

UN ALIMENT CONTENANT UNE SOUCHE PROBIOTIQUE AMELIORE LES PERFORMANCES ZOOTECHNIQUES ET RENFORCE LES FONCTIONS DE BARRIERE PHYSIQUE ET IMMUNITAIRE DE L'INTESTIN CHEZ LE POULET

Pauline BELLOIR¹, Fanny PLACIDE², Valérie TONDEREAU^{1,2}, Gervais WALLOIS¹, Audrey SACY³, Florence BARBE³, Hélène EUTAMÈNE^{1,2}

¹El.Purpan-75 voie du TOEC, 31076 Toulouse,

² UMR 1131 TOXALIM INRA, 180 Chemin de Tournefeuille, 31300 Toulouse

³ Lallemand SAS 19 Rue des Briquetiers, 31702 Blagnac

pauline.belloir@purpan.fr

RÉSUMÉ

Pour réduire l'usage d'antibiothérapie en élevage, l'aviculture se doit de trouver des alternatives durables pour optimiser la croissance de l'animal, accroître la santé digestive et la mise en place du système immunitaire. L'utilisation de probiotiques est actuellement présentée comme solution alternative pour atteindre ces objectifs. L'intestin constitue une barrière anatomique et immunologique dynamique qui permet d'assurer une bonne communication entre le compartiment luminal et systémique. L'impact d'un aliment pour poulet contenant ou non une souche probiotique i.e. *Bacillus pumilus* (Bp) a été testé sur des paramètres de performance zootechniques. La barrière physique et immunitaire de l'intestin ont été évaluées respectivement via une estimation de la présence de cellules à mucus et la présence d'un peptide antimicrobien i.e le lysozyme. L'évolution du poids des organes lymphoïdes de l'animal a été apprécié par la pesée des organes lymphoïdes (rate et bourse de Fabricius). L'essai a été mené en cage expérimentale 384 poulets mâles et femelles ROSS PM3 de 1 jour ont reçu pendant 35 jours soit l'aliment contrôle soit l'aliment Bp et ont été répartis selon le dispositif expérimental suivant : 24 cages/lot, 8 animaux/cage. Les performances de croissance ont été relevées à j0, j10, j25 et j35. A j35, la rate et la bourse de Fabricius ont été prélevés puis pesés. Des segments intestinaux ont été collectés pour évaluer le nombre de cellules à mucus au niveau des villosités et la présence du lysozyme. Une amélioration significative de l'IC a été observée au cours de la période j0-j10 après consommation de l'aliment Bp. A j35, une diminution significative du rapport du poids de la rate/poids de la bourse de Fabricius a été mesurée chez les animaux ayant consommé l'aliment Bp. Une augmentation significative d'une part du nombre des cellules à mucus au niveau des villosités ont également été observés chez les animaux Bp. En conclusion, l'utilisation d'un aliment enrichi en *Bacillus pumilus* chez le poussin permet l'amélioration des performances de croissance chez le poulet pendant la phase de démarrage. Cet effet est associé au niveau du tube digestif par un renforcement de la barrière physique et un effet sur le développement des organes lymphoïdes.

ABSTRACT

To reduce the use of antibiotics, we need to find sustainable solutions to optimise growth of poultry, improve their health and their immune statue. For now, the use of probiotics is one of the solution to reach these goals. Intestine is an anatomical and a dynamic immunological barrier that assure a good balance between luminal compartment and the systemic one. In this trial, the impact of a feed enriched or not in probiotic based on bacillus has been tested on zootechnical performance and evaluation of goblets cells presence in villi of the intestinal tract and the presence of lysozyme. 384 one day old chickens ROSS PM3 were reared during 35days in experimental cages (24 cages per treatment, 8 chickens per cages) and received control or the probiotics *Bacillus pumilus* feed respectively. Zootechnical performances were measured at day 10, 25 and 35. At day 35 lymphoid organs and intestinal segments have been removed. Mucus cells number were histologically measured into the villi and determined by immunohistochemistry. FCR was improved at d10 and d35 for the probiotic treatment with a higher weight of lymphoid organs ratio. At the intestine level, the number of goblets cells as well as the lysozyme presence were significantly increased in B1 chickens in comparison with control.

