

Effet des sources et doses de cuivre sur le microbiote intestinal des porcelets sevrés

Carmen M.S. AMBROSIO (1), Hauke SMIDT (1), Jurgen VAN BAAL (1), Agathe ROMÉO (2), Paul BIKKER (1)

(1) Wageningen University & Research, 6708 PB Wageningen, Pays-Bas

(2) Animine, 74330 Sillingy, France

aromeo@animine.eu

Effet des sources et doses de cuivre sur le microbiote intestinal des porcelets sevrés

Le cuivre (Cu) peut améliorer la croissance des porcelets au sevrage s'il est supplémenté à dose élevée (160 mg/kg) dans l'aliment, mais ses mécanismes exacts sont encore mal connus. Une des hypothèses concerne ses propriétés antimicrobiennes. L'étude est menée sur 600 porcelets sevrés à 26 jours et divisés en 6 groupes expérimentaux (10 cases par groupe, 10 porcelets par case). Pendant 5 semaines, ils ont consommé un sulfate de cuivre (CuSO₄) ou un oxyde de dicuivre (Cu₂O ; CoRouge®, Animine) à différentes doses de Cu : 15 mg/kg (dose nutritionnelle), 80 mg/kg (dose intermédiaire) et 160 mg/kg (dose maximale autorisée). A la fin de l'essai, 8 porcelets par traitement ont été abattus. Les contenus de l'iléum et du côlon ont été prélevés et les populations bactériennes évaluées par qPCR. La source et la dose de Cu n'ont pas affecté le nombre total de bactéries. Augmenter la dose de Cu a diminué significativement ($P < 0,05$) les Firmicutes dans l'iléum. Comparé à CuSO₄, Cu₂O à haute dose a réduit significativement la présence de *Escherichia coli* dans l'iléum. Indépendamment de la source, une dose croissante de Cu a diminué le nombre de *E. coli* dans le côlon, avec un effet plus marqué du Cu₂O (0,010 vs. 0,047% ; $P = 0,053$). Ces résultats peuvent être reliés aux performances de croissance : une dose plus élevée de Cu augmentait le gain de poids pendant l'essai, avec des résultats numériquement meilleurs pour Cu₂O ($P < 0,09$). La supplémentation en Cu pourrait donc réguler la composition du microbiote avec des effets positifs sur la croissance.

Effect of two copper sources on intestinal microbiota of weaned piglets

Copper (Cu) can improve piglet growth performance during the post-weaning period when it is supplied at a high dose (160 mg/kg) in the diet, but its mode of action is not fully elucidated. Its antimicrobial properties are under investigation. The study was carried out with 600 piglets weaned at 26 days and divided into 6 experimental groups (10 pens per group, 10 piglets per pen). For 5 weeks, they were fed copper sulphate (CuSO₄) or dicopper oxide (Cu₂O; CoRouge®, Animine) at different Cu levels: 15 mg/kg (nutritional level), 80 mg/kg (intermediate level) or 160 mg/kg (maximum authorised level) of Cu. At the end of the experiment, 8 piglets per pen were sacrificed, ileum and colon contents were sampled and selected bacterial populations were analysed by pPCR targeting the 16S ribosomal RNA (rRNA) gene. The results showed no significant differences in total bacterial 16S rRNA gene copies. Increasing the Cu dose led to decreasing abundance of Firmicutes in the ileum. Compared to CuSO₄, Cu₂O at high dose decreased *Escherichia coli* abundance in the ileum significantly; regardless of the source, high doses of Cu decreased *E. coli* abundance in the colon, but Cu₂O tended to be more effective (0.010% vs. 0.047%, respectively; $P = 0.053$). These results are similar to those obtained for growth performance: increased Cu dose was related to an increase in weight gain, with higher weight gain for Cu₂O ($P < 0.09$). Therefore, Cu supplementation may regulate microbiota composition with positive effects on animal performance.

INTRODUCTION

En Europe, une dose élevée de cuivre (Cu) a été longtemps autorisée dans les aliments complets pour porcelets. Les rations des porcs en croissance étaient limitées à 25 mg/kg de Cu total, une concentration maximale de 170 mg/kg de Cu total était autorisée pour les porcelets jusqu'à 12 semaines d'âge. La réglementation est en évolution pour réduire les apports en minéraux et notamment en Cu pour les porcelets pendant le post-sevrage (Règlement d'exécution UE N° 2018/1039). Dorénavant, les aliments pour porcelets seront limités à 150 mg/kg de Cu jusqu'à 4 semaines post-sevrage, puis 100 mg/kg jusqu'à 8 semaines post-sevrage, avant de descendre à 25 mg/kg pendant l'engraissement.

