

TOUTES LES FORMES DE METHIONINE L-, DL- OU OH-METHIONINE SONT EQUIVALENTES POUR LA CROISSANCE DU POULET DE CHAIR

Batonon-Alavo Dolores I., Jeremy Jachacz, Mercier Yves
ADISSEO France S.A.S., CERN, 6 Route noire, F-03600 Malicorne

dolores.batonon-alavo@adisseo.com

RÉSUMÉ

La méthionine est le premier acide aminé limitant chez la volaille et son utilisation en poulet de chair reste incontournable. La méthionine est également remarquable par la diversité de formes disponibles commercialement : L-Méthionine, DL-Méthionine et DL-Hydroxy-Méthionine. De ce fait, un débat de plusieurs décennies existe toujours sur la bio-efficacité des différentes formes. Ce nouveau travail vise à comparer 2 à 2 ou ensemble ces sources au travers de 3 études pour déterminer leur efficacité relative sur les performances de croissance de poulet Ross PM3 mâles entre 0 et 36 jours (Expériences 1 et 2) ou 0 et 42 jours (Expérience 3). Les données zootechniques obtenues ont été analysées par une ANCOVA à 2 facteurs principaux (Doses et Sources) permettant de montrer des améliorations significatives ($p < 0.05$) de la dose sans écart entre les sources ni d'interactions, dans les trois études. Les modèles exponentiels appliqués sur le gain de poids en fonction de l'ingéré en acides aminés soufrés indiquent que la DL-Méthionine est équivalente à 100% à la L-Méthionine entre 0 et 36 jours ; l'hydroxy-Méthionine est équivalente à 100% à la L-Méthionine entre 0 et 36 jours et les trois sources de Méthionine démontrent une efficacité de 100% quand comparées 2 à 2, entre 0 et 42 jours. L'originalité de cette analyse est basée sur un modèle prenant en compte la performance en fonction de l'ingéré réel en soufrés. Ceci montre que l'efficacité relative des trois sources commerciales de méthionine est identique.

ABSTRACT

All forms of methionine, L-, DL- or OH-Methionine are equivalent for broiler chicken growth

Methionine is the first limiting amino acid in poultry and must be used in broiler to ensure optimal performance. Methionine is available under different forms: DL-Methionine, L-Methionine and DL-Hydroxy-Methionine. For decades, there is debate regarding the efficacy of the different forms. This new work aims to compare these sources on a 2-by-2 basis or together in three trials and to determine their bio-efficacy. Ross PM3 broilers chickens were reared from 0 to 36 days (Trial 1 and 2) or from 0 to 42 days (Trial 3). Growth performance data were analyzed with an ANCOVA model with the dose and the source of methionine as main variables. Results showed a significant improvement of performance ($p < 0.05$) with the increasing dose of Met and no significant difference between sources of methionine. Exponential models were applied on the overall weight gain to determine the relative efficacy of Met sources. DL-Methionine was found to be 100% equivalent to L-Methionine from 0 to 36 days; hydroxy-Methionine was found to be 100% equivalent to L-Methionine from 0 to 36 days. The three sources demonstrated 100% relative efficacy when compared 2-by-2 from 0 to 42 days. The originality of this analysis was based on a model taking into account the performance according to the real sulfur amino acid intake. This shows that the relative efficacy of the three commercial sources of methionine is identical.

INTRODUCTION

La méthionine (Met) est le premier acide aminé limitant chez la volaille et son incorporation dans les aliments volaille est systématique. La Met est également le seul acide aminé obtenu par synthèse chimique sous forme d'un mélange chirale D et L alors que les autres acides aminés sont obtenus par fermentation car seules les formes L, dites naturelles, sont utilisables pour la synthèse protéique et la formation de liaison peptidique. L'autre exception est que la méthionine est le seul acide aminé proposé sous la forme DL-hydroxy-méthionine (OH-Met), qui est absorbée puis convertie en L-Met à 100%. Les essais réalisés avec les formes OH des autres acides aminés n'ont jamais pu démontrer une équivalence aux formes L natives (Baker, 1986). Depuis quelques années, la L-Met est disponible commercialement. Face à cette diversité de formes, différentes études tentent d'établir un classement et de donner la bio-efficacité relative de l'une par rapport à l'autre. Ces études reposent essentiellement sur des études de dose-réponse à partir d'un aliment basal déficient en acides aminés soufrés (AAS) et l'application d'un modèle exponentiel à plateaux communs comparant les paramètres de performance (gain de poids, indice de consommation, etc..) en fonction des doses ajoutées en Met sans tenir compte de l'ingéré et/ou des variations de composés actifs après analyse de l'aliment (Lemme et al. 2002, Sauer et al. 2008). Toutefois, d'autres approches (Agostini et al. 2016) proposant une efficacité de Met exprimée en gramme de Met additionnelle par gramme de gain de poids supplémentaire ou une modélisation exponentielle des gains par rapport à l'ingéré en AAS, semble indiquer que le modèle et/ou le mode d'expression, compte pour beaucoup dans le résultat final. Ainsi, ce travail propose de comparer l'efficacité relative des trois sources de Met, deux à deux ou ensemble au travers de trois études.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Schéma expérimentaux