In conclusion, the use of probiotics i.e *Bacillus pumilus* leads to improve growth zootechnical performances of chickens during the starter phase. This effect is associated by an enhancement of the physical and chemical (innate immune system) and by a development of the lymphoid tissue.

INTRODUCTION

Dans une stratégie de réduction de l'usage d'antibiotiques en élevage, l'aviculture se doit de trouver des alternatives durables pour optimiser la croissance du jeune poussin tout en préservant sa santé digestive en termes de maintien d'une communication équilibrée entre le microbiote et l'hôte qui se traduit par un appareil digestif fonctionnel (digestion) et une bonne mise en place de son système immunitaire. Parmi les différentes stratégies pouvant être mises en place, l'incorporation dans les rations alimentaires de souches probiotiques est aujourd'hui présentée comme une des solutions alternatives.

L'épithélium intestinal constitue une barrière anatomique et immunologique dynamique qui permet d'assurer une bonne communication bidirectionnelle entre le compartiment luminal et systémique. Dans les conditions physiologiques, ceci est en partie assurée par la production et la libération de mucus *via* les cellules à mucus et la libération d'une protéine antimicrobienne comme le lysozyme. Cette protéine, constituant majeur de l'immunité innée, est présente chez de nombreuses espèces animales comme dans les cellules de Paneth au fond des cryptes de l'épithélium intestinal (Wang et al., 2011). Bien qu'actuellement la présence des cellules de Paneth chez le poulet reste controversée, la présence de lysozyme au niveau de la muqueuse digestive des volailles est largement décrite (Bar Shira et Friedman, 2018). Le lysozyme possède une activité bactéricide vis-à-vis des bactéries Gram-positif grâce à sa fonction enzymatique qui coupe la liaison glycosidique $\beta(1-4)$ entre les molécules de N-acetyl glucosamine et N-acetyl muramic acid du peptidoglycane (Chipman and Sharon, 1969). De plus, le lysozyme possède également grâce à un deuxième mécanisme d'action non lytique des propriétés antibactériennes à la fois sur les bactéries Gram-positifs et Gram-négatifs (Nile et al., 2004).

Comme le Thymus, la bourse de Fabricius est un organe lymphoïde primaire qui joue un rôle majeur dans l'immunité des oiseaux (Toivanen, 1987). Chez le poussin, le développement pondéral par l'apport d'une alimentation précoce non interrompue induit une augmentation du poids de la bourse de Fabricius et une prolifération plus intense des lymphocytes.

Des perturbations environnementales comme une mauvaise hygiène, un stress, des troubles de la santé impactent fortement sur le développement physiologique et anatomique de la bourse de Fabricius (Siegel, 1990) affectant la croissance ultérieure des poussins en réduisant leur capacité de défense immunologique (Bigot et al., 2001). La rate, organe lymphoïde secondaire présente un rôle prédominant dans le développement de l'immunité adaptative.

Il existe un lien fort entre les produits de dégradation de l'aliment et son action sur la barrière intestinale, notamment du fait de son contact direct. Dès lors, l'utilisation d'un aliment enrichi en probiotique peut s'avérer stratégique pour améliorer l'intégrité de la barrière physique et immunitaire de la muqueuse digestive.

