

IMPACTS A COURT ET A MOYEN TERME D'UNE SUPPLEMENTATION PRECOCE EN XYLANASE-XOS SUR LE METABOLOME ET LE MICROBIOME CAECAL DES POULETS DE CHAIR

Vincent Jonchère¹, Françoise I. Bussière², Vahid Khaksar¹, Michel J. Duclos¹, Léa Cornaille¹, Nathalie Meme¹, Olivier Zemb³, Christelle Hennequet-Antier¹, Catherine Schouler², Rodrigo Guabiraba-Brito² & Agnes Narcy¹

¹BOA, Université de Tours, INRAE, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

²ISP, Université de Tours, INRAE, Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France

³GenPhySE, Université de Toulouse, INRAE, 31320 Castanet-Tolosan, France

vincent.jonchere@inrae.fr

RÉSUMÉ

La période postnatale est une période de forte plasticité permettant une orientation précoce des fonctionnalités digestives. Les xylo-oligosaccharides (XOS), produits de l'hydrolyse des polysaccharides non amyliques (NSPs) par la xylanase (Xyl), sont des prébiotiques agissant sur le microbiote caecal. Dans ce travail, nous avons comparé les effets sur le métabolome et le microbiote caecal d'une supplémentation précoce (démarrage) ou tardive (croissance) d'un mélange de xylanase et XOS (Xyl.XOS) en présence d'un challenge infectieux à *E. tenella*.

Des poussins recevant un régime basal riche en NSP ont été répartis en quatre groupes : sans additif (J0-J22), avec ajout de Xyl.XOS en démarrage (J0-J9) ou en croissance (J10-J22) ou pendant toute la période (J0-J22). A partir de ce plan factoriel complet, les effets sur les performances ainsi que sur le métabolome et le microbiome caecal ont été évalués (J9 et J22). Lors de la période de démarrage, l'ajout du mélange Xyl.XOS a un effet positif sur la croissance. A J9, une diminution des acides gras à chaînes courtes (SCFAs) et des bactéries de la famille des *Lachnospiraceae*, productrices des SCFAs, a été observée dans les caeca des animaux supplémentés. A l'inverse, la supplémentation dans l'aliment démarrage seul augmente la production de SCFAs jusqu'à J22. Nous évaluons actuellement l'effet différé de cette supplémentation précoce sur le microbiote à J22. Enfin chez les animaux inoculés, la supplémentation tardive en Xyl.XOS réduit significativement les effets délétères de l'infection sur la croissance alors que la supplémentation précoce n'a pas eu d'effet détectable.

En conclusion, la supplémentation précoce en Xyl.XOS a un effet à court et moyen terme sur les métabolites et la croissance des animaux.

ABSTRACT

Differentiated short and medium term impacts of early Xylanase-XOS supplementation on caecal metabolome and microbiome in broiler

The postnatal period is critical for early development. Due to the great plasticity of the digestive tract, this period constitutes a unique window to orient the digestive phenotypes. Xylo-oligosaccharides (XOS) produced from the hydrolysis of non-starch polysaccharides (NSPs) by xylanase are prebiotics acting on the caecal microbiota. In this work, we compared the effects on metabolome and caecal microbiota composition of early (starter) or late (grower) supplementation with a mixture of xylanase and XOS (Xyl.XOS) with an *E. tenella* challenge.

Chicks fed a basal diet rich in NSPs were divided into four groups: without additive (D0-D22), with a supplementation of Xyl.XOS during the start-up period (D0-D9), the growth period (D10-D22), or during the entire period (D0-D22). Based on this full factorial design, effects on performance as well as on the metabolome and caecal microbiome were assessed (D9 and D22). During the start-up period, the addition of Xyl.XOS has a positive effect on growth. At D9, a decrease in Short Chain Fatty Acids (SCFAs) and *Lachnospiraceae*, producers of SCFAs observed in the caeca of supplemented animals with Xyl.XOS. In contrast, supplementation in the starter diet alone increased SCFA production until D22. We are actually evaluating the effect of this early supplementation on the microbiota at D22. Finally, animals inoculated with *E. tenella*, the supplementation with Xyl.XOS in grower reduced significantly the deleterious effects of infection on growth while early supplementation had no detectable effect.

