

QUANTIFICATION D'UNE BACTERIE PROBIOTIQUE (*PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI*) DANS LES SEGMENTS DIGESTIFS DE POULES PONDEUSES

Guillou David¹, Mulsant Caroline², Sacy Audrey¹, Roffidal Lucien²

¹LALLEMAND SAS - 19 rue des Briquetiers BP59 -31702 BLAGNAC Cedex, France

²INZO – Rue de l'Eglise- Chierry – CS 90019 - 02402 CHATEAU THIERRY, France

asacy@lallemand.com

RÉSUMÉ

Cet essai a pour objectifs d'étudier l'effet dose d'un probiotique (*Pediococcus acidilactici* MA 18/5M (PA)) et l'intérêt de son encapsulation dans les contenus digestifs après une semaine de supplémentation de cette bactérie sur 46 poules pondeuses NovoBrown de 56 semaines d'âge en cage de 3. Le premier jour de l'essai, 3 poules d'une même cage, n'ayant pas reçu de probiotique, étaient euthanasiées. Les 15 autres cages étaient réparties en 5 lots et recevaient pendant une semaine l'un des aliments suivants : témoin sans probiotique (T1), PA était inclus à la demi-dose réglementaire (T2), PA à la dose réglementaire minimale (T3, 1.10^6 UFC/g), PA à 5 fois la dose réglementaire (T4), et PA micro-encapsulé à la dose réglementaire (T5). Puis, toutes les poules recevaient le régime T1 pendant la deuxième semaine de l'essai. La collecte des contenus digestifs était réalisée à 7 jours (après une semaine de supplémentation) sur 6 poules par traitement et à 14 jours (après une semaine d'arrêt) sur les dernières 3 poules par traitement. Les digestats étaient prélevés dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon et les caeca. *Pediococcus spp.* n'était jamais détecté dans les échantillons des poules du lot T1 et après une semaine d'arrêt pour tous les lots. PA n'était retrouvé dans les digestats des poules que pendant la période d'administration et en proportion de la dose administrée. Les dénombrements de PA dépendaient significativement du segment intestinal et de l'aliment, mais pas de leur interaction. La micro-encapsulation ne semblait affecter que la teneur dans l'iléon. Les numérations dans les différents digestats étaient proches des teneurs dans l'aliment pour une inclusion supérieure ou égale à la dose réglementaire (T3, T4 et T5). A la fin du tractus (dans les caeca), les numérations étaient supérieures à celles des autres compartiments et tendaient à saturer pour les inclusions supérieures à la dose réglementaire (1.10^6 UFC/g).

ABSTRACT

Quantitative recovery of probiotic bacteria (*Pediococcus acidilactici*) in the gut segments of laying hens

This trial aims at defining a probiotic dose effect (*Pediococcus acidilactici*, MA 18/5, PA) and the interest of its microencapsulation after one week of supplementation of this bacteria on 46 NovoBrown laying hens from 56 weeks of age, housed in cages of 3. The first trial day, 3 hens from the same cage were skulled to describe the initial state. The 15 other cages were allocated to 5 treatments: negative control (T1), half of the registered dose (T2), registered dose (T3, 1.10^6 CFU/g), 5 times of the registered dose (T4), and the micro-encapsulated product at the registered dose (T5). Then, all hens received T1 diet during the second week of the trial. The digestive content was collected at day 7 (after one week of supplementation) on 6 hens per treatment and at day 14 (after one week of T1 diet) on the last 3 hens per treatment. Their digestive tract collected and their digesta sampled coming from duodenum, ileum, jejunum and caeca. *Pediococcus spp.* was never found in the digestive tract in the T1 group and after one week of supplementation for all groups. PA was only found during the period of supplementation and in proportion of the inclusion rate. The micro-encapsulation seemed to improve the concentration of *Pediococcus* only in the ileum. The counts in the digesta were closed to the concentration of PA in the diet for the inclusion rate superior or equal to the registered dose (T3, T4 and T5). The number of PA colonies was significantly depending on intestinal compartment and the diet, but not to their interaction. At the end of the tract (in the caeca), counts were higher than in the upper intestine, and the dose-response tended to saturate above commercial dose.

