

Effet de l'acide benzoïque protégé sur le profil microbien fécal des porcelets sevrés comme alternative à l'oxyde de zinc

Roberto BAREA (1), Mireille HUARD (1), Marisol CASTILLO (1), Antonio PALOMO-YAGÜE (2), Federico CORREA (3), Paolo TREVISI (3)

(1) Novus Europe NV, Leuvensesteenweg 643 Box 15, 1930 Zaventem, Belgique

(2) Université Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro s/n., 28040 Madrid, Espagne

(3) Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, 40127 Bologna, Italie

roberto.barea@novusint.com

Effect of protected benzoic acid on the fecal microbial profile of weaned piglets as an alternative to zinc oxide

Organic acids, especially benzoic acid, have long been used for their broad antimicrobial activity and are known to promote gut health and increase performance in pigs. The aim of this study was to study the effect of a protected benzoic acid (PBA) as an alternative to zinc oxide (ZnO) in piglet diets on the intestinal microbiota profile. The trial was run on 4 commercial farms. Approximately 2,610 piglets were fed diets containing PBA or ZnO (each dosed at 2.5 kg/t) in the creep feed (from 7 days of age to 3-7 days after weaning, at 28 days) and in the starter diet (from 28-42 days). The piglets were divided into the blocks according to body weight and sex. At the end of the trial, 64 fecal samples (from 16 pens/farm, 8 per treatment) were collected for phylogenetic analysis of the microbial profile based on metagenomic methods. The fecal microbiota was characterized by higher alpha diversity in the PBA treatment (Shannon: 4.52 vs 4.10, $P < 0.001$; InvSimpson: 36.1 vs 24.5, $P < 0.01$). The microbial composition was significantly influenced by the treatment ($P < 0.01$, $R^2 = 0.03$). Piglets fed PBA showed a higher abundance of *Ruminococcus* (FDR = 0.02) and *Fibrobacter* (FDR = 0.04), known for their ability to ferment dietary fiber. In conclusion, supplementation of PBA modulated the gut microbial profile of weaned piglets by increasing alpha diversity and promoting the growth of beneficial bacteria that are related to polysaccharide metabolism and the production of short-chain fatty acids.

INTRODUCTION

L'oxyde de zinc (ZnO) à des doses pharmacologiques (2,5 kg/tonne d'aliment) a été largement utilisé dans la phase post-sevrage comme activateur de croissance et pour réduire l'incidence des diarrhées. Cependant, un apport élevé de ZnO dans l'alimentation porte à l'accumulation de Zn dans l'environnement (Buff *et al.*, 2005) et des processus de résistance bactérienne aux antibiotiques (Vahjen *et al.*, 2015). Dans ce contexte, la Commission Européenne a décidé d'interdire l'utilisation de doses pharmacologiques de ZnO à partir de juin 2022. Les acides organiques ont de multiples effets bénéfiques sur les performances de croissance des porcs, en réduisant ou en éliminant les bactéries pathogènes habituellement sensibles à un pH bas (Yousaf *et al.*, 2016), bien que le facteur limitant de l'effet antibactérien des acides organiques soit la nécessité d'être libérés dans l'intestin. La technologie de protection dans une matrice de lipides hydrogénés, est utilisée pour augmenter la stabilité et contrôler la libération de composés actifs dans l'intestin des animaux (Bosi *et al.*, 2007). L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet d'un acide benzoïque protégé (ABP) sur le profil microbien fécal des porcelets en remplacement du ZnO à dose pharmacologique.