Les trois essais ont été réalisés à la station expérimentale ADISSEO CERN selon les schémas expérimentaux résumés dans le tableau. Des poussins de souche Ross PM3 ont été utilisés. Les expériences 1 et 2 ont été réalisées sur 3 périodes avec 7 traitements (1 régime basal et trois doses de méthionine supplémentées sur une base iso-moléculaire avec de la L-Met ou de la DL-Met (Exp. 1) et de la L-Met ou de l'OH-Met (Exp. 2). Le troisième essai a été réalisé sur une durée de 42 jours répartie sur trois périodes avec 13 traitements (1 régime basal et 4 doses de Met ajoutée sur une base iso-moléculaire pour chacune des trois sources.) L'aliment utilisé dans les trois

expériences était un aliment à base maïs-soja formulé sur les recommandations d'Adisseo, 2013 (Exp. 1 & 2) ou d'Aviagen, 2014 (Exp. 3) pour les acides aminés à l'exception des AAS. Pour les trois expériences, la température a été modulée entre 32°C et 22°C depuis le début jusqu'à la fin de l'expérience (conditions standard d'élevage). L'humidité relative était de 55 % $\pm$ 15% durant toute la durée des essais. La durée d'éclairage a été de 23 h pendant les neuf premiers jours, de 20 h de 9 à 12 j et de 18 h jusqu'à la fin de l'expérience. Les mesures de performances zootechniques : poids vif, gain de poids, consommation ont été réalisées pour chacune des périodes permettant un calcul des indices de consommation et l'efficacité de Met selon la méthode proposée par Agostini et al. (2016).

1.2. Analyses statistiques

Le parquet était considéré comme unité expérimentale. Les données de performance zootechnique ont été analysées à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2015.3.01.19199). Elles ont été analysées à l'aide d'un modèle ANCOVA avec la source et la dose de Met comme variables principales. Pour déterminer la bio-efficacité relative des sources de Met, des modèles exponentiels à plateaux séparés ont été appliqués aux gains de poids exprimés en fonction des valeurs ingérées en Met+Cys analysées. Ces modèles ont été appliqués en utilisant la fonction NLMIXED dans SAS v. 9.4. La bio-efficacité relative a été déterminée par le ratio des coefficients de courbure de chaque courbe exponentielle.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Pour chaque expérience, des différences significatives ont été observées entre le régime basal et tous les régimes supplémentés, pour la consommation d'aliment, le gain de poids et l'indice de consommation. La dose de Met n'a pas eu d'effet significatif sur la consommation alimentaire des régimes supplémentés. Le gain de poids corporel et l'indice de consommation ont été améliorés à mesure que le niveau de Met augmentait, conformément aux résultats de plusieurs auteurs (Agostini et al. 2016 ; Zhao et al., 2018). Le poids corporel, le gain de poids, l'indice de consommation et l'efficacité de la Met n'étaient pas significativement différents entre les sources quelle que soit la dose considérée. Aucune interaction n'a été observée entre la dose de Met et la source pour toutes les périodes et tous les paramètres. Ces résultats sont conformes à des données précédentes qui n'ont démontré aucune différence significative entre les sources de Met pour maintenir la performance de croissance (Dilger et Baker, 2007).

En outre, les modèles exponentiels appliqués aux gains de poids de ces trois expériences ont confirmé l'équivalence d'efficacité entre les sources de Met testées (Figure). L'efficacité de la DL-Met relative à la L-Met chez le poulet est de 99% avec un intervalle de confiance de [96% ; 103%] dans l'étude 1 et de 100% [92% ; 107%] dans l'étude 3; celle de l'OH-Met relative à la L-Met est de 100% avec un intervalle de confiance de [98% ; 103%] dans l'étude 2 et de 102% [92% ; 110%] dans l'étude 3. Au-delà du fait que ces résultats montrent une efficacité relative identique entre sources, ils mettent également l'accent sur la méthode d'analyse des résultats. D'autres auteurs ont mis en évidence des rapports d'efficacité relative différents entre sources en appliquant le même type de modèle exponentiel mais en utilisant les doses ajoutées plutôt que l'ingéré réel en Met ou en AAS (Lemme et al., 2002 ; Sauer et al., 2008). Pour autant, cette comparaison d'efficacité relative de sources d'acides aminés prenant en compte l'ingéré réel a déjà été publiée lors de la comparaison de sources de lysine (Lysine sulfate et Lysine HCl) par Smiricky-Tjardes et al. (2004) ou par Agostini et al. (2016) pour la comparaison entre DL-Met et OH-Met. La pertinence de cette approche est qu'elle permet une comparaison sur la base de l'actif ingéré réellement et de sa réponse biologique, la performance. A titre d'illustration sur les différents graphes de la figure, la réponse du gain de poids en fonction de l'ingéré AAS est représentée, prenant en compte les apports provenant à la fois des matières premières et des suppléments réalisés avec les différentes sources. Ainsi, les régimes témoins déficients, qui ne contiennent que les apports des matières premières, montrent une variation de gain de poids allant de 100 g à plus de 500 g respectivement sur l'étude 1 et 3. Dans les conditions de carence en AAS, les variations