INTRODUCTION

Un des pré-requis à l'étude des effets des probiotiques, est la détermination de leur taux d'incorporation dans l'aliment ou dans l'eau de boisson, suivant la dose efficace que l'on souhaite retrouver dans le tractus digestif de l'espèce cible. selon la définition des probiotiques donnée en 2001 par l'OMS et la FAO, ce sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ». Cette information est également un préalable à la compréhension de l'étude du mode d'action de ces micro-organismes chez l'hôte.

L'efficacité zootechnique du probiotique *Pediococcus acidilactici* CNCM MA 18/5M (PA) a largement été documentée en poules pondeuses (Awaad *et al.*, 2005 ; Quarantelli *et al.*, 2008 ; Mikulski *et al.*, 2012 ; Alleman *et al.*, 2011 ; Agazzi *et al.*, 2007 ; Chevaux *et al.*, 2014) et cette bactérie fut approuvée par l'Union Européenne comme additif zootechnique (groupe fonctionnel : stabilisateur de flore intestinale, Reg. 212/2011). La dose minimale d'incorporation enregistrée en poules pondeuses est de 10^6 UFC/g d'aliment.

Ainsi, l'objectif de cet essai est la détermination du nombre de colonies viables dans les différents segments digestifs de la poule pondeuse, en fonction de la dose incorporée dans l'aliment. L'intérêt de la technologie de la micro-encapsulation, qui permet de protéger la bactérie de certains traitements thermiques, est également investigué dans cette étude.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et logement

L'essai s'est déroulé au Centre de Recherches Zootechniques Appliquées à Montfaucon (Aisne). Quarante huit poules de souche NovoBrown, âgées de 56 semaines, étaient logées dans 16 cages identiques contenant 3 poules. La température de consigne pour toute la durée de l'essai était de 22°C, avec un programme lumineux de 16h de jour.

1.2. Alimentation

La semaine précédant le démarrage de l'essai, toutes les poules recevaient un même aliment, composé de maïs, blé, tourteau de soja, gluten de maïs, tourteau de tournesol, tourteau de colza, son fin de blé, minéraux et acides aminés, et apportant 2580 kcal/kg EMAn, 159 g/kg de Matières Azotées Totales et 40 g :kg de calcium, présenté sous forme de farine. L'aliment était distribué manuellement, en deux repas par jour, à 8h puis 15h30, à volonté.

L'essai consistait à comparer cinq régimes : un aliment Témoin (T1), sans probiotique, identique à l'aliment de la période pré-expérimentale ; trois

aliments (T2, T3, T4) correspondant à des doses croissantes de PA (la moitié de la dose minimale réglementaire, la dose minimale réglementaire et cinq fois celle-ci) ; un dernier aliment (T5), incorporant une forme de PA micro-encapsulée, à la dose minimale réglementaire. Ainsi, deux sources de PA étaient employées : BACTOCELL® et BACTOCELL®ME pour la forme micro-encapsulée (Lallemand SAS, France). Elles étaient incorporées à l'aliment T1 sous la forme de pré-mélanges à 10%, sur support carbonate de calcium, à l'aide d'un mélangeur de laboratoire et d'une balance de précision.

Les teneurs en humidité, Matières Azotées Totales, Calcium et PA étaient déterminées sur les 5 régimes. La composition nutritionnelle était conforme à l'attendu, les teneurs en PA étaient inférieures à l'attendu mais la hiérarchie entre les régimes restait respectée (soit en \log_{10} (UFC/g) : T2=4,35 ; T3=5,21 ; T4=5,36 et T5=3,76).

1.3. Déroulement de l'essai

Le premier jour de l'essai, 3 poules d'une même cage étaient euthanasiées, dans le but de décrire l'état initial des contenus digestifs.

Trois cages par traitement ont été aléatoirement affectées à l'un des 5 régimes pendant une semaine, toutes situées dans une même salle. Après 7 jours, les poules de deux cages par traitement étaient euthanasiées à leur tour.