Utiliser des sources de cuivre biodisponibles et plus efficaces que le sulfate de cuivre (CuSO₄), la source de référence, peut compenser la diminution de la dose autorisée.

Dans notre étude, nous avons comparé CuSO₄ et un oxyde de dicuivre (Cu₂O, CoRouge®), du sevrage jusqu'à 5 semaines post-sevrage. Nous avons notamment mesuré leurs effets sur le microbiote intestinal à différentes doses.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Animaux et aliments expérimentaux

L'étude a été menée sur deux bandes de porcelets, avec 5 répétitions par traitement pour chaque bande. Un total de 600 porcelets croisés Tempo x (York x Dutch Landrace) sevrés à 26 jours, mâles entiers et femelles, avec un poids initial moyen de 7,8 kg dans chaque groupe a été utilisé pour l'essai. Les animaux ont été répartis dans 60 cases, en fonction de leur poids et de leur portée d'origine. Ils étaient divisés dans des salles contenant 6 ou 12 cases d'étude, avec une égale répartition des traitements. L'essai a duré 5 semaines, du sevrage jusqu'à l'âge de 9 semaines.

Un aliment commercial était à la disposition des porcelets avant le sevrage. Une semaine avant le début de l'essai, il a été remplacé par un des aliments préparés pour le premier âge (T1, 15 mg/kg de Cu par CuSO₄) pour habituer les animaux aux aliments expérimentaux et faciliter la transition au sevrage. Pendant l'étude, les animaux avaient accès libres à l'eau et à l'aliment. Les aliments expérimentaux, fabriqués à base de blé, d'orge, de maïs et de tourteau de soja, sans phytase, étaient proposés sous forme de granulés. La période du premier âge s'étendait du sevrage au 14^e jour post-sevrage. Pendant cette période, les teneurs en matières azotées totales (MAT) et d'énergie nette (EN) étaient respectivement de 16,9% et 9,8 MJ/kg. Pour le deuxième âge jusqu'à la fin de l'essai, l'aliment contenait 15,5% de MAT et 9,6 MJ/kg d'EN.

L'essai portait sur six aliments expérimentaux, avec différentes sources et doses de cuivre.

Tableau 1 – Traitements expérimentaux

	CuSO ₄	Cu ₂ O
15 mg/kg	T1	T4
80 mg/kg	T2	T5
160 mg/kg	T3	T6

1.2. Suivi des performances

Les porcelets ont été pesés individuellement au sevrage, 14 et 35 jours post-sevrage. La consommation de chaque case a été

mesurée au moment du changement entre le premier et le deuxième âge (14 jours après le sevrage), puis à la fin de l'essai (35 jours après le sevrage). Le gain moyen quotidien (GMQ) et l'ingéré ont été calculés pour chaque période.

1.3. Prélèvements

A la fin de l'étude, 48 porcelets femelles proches du poids moyen de leurs cases ont été euthanasiées, par injection d'Euthasol® (20% pentobarbital sodium, Produlab Pharma B.V. Raamsdonksveer, Pays-Bas) dans la veine auriculaire.

Les contenus de cinq segments du tractus digestif (estomac, jéjunum proximal, jéjunum distal, iléum, côlon) ont été prélevés dans des conditions aseptisées pour éviter les contaminations croisées, puis ont été conservés à -20°C ou à -80°C en vue d'analyses complémentaires.

1.4. Extraction ADN, amplification par PCR, séquençage

Un broyage à billes, le tampon Stool Transport and Recovery (Roche Diagnostics Nederland BV, Almere, the Netherlands) et l'instrument Maxwell® 16 (Promega, Leiden, the Netherlands) ont été utilisés pour extraire et purifier l'ADN des bactéries de l'iléum et du côlon, en suivant le protocole de van Gastelen *et al.* (2017). La région hypervariable V5-6 du gène codant l'ARN ribosomique (rARN) bactérien 16S a été amplifiée en utilisant des amorces universelles (784 f: 5'-[AG]GGATTAGATACCC-3', 1064 r: 5'-CGAC[AG][AG]CCATGCA[ACGT]CACCT-3') qui contenaient des codes-barres génétiques uniques pour chaque échantillon. L'amplification par réaction en chaîne polymérase (PCR) est réalisée avec une dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes, suivie par 25 cycles de dénaturation à 98°C pendant 10 secondes, un appariement à 42°C pendant 10 secondes, une élongation à 72°C pendant 10 secondes, puis une étape finale à 72°C pendant 7 minutes. Le succès de l'amplification a été contrôlé dans une chambre à électrophorèse, en fixant les produits de la PCR dans un gel d'agarose à 1,3%. Ces produits ont ensuite été purifiés en utilisant le kit CLEANPCR (CLEAN NA, GC Biotech B.V., The Netherlands). Les amplicons ainsi purifiés ont constitué les bibliothèques utilisées pour le séquençage par Illumina HiSeq. La qualité des bibliothèques a été vérifiée par un fluorimètre Qubit 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) et le séquençage a été réalisé par GATC (Constance, Germany).