d'ingéré, donc d'AAS entraînent des variations de gain qui sont indépendantes de la source considérée. Ces variations apparaissent également tout le long de la courbe pour les différentes doses expliquant ainsi une part importante des variations numériques de gain. Par comparaison avec l'étude de Lemme et al., (2002), l'ANCOVA montre l'absence de différences significatives aux différentes doses testées sur le gain de poids ou l'indice de consommation entre DL-Met et OH-Met. Pour autant, les modélisations appliquées en fonction des doses théoriques d'actifs entraînent des conclusions différentes. Par ailleurs, la modélisation du gain de poids en fonction de l'ingéré réel établit une représentation synthétique, assimilable à un indice de consommation en AAS, et permet d'établir une seule valeur d'équivalence. L'approche de modélisation sur la base des doses entraîne fréquemment des valeurs d'équivalence relative entre sources différentes selon le critère considéré comme le gain de poids ou l'indice de consommation (Lemme et al., 2002) qui restent difficiles à expliquer d'un point de vue biologique.

CONCLUSION

Ce travail présente les résultats de trois études comparant trois sources de Met chez le poulet de chair. Dans nos conditions expérimentales, l'apport de Met, quelle que soit la forme utilisée, permet d'augmenter les performances de croissance du poulet par rapport à un aliment déficient en AAS. Les résultats obtenus démontrent que toutes les sources de sont équivalentes à 100% chez le poulet de chair. Ce travail montre l'importance du modèle utilisé dans l'exploitation des résultats pour le calcul de l'équivalence des sources de méthionine.

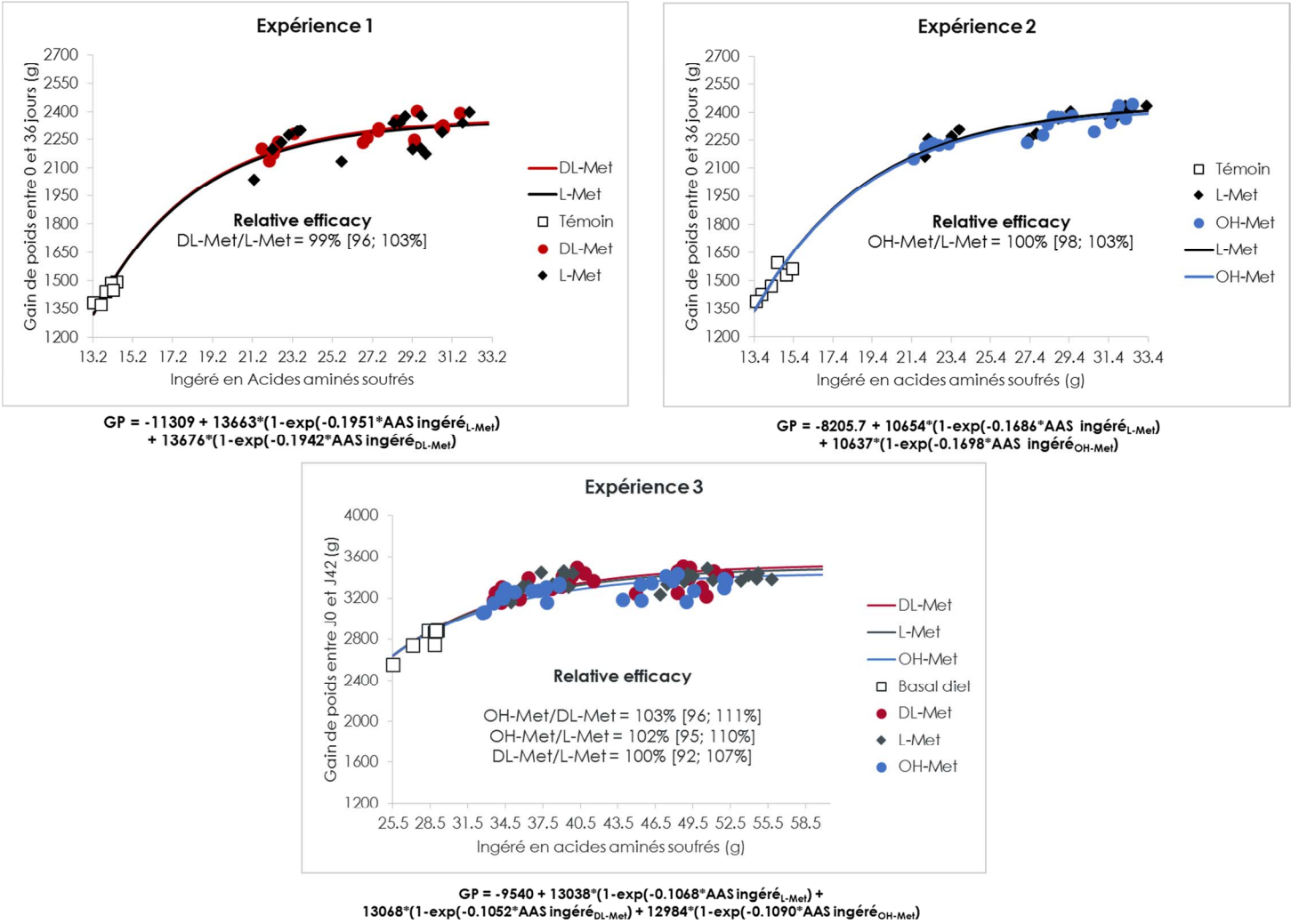
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adisseo, 2013. Adisseo Rhodimet Nutrition Guide © Version 2013.
 Agostini et al., 2016. Poult. Sci., 95(3), 560-569.
 Aviagen, 2014. http://en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-308-Broiler-Nutrition-Specs-2014r17-EN.pdf
 Baker, 1986. Prog. Food Nutr. Sci., 10, 133-178.
 Dilger et Baker, 2007. Poult. Sci., 86, 2367-2374.
 Zhao et al., 2018. Poult. Sci., 97(9), 3166-3175.
 Smiricky-Tjardes et al. 2004. Poult. Sci. 82, 2610-2614
 Lemme et al. 2002. Poult. Sci. 81:838-845
 Sauer et al 2008. Poult. Sci. 87:2023-2031

