

EFFETS DE L'ADDITION DE *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* SUR L'INFECTION A *ESCHERICHIA COLI* ET SUR LA COLONISATION PAR *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ET *SALMONELLA TYPHIMURIUM* CHEZ LE POULET.

Awaad M.H.H. ¹, Afify M. A. ¹, Zouel-Fakar S.A. ¹, Shalaby B. ¹, Chevaux E. ²,
Delforge J. ², Dussert L. ², Khetrou M. ²

¹Faculté des Sciences Vétérinaires, Université du Caire, Egypte

²Lallemand S.A.S., BP 59 – 31702 Blagnac Cedex, France

Effets de l'addition de *Pediococcus acidilactici* sur l'infection à *Escherichia coli* et sur la colonisation par *Clostridium perfringens* et *Salmonella typhimurium* chez le poulet de chair

Le projet a été conduit durant la période 2001-2003 à l'Université Vétérinaire du Caire en Egypte. Le but était d'évaluer l'impact de *Pediococcus acidilactici* (CNCM MA 18/5M) sur des germes pathogènes majeurs.

Expérience 1 : 300 poulets 'Hubbard' ont été répartis en 2 groupes (1-2) expérimentaux : Traitement (*Pediococcus acidilactici*, PA) et Témoin (TEM). L'additif microbien a été incorporé dans l'aliment du 1^{er} jour au 49^e jour d'âge, à la dose de 100g/tonne d'aliment, soit 10⁹ UFC/kg d'aliment. Chaque groupe contenait 150 poulets répartis en 3 parquets de 50 poulets chacun. Les 2 groupes ont été infectés par *E. coli* O142 à 10⁵ UFC/oiseau à 28 jours d'âge et gardés sous observation clinique pendant 3 semaines. Trois oiseaux de chaque groupe ont été sacrifiés aux jours 3, 7, 14 et 21 après l'infection, pour des études histopathologiques du cœur, de la rate, du foie et pour quantifier les lésions associées à ce pathogène (1:faible ; 2: modéré ; 3: sévère). Chez les animaux infectés à *E. coli*, la viabilité était de 36 % dans le groupe supplémenté à *P. acidilactici* et de 28% dans le groupe Témoin. Les lésions étaient significativement moins importantes pour les animaux Traités (PA=1,83 et TEM=2,39, p<0,05).

Expérience 2 : 300 poulets 'Hubbard' ont été répartis en 5 groupes (1-5). Chaque groupe contenait 60 poulets répartis en 3 parquets de 20 poulets chacun. Les groupes 1 et 2 étaient supplémentés en *Pediococcus acidilactici*, du 1^{er} au 21^e jour d'âge, à la dose de 100g/tonne d'aliment, soit 10⁹ UFC/kg d'aliment. Les groupes 1 et 3 étaient infectés *per os* par *Salmonella typhimurium* au jour 2 à la dose de 10⁵ UFC/oiseau. Les groupes 2 et 4 étaient infectés *per os* par *Clostridium perfringens* au jour 2 à la dose 0,5.10⁸ UFC/oiseau. Le groupe 5 n'était ni supplémenté en probiotique, ni infecté. Sept oiseaux de chaque groupe ont été sacrifiés pour quantifier les lésions ; les contenus intestinaux et caecaux ont été mis en culture pour dénombrer *S. typhimurium* et *C. perfringens* aux jours 7, 14 et 21 après challenge. Chez les animaux challengés à *C. perfringens* et *S. typhimurium*, une réduction significative de la colonisation intestinale et caecale de *C. perfringens* et *S. typhimurium* a été relevée dans le groupe traité. Ainsi, l'administration de *Pediococcus acidilactici* (MA 18/5M) contribue à améliorer la santé du poulet de chair et de l'homme en limitant le développement et la contamination de germes potentiellement pathogènes.

Effects of the addition of *Pediococcus acidilactici* on *Escherichia coli* infection and on the colonisation of *Clostridium perfringens* and *Salmonella typhimurium* in broilers

The project was conducted during the period 2001-2003 by the Vet University of Cairo in Egypt. The aim was to assess the impact of *Pediococcus acidilactici* (CNCM MA 18/5M) on pathogens found in poultry production.