In conclusion, early supplementation with Xyl.XOS has a short and medium term effect on the metabolites and growth of the animals.

INTRODUCTION

L'utilisation efficace de ressources alimentaires variées est un élément déterminant pour assurer la transition vers des systèmes d'élevage multi-performants, considérant la maîtrise des impacts environnementaux et de la santé des animaux. Celle-ci repose sur le maintien d'un équilibre étroit entre la paroi digestive, le microbiote intestinal et les composés alimentaires. Dans ce contexte, il est important de proposer de nouvelles stratégies nutritionnelles afin de contrôler sur le moyen terme l'homéostasie digestive et de maintenir l'efficacité alimentaire tout en préservant le bien-être et la santé des animaux.

A l'éclosion, la plupart des fonctions physiologiques des oiseaux sont immatures. Au niveau digestif, le passage brutal à une alimentation solide exogène stimule le développement du système gastro-intestinal, des glandes annexes et s'accompagne de la mise en place du microbiote. Cette période précoce offre donc une fenêtre unique de plasticité pour orienter les fonctionnalités du tube digestif par la nutrition (Korotkova et al., 2005; Rubio, 2019). A ce jour, seules quelques d'études ont exploré cette question chez les oiseaux et sont pour la plupart anciennes et limitées à une description macroscopique et non exhaustive en termes de fonctions. Récemment, Baldwin et al. ont montré que des poussins inoculés immédiatement après l'éclosion avec des Lactobacilles montraient une modification durable de leur microbiote s'accompagnant d'une amélioration significative de leur poids à l'âge de 28 jours (Baldwin et al., 2018). Keerqin et al. ont également constaté que la supplémentation précoce en acides aminés exerçait un effet bénéfique et durable sur des poulets soumis par la suite à différents facteurs de stress en favorisant les familles Lactobacilles dans la partie inférieure de l'intestin grêle (Keerqin et al., 2017).

Les caractéristiques physicochimiques des aliments, dont notamment la teneur en polysaccharides non amylacés hydrosolubles (NSPs), sont essentielles pour permettre une bonne utilisation des ressources en élevage. Les NSPs sont de longs polymères complexes qui ne peuvent être dégradés par les enzymes endogènes des volailles et qui entraînent une diminution des performances liée à l'augmentation de la viscosité du digesta, de la sécrétion de mucus et des translocations bactériennes entraînant à terme une dysbactériose (Tellez et al., 2014). Dans ce contexte, l'utilisation de composés prébiotiques ou d'enzymes peuvent constituer de bonnes stratégies pour contrecarrer les effets négatifs des NSPs. Les prébiotiques sont des substances alimentaires qui stimulent sélectivement la croissance et l'activité de bactéries bénéfiques à la santé intestinale (Gibson et al., 2010). Par ceux-ci, les xylo-oligosaccharides

(XOS) permettent d'orienter la microbiote commensal vers une production d'acides gras à chaînes courtes (SCFAs) avec des effets sur l'homéostasie digestive et les performances des poulets (Ribeiro et al., 2018; Dale et al., 2020). Cet apport en XOS peut être exogène ou induit par l'ajout de xylanase au régime alimentaire, enzyme qui hydrolyse les xylosidiques, constituant principales des NSPs, en XOS.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les impacts à court et à moyen terme d'une supplémentation précoce d'un mélange de xylanase et de XOS (Xyl.XOS) chez des poussins de chair nourris avec un régime à base de blé et de seigle riche en NSPs favorisant le développement d'une dysbactériose intestinale. Les conséquences sur la croissance, les métabolites intestinaux et le microbiote sont évalués sur des animaux infectés ou non par un parasite pathogène courant *Eimeria tenella*.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Incubation des œufs, oiseaux, logement

Toutes les procédures expérimentales de cette étude ont été réalisées conformément aux directives européennes pour le soin et l'utilisation des animaux dans la recherche (Directive 2007/43/CE) et ont été approuvées par le comité d'éthique local. Les œufs à couver de poulets de chair Ross PM3 ont été désinfectés pour obtenir des oiseaux Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiés (EOPS). Après sexage, les poussins âgés d'un jour ont été répartis dans 16 parquets. Les oiseaux n'ont pas été vaccinés afin d'éviter tout agent externe modifiant l'activité de leur système immunitaire.