1.5. PCR quantitative en temps réel

Les amorces décrites dans le tableau 2 sont utilisées pour les PCR quantitatives (qPCR). Les qPCR en SYBR Green sont réalisées en utilisant un système de détection en temps réel (Bio-Rad Laboratories B.V., Venendaal, the Netherlands). Toutes les analyses qPCR sont faites en triple exemplaire, avec un volume de réaction de 10 µL, contenant une mixture iQ SYBR green, chaque amorce à 10 µM et 2,5 µL d'échantillon ADN (ou d'eau ultra-pure, qualité « biologie moléculaire »). Le processus d'amplification comprenait une dénaturation initiale à 95°C pendant trois minutes, suivie par 39 cycles à 95°C pendant 15 secondes, 60 ou 52°C pendant 30 secondes, et 72°C pendant 30 secondes. Après l'amplification, les courbes de fusion ont été obtenues par un chauffage progressif à 0,5°C par seconde, de 65 à 95°C. Les courbes standard sont générées par une série de 10 dilutions des rARN codant pour les gènes 16S, pour chaque espèce évaluée.

Tableau 1 – Amorces utilisées pour la qPCR

Amorces	Orientation	Séquence de l'amorce (5' to 3')	Température d'appariement (°C)	Références
Bactéries totales	Sens	GTGSTGCAYGGYYGTCGTCA	52	Heinritz <i>et al.</i> , 2018
	Antisens	ACGTCRTCCMCNCCTTCTC		
<i>Lactobacillus</i>	Sens	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	52	He <i>et al.</i> , 2017
	Antisens	ATTCCACCGCTACACATG		
<i>Escherichia coli</i>	Sens	CATGCCGCGTGTATGAAGAA	60	He <i>et al.</i> , 2017
	Antisens	CGGGTAACGTCAATGAGCAA		

1.6. Bio-informatique

Les données du séquençage des rARN codant pour le gène 16S ont été analysées en utilisant un pipeline bio-informatique interne NG-Tax version 2.0 (Ramiro-Garcia *et al.*, 2016).

Les unités taxonomiques opérationnelles (UTO) ont été définies en utilisant une sélection de référence ouverte. L'assignation à ces UTO a été réalisée à l'aide d'une base de données des rARN 16S SILVA.

L'analyse de la diversité bêta a permis d'évaluer les différences dans les populations microbiennes de l'iléum et du côlon en fonction de l'alimentation (sources et doses de cuivre).

Le logiciel R (version 3.5.0) a été utilisé pour une analyse en coordonnées principales (ACoP) basée sur les matrices de distance d'un UniFrac pondéré, avec des ellipses de confiance ($P < 0,05$). Il a également calculé l'abondance de certains taxons microbiens, exprimée avec un pourcentage des séquences totales des rARN codant pour le gène 16S.

1.7. Analyses statistiques

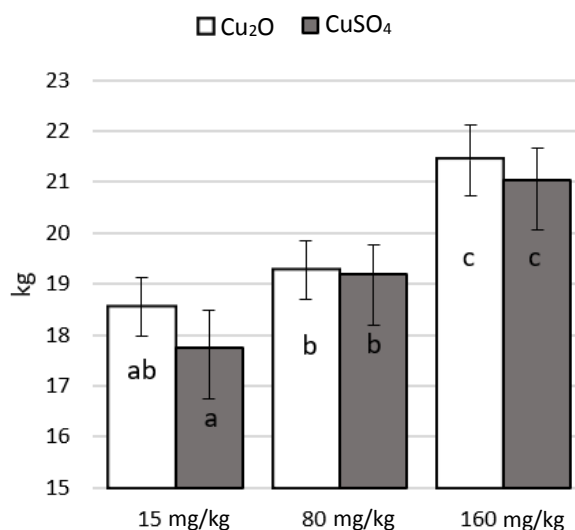
L'unité expérimentale était la case pour les performances de croissance. Les données ont été analysées par la méthode ANOVA (analyse de la variance), en utilisant le traitement expérimental comme effet fixe et les salles comme effet aléatoire.