Experiment 1 : 300 chickens "Hubbard" were assigned to 2 experimental groups (1-2): Treatment (*Pediococcus acidilactici*, PA) and Control (CTR). The microbial additive was incorporated in the feed from the 1st day to the 49th day of life, at 100g/ton feed (10⁹ CFU/kg feed). Each group was composed of 150 chickens, divided into 3 pens of 50 birds each. Groups 1 and 2 were infected by *E. coli* O142 at 10⁵ CFU/bird at 28 days of age and kept under clinical observation for 3 weeks. Three birds of each group were sacrificed at day 3, 7, 14 and 21 after challenge, for histopathologic studies of the heart, spleen, liver and to quantify the associated lesions (1:mild ; 2: moderate ; 3: severe). In the infected animals with *E. coli*, the viability was 36 % in the group supplemented with *P. acidilactici* and 28 % in the Control group. The lesions were significantly reduced for the animals Treated (PA=1.83 and CTR =2.39, p<0.05)

Experiment 2 : 300 chickens "hubbard" were assigned to 5 groups (1-5). Each group contained 60 birds, divided into 3 pens of 20 birds each. Groups 1 and 2 were supplemented with *Pediococcus acidilactici*, from the 1st day to the 21th day of live, at 100g/ton feed (10⁹ CFU/kg feed). Groups 1 and 3 were challenged *per os* with *Salmonella typhimurium* at day 2 at 10⁵ CFU/bird. Groups 2 and 4 were challenged *per os* with *Clostridium perfringens* at day 2 at 0.5.10⁸ CFU/bird. Group 5 was neither supplemented with probiotic nor infected. Seven chickens per group were randomly sacrificed and subjected to post mortem lesion scoring, and their intestinal and cecal contents were cultured for bacterial count of *S. typhimurium* and *C. perfringens* at day 7, 14 and 21 after challenge. In the animals challenged with *C. perfringens* and *S. typhimurium*, a significant reduction of intestinal and cecal colonization of *C. perfringens* and *S. typhimurium* were observed in the treated group.

The administration of *Pediococcus acidilactici* (MA 18/5M) contributes to improve health of broiler and consumer by limiting the development of potential food borne pathogens.

INTRODUCTION

La sécurité alimentaire est une question essentielle dans l'industrie de la volaille. Les probiotiques représentent une méthode naturelle d'enrichissement de la flore intestinale et d'exclusion compétitive pour lutter contre les bactéries pathogènes.

Pediococcus acidilactici est un microorganisme capable de produire de l'acide lactique. Utilisé comme probiotique il présente des effets positifs sur l'équilibre et le rôle de la flore intestinale (Jin et al., 2000) tout en améliorant également les performances de l'animal (Simon et al., 2001).

P. acidilactici renforce l'écosystème microbien des volailles, contribue à la défense immunitaire et protège les poulets contre les conséquences de stress tels que la vaccination ou les changements de températures. Une amélioration de la consommation, du gain de poids et de l'indice de consommation a été observée (Jin et al., 1998; Simon et al., 2001).

L'objectif de cette étude était de mesurer l'effet d'un additif microbien *Pediococcus acidilactici* (Bactocell®) sur la colonisation de micro-organismes potentiellement pathogènes.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Lieu de l'étude

L'étude s'est déroulée à l'Université Vétérinaire du Caire en Egypte [poultry disease department].

1.2. Durée de l'étude

L'étude a été menée en deux expérimentations réparties sur une période de 2 années entre 2001 et 2003. La durée d'élevage était de 49 jours pour la première et de 24 jours pour la deuxième.

1.3 Animaux

Pour l'expérience 1, 300 poulets 'Hubbard' ont été répartis en 2 groupes (1-2) de 150 animaux, répartis en 3 parquets de 50 poulets chacun.

Pour l'expérience 2, 300 poulets 'Hubbard' ont été répartis en 5 groupes (1-5). Chaque groupe contenait 60 poulets répartis en 3 parquets de 20 poulets chacun.

Tous étaient gardés dans des enclos séparés avec une densité de 12 volailles/m². Les poulets ont été vaccinés contre la maladie de Newcastle à 5 et 18 jours d'âge.