Tableau : Résumé des schémas expérimentaux pour les trois études comparant les sources de méthionine chez le poulet de chair.

Périodes d'élevage (jours)		Expériences 1 & 2	Expérience 3
		0-10	0-14
Périodes d'élevage (jours)	Démarrage	11-24	15-28
	Croissance	25-36	29-42
	Finition		
dMet+Cys (%) dans l'aliment basal	Démarrage	0,66	0,63
	Croissance	0,60	0,57
	Finition	0,50	0,53
Doses ajoutées en méthionine équivalent (%)	Démarrage	0,16/ 0,36/ 0,46	0,08/ 0,20/ 0,39/ 0,49
	Croissance	0,15/ 0,33/ 0,42	0,07/ 0,17/ 0,35/ 0,44
	Finition	0,07/ 0,22/ 0,29	0,09/ 0,14/ 0,32/ 0,40
Nombre d'animaux (Ross PM3)		630	1365
Nombre de traitements		7 de 6 répétitions chacun	13 de 7 répétitions chacun

Figure. Efficacité relative des sources de méthionine déterminée par un modèle exponentiel appliqué aux données de croissance du poulet de chair (Expériences 1, 2 & 3)



EVALUATION DU MODE D'ACTION ET DE L'EFFICACITE DE DIFFERENTS COMPOSANTS ALIMENTAIRES PAR SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT DU TRANSCRIPTOME DE POULET

**Bertrand Grenier¹, Candida Vaz², Silvia Fibi-Smetana¹, Suzana Ilic¹, Vivek Tanavde²
and Gerd Schatzmayr¹**

¹*BIOMIN Research Center, BIOMIN Holding GmbH, Tulln, Austria*

²*Bioinformatics Institute, Agency for Science, Technology & Research (A*STAR), Singapore*