L'unité expérimentale était le porcelet pour toutes les analyses relatives au microbiote (un porcelet choisi dans 4 cases sur 5 pour chaque répétition de l'essai et chaque traitement). L'analyse statistique reposait sur un arrangement factoriel 2x3 avec la source de Cu (CuSO_4 ou Cu_2O) et la dose (15, 80 ou 160 mg/kg). Les données ont été traitées par ANOVA et par le test de Fisher (LSD), avec la procédure MIXED de GenStat : la dose et la source de cuivre étaient utilisées comme facteurs fixes, la période et le poids du porcelet comme facteurs aléatoires. Les différences étaient considérées significatives pour $P < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Performances de croissance

Les doses croissantes de cuivre ont significativement amélioré le gain de poids ($P < 0,05$) (Figure 1), la consommation et l'indice de consommation (Roméo *et al.*, 2018). La source d'oxyde de dicuivre tendait ($P < 0,09$) à augmenter le GMQ et le poids vif comparée au sulfate, en particulier à dose nutritionnelle (Roméo *et al.*, 2018).

**Figure 1** – Poids final des porcelets (J35)

Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$)

Les supplémentations de Cu à haute dose sont couramment utilisées sur le terrain et en station, et ont déjà démontré leur effet positif sur les performances de croissance et la santé intestinale des porcelets. Néanmoins, leur mode d'action est encore en discussion.

Un effet systémique est suggéré dans certaines études (Zhou *et al.*, 1994), avec une action sur le système nerveux et la sécrétion d'hormones stimulant la croissance et l'appétit. En effet, l'amélioration des performances de croissance des porcelets passe souvent par une augmentation de la consommation, qui n'est généralement pas accompagnée d'une amélioration de l'indice de consommation (Bikker *et al.*, 2016). Dans le cadre de notre étude, les doses et sources de cuivre ont augmenté la consommation, sans montrer un effet significatif sur l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH).

Une autre hypothèse, parmi les plus couramment admises, concerne son pouvoir antibactérien (Dupont *et al.*, 2011), qui aboutirait à une régulation du microbiote intestinal des animaux.

2.2. ACoP du microbiote intestinal

Les variations dans la composition du microbiote et le degré de similarité entre l'iléum et le côlon ont été mesurés via ACoP. Cette analyse révèle que la composition au niveau des UTO ne varie pas significativement avec la dose et la source de Cu. Néanmoins, la composition des populations iléales est affectée ($P < 0,05$) par la dose de sulfate (Figure 2).

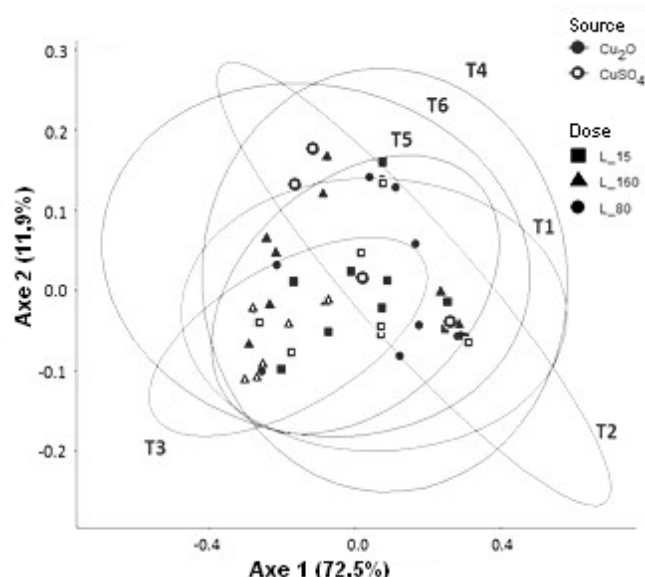


Figure 2 – ACoP du microbiote iléal, basée sur les matrices de distance d'un UniFrac pondéré (% de variance expliquée par chaque axe factoriel)

2.3. Abondances relatives des bactéries dans l'iléum et le côlon

La distribution taxonomique des bactéries les plus communes dans l'iléum et le côlon a été étudiée, en se basant sur leur abondance relative au niveau du phylum. Les *Firmicutes* constituent le phylotype le plus abondant dans l'iléum (> 98%) et dans le côlon (80-86%). La source de cuivre n'affecte pas leur abondance relative.