1.4 Traitements expérimentaux

L'essai 1 comprenait 2 groupes expérimentaux: groupe 1, supplémenté par *Pediococcus acidilactici*, (PA) et groupe 2, témoin non supplémenté (TEM). L'additif microbien a été incorporé dans l'aliment du 1^{er} au 49^e jour d'âge, à la dose de 100g/tonne d'aliment, soit 10⁹ UFC/kg d'aliment. Les groupes 1

et 2 ont été inoculé oralement par *E. coli* O142 à 10⁹ UFC/oiseau à 28 jours d'âge et gardés sous observation clinique pendant 3 semaines. Trois oiseaux de chaque groupe ont été sacrifiés aux jours 3, 7, 14 et 21 après l'infection, pour des études histopathologiques du cœur, de la rate, du foie et pour quantifier les lésions associées à ce pathogène. Les tissus ont été conservés dans une solution saline à 10% de formol; la sévérité des lésions est notée visuellement selon un barème de 1 (léger) à 3 (fort). Le score lésionnel représente la moyenne des enregistrements par groupe.

L'expérience 2 comprenait 5 groupes. Les groupes 1 et 2 étaient supplémentés en *Pediococcus acidilactici*, du 1^{er} au 21^e jour d'âge, à la dose de 100g/tonne d'aliment, soit 10⁹ UFC/kg d'aliment. Les groupes 1 et 3 étaient infectés *per os* au jour 2 avec 0,25ml de solution contenant 4*10⁵/ml *Salmonella typhimurium* résistante à la novobiocine (NO) et l'acide nalidixic(AN). Les groupes 2 et 4 étaient infectés *per os* au jour 2 avec 0,5 ml d'une solution contenant 10⁸ CFU/ml de *Clostridium perfringens*. Le groupe 5 n'était ni supplémenté en probiotique, ni infecté. Sept oiseaux de chaque groupe ont été aléatoirement sacrifiés pour quantifier les lésions selon le barème décrit en expérience 1. Les contenus intestinaux et caecaux ont été mis en culture pour dénombrer *S. typhimurium* (gélose vert brillant contenant NO et AN) et *C. perfringens* (gélose au sang) aux jours 7, 14 et 21 après infection.

1.5 Rations et système d'alimentation

Pour les deux expériences, les poulets ont reçu successivement deux aliments différents : démarrage (63,5% maïs, 32% farine de soja, 2,7% farine animale, 1,1% son de blé, prémix, méthionine et chlorure de sodium -- protéine brutes : 21,64%, graisse : 2,7%, fibres : 2,7%, énergie métabolisable: 2950 Kcal/kg), engraissement (72% maïs, 22% farine de soja, 2,6% farine animale, 2,5% son de blé, prémix, méthionine et chlorure de sodium -- protéine brutes : 17,7%, graisse : 3%, fibres : 2,7%, énergie métabolisable: 3010 Kcal/kg). La ration contenait un anticoccidien, la semduramicine, à une concentration de 25 ppm et ne contenait pas d'antibiotique facteur de croissance.

1-6 Analyses statistiques

Les scores lésionnels et les niveaux de colonisations intestinales ont été comparés selon le test de Mann-Whitney. Les différences sont considérées significatives au seuil de 5 %.

2. RESULTATS

Pour l'expérience 1, la viabilité était de 36% dans le groupe supplémenté par *P. acidilactici* et de 28% (p<0.05) dans le groupe témoin. Les lésions dues à *E. coli*, O 142 étaient significativement moins

importantes pour les animaux Traités (PA=1,83 et TEM=2,39, p≤0,05). (Tableau 1).

Pour l'expérience 2, les animaux infectés par *C. perfringens* et recevant *P. acidilactici* ont enregistré une réduction significative de la colonisation intestinale et caecale de *C. perfringens* à J7, J12, J21. (Tableau 2).

De même, pour l'infection à *S. typhimurium*, le groupe traité avec *P. acidilactici* a enregistré une réduction significative de la colonisation d'un facteur d'environ 3 log entre J3 et J14 (Tableau 3).

Les lots traités et témoins inoculés en salmonelle ou clostridium n'ont pas enregistré de mortalité et de signe de lésion.

3. DISCUSSION

Mulder (1996) précise que les probiotiques sont capables d'inhiber la croissance de bactéries potentiellement pathogènes en modifiant le pH, par la production d'acide lactique.

Pour l'exemple des salmonelles ingérées par voie orale, la colonisation intestinale est généralement la première étape d'infection provoquant une excrétion persistante dans les fientes. L'invasion peut atteindre le foie et la rate mais le principal site de multiplication est le caecum (Hudault, 1985).