bertrand.grenier@biomin.net

RÉSUMÉ

Aujourd'hui, la tendance mondiale est à la réduction de l'usage des antibiotiques comme facteurs de croissance (AFC) en production animale. Il est donc important d'identifier des alternatives nutritionnelles efficaces, imitant le mode d'action des AFC afin de pouvoir les substituer. Des études récentes ont démontré que l'amélioration des performances des animaux nourris avec des AFC est notamment due à une inhibition des processus inflammatoires dans le tractus intestinal. La présente étude visait à étudier l'effet d'un AFC ou d'un phytogénique (additif alimentaire d'origine végétale) sur le transcriptome intestinal du poulet, en condition contrôle ou suite à l'induction d'une inflammation. Le transcriptome complet (soit ≈ 25000 gènes) a été étudié par RNA-Seq (séquençage d'ARN), et les données brutes traitées avec un pipeline bioinformatique adapté à la dernière version du génome du poulet (Gallus5). Dans une première expérience, nous avons pu confirmer que des poulets de chair nourris en continu pendant 35 jours avec un supplément en avilamycine (AFC) présentaient un profil transcriptomique différent de celui des animaux non supplémentés, en particulier avec un effet dans l'intestin sur des voies immunologiques spécifiques telles que les signalisations cellulaires IL-22 et STAT3. Une seconde expérience a montré un mode d'action en commun entre le phytogénique et l'avilamycine. Dans cette même expérience, un modèle mimant une infection par différentes espèces d'*Eimeria*, responsable de la coccidiose aviaire, a permis de montrer que le phytogénique avait réduit l'effet inflammatoire mesuré sur le transcriptome dans le caecum (retour à la normale de l'expression de 259 gènes sur les 548 gènes initialement affectés par le modèle).

ABSTRACT

High throughput sequencing of the chicken transcriptome for evaluating mode of action and efficacy of feed compounds

Now that the use of antibiotic growth promoters (AGPs) is discouraged in animal production, and worldwide, it is important to identify dietary compounds that are as effective as AGPs. Ideally, these alternatives should mimic the mode of action of AGPs. Recent studies have for instance demonstrated that the better performance of animals fed AGPs is also driven by reduction of the innate inflammatory response in the intestinal tract. The present study aimed at investigating the effect of an AGP or a phytogenic (feed additive of plant origin) on the intestinal transcriptome of broiler chickens, either in control conditions or following inflammation. The full transcriptome ($\approx 25,000$ genes) was covered with the RNA-Seq (RNA sequencing), and the raw data processed with our own bioinformatics pipeline and adapted to the latest version of the chicken genome (Gallus5). In a first experiment, we were able to confirm that broiler chickens fed continuously avilamycin (AGP) for 35 days had a very different transcriptomic profile from animals not supplemented, in particular with an effect in the intestine on specific immunological pathways such as IL-22 and STAT3 signalling. A second experiment with RNA-Seq in broiler chickens showed a common mode of action between the phytogenic and avilamycin. In the same experiment, a model mimicking infection by different species of *Eimeria*, responsible for avian coccidiosis, showed that the inflammation in the cecum of birds fed phytogenic was reduced (259 genes back to normal out of 548 genes seen initially affected in the challenged birds on basal feed).

INTRODUCTION

Il est bien connu que les conditions et performances en production animale se sont grandement améliorées grâce à l'administration des antibiotiques comme facteurs de croissance (AFC) dans l'alimentation animale. Malheureusement, l'émergence de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques chez l'homme et les animaux a conduit plusieurs pays à interdire leur utilisation dans la production animale (depuis 2006 dans l'UE). En outre, pour les pays qui ne l'interdisent pas encore, l'utilisation des AFC pourrait diminuer en réponse à l'attente des consommateurs. Plusieurs grandes entreprises ont déjà rendu obligatoire le retrait des AFC de la production des poulets de chair. Les solutions proposées pour produire à grande échelle et sans antibiotiques portent sur les conditions d'élevage (densité, durée des vides sanitaires, gestion des reproducteurs, assainissement et nettoyage des œufs), la vaccination et/ou l'utilisation d'alternatives aux antibiotiques dans l'alimentation (par exemple, acides organiques, enzymes, probiotiques, phytogéniques, peptides antimicrobiens). Les solutions de remplacement des AFC pour animaux ont suscité beaucoup d'intérêt au cours des dernières années. Cependant, notre manque de connaissance des mécanismes d'action des AFC a entravé le développement d'alternatives efficaces.

Comme l'ont passé en revue Brown *et al.*, (2017), les données actuelles sur le mode d'action des AFC divergent en deux hypothèses principales : (i) centrée sur les bactéries ; et (ii) centrée sur l'hôte. La plupart des recherches ont été faites d'après l'hypothèse centrée sur les bactéries, montrant que les AFC éliminent ou inhibent directement la croissance des bactéries, ce qui mène à terme à des changements dans les communautés bactériennes. Ces changements dans le microbiome pourraient prévenir la colonisation par des pathogènes et/ou conduire à un système plus efficace favorisant l'hôte par rapport à son microbiote dans la compétition pour les nutriments (Dibner et Richards, 2005).