Les poules restantes (1 cage par traitement) recevaient à nouveau l'aliment T1 pendant 1 semaine, puis euthanasiées, afin d'évaluer la persistance de PA dans les segments intestinaux.

1.4. Mesures, prélèvements, analyses de PA

Chaque semaine, la consommation d'aliment, le nombre d'œufs pondus et leur poids, étaient enregistrés pour chaque cage.

Aux dates prévues, après étourdissement par électronarcose, et exsanguination, les intestins des poules étaient prélevés et disséqués sans attendre. Des prélèvements de contenus étaient réalisés dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon, et les caeca. Chaque segment digestif était pesé avant prélèvement, puis après vidange complète. Une portion de chaque échantillon (minimum 2 g) était mise en pot stérile puis expédiée par transport rapide au laboratoire de Lallemand SAS à Blagnac, pour dénombrement de PA le jour suivant.

La numération des colonies de *Pediococcus spp.* était réalisée conformément à la méthode de référence pour les aliments (Leuschner *et al.*, 2002), par mise en culture des contenus digestifs dilués sur gélose MRS neutre, additionnée de 4% de NaCl, de chlorure de triphényl-tétrazolium (colorant) et de 0,5% de Vancomycine.

1.5. Calculs et analyses statistiques

En raison du nombre de répétitions, l'effet du traitement sur les performances n'était analysé (par analyse de la variance) que pendant la semaine de supplémentation (3 cages par traitement), pas la semaine suivante (1 cage).

Pour les données de dénombrement, l'unité expérimentale considérée était la poule.

Une analyse de la variance incluant l'effet du compartiment intestinal, de l'aliment expérimental et de leur interaction, était effectuée sur les concentrations de *Pediococcus spp.* dans les contenus intestinaux, exprimées en logarithme décimal des unités formant colonies par mL, après vérification de l'absence d'effet significatif de la cage, intra traitement.

La relation quantitative entre les concentrations en PA ajoutées dans les aliments et les dénombrements dans l'intestin était décrite par régression linéaire ou quadratique.

Les calculs étaient réalisés à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2012).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Alors qu'elle s'avérait un peu faible en période pré-expérimentale (88-99 g/j), la consommation d'aliment était normale (110-130 g/j) pendant les deux semaines de l'essai. De même, le nombre d'œufs pondus et leurs calibres correspondaient aux attentes au cours des 3 semaines d'essai. Pendant la semaine de distribution des 5 traitements expérimentaux, il n'y avait pas de différences significatives de performance entre traitement, le nombre de répétitions étant limité à 3.

Dans les contenus digestifs des oiseaux du groupe T1, *Pediococcus spp.* était indétectable ($<10^2$ UFC/mL). En revanche, des quantités variables étaient retrouvées dans les différents segments des poules des autres traitements après une semaine de supplémentation (Tableau 1). A l'issue de la semaine suivant le retrait, on ne retrouvait pas de *Pediococcus spp.* dans les contenus digestifs des poules.

Globalement, la valeur dénombrée dépendait du segment considéré ($P<0,001$), de l'aliment ($P<0,001$) mais sans interaction entre ces deux facteurs. Pourtant, numériquement, les dénombrements étaient identiques dans tous les segments avec l'aliment T2 (4 log (UFC/mL)), alors que pour les autres traitements les teneurs dans les caeca restaient plus élevées que dans les autres segments. De plus, pour les traitements T4 et T5, les teneurs dans l'iléon étaient intermédiaires entre celles du jéjunum et celles des caeca.

Dans le duodénum (Figure 1) ou le jéjunum (non illustré), on observait une augmentation des dénombrements proportionnelle à l'apport alimentaire. Cet effet dose peut être rapproché de celui rapporté dans la littérature en poules pondeuses sur les performances zootechniques (Mikilskii *et al.*, 2012).

En revanche, dans l'iléon (Figure 2), on ne pouvait pas regrouper dans une même relation les apports de PA (T2 à T4) et PA micro-encapsulé (T5). Avec les 3 doses de PA, on observait une augmentation plus que proportionnelle (pente=1,5) aux apports alimentaires.