1.2. Design expérimental

Deux régimes alimentaires permettant de satisfaire les besoins des animaux ont été formulés pour la période de démarrage (J0 à J9) et de croissance (J10 à J22) sur une base de blé et de seigle. La moitié des animaux ont été infectés expérimentalement avec *E. tenella* à 16 jours d'âge. L'effet d'une supplémentation en un mélange de XOS et xylanase (Signis®, AB Vista, Marlborough, UK, 100g/tonne) pendant les phases de démarrage (de J0 à J9) et de croissance (J10 à J22) a été mesuré selon un plan factoriel complet en blocs aléatoires. La consommation d'aliment par parquet et le poids vif individuel ont été mesurés aux jours J0, J9, J16 et J22. De J0 à J9, huit parquets ont été affectés à l'un des deux régimes de démarrage (Ctrl, Xyl.XOS). À J9, 16 oiseaux par traitement ont été euthanasiés et les tissus collectés. De J10 à J22, la moitié des parquets de chaque régime de démarrage a reçu l'un des deux régimes croissance (Ctrl, Xyl.XOS). À J16, la moitié des animaux a été inoculée avec *E. tenella*. À la fin de l'expérience, 12

oiseaux par condition ont été euthanasiés et les tissus collectés.

1.3. Analyse du métabolome

Les échantillons de contenus caeaux ont été préparés selon le protocole décrit par Hauser et al. (Hauser et al., 2019). Brièvement, les spectres RMN 1H ont été obtenus sur un spectromètre Bruker Avance III HD 600 pour 21 métabolites.

1.4. Analyse du microbiome

Les échantillons microbiens ont été préparés et analysés selon la méthode d'Aliakbari (Aliakbari et al., 2021). Brièvement après extraction de l'ADN microbien, la région V3-V4 a ensuite été amplifiée à partir d'ADN génomique dilué avec les amorces F343 et R784. Les produits PCR résultants ont été purifiés et chargés sur une cartouche MiSeq d'Illumina suivant les recommandations du fabricant. Les données ont été analysées à l'aide du package DADA2 (Ombrello, 2020) et annotées avec le set de données Silva Dataset v138 (Quast et al., 2013).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Lors de la période de démarrage, l'ajout du mélange Xyl.XOS a eu un effet significatif sur la croissance à J9 (+3,2% GMQ, $P=0,05$; Fig.1A). Cet effet semble être associé à des modifications significatives des contenus caeaux, notamment une diminution des teneurs en acides gras à chaînes courtes (SCFAs : acétate, $P=0,03$; Fig.1B ; propionate, $P=0,02$ données non montrés). L'étude du microbiote caecal par séquençage 16S indique une diminution significative d'une famille de bactéries, les *Lachnospiraceae* (Fig.1C), connues comme étant productrices de SCFAs (Vacca et al., 2020). Les effets bénéfiques de cette supplémentation précoce résultent probablement de l'action de la xylanase par l'hydrolyse des NSPs. Nous explorons actuellement si d'autres fonctionnalités du tractus digestif pourraient être à l'origine de ce gain de performances.

Chez les animaux inoculés, la supplémentation en Xyl.XOS à partir de J10 réduit significativement les effets délétères de l'infection sur la croissance (inoculation \times croissance, $P=0,03$, +9.8% GMQ, Fig.2). En revanche, la supplémentation durant la période précoce n'a eu aucun mesurable sur la réponse des animaux à l'infection.

L'effet de la supplémentation dans l'aliment croissance sur les performances est dépendante d'une supplémentation dans l'aliment démarrage (démarrage \times croissance, $P=0,07$, Fig.3A). La supplémentation en Xyl.XOS dans l'aliment croissance seul permet une amélioration significative des performances alors que la supplémentation dès la phase de démarrage permet

de maintenir un niveau intermédiaire sur le moyen terme.