1. MATERIEL ET METHODES

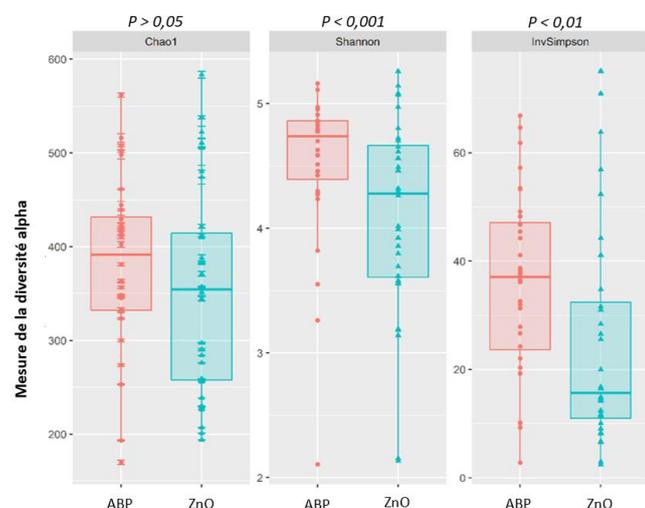
L'étude a été précédemment présentée par Barea *et al.* (2020) en ce qui concerne les résultats de performance et de santé de porcelets. Brièvement, environ 2 610 porcelets, appartenant à 4 élevages commerciaux ont reçu des régimes contenant du ABP (PROVENIA™, Novus International Inc., St Charles, États-Unis) ou du ZnO (dosés chacun à 2,5 kg/tonne) dans l'aliment "initiateur lacté" (de 7 jours de vie à 3-7 jours après le sevrage, soit à 28 jours d'âge) et dans l'aliment 1er âge (de 28 à 42 jours d'âge). Les aliments étaient à niveau nutritionnel équivalent et aucun antibiotique n'a été ajouté. Les porcelets ont été répartis dans les blocs en fonction du poids vif et du sexe. A la fin de l'essai, un total de 64 échantillons fécaux (16 blocs/élevage, 8 par traitement) a été collecté pour l'analyse phylogénique du profil microbien basée sur méthodes métagénomiques. Les matières fécales fraîches ont été immédiatement collectées dans un tube stérile et immédiatement surgelées et conservées à -80°C jusqu'à l'analyse. L'ADN bactérien a été isolé et extrait avec un kit (MP Biomedicals, Santa Ana, États-Unis) en suivant les instructions du fabricant. Après vérification de la concentration et de la pureté de l'ADN par spectrophotométrie (Fisher Scientific, 13 Schwerte, Allemagne), les régions V3-V4 du gène de l'ARNr 16S (460 pb) ont été amplifiées selon la méthode de

Takahashi *et al.* (2014) et séquencées à l'aide de la plateforme Illumina MiSeq 300x2 pb (Illumina Inc., San Diego, États-Unis). Pour tester les différences entre les groupes selon la diversité alpha et l'abondance différentielle des unités taxonomiques, un modèle ANOVA multifactoriel (MANOVA) a été adapté, en tenant compte de la profondeur de séquençage, du traitement, de l'élevage et leur interaction en tant que facteurs. Pour la diversité alpha, les indices de Chao1, Shannon et InvSimpson ont été calculés. Les différences de composition taxonomique ont été testées à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Les valeurs P ont été ajustées à l'aide de la méthode du taux de fausses découvertes ou False Discovery Rate (FDR). Une probabilité de P ou FDR < 0,05 est considérée comme statistiquement significative.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats pour la diversité alpha sont présentés dans la Figure 1. Par rapport au ZnO, le traitement ABP a montré une diversité microbienne plus élevée ; cette différence était statistiquement significative pour les indices de Shannon et de Simpson mais pas pour l'indice Chao1. Une plus grande diversité est considérée comme le marqueur d'un microbiote plus équilibré, plus résilient et plus mature (Yang *et al.*, 2017).