Enfin, les comptages réalisés dans les caeca présentaient une évolution quadratique (Figure 3) : à partir de la dose minimale réglementaire (1.10^6 UFC/g, soit 6 log), les concentrations dans les contenus caecaux semblaient suivre la pente de la bissectrice, alors qu'aux teneurs plus basses la progression demeurait plus rapide.

La recherche de ce microorganisme à différents niveaux du tractus et la mesure de son temps de résidence a déjà été étudiée chez la crevette (Castex, 2009) confirmant ainsi la survie dans les différents compartiments digestifs, mais l'incapacité de la souche *P. acidilactici* à coloniser le tractus intestinal.

A dose équivalente (T3 et T5), la forme microencapsulée permet une augmentation de numération de PA de 25% dans l'iléon. Ainsi pour l'étude du mode d'action et de son efficacité du probiotique et suivant le compartiment ciblé, la forme microencapsulée pourra être privilégiée, comme pour l'iléon, alors que dans les caeca, l'utilisation de la microencapsulation ne modifierait pas les conclusions.

CONCLUSION

Le probiotique *Pediococcus acidilactici* est retrouvé vivant dans les différents compartiments intestinaux avec des numérations croissantes suivant le taux d'incorporation dans l'aliment. En l'absence de stress (challenge pathogène, nutritionnel, ...), une valeur seuil semble s'établir dans les caeca pour la dose minimale enregistrée par l'UE, justifiant ainsi son niveau d'incorporation dans l'aliment. La réponse différentielle observée sur les concentrations dans l'iléon et les caeca ouvre des perspectives intéressantes de modulation des conséquences physiologiques du probiotique en fonction de la dose et de la forme d'apport. Dans une prochaine étape, à partir des contenus digestifs collectés durant cette étude pour les différents traitements, une description de la diversité bactérienne sera réalisée afin de mesurer l'influence du *Pediococcus acidilactici*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Alleman, F. Eutamene, H., Gabarrou, J.F., Micault, A., Chevaux, E ; et Demey, V. (2011). Influence of the supplementation with *Pediococcus acidilactici* on zootechnical performances of free range laying hens. 30th Poultry Science Symposium, Glasgow, 7-9 Sept 2011
2. Awaad, M. H. H.; Amer, M. H., Atta A.; ZOHAIR G. A.; Elmeniaawy, M. and Elkholy, M. A. (2005). Effect of *Pediococcus Acidilactici* on Layer Hens Serum / yolk cholesterol, egg quality and intestinal / egg shedding of *Salmonella Enteritidis*. Vet. Med. J., Giza. 53:2, 489-499
3. Castex M., 2009, Evaluation du probiotique bactérien *Pediococcus acidilactici* MA18/5M chez la crevette péneïde *Litopenaeus stylirostris* en Nouvelle-Calédonie, thèse N° /2009AGPT0017/
4. Chevaux E., Duteil E., Avril F., Demey V., Sacy A., Effect of a Probiotic (*Pediococcus acidilactici*) on Zootechnical Performances in Laying Hens on Organic Farming during Two Production Cycles, EPC 2014
5. FAO/WHO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria; Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria; Amerian Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina: FAO/WHO; 1–34
6. Griggs, J.P., and Jaco, J.P. (2005). Alternatives to Antibiotics for Organic Poultry Production, J Appl Poult Res , 14 (4): 750-756.
7. Leuschner R., Kneifel W., Vernoux J.P., Stanton C., Aldamiz P., 2002.Methods for the official control of probiotics used as feed additives, Volume I. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp 379.
8. Milkulski, D., Jankowski, J., Naczamanski, J., Mikulska, M. and Demey, V. (2012). Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. Poultry Science 91 :2691–2700
9. Quarantelli A, Righi F, Agazzi A, Invernizzi G, Ferroni M, Chevaux E (2008). Effects of the administration of *Pediococcus acidilactici* to laying hens on productive performance. Vet. Res. Commun. 32: S359-361.
10. R Development Core Team 2012.URL <http://www.R-project.org/>.