De manière intéressante, la supplémentation dans l'aliment démarrage conduit à une augmentation significative de la production des SCFAs à J22 (respectivement acétate, $P= 0,03$; butyrate, $P= 0,04$, Fig.3B et Fig.3C) et ce, indépendamment d'une supplémentation tardive. Ces résultats suggèrent que la supplémentation précoce en Xyl.XOS permettrait une orientation de la composition du microbiote, qui doit maintenant être confirmée par l'étude de la composition du microbiote (16S caecal). L'étude de la dégradation des polysaccharides dans l'iléon devrait contribuer à la compréhension des mécanismes sous-jacents.

CONCLUSION

En conclusion, la supplémentation précoce en Xyl.XOS a un effet positif sur la croissance des animaux davantage marquée durant la première période de vie (J0-J9). Cet effet bénéfique peut vraisemblablement s'expliquer par l'action de la xylanase permettant la dégradation des NSPs et l'amélioration du transit alimentaire. A moyen terme, la supplémentation précoce en Xyl.XOS permet d'augmenter la production de SCFAs dans les caecas. La supplémentation tardive a quant à elle un effet bénéfique sur les performances des animaux (J0-J22) mais qui dépend de la supplémentation précoce. Cette supplémentation tardive permet également de limiter les effets délétères d'une inoculation à *E. tennela* sur la croissance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aliakbari, A., O. Zemb, Y. Billon, C. Barilly, I. Ahn, J. Riquet, and H. Gilbert. 2021. Genetic relationships between feed efficiency and gut microbiome in pig lines selected for residual feed intake. *J. Anim. Breed. Genet.* 138:491–507.
- Baldwin, S., R. J. Hughes, T. T. H. Van, R. J. Moore, and D. Stanley. 2018. At-hatch administration of probiotic to chickens can introduce beneficial changes in gut microbiota. *PLoS One* 13:1–14.
- Craig, A. D., F. Khattak, P. Hastie, M. R. Bedford, and O. A. Olukosi. 2020. Xylanase and xylo- oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 61:70–78 Available at <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2019.1673318>.
- Dale, T., I. Hannay, M. R. Bedford, G. A. Tucker, J. M. Brameld, and T. Parr. 2020. The effects of exogenous xylanase supplementation on the in vivo generation of xylooligosaccharides and monosaccharides in broilers fed a wheat-based diet. *Br. Poult. Sci.* 61:471–481 Available at <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1751805>.
- Gibson, G. R., K. P. Scott, R. A. Rastall, K. M. Tuohy, A. Hotchkiss, A. Dubert-Ferrandon, M. Gareau, E. F. Murphy, D. Saulnier, G. Loh, S. Macfarlane, N. Delzenne, Y. Ringel, G. Kozianowski, R. Dickmann, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Walker, and R. Buddington. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods* 7:1–19.
- Hauser, A., P. Eisenmann, C. Muhle-Goll, B. Luy, A. Dötsch, D. Graf, and P. Tzvetkova. 2019. Efficient extraction from mice feces for NMR metabolomics measurements with special emphasis on SCFAs. *Metabolites* 9.
- Keerqin, C., S. B. Wu, B. Svihus, R. Swick, N. Morgan, and M. Choct. 2017. An early feeding regime and a high-density amino acid diet on growth performance of broilers under subclinical necrotic enteritis challenge. *Anim. Nutr.* 3:25–32 Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2017.01.002>.
- Korotkova, M., C. Ohlsson, B. Gabrielsson, L. Å. Hanson, and B. Strandvik. 2005. Perinatal essential fatty acid deficiency influences body weight and bone parameters in adult male rats. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1686:248–254.
- Ombrello, A. K. 2020. Dada2. *Encycl. Med. Immunol.* 13:1–7.
- Quast, C., E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. Glöckner. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41:590–596.
- Ribeiro, T., V. Cardoso, L. M. A. Ferreira, M. M. S. Lordelo, E. Coelho, A. S. P. Moreira, M. R. M. Domingues, M. A. Coimbra, M. R. Bedford, and C. M. G. A. Fontes. 2018. Xylo-oligosaccharides display a prebiotic activity when used to supplement wheat or corn-based diets for broilers. *Poult. Sci.* 97:4330–4341 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey336>.
- Rubio, L. A. 2019. Possibilities of early life programming in broiler chickens via intestinal microbiota modulation. *Poult. Sci.* 98:695–706 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey416>.
- Tellez, G., J. D. Latorre, V. A. Kuttappan, M. H. Kogut, A. Wolfenden, X. Hernandez-Velasco, B. M. Hargis, W. G. Bottje, L. R. Bielke, and O. B. Faulkner. 2014. Utilization of rye as energy source affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition, and bone mineralization in broiler chickens. *Front. Genet.* 5:1–7.
- Vacca, M., G. Celano, F. M. Calabrese, P. Portincasa, M. Gobbetti, and M. De Angelis. 2020. The controversial role of human gut lachnospiraceae. *Microorganisms* 8:1–25.