Figure 1 – Diagramme en boîte de la diversité alpha selon les indices Chao1, Shannon et InvSimpson par traitement nutritionnel : oxyde du zinc (ZnO) ou acide benzoïque protégé (ABP)



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barea R., Castillo M., Morales J., Palomo-Yagüe A., 2020. Complément nutritionnel protégé comprenant de l'acide benzoïque : une alternative potentielle à l'oxyde de zinc dans l'alimentation des porcelets au sevrage. Journées Rech. Porcine, 52, 170–171.
- Bosi P., Sarli G., Casini L., De Filippi S., Trevisi P., Mazzoni M., Meriardi G., 2007. The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in Escherichia coli K88-challenged weanling pigs. Anim. Feed Sci. Technol., 139, 170–185.
- Buff C.E., Bollinger D.W., Eilersieck M.R., Brommelsiek W.A., Veum T.L., 2005. Comparison of growth performance and zinc absorption, retention, and excretion in weanling pigs fed diets supplemented with zinc-polysaccharide or zinc oxide. J. Anim. Sci., 83, 2380–2386.
- Flint H.J., Bayer E.A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A., 2008. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. Nat. Rev. Microbiol., 6, 121–131.
- Takahashi S., Tomita J., Nishioka K., Hisada T., Nishijima M., 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of bacteria and archaea using next-generation sequencing. PLoS One 9, e105592.
- Vahjen W., Pietruszynska D., Starke I.C., Zentek J., 2015. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. Gut Pathog., 7, 23–27.
- Yang H., Huang X., Fang S., He M., Zhao Y., Wu Z., Yang M., Zhang Z., Chen C., Huang L., 2017. Unraveling the fecal microbiota and metagenomic functional capacity associated with feed efficiency in pigs. Front. Microbiol., 8, 1555.
- Yousaf M., Goodarzi B., Vahjen W., Männer K., Hafeez A., Ur-Rehman H., Keller S., Peris S., Zentek J., 2016. Encapsulated benzoic acid supplementation in broiler diets influences gut bacterial composition and activity. Br. Poult. Sci., 58, 122-131.

Selon la composition taxonomique du microbiote fécal, les genres *Ruminococcus*, *Solobacterium*, *Selenomonas*, *Fusicatenibacter*, *Oribacterium*, *Marvinbryantia*, *Catenisphaera* and *Fibrobacter* étaient plus élevés (FDR < 0,05) dans le groupe ABP par rapport au ZnO (Tableau 1).

Tableau 1 – Abondance relative (%) des fèces des porcelets ayant reçu un aliment supplémenté avec de l'oxyde du zinc (ZnO) ou de l'acide benzoïque protégé (ABP)

Taxa	ZnO	ABP	FDR ¹
<i>Ruminococcus</i>	2,04	4,34	0,02
<i>Solobacterium</i>	0,10	0,32	0,04
<i>Selenomonas</i>	0,15	0,44	0,01
<i>Fusicatenibacter</i>	0,02	0,07	0,01
<i>Oribacterium</i>	0,01	0,07	0,01
<i>Marvinbryantia</i>	0,01	0,05	0,04
<i>Catenisphaera</i>	0,02	0,06	0,03
<i>Fibrobacter</i>	0,01	0,05	0,04

¹FDR : False Discovery Rate ou taux de fausses découvertes.

Une abondance accrue de *Fibrobacter* et de *Ruminococcus* a été positivement associée à l'efficacité alimentaire et à de meilleures performances de croissance, ainsi qu'à une amélioration de la fermentation des polysaccharides alimentaires et de la production d'acides gras à chaîne courte, qui sont connus pour exercer une action bénéfique pour l'hôte (Flint *et al.*, 2008, Yang *et al.*, 2017).

CONCLUSION

La supplémentation en acide benzoïque protégé pourrait influencer positivement le profil microbien des porcelets sevrés par rapport à une dose pharmacologique de ZnO en augmentant la diversité alpha, considérée comme un marqueur d'un microbiote plus équilibré, plus résilient et plus mature. De plus, la supplémentation en ABP a favorisé la prolifération de taxons bactériens comme *Ruminococcus* et *Fibrobacter*, impliqués dans l'utilisation des fibres et l'efficacité alimentaire. Cette découverte associée à l'amélioration observée des performances de croissance et à la réduction de l'incidence de la diarrhée (Barea *et al.*, 2020) fournit un excellent outil nutritionnel pour le remplacement du ZnO.