Tableau 1. Dénombrement de *Pediococcus spp.* (Log UFC/ml) dans les segments intestinaux de poules en fonction de la dose et de la forme d'apport alimentaire de *Pediococcus acidilactici* CNCM MA18/5 M après une semaine d'alimentation (n=6)

| | T2 (½ D) | | T3 (D) | | T4 (5 D) | | T5 (D-ME) | |
|-----------------------------|----------|--------|----------------------|--------|------------------------|--------|-------------------|--------|
| | Moyenne | ± e.t. | Moyenne | ± e.t. | Moyenne | ± e.t. | Moyenne | ± e.t. |
| Duodénum | 4,081 | 0,1403 | 4,233 | 0,4036 | 5,100 | 0,3476 | 4,534 | 0,6811 |
| Jéjunum | 4,000 | 0,0000 | 4,492 | 0,8528 | 5,100 | 0,1738 | 4,500 | 0,7071 |
| Iléon | 3,938 | 0,3374 | 4,000 | 0,0000 | 5,389 | 0,3012 | 5,100 | 0,1738 |
| Caeca | 3,958 | 0,0721 | 5,667 | 0,5774 | 6,344 | 1,1115 | 5,725 | 0,7389 |
| Signification statistique : | | | Segment, $P=0,00089$ | | Aliment, $P=9.10^{-6}$ | | Interaction, N.S. | |

D : dose minimale enregistrée ; ME : micro-encapsulé

Figure 1. Relation entre la dose de *Pediococcus acidilactici* (log UFC/mL) ajoutée dans l'aliment et les dénombrements de *Pediococcus spp.* dans le duodénum

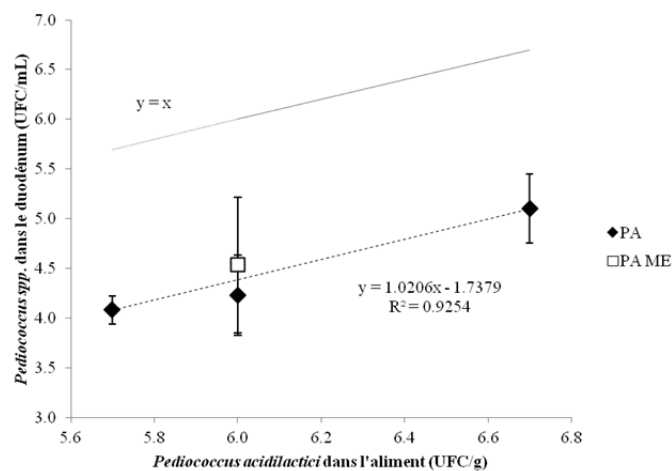


Figure 2. Relation entre la dose de *Pediococcus acidilactici* (log UFC/mL) ajoutée dans l'aliment et les dénombrements de *Pediococcus spp.* dans l'iléon

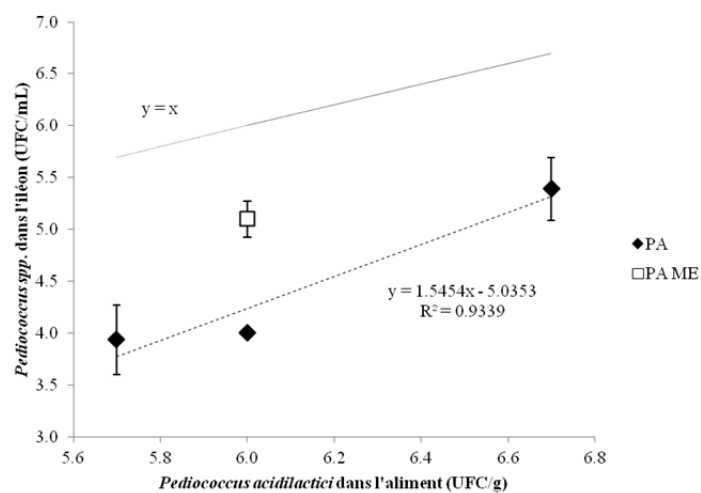


Figure 3. Relation entre la dose de *Pediococcus acidilactici* (log UFC/mL) ajoutée dans l'aliment et les dénombrements de *Pediococcus spp.* dans les caeca