Clostridium est une cause majeure d'entérite nécrotique chez l'homme (Brynstad, 2002) et reste plus fréquemment rencontré dans les pays industrialisés. Son action ainsi que celle de son

entérotoxine peut être mortelle chez le nouveau né ou les personnes âgées.

Au vu des présentes expériences, il apparaît que l'addition de *Pediococcus acidilactici* (CNCM MA 18/5M), souche capable de produire de hauts niveaux d'acide lactique, permet de limiter la colonisation au niveau intestinal et caecal par *Salmonella typhimurium* et *Clostridium perfringens* et probablement de *Escherichia coli*.

L'action protectrice du probiotique *Pediococcus acidilactici* a été récemment décrite sur modèle monogastrique porcelet: Lessard & al (2005) démontrent que la présente souche ainsi qu'un antibiotique limitent la translocation d'*E.coli* comparée à un témoin et favorise l'intégrité du tube digestif.

Fukata & al 1991 ont mis en évidence que *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus faecium* réduisent la sévérité de l'entérite nécrotique.

Line et al 1998 mesure une réduction du portage de Salmonelle dans le caecum de poulets supplémentés en levure probiotique.

L'utilisation de probiotique pour l'exclusion compétitive de pathogène est aussi décrite en application humaine; elle est même utilisée en tant qu'agent préventif de diarrhée et de prolifération de pathogènes opportunistes associés à l'utilisation d'antibiotiques (Mc Farland 1993).

En conclusion, l'additif *Pediococcus acidilactici* peut représenter une solution de lutte contre certains pathogènes. Ce bénéfice concerne également l'alimentation humaine, le poulet étant une source de contamination pour l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brynstad 2002 Int.J.Of Food Microbiol. Vol 74 (3) 195-202
Fukata T 1991 .Avian Dis 35:635-647
Hudault, Can J.Microbiol. 31,832
Jin L.Z., Ho Y.W., Abullah N., Ali M.A., Jalaludin S., 1998. Anim. Feed Sci. Technol., 70: 197-209.
Jin L.Z., Ho Y.W., Abullah N., Ali M.A.,
Lessard Et Al 2005, Journée Recherche Porcine, 37, 359-366
Line Je, 1998. Poult Sci ; 77(3):405-10
Mc Farland, Bernasconi, 1993. Microbial Ecology In Health And Disease. 6: 157-171
Simon O., Jadamus A., Vahjen W., 2001. J. Anim. Feed Sci., 10: 51-67.

Tableau 1 - Résultats d'infection de poulets traités ou non de Bactocell avec E.Coli 10⁹ CFU .

Traitement	Age (jours)	No. animaux	Survivants	morts	Score lésionnel	Taux de viabilité (%) n=293
<i>P. acidilactici</i>	7	150	150	0	1.83 *	36 % *
	14		150	0		
	21		150	0		
	28		150	0		
	35		59	91		
	42		54	5		
	49		54	0		
Témoin	7	150	150	0	2.39	28 %
	14		150	0		
	21		150	0		
	28		150	0		
	35		51	99		
	42		43	8		
	49		42	1		

*: différence significative par rapport au témoin non traité (P<0.05).

Tableau 2 - Mesures intestinales de *Clostridium perfringens* chez des poulets ayant reçu ou non *P.acidilactici* de 0 à 21 jours après l'infection

Mesure intestinale de <i>C. perfringens</i> (x10 ⁵ ufc/g contenu intestinal)	0 h	3 j	7 j	14 j	21 j
<i>C. perfringens</i>	0	1,5	2,7	12,5	25
<i>C. perfringens</i> + <i>P. acidilactici</i>	0	0	0,5*	1,5*	2,5*

. * : différence significative par rapport au témoin non traité (p≤0,05) n=7/traitement/jour

Tableau 3 - Mesures cecales de *Salmonella typhimurium* chez des poulets ayant reçu ou non *P.acidilactici* de 0 à 21 jours après l'infection

Mesure cécale de <i>S. typhimurium</i> (x10 ⁵ ufc/g contenu cecal)	0 h	3 j	7 j	14 j	21 j
<i>S. typhimurium</i>	0	1305	42800	2550	4
<i>S. typhimurium</i> + <i>P. acidilactici</i>	0	130*	305*	151*	0,002*

* : différence significative par rapport au témoin non traité (p≤0,05)) n=7/traitement/jour