Cependant, étant donné l'extrême complexité des interactions entre les bactéries intestinales, le régime alimentaire et l'hôte, il est probable que les AFC fonctionnent également en affectant directement ou indirectement la physiologie intestinale de l'hôte. Les arguments en faveur d'un effet des AFC indépendant de leur effet antibactérien ont été présentés dans une revue par Niewold en 2007. En effet : (i) la quantité d'AFC utilisée pour stimuler la croissance des animaux est normalement inférieure à la concentration minimale requise pour inhiber les agents pathogènes entériques ; (ii) les AFC favorisent également la croissance malgré leurs effets variables sur le microbiote ; et (iii) les alternatives aux AFC, bien que connues pour affecter le microbiote, ont des effets moins répétables que ceux des AFC. Toutefois, il y a peu de recherches sur leurs effets physiologiques sur

l'organisme hôte. Afin d'apporter des données supplémentaires sur ce sujet, nous présentons ici deux études par RNA-Seq pour étudier l'effet des AFC sur le transcriptome de l'hôte, ainsi que pour évaluer l'efficacité d'alternatives aux AFC.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Expériences animales et échantillons

La première expérience était dédiée à l'étude d'un AFC, l'avilamycine chez les poulets de chair. Cette expérience était composée de deux groupes, i) le groupe avec l'aliment contrôle et ii) le groupe avec l'aliment supplémenté en avilamycine (10 g/tonne d'aliment; Elanco), avec 8 enclos par groupe et 15 oiseaux par enclos (120 oiseaux au total par groupe). Les poulets ont reçu les aliments expérimentaux pendant 35 jours et, à la fin de l'expérience, l'iléon (partie inférieure de l'intestin grêle) a été prélevé sur 16 oiseaux (2 oiseaux par enclos) par groupe, placé dans le RNAlater et conservé à -80 °C jusqu'aux analyses.

La deuxième expérience concernait l'effet d'un phytogénique (additif alimentaire consistant en un mélange d'huiles essentielles, d'extraits, d'herbes et d'épices encapsulés, caractérisé par l'huile d'origan, l'huile de menthe, l'extrait de raisin et la poudre de cannelle) sur les poulets de chair dans des conditions normales, ou soumis à une épreuve par un surdosage en vaccin anticoccidien (Grenier *et al.*, 2016). Cette expérience était composée de trois groupes : i) le groupe avec l'aliment contrôle, ii) le groupe avec l'aliment supplémenté en phytogénique (Digestaron® DC, 150 g/tonne d'aliment, BIOMIN Phytogenics, Allemagne), et iii) groupe coccidiostat (Maxiban® G160, 562 g/tonne d'aliment ; Elanco) avec de nouveau 8 enclos par groupe et 15 oiseaux par enclos (120 oiseaux par groupe au total). Les oiseaux ont reçu les régimes expérimentaux pendant 41 jours. Au 35e jour, un premier prélèvement a eu lieu avec prélèvement de l'iléon chez 8 oiseaux (1 oiseau par enclos) par groupe, placés dans le RNAlater et conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Au 35e jour, la moitié des oiseaux ont également été éprouvés avec une surdose (25 fois la dose recommandée) de vaccin contre la coccidiose aviaire Paracox-5 (mélange de souches vivantes atténuées d'*Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis* et *E. tenella*) afin de provoquer une inflammation intestinale modérée. Six jours plus tard, au jour 41, le caecum des oiseaux non challengés et challengés a été collecté (1 oiseau par enclos), placé dans le RNAlater et conservé à -80°C jusqu'aux analyses.

1.2. RNA-Seq et analyses bioinformatiques

L'ARN a été extrait de l'iléon et du caecum des oiseaux dans les deux expériences avec le kit RNeasy

mini (Qiagen, Allemagne), et tous les ARNs étaient de très bonne qualité avec des valeurs RIN (RNA Integrity Number) > 9. Pour chacune des expériences, des échantillons d'ARN de 5 oiseaux par groupe (sauf expérience 2 pour l'iléon avec 4 oiseaux par groupe) ont été envoyés à une plateforme de séquençage (Agency for Science, Technology & Research, Singapore). Le kit TruSeq Stranded Total RNA Illumina incluant le Ribo-Zero Gold pour éliminer l'ARN ribosomique a été utilisé pour la préparation des bibliothèques de séquençage. Les bibliothèques créées ont été séquencées avec l'instrument Illumina HiSeq 4000. La couverture de séquençage (données PE, 28-50 Mio lectures, 150 bp) et le nombre de réplicats utilisés permettent d'avoir assez de puissance statistique pour détecter l'expression différentielle et plus de 95% des gènes annotés (Wang et al, 2011 ; Conesa et al, 2016).