Dans ce cadre, l'impact d'un aliment pour poulet de chair contenant ou non un probiotique *Bacillus pumilus* a été testé à la fois sur 1) les performances zootechniques, 2) l'intégrité de la barrière physique et immunitaire de l'intestin à travers une quantification du nombre des cellules à mucus et des niveaux de lysozyme au niveau de l'épithélium intestinal et 3) les organes lymphoïdes reflétant l'état de développement de l'immunité systémique (rate et bourse de Fabricius).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Protocole expérimental

L'essai s'est déroulé sur le domaine expérimental de Lamothe, Seysses (31600). Un effectif de 384 poussins mâles et femelles de souche ROSS PM3 a été utilisé sur une période allant de 0 à 35 jours suivant la conduite d'élevage indiquée par Aviagen et élevés dans un dispositif de type cage (48 cages de 3m², sur grillage isolant les animaux de leur excréta). Dans chaque case sont placés 8 poussins à j0, et ce, jusqu'à la fin de la période expérimentale (j35). Du stade poussin au stade poulet, les animaux ont reçu sur une période d'élevage de 35 jours soit l'aliment contrôle soit l'aliment Traitement Bp (taux d'inclusion à 10⁹ ufc/kg d'aliment). Les animaux ont été répartis selon le dispositif expérimental suivant : 24 cages/lot, 8 animaux/cage, soit 192 animaux par traitement. Concernant l'aliment, il couvre les besoins des animaux sans carence ni excès. Seule la présence du probiotique Bp dans l'aliment diffère entre les deux

aliments. A j0, j10, j25 et j35 l'ensemble des animaux ont été pesés et les paramètres suivants ont été évalués en tenant compte ou non de la mortalité : Gain Moyen Quotidien (GMQ), GMQ Vivants (GMQ V), Consommation (Conso) et Conso V, indice de consommation (IC) et IC V. L'IC économique (IC E) a été ensuite calculé grâce au rapport Conso/GMQ V. A j35, après la pesée et de façon aléatoire, 10 animaux par traitement ont été abattus par électronarcose puis saignés par exsanguination. Les organes lymphoïdes ont été pesés sur l'ensemble des animaux. Puis des segments de jéjunum et d'iléon ont été prélevés pour les analyses visant l'évaluation de l'état de la barrière intestinale physique et immunitaire des animaux.

1.2. Etat de développement du statut immunitaire

A j35, deux organes lymphoïdes (rate, bourse de Fabricius) ont été prélevés afin d'évaluer l'influence du probiotique par rapport à l'aliment contrôle sur leur développement. Après prélèvement, les organes ont été pesés et le ratio du poids de rate sur le poids de la bourse de Fabricius a été calculé.

1.3 Analyses immunohistochimiques et histologiques

A j35, le tractus digestif des animaux a été retiré : au niveau du jéjunum et de l'iléon dans la première portion de leur partie distale un segment d'un centimètre a été prélevé et fixé dans une solution de formaldéhyde à 4% ou dans une solution de Carnoy pendant 24h. Les tissus ont été déshydratés puis inclus en paraffine. Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Microm, France) (2 lames par animaux). Pour le marquage du lysozyme, les coupes ont été hydratées et plongées dans un bain de tampon citrate 10mM, pH 6 à 95°C, pour régénérer les antigènes. Après saturation des sites de liaison non spécifiques avec du PBS-Tween-BSA, les coupes ont été exposées successivement avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-lysozyme (1/100, Abcam, Paris, France) une nuit à +4°C, puis avec des anticorps d'âne anti-lapin IgG alexa 488 (1/2000, Jackson, Suffolk, UK) et avec le WGA alexa 594 (1/4000, Invitrogen, Life Technology, Cergy Pontoise, France). Les lames ont été rincées avec du PBS puis recouvertes avec un milieu de montage contenant du DAPI (P36931, Invitrogen). Sur les coupes d'iléon, les mucines neutres ont été mises en évidence grâce à une

coloration à l'acide périodique et réactif de Schiff tandis que pour les mucines acides, une coloration au bleu d'Alcian a été effectuée (Kamphuis et al., 2017).

Suite à ces colorations, les lames ont été analysées à l'aide d'un microscope optique (Nikon Eclipse 90i) et d'un logiciel d'image (Image J). Le dénombrement des cellules a été exprimé en nombre de cellules par villosité.