Au niveau des familles, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae* et *Streptococcaceae* étaient les plus représentées dans l'iléum, et la dose de Cu avait un impact significatif ($P < 0,05$) sur leur abondance relative. En particulier, l'abondance de la famille des *Lactobacillaceae* augmentait dans les groupes qui avaient consommé 80 mg/kg de Cu, pour les deux sources, dans l'iléum (59,4% et 50,9% des bactéries totales) et le côlon (40,5% et 32,1% des bactéries totales).

En ce qui concerne les genres appartenant à la famille *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus* était le genre le plus abondant, en particulier dans le côlon. Le sulfate de cuivre et l'oxyde de dicuivre avaient globalement le même effet sur l'abondance relative de ce genre, sans effet significatif lié à la source. Pour la dose, des effets significatifs ont été relevés, notamment pour les porcelets ayant consommé 80 mg/kg de Cu : dans ces groupes, l'abondance des *Lactobacillus* augmentait, quelle que soit la source. Par exemple, dans le côlon, les abondances relatives de *Lactobacillus* relevées dans les groupes supplémentés avec 80 mg/kg Cu étaient respectivement 26,5% et 22,2% pour CuSO_4 et Cu_2O , contre 19,5% et 13,7% dans les groupes à 15 mg/kg.

L'abondance de l'espèce *E. coli* a également été mesurée. En effet, même si la très grande majorité des *E. coli* retrouvés dans l'intestin sont des bactéries commensales, certaines souches sont incriminées dans les diarrhées post-sevrage du porcelet (Luppi, 2017). Il a été observé que la plus haute source d'oxyde de dicuivre diminuait significativement l'abondance d'*E. coli* dans l'iléum, comparée au sulfate (Figure 3).

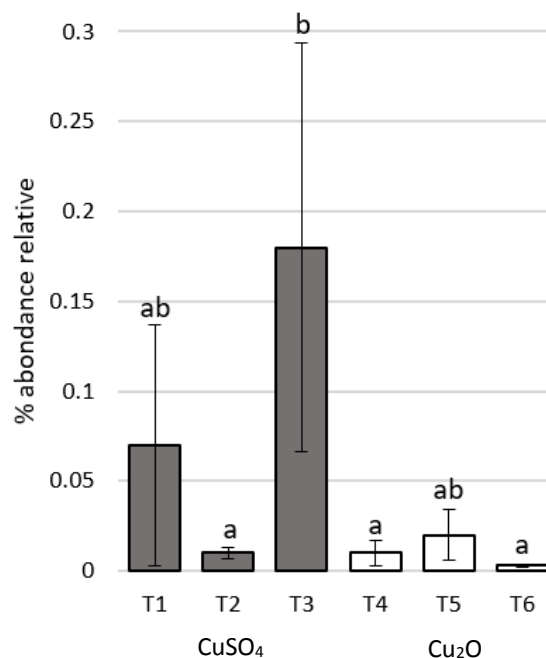


Figure 3 – Abondance relative d'*E. coli* dans l'iléum

Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$)

De même, la source oxyde de dicuivre tendait ($P = 0,053$) à diminuer l'abondance d'*E. coli* dans le côlon, comparée au sulfate de cuivre (Figure 4).

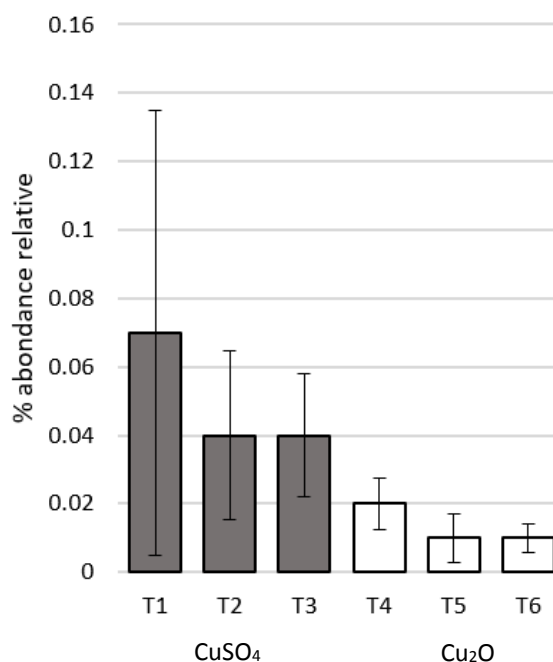


Figure 4 – Abondance relative d'*E. coli* dans le côlon

Ces résultats peuvent être rapprochés des résultats obtenus sur les performances de croissance : en effet, l'oxyde de dicuivre tendait à augmenter le gain moyen quotidien, et en conséquence le poids vif des porcelets, tandis qu'il diminuait l'abondance relative des *E. coli* dans l'iléum et dans le côlon.