Les données brutes du RNA-Seq ont été traitées par le biais de notre propre pipeline bioinformatique créée à partir d'un consensus de plusieurs outils informatiques (utilisation de Snakemake pour exécuter le workflow comprenant Trimmomatic – STAR aligner – HTseq count – DESeq2) et adaptée au génome du poulet (*Gallus gallus*-5.0). Les données en RNA-Seq étant non-normalement distribuées, le modèle linéaire généralisé (GLM) dans DESeq2 utilisant une distribution binomiale négative a été préférée à l'ANOVA (Huang et al., 2015; Lin et al., 2016). Un gène était différentiellement exprimé (DE) lorsque la p-value du test ajustée FDR est inférieure à 0,05. De plus, un filtre sur le fold change a été appliqué, et les gènes étaient considérés différentiels si leur fold change est >2 ou <-2. Enfin, les gènes DE ont été utilisés dans Reactome pour prédire les voies de signalisations cellulaires auxquelles ils appartiennent (utilisation du Gene Name ID pour les données saisies).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Comme attendu, dans la première expérience animale, les oiseaux nourris à l'avilamycine pendant 35 jours ont montré des performances significativement plus élevées que les oiseaux témoins (moyenne poids contrôle = 1781g ± 107 versus avilamycine = 1898g ± 61, t-test p=0,017). Le RNA-Seq et l'analyse statistique ont révélé que 167 gènes dans l'iléon étaient exprimés différemment entre les oiseaux nourris avec ou sans l'avilamycine, nombre d'entre eux étant associés aux réponses immunitaires inflammatoires et innées, telles que la signalisation IL-6, IL-10, IL-22, NF-κB et la production d'oxyde nitrique et d'oxygène réactif dans les macrophages. Pour la majorité d'entre eux, l'expression est réduite chez les oiseaux nourris à l'avilamycine. La diminution de l'IL-22 observée en RNA-Seq a également été confirmée lors de la validation par RT-qPCR chez les mêmes oiseaux (n=5), et sur un échantillon élargi (n=16) confirmant une diminution

des niveaux d'ARNm de l'IL-22 (réduits de 6,2 fois dans le groupe avilamycine comparé au groupe témoin). L'IL-22 a fait l'objet de nombreuses études depuis sa découverte en 2000 pour son rôle dans la prévention des lésions tissulaires et l'inhibition de l'inflammation (Parks et al., 2015).

Nos résultats fournissent des preuves supplémentaires sur les propriétés anti-inflammatoires des AFC, comme l'avait supposé Niewold en 2007, ce qui permettrait de consacrer plus de ressources aux processus anaboliques associés au développement musculaire (Costa et al., 2011). En raison des nombreux facteurs de l'hôte et du microbiote qui contrôlent l'environnement intestinal, la séparation des mécanismes d'action des AFC liées à l'hôte ou d'origine bactérienne est extrêmement difficile, d'où la nécessité pour les chercheurs d'examiner les effets des AFC d'une manière intégrée prenant en compte l'hôte et son microbiote (e.g. avec une approche métagénomique ou métatranscriptomique des microorganismes présents dans le microbiote intestinal).

Dans la seconde expérience animale, nous avons constaté que 73 gènes étaient exprimés différemment entre les oiseaux nourris avec l'aliment témoin et les oiseaux nourris avec le phytogénique de 1 à 35 jours. Parmi ceux-ci, 40% sont communs avec ceux mis en évidence dans la première expérience avec l'AFC dans le tissu intestinal. Bien que la nature et la composition du phytogénique et de l'avilamycine diffèrent grandement, un pool de gènes en commun pourrait partiellement expliquer certains effets bénéfiques connus chez l'animal.

Afin d'étudier plus en détail les propriétés anti-inflammatoires du phytogénique, nous avons induit une inflammation de l'intestin avec des lésions modérées dans le cæcum des oiseaux 6 jours après l'épreuve (score lésionnel 2/4). Les lésions étaient attribuées à *Eimeria tenella*, connu pour cibler spécifiquement le caecum. La fréquence et la sévérité des lésions étaient moins prononcées chez les oiseaux nourris avec le phytogénique que chez les oiseaux témoins (n=10; moyenne score lésionnel groupe témoin = 1,81 ± 0,87 versus phytogénique = 0,44 ± 0,53, t-test p<0,001). Comme prévu aucune lésion n'a été observée dans le groupe traité par le coccidiostat, considéré comme un témoin positif dans cette expérience.

L'inflammation induite par le surdosage vaccinal a modifié l'expression de 548 gènes dans le caecum des oiseaux challengés et nourris avec l'aliment témoin en comparaison des oiseaux non-challengés avec le même aliment témoin (Table 1 ; Figure 1). La plupart des gènes étaient surexprimés (357/548) suite à l'inflammation (jusqu'à 57 fois plus exprimé). De plus, l'outil de prédiction Reactome a révélé que plusieurs de ces gènes étaient liés à la signalisation des cytokines, en particulier de l'interféron (IFN). Ceci

est en accord avec la littérature montrant que l'IFN est un médiateur clé de la réponse immunitaire à la coccidiose chez la volaille.

En ce qui concerne l'effet du challenge chez les oiseaux nourris avec le phytogénique, il semble qu'ils étaient moins sujets à l'inflammation déclenchée par la coccidiose, avec un retour à la normale de l'expression de 259 gènes sur les 548 gènes initialement affectés chez les oiseaux témoins (Table 1). De plus, sur les gènes encore significativement affectés dans le groupe phytogénique (soit 289), l'effet était moins prononcé que dans le groupe challengé témoin (10 à 50% moins d'effet selon les gènes sur le fold change). Ces résultats ont été validés par RT-qPCR sur une sélection de 16 gènes.