Figure 1. Effet à J9 d'une supplémentation précoce en Xyl.XOS sur les performances (A ; Gain moyen Quotidien), le métabolome caecal (B) et sa composition (C)

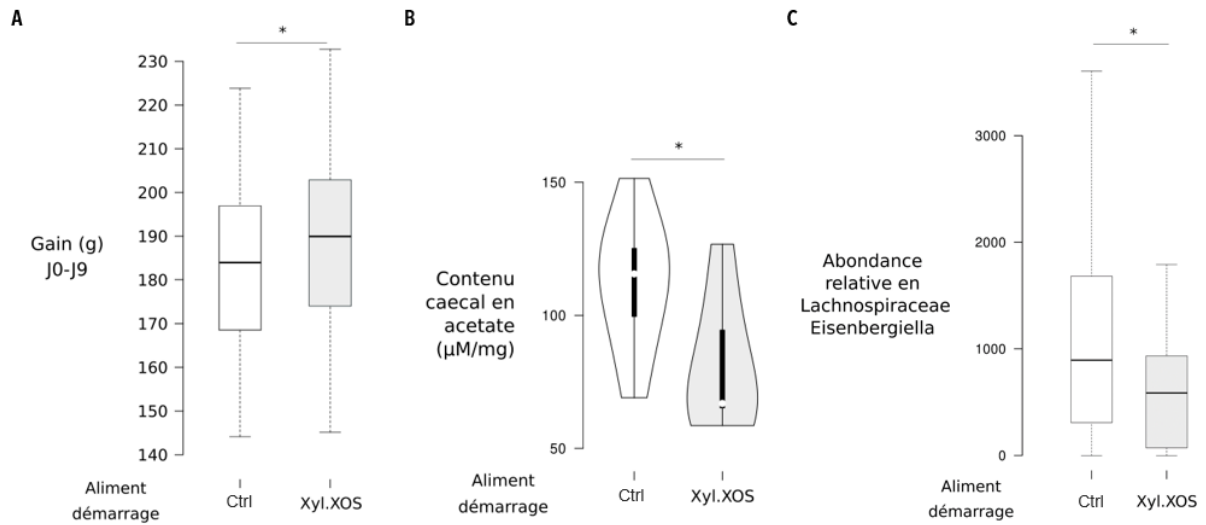


Figure 2. Effet à J22 d'une supplémentation tardive (J10-J22) en Xyl.XOS sur les performances suite à un challenge infectieux

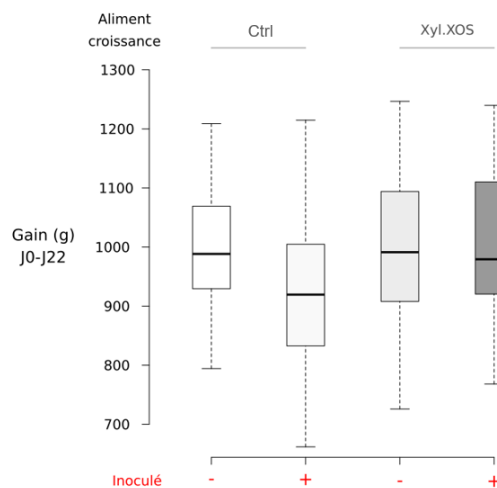


Figure 3. Effet à J22 d'une supplémentation précoce et tardive en Xyl.XOS A) Interaction d'une supplémentation précoce et tardive en Xyl.XOS sur les performances B-C) Effet d'une supplémentation précoce sur les concentrations en acétate et en butyrate.

