

L'oxyde de dicuivre pourrait diversifier le microbiote intestinal chez les porcelets sevrés

Laià BLAVI (1), María RODRIGUEZ (2), Alessandra MONTEIRO (3), Denise CARDOSO (3), David SOLA-ORRIOL (1), Joaquín MORALES (2)

(1) Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelone, Espagne

(2) PigCHAMP Pro Europa, Segovia, Espagne

(3) Animine, Annecy, France

amonteiro@animine.eu

Dicopper oxide may promote a positive shift in intestinal microbiota in weanling pigs

Copper (Cu) is known for its antimicrobial effects. A trial was performed to evaluate effects of two Cu sources (CuSO₄ and Cu₂O) on the intestinal microbiota of weanling pigs. A total of 180 piglets (28 days old) were randomly allocated to 2 treatments: 150 ppm of Cu from CuSO₄ or Cu₂O, with 8 replicates per treatment and 8 pigs per pen followed for 35 days. At the end of the trial, one pig per pen was slaughtered, and the proximal and distal content of the ileum was collected to assess its microbiota (PCR, 16S rRNA gene method). Statistical analysis was performed with RStudio v.3.5.1. An 8.6% increase in body weight was observed when pigs were fed 150 ppm of Cu from Cu₂O compared to pigs fed CuSO₄. Bacterial diversity and species richness, determined by the Shannon index, were greater ($P < 0.05$) in pigs fed Cu₂O than in pigs fed CuSO₄ in the proximal, but not in the distal, ileal portion. Regardless of the source, alpha diversity decreased from the proximal to the distal portion. Pigs fed 150 ppm CuSO₄ had greater abundance (FDR ≤ 0.2) of Enterobacteriaceae and *Clostridium sensu stricto*, and lower abundance of Bifidobacteriaceae, in the proximal portion than pigs fed Cu₂O. Neither coliforms in the distal portion nor *Lactobacillus* abundance differed between the sources. To conclude, compared to pigs fed CuSO₄, higher diversity and lower abundance of Enterobacteriaceae and *Clostridium* in the proximal section could partially explain the improvement in weight observed in pigs fed Cu₂O.

INTRODUCTION

Le cuivre (Cu) peut améliorer la croissance des porcelets au sevrage s'il est supplémenté à dose élevée (~150 mg/kg) dans l'aliment, mais les mécanismes d'action exacts sont encore mal connus. Une des hypothèses concerne ses propriétés antimicrobiennes.

Le Cu pourrait agir comme un régulateur de flore intestinale et augmenter la diversité microbienne en limitant la croissance des populations potentiellement pathogènes (Zhang *et al.*, 2017).

En Europe, la dose autorisée est de 150 mg/kg de Cu du sevrage jusqu'à 4 semaines post-sevrage (PS), et de 100 mg/kg de 5 à 8 semaines, en PS. L'objectif de l'étude était d'évaluer l'effet de deux sources de Cu sur la modulation du microbiote intestinal chez le porcelet.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Animaux

L'étude a été menée sur un total de 180 porcelets (mâles entiers et femelles ; Topigs x Piétrain) sevrés à 28 jours d'âge, avec un poids initial moyen de $9,18 \pm 0,11$ kg au sevrage dans chaque groupe. L'essai a été conduit au Centro de Experimentación Porcino, à Ségovie, Espagne. Les animaux ont été répartis dans deux groupes, à raison de huit cases par groupe et huit porcelets

par case (50% de chaque sexe). L'essai a duré cinq semaines, du sevrage jusqu'à l'âge de 63 jours.

1.2. Aliments expérimentaux

Pendant l'étude, les animaux avaient librement accès à l'eau et à la nourriture. Les aliments expérimentaux, à base de maïs, blé, d'orge et de tourteau de soja, ne contenaient pas de phytase et étaient proposés sous forme de farine. La période du premier âge s'étendait du sevrage au 14^{ème} jour de PS. Pendant cette période, les teneurs en matières azotées totales (MAT) et d'énergie nette (EN) étaient respectivement de 18,6 % et 11,4 MJ/kg. Pour le deuxième âge, jusqu'à la fin de l'essai, l'aliment contenait 16,8 % de MAT et 10,5 MJ/kg d'EN.

L'essai portait sur deux aliments expérimentaux, supplémentés soit avec un sulfate de cuivre (CuSO₄), soit avec un oxyde de dicuivre (Cu₂O, CoRouge®, Animine) apportant 150 mg/kg de Cu.

1.3. Mesures

A la fin de l'étude, un porcelet proche du poids moyen de sa case a été étourdi, par l'utilisation d'un pistolet à tige perforante, et saigné. Les contenus de l'intestin proximal et distal ont été prélevés dans des conditions aseptiques pour éviter les contaminations croisées, puis ont été conservés à -0°C. Ensuite, les populations bactériennes ont été évaluées par PCR (méthode 16S rRNA gene).

1.4. Analyses statistiques

La diversité a été analysée en terme d'OTU (*Operational Taxonomic Units*) et une analyse d' « abondance différentielle » a été réalisée pour caractériser l'abondance relative des taxons au moyen d'un modèle de mélange dit « zero-inflated log-normal model ». Les valeurs de *P* ont été ajustées à l'aide du taux de fausses découvertes (False Discovery Rate, FDR) à l'aide du package « metagenomeseq » du logiciel R (RStudio v.3.5.1).

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.1. Performances de croissance

Les sources de cuivre n'ont pas affecté la consommation d'aliment (moyenne de 454 g/j/porc). Ces résultats ne corroborent pas ceux observés par Bikker *et al.* (2016), qui ont noté que la supplémentation de cuivre à haute dose (160 mg/kg) augmentait la consommation du sevrage jusqu'à 40 jours de PS.