Par contre, 99 % des gènes affectés par la coccidiose n'étaient plus affectés dans le groupe traité par le coccidiostat (Table 1), confirmant que ce produit a été capable de neutraliser et d'éradiquer les parasites

d'*Eimeria* avant qu'ils n'induisent des dommages tissulaires et une inflammation.

CONCLUSION

En conclusion, l'utilisation d'une approche par séquençage d'ARN (RNA-Seq) permet de fournir des informations essentielles sur le transcriptome de l'hôte en réponse à des constituants alimentaires tels que les AFC, et de formuler des hypothèses sur leur mode d'action. Ceci pourrait ouvrir la voie au développement d'alternatives aux AFC et à l'optimisation de l'alimentation animale. Dans cette optique, nous avons appliqué avec succès cette approche au phytogénique. Les résultats suggèrent un mode d'action similaire à celui des AFC, et confirment leurs propriétés anti-inflammatoires *in vivo* dans un modèle d'inflammation intestinale.

Table 1 – Résultat de l'analyse de l'expression des gènes dans le caecum à J41 en comparaison avec les poulets de chair non-challengés et nourris avec l'aliment témoin

Comparaison avec les Contrôles non-challengés	Contrôles challengés	Phytogénique challengés	Coccidiostat challengés
Nombre de gènes totaux différenciellement exprimés ¹	548	557	85
Gènes en commun avec les contrôles challengés	548	289	3

¹ Bioinformatique pipeline : STAR/HTSeq/DESeq2 ; critères considérant un gène différenciellement exprimé : p-value ajustée FDR < 0.05, fold-change < -2 ou > 2

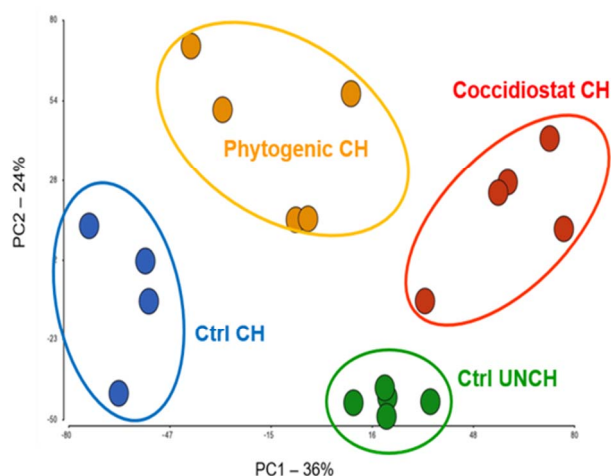


Figure 1 – Analyse en composantes principales (PCA)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brown, K., R. R. E. Uwiera, et al. (2017). "Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives." *International Journal of Antimicrobial Agents* 49(1): 12-24.
- Conesa, A., P. Madrigal, et al. (2016). "A survey of best practices for RNA-seq data analysis." *Genome Biology* 17(1): 13.
- Costa, E., R. R. E. Uwiera, et al. (2011). "Non-therapeutic administration of a model antimicrobial growth promoter modulates intestinal immune responses." *Gut Pathogens* 3: 14-14.
- Dibner, J. J. and J. D. Richards (2005). "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action." *Poultry Science* 84(4): 634-643.
- Grenier, B., I. Dohnal, et al. (2016). "Susceptibility of Broiler Chickens to Coccidiosis When Fed Subclinical Doses of Deoxynivalenol and Fumonisin—Special Emphasis on the Immunological Response and the Mycotoxin Interaction." *Toxins* 8(8): 231.
- Huang, H.-C., Y. Niu, et al. (2015). "Differential Expression Analysis for RNA-Seq: An Overview of Statistical Methods and Computational Software: Supplementary Issue: Sequencing Platform Modeling and Analysis." *Cancer Informatics* 14s1: CIN.S21631.
- Lin, Y., K. Golovnina, et al. (2016). "Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual *Drosophila melanogaster*." *BMC Genomics* 17: 28.
- Niewold, T. A. (2007). "The Nonantibiotic Anti-Inflammatory Effect of Antimicrobial Growth Promoters, the Real Mode of Action? A Hypothesis." *Poultry Science* 86(4): 605-609.
- Parks, O. B., D. A. Pociask, et al. (2015). "Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3: 85.
- Wang, Y., N. Ghaffari, et al. (2011). "Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens." *BMC Bioinformatics* 12(10): S5.
- Warren, W. C., L. W. Hillier, et al. (2017). "A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure." *G3: Genes|Genomes|Genetics* 7(1): 109-111.