L'effet des minéraux sur la santé intestinale du porcelet est un sujet très étudié et très discuté au niveau scientifique et au niveau réglementaire. Le cuivre a déjà démontré ses propriétés antibactériennes *in vivo* et *in vitro*.

Il pourrait aussi agir comme un régulateur de flore et augmenter la diversité microbienne en limitant la croissance des populations pathogènes (Zhang *et al.*, 2017), comme le fait l'oxyde de zinc (Starke *et al.*, 2014).

Dans le cadre de notre étude, l'effet des sources et doses de cuivre sur la diversité des populations s'est avéré assez faible, mais une réduction des *E. coli* a été observée dans l'iléum et le côlon.

CONCLUSION

Le cuivre pourrait agir sur la santé intestinale, et donc indirectement sur la consommation et la croissance des porcelets, en régulant le microbiote intestinal. La source d'oxyde de dicuivre tendrait à être plus efficace sur les *E. coli*, ce qui corrèle avec une légère augmentation du gain de poids.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 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.
- Dupont C.L., Grass C., Rensing C., 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance – new insights and applications. *Metallomics*, 2011, 3, 1109–1118.
- He, X., Sun, W., Ge, T., Mu, C., and Zhu, W., 2017. An increase in corn resistant starch decreases protein fermentation and modulates gut microbiota during in vitro cultivation of pig large intestinal inocula. *Anim. Nutr.* 3, 219–224.
- Heinritz, S. N., Weiss, E., Seifert, J., Mosenthin, R., Kuß, S., Degenhardt, A. G., et al., 2018. Effect of cellobiose supplementation on in vitro fermentation activity and bacterial numbers of porcine inocula. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 102, 474–482.
- Luppi, A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, 3:16.
- Ramiro-Garcia, J., Hermes, G. D. A., Giatsis, C., Sipkema, D., Zoetendal, E. G., Schaap, P. J., et al., 2016. NG-Tax, a highly accurate and validated pipeline for analysis of 16S rRNA amplicons from complex biomes. *F1000Research* 5, 1791.
- Règlement d'exécution (UE) 2018/1039, de la Commission du 23 juillet 2018 concernant l'autorisation du diacétate de cuivre(II) monohydraté, du dihydroxycarbonate de cuivre(II) monohydraté, du chlorure de cuivre(II) dihydraté, de l'oxyde de cuivre(II), du sulfate de cuivre(II) pentahydraté, du chélate de cuivre(II) et d'acides aminés hydratés, du chélate de cuivre(II) et d'hydrolysats de protéines, du chélate de cuivre(II) et de glycine hydratés (sous forme solide) et du chélate de cuivre(II) et de glycine hydratés (sous forme liquide) en tant qu'additifs pour l'alimentation de toutes les espèces animales et modifiant les règlements (CE) n° 1334/2003, (CE) n° 479/2006 et (UE) n° 349/2010 ainsi que les règlements d'exécution (UE) n° 269/2012, (UE) n° 1230/2014 et (UE) 2016/2261
- 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.
- Starke I., Pieper R., Vahjen W., Zentek J., 2017. Impact of Dietary Zinc Oxide on the Bacterial Diversity of the Small Intestinal Microbiota of Weaned Piglets. *J. Veterinar. Sci. Techn.*, 5:2.
- van Gastelen, S., Visker, M. H. P. W., Edwards, J. E., Antunes-Fernandes, E. C., Hettinga, K. A., Alferink, S. J. J., et al. (2017). Linseed oil and DGAT1 K232A polymorphism: Effects on methane emission, energy and nitrogen metabolism, lactation performance, ruminal fermentation, and rumen microbial composition of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 100, 8939–8957.
- 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(9), 694-702.
- Zhou W., Kornegay E.T., Lindemann M.D., Swinkels J.W.G.M., Weltens M.K., Wong E.A., 1994. Stimulation of growth by intravenous injection of copper in weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 72, 2395-2403.