1.4. Analyses statistiques

Compte tenu du dispositif expérimental décrit ci-dessus, les résultats ont été analysés en utilisant un test de comparaison 2 à 2 i.e test de Student. Pour les critères de zootechnie, le poids à j0 a été utilisé comme covariable afin de s'affranchir d'un biais lié au poids de départ des animaux. De la même façon les données d'histologie ont été analysées sur chaque segment (test de Student). L'ensemble des analyses ont été réalisés à l'aide du logiciel R et jugé significatif pour une valeur de $p < 0.05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Sur toute la période expérimentale (j0 à j35), aucune différence significative sur GMQ ou la Conso (Vivants ou Totale) n'a pu être mise en évidence (y compris en prenant en compte un effet salle et le poids à J0 en covariable d'analyse statistiques). Aucune différence significative entre les traitements de l'IC V et de l'IC E n'a pu être mise en évidence sur la période totale d'élevage, seule une tendance ($p = 0.08$ et $p = 0.07$ respectivement) a été observée. En revanche, pour l'IC total (IC), on observe une différence significative entre les traitements ($p = 0.04$) (Tab. 1). L'ensemble des résultats obtenus à j35 résultent des performances observées chez le poussin (j0-j10) par une diminution significative de l'IC des animaux consommant l'aliment Bp ($p = 0.04$). En effet, les résultats obtenus sur les périodes j10-j25 et j25-j35 ne présentent aucune différence significative (résultats non présentés ici). L'aliment Bp présente donc un réel intérêt sur la phase de démarrage du jeune animal.

De nombreuses études ont montré que la phase de démarrage est une phase critique dans la mise en place du système immunitaire chez le poulet. (Kaspers et al., 2017 ; Shira et Friedman 2018).

La consommation de l'aliment Bp induit une diminution du rapport poids de rate/poids de bourse de Fabricius. Elle résulte essentiellement d'une

diminution du poids de la rate (Tab 2), organe lymphoïde secondaire, montrant une possible adaptation et la mise en place d'une réponse immunitaire de l'animal.

En parallèle, l'analyse immunohistochimique montre une augmentation significative du nombre de cellules à mucines neutres et acides sur l'iléon prélevé chez les animaux ayant reçu le traitement Bp. Ces cellules ont un fort pouvoir sécrétoire de mucines, glycoprotéines qui forment une barrière de mucus tridimensionnelle jouant un rôle protecteur de l'épithélium intestinal contre différents agents potentiellement pathogènes ou toxiques contenus dans la lumière intestinale. Par ailleurs le mucus joue un rôle lubrifiant qui facilite le passage du bol alimentaire et des matières fécales tout au long du tube digestif diminuant le risque abrasif des fientes (Florey, 1955).

L'ensemble de ces résultats montre une modulation du développement du système immunitaire chez les animaux consommant le probiotique Bp et d'autre part un renforcement de la barrière physique de mucus visant à protéger la muqueuse intestinale face à de multiples agents agresseurs.

L'analyse des coupes immunohistochimiques a également permis de mettre en évidence et confirmer la présence de lysozyme au niveau de l'épithélium intestinal du poulet. Cette présence, n'est pas localisée dans les cellules de Paneth comme chez les mammifères, mais tout le long de la villosité (Fig. 1). Ces résultats viennent confirmer ceux de Wang et al., 2016 : la présence du lysozyme n'est pas uniquement réduite au niveau des cryptes mais est également localisée tout au long des villosités. En revanche, une approche semi-quantitative de type Western Blot permettrait de quantifier d'éventuelles différences entre traitements quant à la présence du lysozyme.

Ces observations peuvent être en lien avec la vitesse très rapide du renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal du poulet en lien avec le transit du bol alimentaire chez le poulet d'environ 3/4h. Une présence sur l'ensemble de la villosité permettrait de répondre de manière plus effective aux agressions exogènes et endogènes. L'ensemble des observations histologiques et immunohistochimiques ont été réalisés à J35. Aussi, il serait intéressant, pour une meilleure compréhension des propriétés immunomodulatrices et de renforcement de la barrière digestive du Bp de mener ce même type d'étude à un âge précoce du poussin (J10). Cette étude permettrait d'illustrer la fenêtre critique d'intervention optimale dans l'apport stratégique d'un aliment contenant la souche Bp pendant toute la période d'élevage.