Cependant, une augmentation de 8,6 % du poids vif final a été observée chez les porcelets ayant reçu le Cu₂O par rapport à ceux qui ont consommé le CuSO₄. Ces résultats vont de pair avec une diminution de l'indice de consommation (IC) sur la période 15-35 jours. Des études précédentes ont montré que, comparé au sulfate, la source d'oxyde de dicuivre tendait à augmenter le GMQ et le poids vif (Roméo *et al.*, 2018).

2.2. Microbiote intestinal

L'exposition au Cu a diminué la diversité alpha dans la portion distale par rapport à la proximale de l'intestin. L'indice Shannon a été de 1,98 dans la portion distale et de 2,58 dans la portion proximale. Dans la portion proximale, la diversité bactérienne et la richesse d'espèces, déterminées par l'indice Shannon, ont été plus élevées (*P* < 0.05) chez les porcelets recevant Cu₂O (3,06) que chez ceux ayant consommé CuSO₄ (2,20).

Les porcelets qui ont consommé le CuSO₄ ont montré une abondance relative plus élevée (FDR ≤ 0.2) des Enterobacteriaceae (1551,5) et *Clostridium* (85,3) ainsi qu'une moindre abondance relative des Bifidobacteriaceae (< 0,01) comparativement au traitement avec le Cu₂O (307, 42,6 et 23,8, respectivement ; **Figure 1**). Parmi les bactéries qui font partie de la famille des Enterobacteriaceae, certaines souches d'*Escherichia coli*, ont été associées aux diarrhées post-sevrage du porcelet (Luppi, 2017) ; certaines espèces de *Clostridium*, comme *C. difficile*, sont responsables de l'entérite néonatal chez le porcelet (Hopman *et al.*, 2011).

Des résultats similaires ont été obtenus par Ambrosio *et al.* (2018), rapportant que le Cu₂O à haute dose a réduit significativement la présence de *E. coli* dans l'iléum comparativement au CuSO₄. L'effet du Cu sur les bactéries peut être lié à son état redox : le Cu(I), la forme « cuivreux » réduite, a montré un effet antibactérien plus fort en conditions anaérobies que le Cu(II), la forme « cuprique » oxydée. Dans notre étude, la diminution de ces bactéries pourrait donc être associée à une meilleure santé intestinale et, par conséquent, au poids final plus élevé des porcelets du groupe Cu₂O.

Dans la portion distale, il n'y a pas eu de différence d'abondance relative pour les Coliformes (*Enterobacter*, *Klebsiella* et *Escherichia*) ni pour les Lactobacillus (moyenne de 16244,7 OTU).

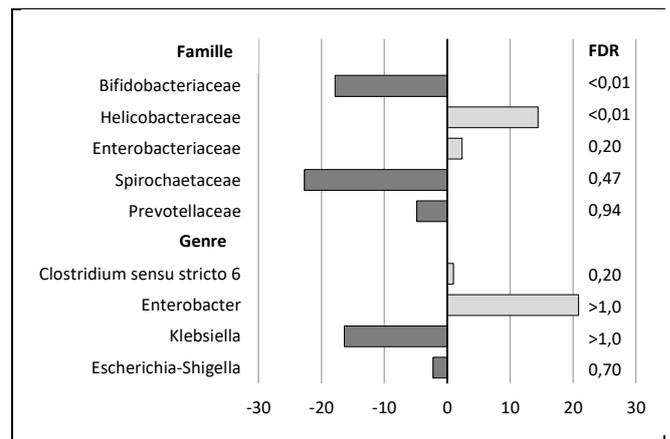


Figure 1 – Différence entre Cu₂O et CuSO₄ aux niveaux de famille et genre dans la portion proximale de l'intestin. Valeurs positives (■) et négatives (■) indiquant une abondance plus ou moins élevée respectivement, pour le CuSO₄ par rapport au Cu₂O.

CONCLUSION

Pour conclure, un plus grand index de diversité bactérienne et une réduction de l'abondance des Enterobacteriaceae et des *Clostridium* dans la portion proximale pourraient expliquer l'amélioration de poids vif chez les porcelets qui ont reçu Cu₂O.

REMERCIEMENTS

Ce projet (www.suminapp.eu) a été financé par Eurostars, avec co-financement du BPI en France et du CDTI en Espagne, dans le cadre d'Horizon 2020 de l'Union européenne.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambrosio C.S., Smidt H., van Baal J., Roméo A., Bikker P., 2018. Differential effects of dietary copper sulphate and copper(I)oxide on gut microbiota of weaned piglets. 14th International Symposium on Digestive Physiology of Pigs (DPP2018), 141.
- Bikker P., Jongbloed A.W., van Baal J., 2016. Dose-dependent effects of copper supplementation of nursery diets on growth performance and fecal consistency in weaned pigs. *J. Anim. Sci.*, 94, 181-186.
- Hopman N.E.M., Keessen E.C., Harmanus C., Sanders I.M.J.G., van Leengoed L.A.M.G., Kuijper E.J., Lipman L.J.A., 2011. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet. Microbiol.*, 149, 186-192.
- Luppi, A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, 3:16.
- Roméo A., Durosoy S., van Baal J., Bikker P., 2018. Effet de deux sources de cuivre sur les performances et le statut en cuivre de porcelets sevrés. *Journées Rech. Porcine*, 50, 131-136.
- Zhang F., Zheng W., Guo R., Yao W., 2017. Effect of dietary copper level on the gut microbiota and its correlation with serum inflammatory cytokines in Sprague-Dawley rats. *J. Microbiol.*, 55, 694-702.