sur chaque pool de

contenu biologique. Les résultats sont exprimés en tant que dilution moyenne des fluides digestifs. Cela signifie que plus ils sont dilués, plus ils ont un effet antibactérien important.

1.3. Analyse du microbiote

L'ADN total a été extrait des échantillons cœcaux à l'aide d'un kit d'ADN (DNeasy, Qiagen, Germany), en suivant les instructions du fabricant. L'analyse du microbiote a été réalisée par séquençage de l'amplicon ARNr 16S sur la plateforme Illumina chez Alimetrics Diagnostics Ltd (Espo, Finlande). En utilisant des amorces pour la région hypervariable V3-V4 16S décrites par Thijs et al. (2017). La taxonomie bactérienne des gènes de l'ARNr 16S a été réalisée à l'aide d'un algorithme sur la base de données Greengenes.

1.4. Analyses statistiques

Les résultats issus de la détermination de l'activité antibactérienne par l'analyse des CMI ont été vérifiés pour sa distribution normale et en conséquence les groupes ont été comparés par le test non paramétrique de Wilcoxon en utilisant JMP (Version 17. SAS Institute Inc., Cary, NC). Concernant les valeurs de microbiote, les données ont été analysées par *LDA effect size* (LefSe) qui permet l'identification des taxons différenciellement abondants au score $LDA > 2,0$ (MicrobiomeAnalyst.ca) ; ainsi que pour une analyse univariée par Wilcoxon.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse CMI a montré que les fluides digestifs des animaux recevant les GLA ont une activité antimicrobienne tout au long du tractus gastro-intestinal contre *Ent. faecalis*. Cette activité a augmenté de 9,4 ; 5,5 ; 7,6 fois respectivement dans le jabot, l'iléon et les caeca ($p = 0,0029$; $<0,0001$; $0,0353$; respectivement) (Figure 1A) ; ce qui garantit la protection des poulets contre les pathogènes en cas d'infection. Les GLA testés purs *in vitro*, sont capables d'inhiber *Ent. faecalis* à une concentration de 2.5794µg après 24h d'incubation (Devan, 2019).

Seuls les fluides caecaux des animaux supplémentés avec les GLA ont présenté une activité antimicrobienne contre *E. coli* ($p = 0,0090$) (Figure 1B). Étant donné que les GLA sont moins actifs contre les bactéries G- (Yang et al., 2010), cette activité antibactérienne pourrait être expliquée par un changement du microbiote cœcal, exercé par les GLA, vers un profil microbien de producteurs de métabolites capables d'inhiber les bactéries G-. L'analyse du microbiote a en effet montré une inversion des bactéries G+ favorisant la présence de *Lactobacillaceae* et diminuant les populations de *Streptococcaceae* (Figure 2). Il a été décrit *in vitro* que le genre *Lactobacillus* est résistant à l'activité antimicrobienne des GLA (Matsue et al.,

2019) et que des groupes pathogènes de Streptocoques étaient sensibles à leur activité (Yoong et al., 2018). Nos résultats *in vivo* sont en ligne avec les résultats présentés par Wu et al., 2021 où une diminution de *Escherichia-Shigella*, *Barnesiella* et *Alistipes*, et une augmentation de *Lactobacillus* et *Bacteroides* ont été observées.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude montrent, en utilisant des fluides digestifs des poulets de chair pour évaluer leur l'activité antimicrobienne *ex vivo*, que les GLA ont un double mode d'action pour inhiber les bactéries pathogènes. Ils agissent directement contre les bactéries G⁺ tout au long du tractus gastro-intestinal grâce à leur capacité d'interagir avec la membrane lipidique bactérienne. Et ils agissent indirectement en inhibant les bactéries G⁻ dans les caeca, cette inhibition étant induite par un changement du microbiote vers la production de métabolites antimicrobiens. D'autres études sont nécessaires pour identifier les molécules produites par le microbiote, expliquant cet effet antimicrobien sur les G⁻.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Devan K., 2019. J Indian Soc Pedod Prev Dent., 37(3):258-264.
Fortuoso B.F., 2019. Microb. Pathog., 129, 161–167.
Jackman J.A., 2020. J. Anim. Sci. Biotechnol., 11 (1), 44.
Lieberman S., 2006 Altern Complement Ther., 12(6), 310–314.
Schlievert, P.M., 2012. PLoS One, 7 (7), e40350.
Thijs S., 2017. Front. Microbiol., 8, 494.
Yang, J., 2010. Can. J. Microbiol., 56 (3), 263–267.
Yoong B.K., 2018. Int. J. Mol. Sci., 19, 1114.
Wu, Y., 2021. Front. Immunol., 12, 759323

Figure 1. Activité contre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (A) et *E. coli* DSM 103262 (B) des fluides digestifs de poulets de chair recevant un régime standard (contrôle) ou un régime standard + GLA à 3 kg/tonne.

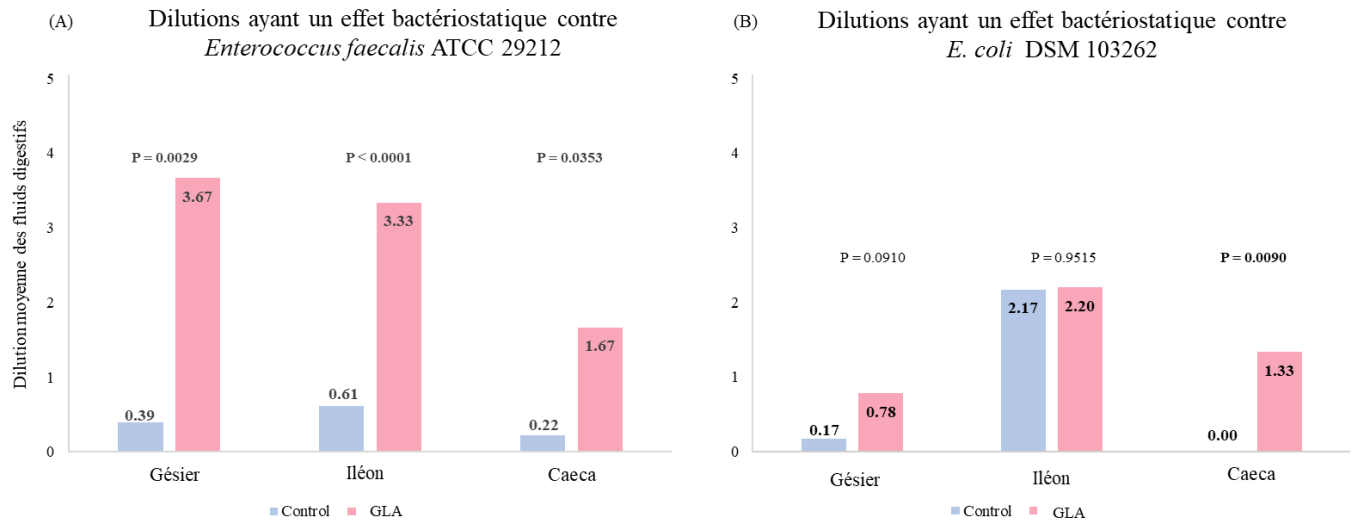


Figure 2. Abondance relative au niveau famille dans les caeca des poulets nourris avec un régime supplémenté ou pas en GLA.