CONCLUSION

L'utilisation du probiotique de type *Bacillus pumilis* permet l'amélioration des performances de croissance chez le poulet de chair pendant la phase de démarrage. Cet effet associé à un renforcement de la barrière physique et immunitaire du tube digestif notamment par l'augmentation du nombre de cellules à mucus au niveau des villosités intestinales et un effet sur les organes lymphoïdes. Ces résultats originaux permettent de proposer cet aliment enrichi en souche probiotique Bp comme une alternative durable à l'antibiothérapie en élevage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Nile CJ, Townes CL, Michailidis G, Hirst BH, Hall J., 2004, Cell Mol Life Sci., Nov;61(21)
 Bar Shira E, Friedman A., 2018, PLoS ONE 13(7)
 Bigot K, Tesseraud S, Taouis M, Picard M., 2001, INRA Prod. Anim., 14 (4), 219-230
 Chipman, D.M. and Sharon, N., 1969, Mechanism of Lysozyme Action. Science, 165, 454-465
 Florey, H., Biological Sciences., 1955, 147-158.
 Kaspers B, Lettmann S, Röhl S, Schouler C, Velge E, 2017, JRA-JRFG 12ème Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à foie gras, Tours, 35-52.
 Kamphuis J. B. J., Mercier-Bonin M, Eutamène H, Theodorou V., 2017, Scientific Reports, 7 (8527)
 Siegel B.P., 1990. Poultry Digest., Vol., 4: 38-42
 A. Toivanen., 1987, Avian Immunology: Basis and Practice, Vol. 1, CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, p. 236.
 Wang DH, Peregrina K, Dhima E, Lin EY, Mariadason JM, Augenlicht LH., 2011, P Natl Acad Sci USA., 108(25):10272-7
 Wang L, Li J, Li J Jr., Li RX, Lv CF, Li S., 2016, Poult Sci; 95(7):1631-5

Tableau 1. Performances zootechniques des animaux

Période d'élevage de 0 à 10 jours				
	Contrôle	Traitement Bp	SEM	p-Value t.test ¹
GMQ Vivants (V)	42,1	42,3	0,16	0,37
GMQ	26,1	26,6	0,24	0,54
Conso V	26,1	26,5	0,25	0,03
Conso	40,2	38,4	0,45	0,10
IC V	1,550	1,441	0,022	0,01
IC	1,559	1,472	0,021	0,04
Période d'élevage de 0 à 35 jours				
	Contrôle	Traitement Bp	SEM	p-Value t.test ¹
GMQ V	53,2	53,2	0,62	0,63
GMQ	50,8	51,3	0,54	0,40
Conso V	64,9	62,5	1,02	0,16
Conso	67,5	65,7	0,82	0,21
IC V	1,233	1,177	0,024	0,08
IC	1,332	1,280	0,011	0,04
IC Economique	1,278	1,235	0,017	0,07

¹ : t.test avec le poids vif à j0 en covariance**Tableau 2.** Résultats des analyses des organes lymphoïdes et immunohistochimiques du tube digestif

Poids des organes lymphoïdes (g) ¹				
	Contrôle	Traitement Bp	SEM	p-Value
rate	2,35	2,10	0,11	0,20
bourse de fabricius	3,04	3,01	0,14	0,65
Poids Rate/Poids de bourse de F.	0,85	0,70	0,03	0,04
Histologie (nb cellules/villosité)				
cellules à mucines neutres ²	16,9	34,1	2,0	<0,001
cellules à mucines acides ³	15,5	28,4	1,8	<0,001

¹n=10 par traitement , ²n=10 par traitement, segments prélevés: jéjunum, iléon, ³n=10, segment prélevé: iléon**Figure 1** Lysozyme marqué par immunofluorescence (flèches) sur coupe de jéjunum.

A : animaux contrôle, B : animaux Bp, (x20)

